

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“DETERMINACIÓN DE LH EN PERRAS CON DOS
PRUEBAS INMUNOCROMATOGRÁFICAS”**

POR

CANDELARIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ.

TESIS

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.

DICIEMBRE DE 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



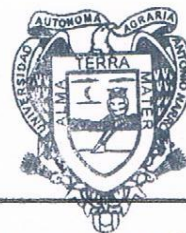
“DETERMINACIÓN DE LH EN PERRAS CON DOS
PRUEBAS INMUNOCROMATOGRÁFICAS”

POR

CANDELARIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

M.V.Z. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ
ASESOR PRINCIPAL

M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.

DICIEMBRE DE 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



TESIS QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO
EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

M.V.Z. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

PRESIDENTE

M.V.Z. SILVESTRE MORENO ÁVALOS
VOCAL

M.C. JUAN LUIS MORALES CRUZ
VOCAL

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

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.

DICIEMBRE DE 2014

AGRADECIMIENTOS.

A DIOS, por el milagro de la vida, por darme la oportunidad de existir y la fuerza y la capacidad de luchar día a día hasta lograr llegar a donde estoy, además haberme permitido conocer siempre a las mejores personas, las cuales siempre me ayudaron y me impulsaron a seguir adelante.

A mis padres, hermanos, y amigos quienes siempre me apoyaron incondicionalmente para que pudiera llegar hasta donde estoy, además de brindarme sus consejos y confianza en la capacidad de lograr mis objetivos.

A mis cuatro sinodales M.V.Z. Carlos Raúl Rascón, M.V.Z. Silvestre Moreno, M.C. Juan Luis Morales y M.C.V. Ramón A Delgado por todo su apoyo, conocimientos, consejos, y ayuda brindada para sacar este proyecto adelante, y de una manera muy especial a los Médicos Silvestre Moreno y Carlos Rascón por ofrecerme además su invaluable amistad.

A mi ALMA TERRA MATER UAAAN UL. Por todo lo aprendido y la oportunidad de desarrollarme como profesionista.

A todos mis maestros, por compartir sus conocimientos, por los consejos, y los regaños, lo cual forma parte de mi vida y me formo en tan hermosa profesión.

A todos gracias.

DEDICATORIAS

A Dios por darme la energía y fuerzas necesarias para lograr llegar al final de mi carrera y completar este proyecto.

A mis padres:

Candelario González Gurrola y Sanjuana Rodríguez castro.

Por su ejemplo de lucha y esfuerzo, por el simple y maravilloso hecho de ser mis padres y haberme regalado la vida, y por su apoyo en todo momento en la realización de mis estudios, las palabras de aliento, y la invitación a hacer siempre el bien.

A mis hermanos: Juan José y J. Guadalupe, por su apoyo incondicional, por los pequeños y grandes detalles que me han ayudado día a día para terminar mi carrera.

A mis hermanos que han nacido en otra familia, mis amigos: Adrian García Gómez, Luis Daniel Esquivel Maldonado, Felipe de Jesús Treviño Rodríguez y Sagrario de la Cruz Landeros; gracias por su compañía, sus consejos y apoyo para poder lograr mis ideales. Gracias por enseñarme a nunca dejar de realizar mis metas y luchar hasta el final por alcanzarlas y por el apoyo y compañía que me brindas en el pasar de mi vida, así como el saber que nunca estaré solo en mí camino.

ÍNDICE.

I. INTRODUCCIÓN.	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.	2
2. 1. Anatomía reproductiva de la perra.	2
2.2. Endocrinología reproductiva.	3
2.3. Ciclo ovárico.	7
2.4. Fases del ciclo ovárico.	9
2.5. Métodos para el diagnóstico de celo.	12
2.6. Clasificación de las células vaginales.	14
2.7. Pruebas hormonales.	17
III. JUSTIFICACIÓN.	20
IV. OBJETIVOS.	20
4.1. Objetivo general.	20
4.2. Objetivos específicos.	21
V. HIPÓTESIS.	21
5.1. Hipótesis alterna.	21
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.	21
6.1. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO.	21
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	24
VIII. CONCLUSIÓN.	29
IX. LITERATURA CITADA.	30
X. ANEXOS.	35
10.1. Anexo 1. Procedimientos en la toma de muestras y estudio experimental.	35
10.2. Anexo 2. Materiales utilizados.	40

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Órganos reproductivos de la hembra canina.	2
Figura 2. Comportamiento hormonal y células vaginales superficiales.	10
Figura 3. Relación estrógenos células vaginales.	14
Figura 4. Células parabasales.	15
Figura 5. Células intermedias y abundantes eritrocitos.	15
Figura 6. Células superficiales y anucleadas.	16
Figura 7. Células anucleadas.	17
Figura 8. Perra con alta receptividad durante estro.	35
Figura 9. Toma de muestra para citología vaginal.	35
Figura 10. Procedimiento de la citología vaginal exfoliativa.	36
Figura 11. Células intermedias y eritrocitos.	37
Figura 12. Células superficiales.	37
Figura 13. Células superficiales y escamosas (10X).	38
Figura 14. Células queratinizadas.	38
Figura 15. Células anucleadas principalmente.	39
Figura 16. Centrifugación de muestra sanguínea.	39

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Relación entre el número de pruebas citológicas, pruebas en suero y en orina para la detección de LH.	25
Cuadro 2. Detección del pico de LH en suero y en orina de perras.	26

RESUMEN

Con base en meras especulaciones dentro del campo clínico, con respecto a la funcionalidad de pruebas hormonales de ELISA de uso humano; se realiza el presente trabajo para determinar su funcionalidad o disfuncionalidad con base científica; para ello se muestrearon 10 perras con signos de proestro-estro, a las cuales se les practico citología vaginal para determinar el momento óptimo de muestreo sérico y de orina para detectar LH, una vez que la citología mostro células escamosas se procedió a identificar el pico de LH en suero sanguíneo, obteniendo los siguientes resultados el 40% de las perras mostro el pico de LH en suero en la primera prueba, el 30% mostro el pico de LH en la segunda prueba y el 30% restante no mostro pico de LH al no seguir el muestreo correspondiente; de éste 30% el 20% solo se muestreó una vez sin mostrar pico de LH, y 10% (un individuo) se muestreó 2 veces sin mostrar pico, excluyendo el 30% que no continuo con el experimento, al resto de los individuos (70%) una vez que mostraron el pico preovulatorio de LH en suero se procedió a tomar muestra de orina para realizar la prueba de uso humano y detectar LH en orina, los resultados fueron completamente negativos, por tanto las pruebas comerciales ELISA para determinar LH en orina de humano, tiene una funcionalidad nula para detectar el pico de LH en orina de perra.

Palabras clave: Estrógenos, LH, pruebas inmunocromatográficas, estro, perras.

I. INTRODUCCIÓN

Al igual que en otras especies la importancia de la reproducción en caninos radica en el éxito de la concepción, para ello es imprescindible conocer los parámetros reproductivos caninos, además de los mejores y más actuales métodos para detectar la ovulación.

Existen numerosos métodos para detectar la ovulación, entre ellos, la citología vaginal, la cual basa su funcionalidad en la respuesta a los estrógenos los cuales producen engrosamiento y descamación de la pared vaginal y cambios específicos en la morfología de las células vaginales de acuerdo a la etapa del ciclo estral; la vaginoscopía, que se basa en el mismo principio de la citología vaginal al observar cambios morfológicos en respuesta a las hormonas; el ultrasonido, con el que se monitorea la imagen del ovario y su ciclo folicular hasta la liberación de los óvulos, lo cual es detectable por ultrasonido; pruebas hormonales, que detectan gonadotropina coriónica, progesterona y hormona luteinizante, como la prueba inmunoenzimática ligada a enzimas, con diferentes variables para su uso en la clínica, entre ellos la inmunocromatografía o prueba de inmuno-migración rápida.

Estos paquetes de diagnóstico han tomado una gran importancia tanto en clínica como entre los grandes criadores y expositores de perros, a pesar de su alto costo. Podría ser este factor costo-beneficio lo que ha dado lugar a especulaciones en dichas áreas, acerca de paquetes comerciales específicos de otras especies (humanos) y su funcionalidad en perros; lo que reduce considerablemente los costos en un supuesto “manejo reproductivo” obviamente sin ninguna base científica. Con base en esto se realiza una breve revisión y experimento de dichos mecanismos que permitirá conocer el momento óptimo de ovulación, y por lo tanto, el correcto manejo reproductivo de las hembras caninas en la fase reproductiva de estro utilizando una prueba de detección de LH de uso humano y una prueba de uso canino.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Anatomía reproductiva de la perra

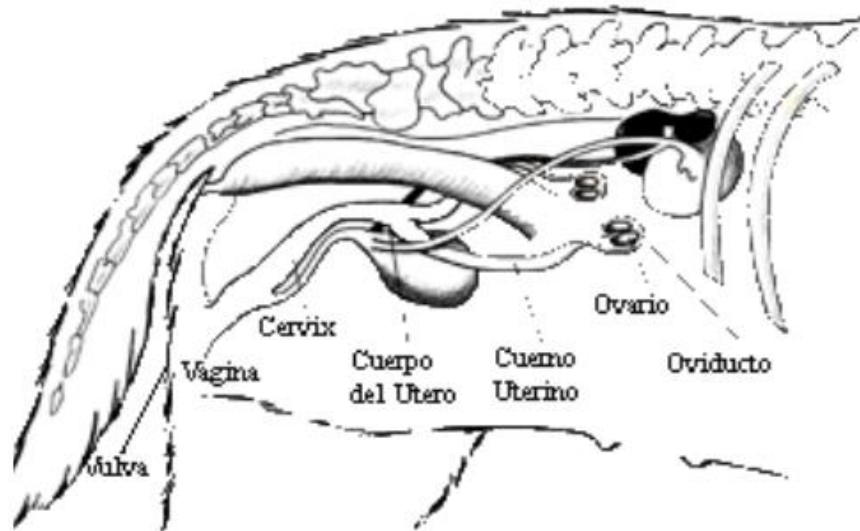


Figura 1. Órganos reproductivos de la hembra canina (FCM, 2011).

Ovarios. Son órganos pares, se localizan en posición caudal a los riñones, están cubiertos por la bolsa ovárica formada a partir del peritoneo; la irrigación sanguínea corre a cargo de los vasos ováricos y uterinos (Boother, 2014).

Trompas uterinas (oviductos). Anatómicamente, el oviducto está compuesto de cuatro segmentos (infundíbulo, ampolla, istmo, y unión útero-tubárica). Histológicamente está constituido de la siguiente manera, puede ser dividido en tres capas, la membrana luminal mucosa, las capas musculares lisas, y la serosa. El oviducto es de gran importancia en la reproducción, proporciona un medio ambiente adecuado para recoger los ovocitos y su maduración, captación transporte y almacenamiento de esperma, además de fertilización y desarrollo embrionario temprano (Urhausen *et al.*, 2011). Además en el oviducto se produce superóxido dismutasa en la etapa de celo el cual es capaz de mantener o mejorar la calidad del esperma o la fertilidad masculina a través de la protección contra el estrés oxidativo (Kobayashi *et al.*, 2014).

Útero. Consta de cuello (cérvix), cuerpo y dos cuernos. Su tamaño varía según la edad, raza, talla del animal y la fase del ciclo estral (Boother, 2014).

Cérvix. El cuello del útero se compone principalmente de tejido conectivo y músculo liso, apoyado por la matriz extracelular. El cuello uterino tiene un papel crucial durante el ciclo reproductivo, la consistencia del cuello uterino varía en función de las etapas del ciclo estral. Se dilata durante la etapa de estro y cierra durante anestro y diestro (Linharattanaruksa *et al.*, 2014).

Vagina. La vagina es una estructura tubular que comunica el útero con el vestíbulo de la vulva. Las dimensiones en la hembra canina son variables dependiendo de la talla del animal. Su pared presenta cuatro capas que desde adentro hacia fuera se denominan: Mucosa, Submucosa, Muscular, Adventicia (Stornelli *et al.*, 2006).

Vestíbulo. Se encuentra entre la vagina y la vulva, la unión (tubérculo) uretral se halla sobre el suelo ventral del vestíbulo.

Vulva. Ocupa una posición caudal en relación con el vestíbulo, está formada por los labios, las comisuras de los labios y la abertura vulvar entre los labios (Boother, 2014).

2.2. Endocrinología reproductiva

Las estructuras involucradas en la endocrinología de los mamíferos son el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas, las cuales están encargadas de la secreción de las hormonas involucradas en la reproducción (Feldman y Nelson, 2000).

GnRH. En la perra, la progresión desde la primera parte a finales del anestro, tiene mayor amplitud y número de pulsos de GnRH. Estos eventos pueden ser desencadenadas por las feromonas y / o por los ritmos naturales en actividad hipotalámica, sólo después de la disminución suficiente de las acciones endocrinas de la progesterona producida en la fase lútea del ciclo ovárico anterior (Concannon, 2005). La GnRH y la Liberación de LH son también dependientes del calcio. La unión a receptores de GnRH en la glándula pituitaria produce un aumento rápido y temporal en iones de calcio intracelular, lo que resulta en la secreción de LH. La naloxona también modula la entrada de calcio a través de los canales de tipo L de calcio (Kutzler, 2012).

LH y FSH. La hormona luteinizante (LH) es una glicoproteína de la familia de hormonas pituitarias, de igual forma que la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH); además de ser leutotrófica (Kowalewski *et al.*, 2013). Siendo estas heterodímeros compuestos por 2 subunidades no covalentes enlazados, α y β . La subunidad α es idéntica entre especies con una secuencia de aminoácidos, mientras que la subunidad β es única y da a la hormona especificidad biológica e inmunológica. La LH es secretada por la glándula pituitaria de una manera pulsátil en respuesta a la hormona (GnRH) liberada por el hipotálamo (Borromeo *et al.*, 2014).

La expresión de receptores de LH es inducida por la FSH en las células de la granulosa del ovario. La LH es progresivamente capaz de reemplazar a la FSH en el apoyo de la maduración folicular; De hecho, dosis suprafisiológicas de LH solo se administran a perras en anestro, de esta manera se induce el crecimiento folicular y por tanto el proestro (Kutzler, 2012). Debido a que la LH se secreta en pulsos discretos, las mediciones informativas de esta son siempre difíciles de realizar (Andersson *et al.*, 2013).

El aumento de la LH junto con FSH actúa para estimular una oleada de folículos (Concannon, 2005). Durante este periodo LH induce una marcada dilatación de las arterias y arteriolas presentes en la pared de la proliferación folicular, dicha dilatación está mediada por sustancias vasoactivas tales como eicosanoides, quininas y prostaglandinas. Los recién formados capilares son vasos sinusoidales sin musculatura lisa que apenas impiden la perfusión vascular (Köster *et al.*, 2001). Este puede ser el momento de la frecuencia de transición abrupta de proestro al estro de comportamiento reproductivo en muchas perras, aunque el cambio de comportamiento puede ocurrir 1-3 días antes, o 1-4 días más tarde y puede que no sea brusco. La media en el comportamiento de inicio del estro, es de 1 día después del pico de LH (Concannon, 2005).

Se cree que las secreciones de LH están regulados por al menos dos formas de mecanismos de retroalimentación; un bucle largo mediado por el control de señales hormonales desde glándulas, y un bucle corto o mecanismo de retroalimentación interna mediada por hormonas pituitarias, lo que sugiere que la GnRH presente en el hipotálamo tiene un papel en la regulación de la liberación de LH pituitaria (Ziecik *et al.*, 1987).

La LH y FSH pueden ser bloqueadas por la acción de agonistas de GnRH con distintos fines entre ellos el aplazamiento de la pubertad en animales jóvenes y la anticoncepción en animales adultos (Romagnoli, 2012).

Estudios en bovinos demostraron que la aplicación de líquido folicular suprime las concentraciones de FSH en plasma sin alterar las concentraciones de LH en plasma, por acción de la glicoproteína inhibina que dicho líquido contiene (Adams *et al.*, 1992).

La prolactina. La prolactina (PRL) es una hormona peptídica con diversas funciones endocrinas, incluyendo la regulación del ciclo reproductor femenino. En

los roedores, PRL sostiene la secreción de progesterona (P4) y apoya la luteolisis (Andersson *et al.*, 2013), la prolactina parece jugar un papel de intervalos interestro en canino, posiblemente al afectar la secreción de gonadotropinas y / o la capacidad de respuesta ovárica a las gonadotropinas (Kutzler, 2012) al igual que la LH es leutotrófica (Kowalewski *et al.*, 2013).

Estrógenos (E2) y progesterona (P4). Al medir estas hormonas en el ciclo de las hembras, deben medirse siempre que sea posible ambas hormonas. Fisiológicamente, estas dos hormonas pueden tener efectos. Por ejemplo, P4 inhibe los efectos de E2 en el endometrio y regula a la baja los receptores de estrógeno en algunos tejidos. Como estas dos hormonas cambian dramáticamente en todo el ciclo ovárico y en respuesta a factores hipotalámicos, se debe tener cuidado al medir estas hormonas para el control de fase del ciclo estral / menstrual y fuentes potenciales de estrés (Andersson *et al.*, 2013). Además la progesterona se caracteriza en las evaluaciones iniciales por su habilidad para aumentar el peso del útero actuando sinérgicamente con los estrógenos, por su habilidad para aumentar el tamaño de las glándulas endometriales y por estimular la actividad secretora del endometrio (Romagnoli y Concannon, 2003). La progesterona puede aumentar desde 24 hasta 48 horas antes de la ovulación por la luteinización de los folículos, característico de la especie canina (Bergeron *et al.*, 2013 y Concannon 2005).

La histología del epitelio oviductal canino ha demostrado variaciones en la morfología celular entre las etapas del ciclo en estrecha relación con las concentraciones en suero sanguíneo de estradiol-17 β y progesterona (Urhausen *et al.*, 2011), estos cambios también pueden apreciarse en el epitelio vaginal tanto en la perra como en otras especies (Ithurralde *et al.*, 2013), las células cúbicas bajas que se encuentran en anestro cambian bajo la influencia de los estrógenos a finales del proestro, entre estas diferencias se encuentra la hipertrofia celular. Los

altos niveles de progesterona indican la presencia de cuerpos lúteos activos además se relaciona con la atrofia de células secretoras y la pérdida de cilios (Urhausen *et al.*, 2011).

2.3. Ciclo ovárico

La perra es considerada la única especie animal doméstico monoéstrico que tienen largos ciclos de celo, además cada etapa conlleva un cambio lento y cierto grado de desvanecimiento entre las fases folicular y lútea, eso por la temprana luteinización de los folículos ováricos (Ithurralde *et al.*, 2013 y Kowalewski *et al.*, 2013). El ciclo ovárico en las hembras se evalúa normalmente por cambios característicos de la mucosa vaginal y del epitelio vaginal, además de análisis de parámetros endocrinos (Köster *et al.*, 2001). Lo que hace difícil determinar un momento óptimo para la monta es precisamente el largo ciclo y la variabilidad tanto racial e individuales dentro de la misma raza (Ithurralde *et al.*, 2013).

Las concentraciones séricas de FSH aumentan en gran parte de anestro canino mientras que las concentraciones de LH son bajas, excepto cerca del final del anestro. Un aumento en la concentración de FSH en plasma basal es crítico para la iniciación de la foliculogénesis en perros (Kutzler, 2012).

En la perra, la progresión desde principios a finales de anestro se caracteriza por una mayor amplitud y mayor número de pulsos de la hormona (GnRH) liberadora de gonadotropina del hipotálamo, un aumento en la sensibilidad de la GnRH pituitaria, y un aumento en la capacidad de respuesta ovárica a la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo-estimulante (FSH) (Kutzler, 2012). A lo largo de la mayor parte de los 5 a 20 o más días de proestro hay un aumento progresivo de estradiol circulante de una oleada de rápido desarrollo de los folículos ováricos (Concannon, 2005).

El rápido aumento en el flujo de sangre por acción indirecta de LH aumenta el suministro de nutrientes y oxígeno al folículo preovulatorio; estos nutrientes son esenciales para el proceso ovulatorio y la aparición de la producción de progesterona (Köster *et al.*, 2001).

En las perras, la ovulación se produce dos días después del pico de LH y una media de dos días después de la inicio del estro (Tsutsui *et al.*, 2012). El estradiol sigue disminuyendo a lo largo de los 6 a 11 días de estro endocrinológico mientras que la progesterona tiende a elevarse (Bergeron *et al.*, 2013). Se consideran valores ovulatorios cuando los niveles de progesterona sérica alcanzan entre 4-10 ng/ml (Lucas, 2011); la progesterona aumenta casi imperceptiblemente durante mediados del proestro de menos de 0,2 ng / ml superior entre 0,3 y 0,6 ng / ml, y luego finales proestro durante el inicio del pico de LH aumenta rápidamente del valor de 0,3-0,6 a valores de 0,9 a 3,0 ng / ml durante las primeras 12-24 h del pico de LH; entre el pico de LH (día 0), la progesterona es variable, pero típicamente aumenta sus a valores entre 2 y 5 ng / ml; por el día 4, y dos días después la ovulación, la progesterona es 3-8 ng / ml, y por el día 6 después de la oleada de LH está típicamente entre 6 y 12 ng / ml.(Figura 2) (Concannon 2005). Por ello se ha establecido como día fijo a partir del cual se debe cronometrar los sucesos normales del ciclo estral el día del pico de LH (Día 0) (Lucas, 2011). Aproximadamente dos días después del pico de LH se produce la ovulación (Tsutsui *et al.*, 2012) siendo necesarias aún 48 h más para que los ovocitos sean capaces de ser fecundados por los espermatozoides (Lucas, 2011).

La supresión del ciclo puede ser causado por cualquiera de una central (hipotalámica o pituitaria) la supresión de las gonadotropinas, en cuyo caso LH, FSH, E2 y P4 debe ser baja, o una supresión directa de la esteroidogénesis ovárica, en cuyo caso E2 y P4 debe disminuirse y LH y FSH debe aumentar en un intento de compensar (Andersson *et al.*, 2013). El momento en que el número de folículos para ovular se establece en perros, no se conoce (Tsutsui *et al.*, 2012).

Es importante mencionar que los cambios histológicos similares a la involución en endometrio de la perra no se completan hasta 135 días después del último estro, independientemente de si la perra estaba preñada o no (Kutzler, 2012).

2.4. Fases del ciclo ovárico

Proestro. El comienzo del proestro se define como el momento en que la perra inicia el sangrado vaginal a través de la vulva, además de ser considerado como el inicio de un nuevo ciclo reproductivo. Los signos de proestro no son detectables en todas las perras, especialmente en aquellas razas de pelo largo o en aquellas que se lamen frecuentemente su zona genital. El proestro tiene una duración promedio de 9 días, con un rango de 6 a 21 (Mansilla, 2008). Estos cambios son inducidos por la actividad gonadotrópica y posteriormente actividad estrogénica; en esta etapa también hay liberación de feromonas lo que hace atractiva a la perra hacia el macho. El primer día de sangrado es considerado como el inicio del proestro y termina cuando la perra acepta la monta del macho, entonces se considera iniciado el estro (Peirano, 2008). La duración del proestro es muy variable, de 6 a 11 días, con un promedio de 9 días (Caffaratti *et al.*, 2013). En esta etapa se presentan folículos antrales ováricos moderadamente grandes con líquido folicular normalmente presentes en ambos ovarios. Estos folículos están revestidos por varias capas de células de la granulosa. Generalmente se encuentran células que contienen pigmentos vacuolados del ciclo anterior. El estroma endometrial es claro y edematoso. Hay proliferación de glándulas endometriales superficiales y profundas. El miometrio es más grueso en comparación con la observada en anestro, con células de músculo liso y eosinófilos hipertrofiados, y la mucosa vaginal está revestido de cinco a siete capas de epitelio escamoso (Chandra y Adler, 2008).

Estro. El estro o celo, comienza el primer día en que la hembra acepta la monta y cópula y termina cuando deja de aceptar al macho. La duración de este período es

de 9 días en promedio, con un rango que va de 4 a 21 días (Mansilla, 2008). A medida que el estro progresa, el edema vulvar se vuelve menos notorio, y el sangrado más acuoso, de color rojizo o amarillento (Peirano, 2008). El evento central del estro es la ovulación la cual ocurre entre 48, 60 y 72 h una vez iniciado, los óvulos son expulsados del ovario como ovocito primario y no son capaces de ser fertilizados hasta alrededor de 60 h después de la ovulación cuando sucede la división meiótica a 60 h después de la ovulación. El período durante el cual los espermatozoides permanecen capaces de fertilización en el tracto reproductor femenino se piensa que es cerca de 5 días. El periodo de apareamiento, durante el cual la concepción es posible por lo tanto cerca de 7 días a partir del inicio del estro (Tsutsui, 1989).

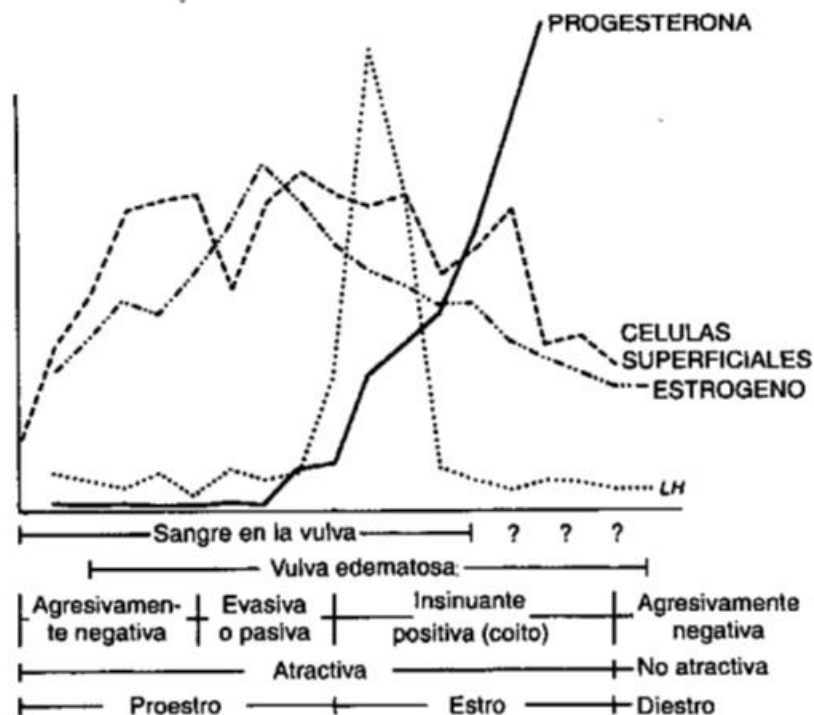


Figura 2. Comportamiento hormonal y células vaginales superficiales durante las etapas de proestro, estro e inicio del diestro (Feldman y Nelson 2000).

Al seccionar histológicamente el ovario se puede observar que son más grandes que en el anestro y de apariencia quística a simple vista. Microscópicamente, durante el estro temprano, cada ovario puede tener dos o tres grandes folículos terciarios revestidos por capas estratificadas de células de la granulosa alargadas que sobresalen en el espacio antral. En la perra, la luteinización de las células de la granulosa precede a la ovulación, y el principio de formación del cuerpo lúteo se observó a finales del estro. En la fase tardía del estro después de la ovulación, los folículos están revestidos por capas gruesas de células redondeadas (Chandra y Adler, 2008), observándose también un aumento característico del flujo sanguíneo durante la ovulación y la fase lútea temprana (Köster *et al.*, 2001). En este periodo se da el pico de hormona luteinizante (LH secretada en la hipófisis) que induce la ovulación de 48 a 72 horas después de la secreción del pico de LH. El pico de LH coincide con la disminución de estrógenos y el aumento de progesterona en sangre. (FCM, 2011).

Diestro. Comienza en promedio ocho días después del pico de LH. Durante esta etapa el cuerpo lúteo secreta progesterona, ésta continúa elevada por encima de los niveles basales, alcanzando las más altas concentraciones 20-30 días post ovulación, luego declina lentamente durante un lapso de 10-20 días. El útero mantiene la hipertrofia de su estructura glandular y la hipervascularización en respuesta a los altos niveles de progesterona en sangre, alcanzando su mayor tamaño, en las hembras no gestantes, el día 20 o 30 del diestro (Stornelli *et al.*, 2006). La vulva retorna al tamaño normal y pierde la flacidez (Mansilla, 2008).

En hembras gestantes la culminación de esta etapa se da con el parto. En hembras no gestantes el cuerpo lúteo sufrirá una apoptosis, destruyéndose y dejando de producir progesterona, además en esta etapa en hembras no gestantes, se puede presentar la pseudogestación (no patológica) y piometra (FCM, 2011).

Las secciones histológicas de los ovarios son más grandes que los observados en anestro, podemos observar el cuerpo lúteo a simple vista. Al iniciar esta etapa cada ovario tiene un máximo de dos grandes cuerpos lúteos con células lúteas estrechamente empaquetados. En la última fase de diestro, las células lúteas han enriquecido de citoplasma vacuolado. Una característica notable del útero en esta fase es el miometrio de espesor compuesto de células del músculo liso hipertrofiados (Chandra y Adler, 2008).

Anestro. El anestro se ha definido como un período de inactividad ovario – hipófisis; sin embargo decir o definir el anestro como completa inactividad también es un error ya que a finales de este los ovarios están muy sensibles a estimulación endógena de gonadotropinas justo antes de comenzar el ciclo posterior (Peirano, 2008). Es muy difícil detectar el inicio del anestro en perras que no quedaron preñadas ya que no existe un cambio perceptible entre la finalización del diestro e inicio del anestro. En cambio en las perras gestantes es evidente que el parto marca el cambio entre gestación y el inicio del anestro. Durante esta etapa ocurre la involución uterina después del parto o la preparación de para el siguiente ciclo ovárico (Lacroix, 2012), la duración de esta etapa es muy variables según sus características genéticas, edad, estado sanitario y otros factores, con un aproximado de 120 días (Mansilla, 2008).

2.5. Métodos para diagnóstico de celo

Los métodos actuales para el seguimiento de eventos periovulatorios, como la vaginoscopía, la citología vaginal, señales de comportamiento, y ensayos hormonales en la sangre se utilizan con éxito, pero tienen limitaciones. Estos métodos pueden ser inexactos, invasores, retrospectivos, caros, y / o mal relacionada con las concentraciones de hormonas subyacentes. La identificación de la época de cría óptima depende del preciso monitoreo de la actividad ovárica durante el pico de LH y la ovulación (Bergeron *et al.*, 2013).

Citología vaginal. Es un método simple para el seguimiento de la fase del ciclo estral. Las células vaginales pueden recolectarse usando un hisopo estéril o un catéter plástico. Al utilizar el primer método no debe rozar el hisopo en el vestíbulo para evitar resultados poco confiables incluso erróneos. Una vez recogidas las células se colocan en un portaobjetos de vidrio girando el hisopo y procurando imprimir las células por rodamiento y no por frotación, o mediante la aplicación de las células aspiradas, las cuales se extienden dejando una capa delgada en la laminilla (De Buen, 2001).

Este es un método no invasivo de investigación, como un componente esencial de ginecología e investigación para determinar el ciclo, también con celo mudo o sospecha de los quistes en ovario. El frotis vaginal es usado a menudo en la práctica, para evaluar el estado de salud vaginal. Los criterios de evaluación incluyen la clasificación de las células según el tamaño y la forma, la relación núcleo-citoplasma y la disposición y la distribución porcentual de las células. Durante el proestro el estrógeno circulante empieza a aumentar de manera significativa, teniendo como efecto el engrosamiento de la pared vaginal, esto reduce el aporte de nutrientes y oxígeno a las capas celulares más externas, provocando su queratinización y deformación hasta la descamación típica de células amórficas (escamosas) durante la concentración más alta de estrógenos, justo antes del estro (figura 3) (Wehrend *et al.*, 2013). Las concentraciones de estrógenos durante el anestro son de 5 a 15 pg/ml, en el proestro temprano puede alcanzar una concentración de 25 pg/ml y justo antes del estro clínico, posiblemente entre 24 y 48 h antes alcanza su máxima concentración hasta 60-70 pg/ml (Feldman y Nelson, 2000).

Se ha determinado de mucha utilidad el análisis de la morfología de las células exfoliadas de la vagina, ya que se han utilizado para determinar el estado

fisiológico y patológico de la hembra de animal, así como una herramienta de bioensayo para hormonas en varias especies animales (Ola *et al.*, 2006).

2.6. Clasificaciones de las células vaginales

Parabasales. Características del proestro, son las células más enteras o claras del ciclo, tienen un núcleo vesiculado grande y muy poco citoplasma, su exfoliación es desde la capa de células germinales muy cerca del aporte sanguíneo (Figura 4) (Mansilla, 2008).

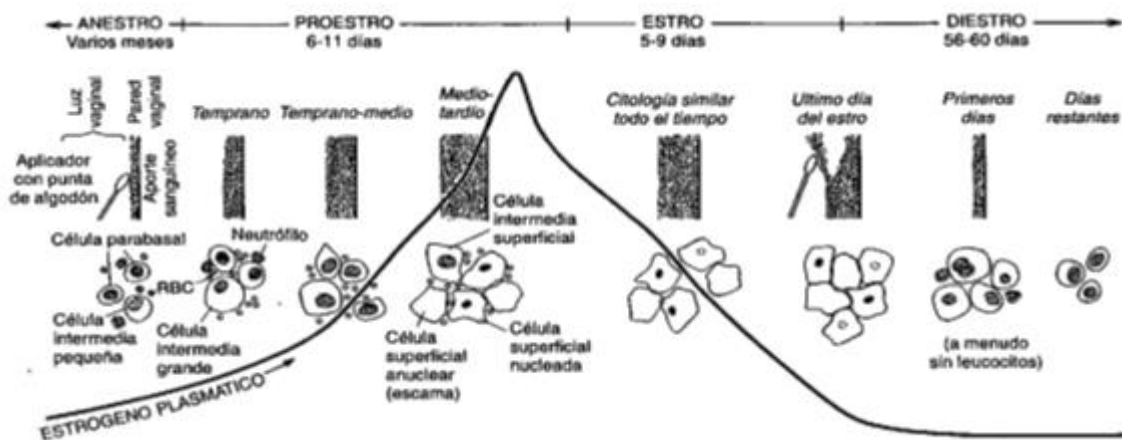


Figura 3. Relación estrógeno-células vaginales (Feldman y Nelson, 2000).

Intermedias. Son relativamente más grandes, empiezan a presentar bordes irregulares ovales o redondeados, mantienen el núcleo vesiculado aunque este es más pequeño que en las células parabasales, tienen más cantidad de citoplasma y para propósitos descriptivos se podrían clasificar en células intermedias pequeñas y grandes (Figura 5) (Wehrend *et al.*, 2013).

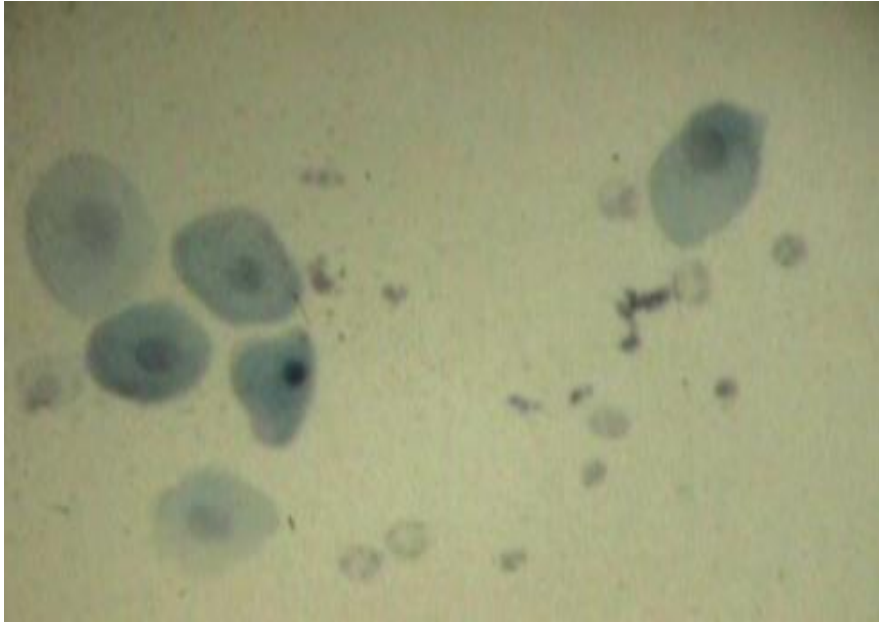


Figura 4. Células parabasales (Lacroix, 2012).

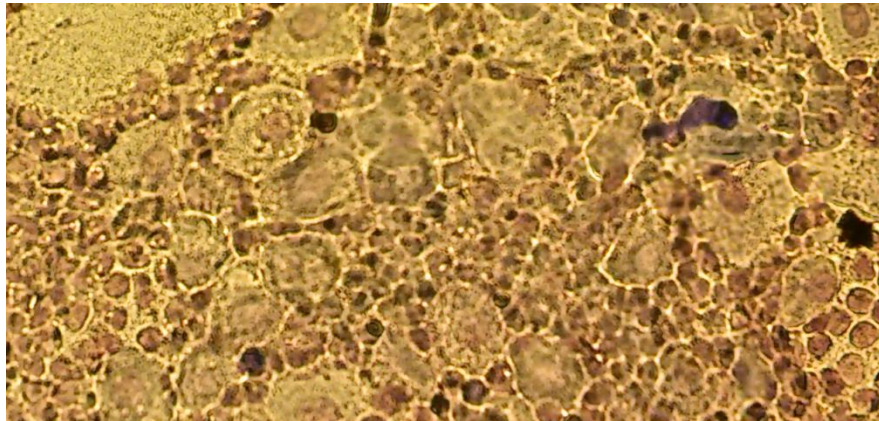


Figura 5. Células intermedias y abundantes eritrocitos (tinción de Wright).

Superficiales. Son células características del estro temprano pueden estar acompañadas de eritrocitos, tienen núcleos pequeños y picnóticos, estas células son características del final del proestro y del estro cuando los niveles de estrógenos están más elevados (Figura 6) (Mansilla, 2008).

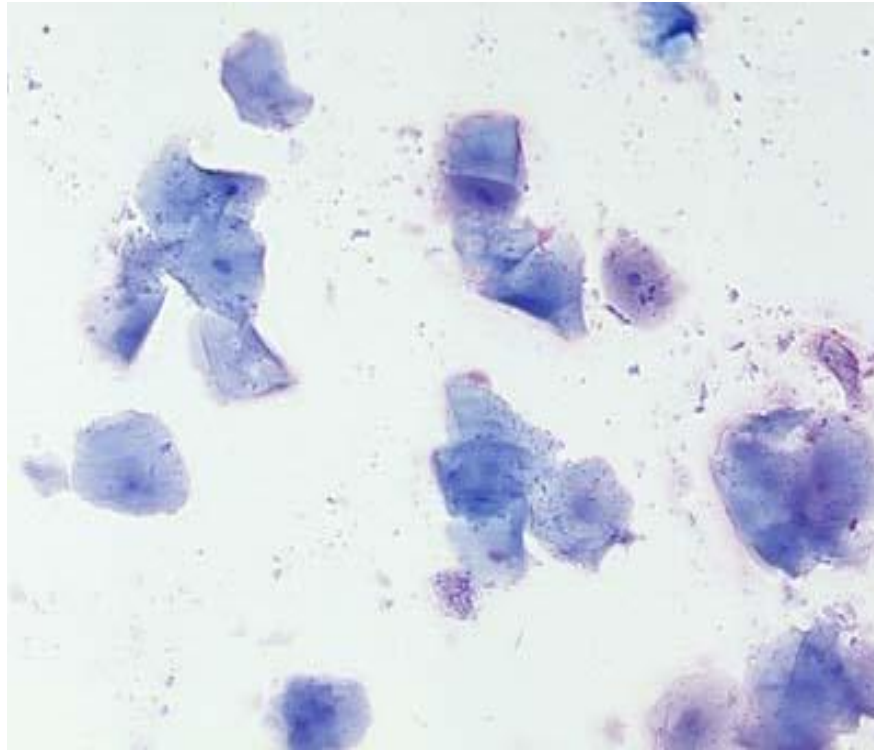


Figura 6. Células superficiales y anucleadas (FCM, 2011).

Anucleadas escamosas. Son células vaginales muertas, planas y completamente deformes (Stornelli *et al.*, 2006). La muerte celular se origina por el engrosamiento de la pared vaginal, este engrosamiento es debido a las altas concentraciones de estrógeno que se alcanzan durante el estro (Figura 7) (Ithurralde *et al.*, 2013).

Células del metaestro. Son células intermedias grandes con neutrófilos dentro del citoplasma; se encuentran normalmente en el metaestro (diestro temprano) y en perras con vaginitis (Wehrend *et al.*, 2013; Stornelli *et al.*, 2006).

La citología vaginal se usó no solo para determinar las fases del ciclo estral, también se ha usado para determinar la relación entre las fases del ciclo con el desarrollo de algunas levaduras vaginales (Clegg *et al.*, 2007), identificación de vaginitis (Feldman y Nelson, 2000), además de piometra (Silva-Molano y Loaiza-Echeverri, 2007) y tumor venéreo transmisible (TVT) (De Buen, 2001).

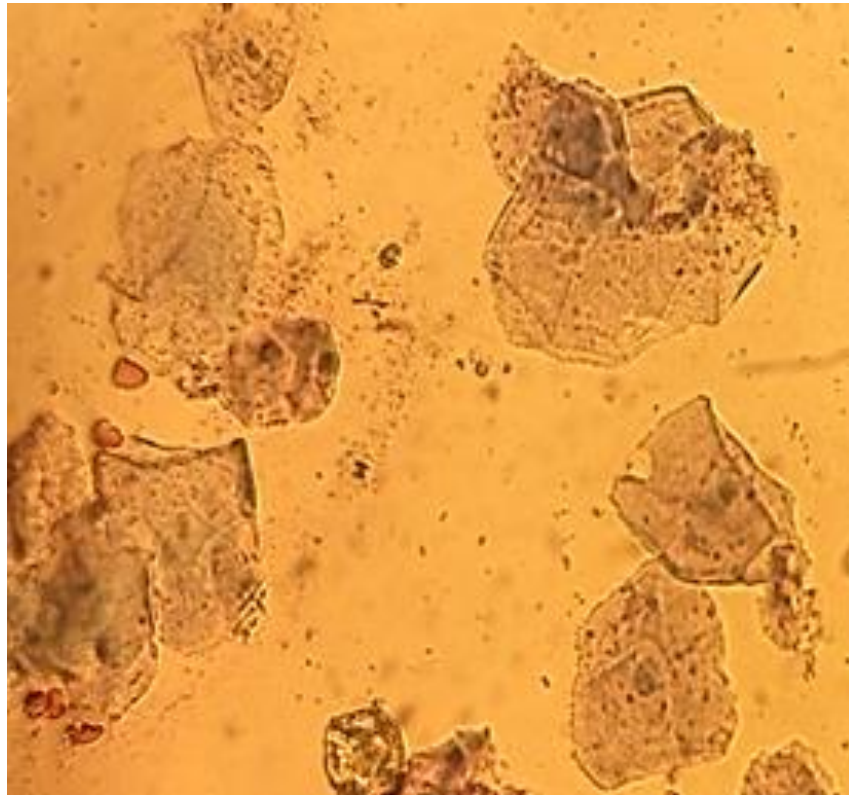


Figura 7. Células anucleadas principalmente, amontonadas por la queratinización; lado inferior derecho células superficiales aun con presencia del núcleo.

A pesar de que la citología vaginal exfoliativa es un método simple barato y muy práctico se debe tomar en cuenta que solo es un estudio complementario (Stornelli *et al.*, 2006; Burciaga, 2014), por tanto se deben evaluar otros parámetros para determinar el estado fisiológico o de salud del animal (Stornelli *et al.*, 2006).

2.7. Pruebas hormonales

El análisis de las hormonas reproductivas se complica por ciclos relativamente raros en celo (2-3 al año) y la variación en las hormonas ováricas durante las etapas del ciclo estral distinta de anestro. El período más estable para el análisis de hormonas reproductivas (E2, P4, PRL, FSH y LH) en la perra es durante el anestro (Andersson *et al.*, 2013), además de que las hormonas relacionadas con la reproducción son muy variables y dependen de factores tales como la edad, el

sexo, la raza, estacionalidad, lo que da un margen de error considerable en este tipo de pruebas rápidas (Lacroix, 2012).

Los métodos estándar para el análisis de la hormona del suero incluyen radioinmunoensayo (RIA), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), y de inmunoensayo múltiplex. Cromatografía líquida / espectrometría de masas (LC / MS) (Andersson *et al.*, 2013).

Cuando se trata de muestreo específico para determinar la hormona LH en orina ya sea con algún derivado de ELISA o RIA, es recomendable diluir la muestra en glicerol (7%) como crioprotector, esto ayudara a estabilizar la LH además de ofrecer tiempo de vida a la hormona en congelación a -20°C (Livesey *et al.*, 1983; Ziegler *et al.*, 1987; Brown *et al.*, 2010).

RIA. La parte fundamental es la hormona radioetiquetada llamada trazador, el cual se añade a un tubo con anticuerpo antihormonal diluido, para ello hay una porción del vínculo del trazador y una porción que permanece libre, entonces ay que separar el vínculo del trazador de la porción libre, la hormona desconocida o del paciente compite con la hormona radioetiquetada y se mide por tanto la radioactividad, si esta disminuye entonces la hormona desconocida está ocupando espacio en el anticuerpo antihormonal de las paredes del tubo; de esta manera podemos medir las concentraciones de dicha hormona en la muestra del paciente. (Kemppainen, 2013)

ELISA. Actualmente existen paquetes que permiten hacer el muestreo en el consultorio (Lacroix, 2012). En estas pruebas, las hormonas o sus anticuerpos se etiquetan por con una enzima detectable por un sustrato específico de enzima. Hay una amplia variedad de estas pruebas como lo son indirectos, competitivos directos, sándwich de anticuerpos, etc. Dependiendo si se trata de la hormona (antígeno) o del anticuerpo que se une, y cuál de las dos es etiquetado por la

enzima (Kemppainen, 2013). En este tipo de pruebas los resultados son muy variables por factores como edad raza y ciclos circadianos (horas del día) es por esto que se recomienda no basar el diagnóstico en una sola muestra ya que existe margen de error, por lo tanto, se requiere de varias muestras y así medir las fluctuaciones de la hormona desde un nivel basal (Lacroix, 2012). Así mismo estos paquetes podrían convalidarse de otras especies, por ejemplo, para determinar la hormona gastrina se han convalidado paquetes de uso humano con una buena funcionalidad en perros y gatos (Gabbert *et al.*, 1984).

Se han creado paquetes ELISA para determinar LH en bovinos, a partir de anticuerpos monoclonales (MAB) y LH anti-bovina (bLH) a partir de extracto de adenohipófisis, estos son capaces de reconocer la subunidad β de la LH creando un sándwich de anticuerpo ELISA, comprobando además la inmunoafinidad cromatográfica de esta prueba (Borromeo *et al.*, 2014).

Las pruebas de tipo ELISA detectan también anticuerpos específicos contra diversas enfermedades, y se ha comprobado que la conjugación de la proteína A/G en este tipo de pruebas ayuda a ofrecer diagnósticos certeros en múltiples especies tanto de animales domésticos como salvajes (Al-Adhami y Gajadhar, 2014).

Además de citología vaginal y mediciones hormonales se han encontrado estudios ecográficos estrechamente relacionados con la etapa reproductiva de la perra; la ecografía de la arteria intraovárica en perras proporciona información complementaria acerca de los cambios cíclicos de la función ovárica (Köster *et al.*, 2001).

III. JUSTIFICACIÓN

La reproducción adecuada en caninos ha tomado una importante relevancia, esto exige estar al tanto de los avances acerca del tema de reproducción en la actualidad. El manejo reproductivo de la hembra es sin duda uno de los factores más importantes para el obtener el éxito en la preñez, una adecuada determinación de los parámetros reproductivos de la hembra canina provee mayores posibilidades de gestación, para ello existen un sin fin de novedosos métodos, entre ellos; las mediciones hormonales prioritariamente y con fines reproductivos mediciones séricas de LH y P4, esto conlleva un costo elevado por la cantidad de muestras a tomar, ya que perder un día de muestra podría representar la no detección correcta al perder el pico de LH, además del estrés producido al animal por la toma de muestra de vasos periféricos diariamente, posiblemente por estos factores se han desarrollado especulaciones principalmente entre criadores y expositores “generalmente más interesados en la reproducción canina” acerca de la funcionalidad de paquetes comerciales de uso humano, para detectar LH en perras, este trabajo pretende determinar la funcionalidad o disfuncionalidad de estas pruebas, además de proponer en una pequeña revisión los métodos más actuales en un adecuado manejo reproductivo en caninos.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- 4.1.1. Determinar el pico de LH en suero y orina de perras utilizando dos métodos inmunocromatográficos.

4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Determinar el pico de LH en suero de perra utilizando una prueba inmunocromatográfica (Witness LH®), después de un estudio citológico vaginal.
- 4.2.2. Determinar el pico de LH en orina de perra utilizando una prueba inmunocromatográfica (Just Ask®), después de la determinación de LH en suero.
- 4.2.3. Comparar las técnicas inmunocromatográficas (Witness LH®/Just Ask®) para determinar el pico de LH en suero y orina en perras

V. HIPÓTESIS

- 5.1. La prueba inmunocromatográfica (Just Ask®) para determinar el pico preovulatorio de LH en orina de mujeres, mide el pico preovulatorio de LH en orina de perras.
- 5.2. **Hipótesis alterna.** La prueba inmunocromatográfica (Just Ask®) para determinar el pico preovulatorio de LH en orina de mujeres, no mide el pico preovulatorio de LH en orina de perras.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Descripción del experimento.

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, entre los meses de marzo a junio de 2014

Animales. Se utilizaron 10 caninos hembras de 2 a 5 años de edad con signos clínicos de proestro-estro.

Metodología. Se determinó el momento de ovulación, midiendo el pico preovulatorio de LH, utilizando previamente citología vaginal, enseguida se midieron los niveles séricos de LH con la prueba comercial “Witness LH®” para uso en caninos, y después se midieron los niveles de LH en orina con la prueba “Just Ask®” para uso en mujeres.

Las citologías vaginales se realizaron cada tercer día hasta detectar células superficiales y escamosas características del estro para posteriormente realizar las pruebas de detección de LH en suero de perras y prueba en mujer respectivamente. Se realizaron de una a cuatro citologías vaginales hasta detectar células escamosas con el siguiente procedimiento:

1. Se valoró clínicamente a la perra.
2. Se realizó limpieza de la 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 sobre un portaobjetos, haciendo de 2 a 4 tiras del material en el extendido.
7. Se tiñeron con la tinción de Wright, durante 5 segundos.
8. Se lavaron con solución amortiguadora de Wright.
9. Se dejaron secar al aire.
10. Se observaron e interpretaron observándose con un microscopio fotónico.

Una vez que las citologías mostraron células escamosas se empezaron a correr las pruebas de LH sérica y en orina.

La prueba para detectar LH en suero sanguíneo de perra, 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. Los procedimientos fueron los siguientes:

1. Se tomó una muestra de sangre en tubo de ensayo al alto vacío, sin anticoagulante, de las venas periféricas.
2. Inmediatamente sea centrifugó a 1200 RPM durante 15 min. Y se separó el suero.
3. La prueba se sacó de la envoltura y se colocó en una superficie plana y seca.
4. Se tomó una muestra de suero sanguíneo en una micropipeta, depositándose 3 gotas en la casilla número 1.
5. Se esperaron 20 minutos y se interpretaron los resultados en las casillas 2 y 3.

Posteriormente se realizó la prueba para detectar LH en orina de humano en la orina de perra, la prueba tiene 3 casillas, la casilla S es el depósito para orina, la casilla T corresponde a resultado positivo a LH en orina, y la casilla C corresponde al control e indicativo de que la prueba está bien hecha. Los procedimientos fueron los siguientes:

1. Se recolectó la orina de las perras de manera natural.
2. Se sacó el dispositivo de la envoltura justo antes de hacer la prueba y se colocó en una superficie plana y seca.
3. Con una micropipeta se tomó muestra de orina y se depositaron 6 gotas de orina en la ventanilla marcada con la letra S, cuidando de no mojar las ventanillas con la letra C y T.

4. Se esperó de 2 a 5 minutos y se interpretaron los resultados, preferentemente antes de los 10 minutos.
5. Si no apareció la línea bajo la letra C, posiblemente se depositó una cantidad insuficiente de orina, se aplicaron 1 a 2 gotas mas de orina, se esperó de nuevo de 2 a 5 minutos
6. La prueba se invalidó si no apareció la línea bajo la letra.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se recolectó la orina de perra de manera natural, lo cual fue fácil ya que en estado de celo las perras suelen tener incontinencia urinaria y deseo de marcar territorio, además de que no se causa traumatismo o se requiere sedación para utilizar una sonda.

La prueba para detectar el pico preovulatorio de LH en orina de mujer, utilizada para detectar el pico de LH en orina de perras, fue negativa cuando el resultado de la prueba para detectar la LH en suero sanguíneo de caninos también fue negativa (3/10).

En contraste con éstos resultados, cuando la prueba de LH fue positiva en suero (7/10), fue negativa en la orina de las perras. Por lo tanto la prueba de mujer no mostró sensibilidad para detectar el pico preovulatorio de LH en orina de perra, tomando como referencia el pico de LH previamente detectado por la prueba específica para perras (cuadro 1).

La cantidad de pruebas citológicas y pruebas de LH varió, de perra a perra puesto que el tiempo en días incluso, en horas, para llegar a células escamosas y posteriormente a pico de LH tuvieron diferencias, incluso en animales de la misma raza y edad ya que son diversos factores los que intervienen para ello, tales como:

estacionalidad, raza, genética, desordenes hormonales, alimentación, y clima entre otros.

Cuadro 1. Relación entre el número de pruebas citológicas, pruebas en suero y pruebas en orina para la detección de LH en perras.

N	Edad en años	Número de citologías hasta mostrar escamas	Número de pruebas (perra) utilizadas para mostrarel pico de LH en suero de perras	Número de pruebas (mujer) utilizadas para mostrar el pico de LH en orina de perras
1	4	3	1 (no mostró pico LH)	1
2	2	2	1 (no mostró pico LH)	1
3	5	2	2 (no mostró pico LH)	1
4	2	2	2	1
5	5	3	1	1
6	4	4	1	1
7	3	2	2	1
8	5	3	1	1
9	2	4	2	1
10	3	3	1	1

El 30% de las perras mostraron el mismo resultado al dar negativo a LH en suero y en orina, mientras que el 70% mostraron resultados diferentes al obtener positivo el pico de LH en suero (prueba de caninos) y negativo a LH en orina (prueba de uso humano).

Considerando éstos resultados se concluye que la prueba para la detección del pico de LH en orina de mujeres, no es útil para la detección del pico de LH en orina de perras (cuadro 2).

Cuadro 2.Detección del pico de LH en suero y orina de perras.

N	Resultado de la última prueba para determinar el pico de LH en suero	Resultado de la prueba para determinar el pico de LH en orina
1	Negativo (-)	Negativo (-)
2	Negativo (-)	Negativo (-)
3	Negativo (-)	Negativo (-)
4	Positivo (+)	Negativo (-)
5	Positivo (+)	Negativo (-)
6	Positivo (+)	Negativo (-)
7	Positivo (+)	Negativo (-)
8	Positivo (+)	Negativo (-)
9	Positivo (+)	Negativo (-)
10	Positivo (+)	Negativo (-)

De acuerdo a Burciaga (2014), la citología vaginal se utiliza como referencia de respuesta hormonal, lo cual facilita y reduce el muestreo sanguíneo para la detección de LH, además de que permite conocer el momento óptimo para realizarlo (Burciaga, 2014). En el presente estudio se tomó muestra de orina con el objetivo de identificar el pico preovulatorio de LH, y de esta manera establecer la utilidad de estas pruebas

Estudios previos demuestran que la citología vaginal seguida por detección de progesterona con ELISA, también son métodos confiables para predecir la ovulación, además de que el último día de receptividad y el primer día de celo determinado por la citología vaginal son métodos fiables para estimar retrospectivamente el tiempo de la ovulación (Bouchard *et al.*, 1991).

Además se ha buscado correlacionar la vaginoscopía, la citología vaginal y el muestreo de LH, tanto en suero sanguíneo como en orina, donde el pico del número de células nucleares se produjo 2.4 días en promedio después del pico de LH y la contracción de la mucosa vaginal con angulación, 6.1 días después aproximadamente. También se ha determinado que la medición de progesterona es la más fiable para determinar la ovulación y por lo tanto la gestación (Jeffcoate y England, 1997). Mas sin embargo, el pico de progesterona es demasiado

prolongado aun después de la ovulación (Stornelli *et al.*, 2006), esto podría crear una falsa visión de la ovulación debido a la variabilidad en la duración del celo, por ello en nuestra investigación se consideró determinar el pico preovulatorio de LH sérico al ser menos prolongado y justo de 2 a 3 días antes de la ovulación.

Jeffcoate también determinó que la medición de LH en orina es de poca relevancia y confiabilidad, y solo muy práctico por la facilidad de la toma de muestra, a pesar de que cinco de los sujetos de experimento lograron mostrar el pico de LH en orina (Jeffcoate y England, 1997), concordando con este, en cuanto a la facilidad de la toma de muestra de orina, pero su lamentable y nula confiabilidad en los resultados.

La facilidad en la toma de la muestra de orina se debe a que han encontrado receptores para LH en la uretra, favoreciendo el llamado mecanismo de incompetencia del esfínter uretral provocando una ligera incontinencia urinaria durante el estro (Wheeler y Lappin, 2012); de acuerdo con esta investigación se explica el porqué la facilidad para toma de muestra urinaria en nuestro experimento.

Podría sugerirse la estabilización de la LH en orina con glicerol al 7%, esto conllevaría a un posible nuevo resultado. La LH se ha estabilizado con glicerol para estudios tanto humanos (Livesey *et al.*, 1983) como en tamarines (Ziegler *et al.*, 1987), además de realizar posibles modificaciones a la prueba, ya que normalmente éstas están diseñadas para determinar la parte β de la LH la cual da a la hormona especificidad inmunológica (Borromeo *et al.*, 2014) de hecho se realizaron modificaciones basadas en anticuerpos monoclonales anti-LH bovina, LH ovina, y anti-IgG de ratón, siendo esta prueba utilizada para determinar LH en suero sanguíneo de elefantes hembras, fue esta misma prueba la que intento convalidarse en esta especie para detección de LH en orina para mayor facilidad en la toma de muestra, los resultados fueron de poca relevancia pese a que la

orina fue tratada con glicerol para estabilizar la LH, los resultados fueron negativos comparados con los resultados obtenidos del suero sanguíneo (Brown *et al.*, 2010).

La disección precisa de los perfiles de LH se lleva a cabo de manera más fiable con el muestreo frecuente en intervalos de 10 a 20 minutos durante un periodo de 4 a 8 horas, produciendo al menos 20 muestras por animal. Esto por lo general requiere catéteres intravenosos. También se puede utilizar para medir otras hormonas como la FSH, PRL, E2 y P4. La FSH tienen mayores niveles basales y pulsatilidad menos pronunciada que la LH y, por tanto, se necesitan un menor número de muestras para determinar los cambios; además establece que dichos estudios no deben combinarse con estudios de toxicidad (Andersson *et al.*, 2013).

En cuanto a citología vaginal en otras especies se ha utilizado para crear parámetros reproductivos, en las cabras enanas de África occidental se realizó un estudio, obteniendo como resultado en los frotis que los leucocitos estuvieron presentes en todo el ciclo, y los recuentos de células aumentaron en los días 1 y 2 y cayeron el día 4, las células superficiales se observaron con más frecuencia en proestro-estro tempranos; estos resultados indican que el patrón de exfoliación de las células vaginales podría ser utilizado para determinar la condición reproductiva y, por extensión, el funcionamiento ovárico de las cabras (Ola *et al.*, 2006).

En perros machos se ha medido la LH para comparar tanto los valores de LH como de prolactina y testosterona en cuatro razas mostrando normoespermia para caracterizar la respuesta de dichas hormonas después de una única aplicación de factor liberador de prolactina (TRH) intravenoso, además de medir tirotrópina y tiroxina, la concentración media general de LH fue más altas en los Foxterrier y la más baja en los Labradores y Gran Danés, y las concentraciones difirieron significativamente entre Foxterrier y Beagle. En las cuatro razas la inyección de

TRH fue seguida por una disminución de la LH en 20 minutos (Urhausen *et al.*, 2008).

En cerdas jóvenes sincronizadas se ha detectado el pico preovulatorio de LH para determinar los efectos de la aplicación de gonadotropina coriónica humana en diferentes dosis obteniendo la disminución de la secreción de E2 inmediatamente después de la administración de hCG, la falla en el pico de LH en algunos animales tratados, y la producción previa de P4 por el desarrollo de un nuevo cuerpo lúteo (Ziecik *et al.*, 1986).

El pico de LH en suero sanguíneo de ratas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma evansi* se ha visto disminuido junto con la FSH las cuales fueron medidas por la técnica de inmunoensayo demostrando así que la infección por *T. evansi* en ratas hembras puede causar cambios en los niveles de LH, FSH, estradiol, progesterona y con independencia del momento de la infección o de la fase del ciclo estral (Faccio *et al.*, 2013).

En bovinos para determinar el número de folículos y oleadas foliculares se ha propuesto que el pico de un pulso de LH es seguido por el pico de un impulso de estradiol dentro de 15 min; y la reducción de las concentraciones sistémicas de progesterona aumentan la frecuencia de los pulsos de LH y las concentraciones de estradiol dentro de las 6 h., confirmando así que los folículos no van aumentando de forma gradual, realmente existen oleadas foliculares hasta llegar al folículo dominante (Ginther *et al.*, 1996) que por acción de las inhibinas del folículo dominante suprime las concentraciones de FSH en plasma sin alterar las concentraciones de LH en plasma (Adams *et al.*, 1992).

VIII. CONCLUSIÓN

Las pruebas comerciales de uso humano para determinar el pico de LH en orina no son útiles en perras.

IX. LITERATURA CITADA

1. Adams G.P., Matteri R.L., Kastelic J.P., Ko J.C.H., y Ginther O.J. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fert.* 94:177-188.
2. Al-Adhami B.H. y Gajadhar A.A. 2014. A new multi-host species indirect ELISA using protein A/G conjugate for detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies with comparison to ELISA-IgG, agglutination assay and Western blot. *Vet Parasitol.* 200 (1-2):66-73.
3. Andersson H., Rehm S., Stanislaus D. y Wood CH.E. 2013. Scientific and Regulatory Policy Committee (SRPC) Paper: Assessment of Circulating Hormones in Nonclinical Toxicity Studies III. Female Reproductive Hormones. *Toxicol. Pathol.* 41: 921-934.
4. Bergeron L.H., Nykamp S.G., Brisson B.A., Madan P. y Gartley C.J. 2013. An evaluation of B-mode and color Doppler ultrasonography for detecting periovulatory events in the bitch. *Theriogenol.* 79:274–283.
5. Boothe W.H. 2004. Aparato reproductor. En: Morgan R.V, Bright R.M y Swartout M.S. Clinica de pequeños animales. Elsevier. 4ª ed. Madrid, España. Pp 581-582.
6. Borromeo V., Berrini A., De Grandi F., Cremonesi F., Fiandanese N., Pocar P. y Secchi C. 2014. A novel monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay to determine luteinizing hormone in bovine plasma. *Anim. Endocrinol.* 48:145-157.
7. Bouchard G.F., Solorzano N., Concannon P.W., Youngquist R.S. y Bierschwal C.J. 1991. Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone. *Theriogenol.* 35(3):603-611.
8. Brown J.L., Kersey D.C. y Walker S.L. 2010. Assessment of luteinizing hormone and prolactin immunoactivity in Asian and African elephant urine using assays validated for serum. *Comp. Endocrinol.* 169 (2):138-143.

9. Burciaga M.F. 2014. Determinación de LH en perras por la técnica de inmuno-migración rápida y estudio complementario con citología vaginal exfoliativa. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Laguna. Torreón, Coahuila, México.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Concannon P. W. 2005. Estrus Induction In Dogs: Approaches, Protocols and Applications. Proceedings of the WSAVA Congress, Mexico, City.
14. De Buen A.N. 2001. Citología Diagnóstica Veterinaria. Editorial El Manual Moderno. México, D.F. pp 19-22.
15. Faccio L., Da Silva A.S., Tonin A.A., França R.T., Gressler L.T., Copetti M.M., Oliveira C.B., Sangoi M.B., Moresco R.N., Bottari N.B., Duarte M.M. y Monteiro S.G. 2013. Serum levels of LH, FSH, estradiol and progesterone in female rats experimentally infected by *Trypanosoma evansi*. *Exp. parasitol.* 135(1):110.
16. FCM. Federación Canofila Mexicana A.C. 2011. Manual de Reproducción Canina. México. P. 23.
17. Feldman E.C. y Nelson R. 2000. Endocrinología y reproducción en Perros y Gatos. Editorial McGraw- Hill Interamericana. 2ª Ed. México, D.F.
18. Gabbert N.H., Nachreiner R.F., Holes-word P. y Kivela JH. 1984. Serum immunoreactive gastrin concentration in the dog. Basal and postprandial values measured by radioimmunoassay. *J. of Vet.* 45: 2351-2353.
19. Ginther O.G., Wiltbank M.C., Fricke P.M., Gibbons J.R. y Kot k. 1996. selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. of reprod.* 55: 1187-1194.

20. Ithurralde J., Costas A.N., Pessina P., Cueto E., Fila D. y Meikle A. 2013. Immunohistochemical determination of estrogen receptor- α in canine vaginal biopsies throughout proestrus, estrus, and early diestrus. *Theriogenol.* 80 (7): 805–811.
21. Jeffcoate I.A. y England G.C. 1997. Urinary LH, plasma LH and progesterone and their clinical correlates in the periovulatory period of domestic bitches. *J. Reprod. Fertil Suppl.* 51:267-275.
22. Just ask®. prueba para determinar LH en orina de mujeres. EUA. Just Care. México 64830.
23. Kempainen J.R. 2013. Test Hormonales. En: Mooney C.T y Peterson M.E (Eds). Endocrinología en pequeños animales. LEXUS. España. Pp 7-14.
24. Kobayashi M., Wada M., Hori T. y Kawakami E. 2014. Superoxide dismutase activity in the oviductal and uterine fluid of the bitch and the effects of the enzyme on viability, motility and hyperactivation of canine sperm *in vitro*. *J Vet Med Sci.* 76(5): 741–743.
25. 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. *Reprod.* 122(3):453-461.
26. Kowalewski M.P., Fox M., Gram A., Boos A. y Reichler I. 2013. Prostaglandin E₂ functions as a luteotrophic factor in the dog. *Reprod.* 145: 213-226.
27. Kutzler M.A. 2012. Métodos y resultados esperados de la inducción del celo en perros y gatos. Congreso Latinoamericano de Emergencia y Cuidados Intensivos. México, DF.
28. Lacroix C. 2012. Ciclo estral de la perra y técnicas utilizadas para su seguimiento. *Vanguardia Vet.* 6-23.
29. Linharattanaruksa P., Srisuwatanasagul S., Ponglowhapan S., Khalid M. y Chatdarong K. 2014. Collagen and Glycosaminoglycan Profiles in the Canine Cervix during Different Stages of the Estrous Cycle and in Open- and Closed-Cervix Pyometra. *J. Vet. Med. Sci.* 76(2): 197–203.

30. 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.
31. 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.
32. Ola S.I., Sanni W.A. y Gabriel Egbunike G. 2006. Exfoliative vaginal cytology during the oestrous cycle of West African dwarf goats. *Reprod. Nutr. Dev.* 46: 87–95.
33. 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.
34. Romagnoli S. 2012. Clinical usage of GnRH agonists in small animal reproduction: a review. *Society for Theriogenology Annual Conference*, Baltimore, MD, USA. 233-243.
35. 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.
36. Silva-Molano R.F. y Loaiza-Echeverri A.M. 2007. Piometra en animales pequeños. *Vet. Zootec.* 1(2):71-86.
37. Stornelli M.A., Savignone C.A, Tittarelli M.C. y Stornelli M.C. 2006. Citología vaginal en caninos: Metodología y aplicaciones clínicas. *Vet. Cuy.* pp 15-21.
38. Tsutsui T. 1989. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 39:269-275.
39. Tsutsui T., Hori T., Takahashi F. y Concannon P.W. 2012. Time of establishment of the number of follicles to be ovulated in dogs. 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Whistler, Canada. Ivis.

40. Urhausen C., Beineke A., Piechotta M., Karrel., Beyerbach M. y Günzel-Apel A.R. 2011. Apoptosis in the Uterotubal Junction and Oviductal Isthmus during the Estrous Cycle of the Bitch. *T. Anatom. Rec.* 294, (2): 342–348.
41. Urhausen C., Seefeldt A., Eschricht F., Koch A., Hoppen H.O., Beyerbach M., Möhrke C., Dieleman S.J., y Günzel-Apel A.R. 2008. Concentrations of prolactin, lh and testosterone as well as of tsh and thyroxin in male dogs of different breeds showing normospermia. 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. European Veterinary Society for Small Animal Reproduction. Vienna, Austria.
42. Wehrend A., Plato K.V. y Goericke-Pesch S. 2013. Die exfoliative Vaginalzytologie bei der Hündin – Indikationen, Durchführung, Interpretation. *Tierärztliche Praxis Kleintiere.* 4: 267-274.
43. Wheeler R. y Lappin M. 2012. Urinary incontinence in a bitch during estrus: A case study. 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Whistler, Canada. Ivis.
44. Witness LH®. Prueba para determinar LH en suero sanguíneo de caninos. México D.F. Pfizer, S.A. de C.V. WIT-MX11-03-487.
45. Ziecik A., Tilton J.E., Espana F. y Weigl R. 1987. Effect of human chorionic gonadotropin on preovulatory luteinizing hormone surge and ovarian hormone secretion in gilts. *J. Anim. Sci.* 64: 1134-1143.
46. Ziegler T.E., Savage A., Scheffler G. y Snowdon C.T. 1987. The Endocrinology of Puberty and Reproductive Functioning in Female Cotton-Top Tamarins (*Saguinus oedipus*) under Varying Social Conditions. *Biol. of reprod.* 37: 618-627.

X. ANEXOS.

10.1. Anexo 1. Procedimientos en la toma de muestras y estudio experimental.



Figura 8. Alta receptividad durante el periodo de celo detectado en uno de los individuos de experimento.



Figura 9. Forma correcta de tomar la muestra de tejido vaginal para la citología (Lacroix 2012).



Figura 10.A) Impresión de células vaginales por rodamiento en un portaobjetos. B) Aplicación de tinción de Wright por goteo-escurrimiento con micropipeta. C) Observación microscópica del extendido vaginal para su interpretación.

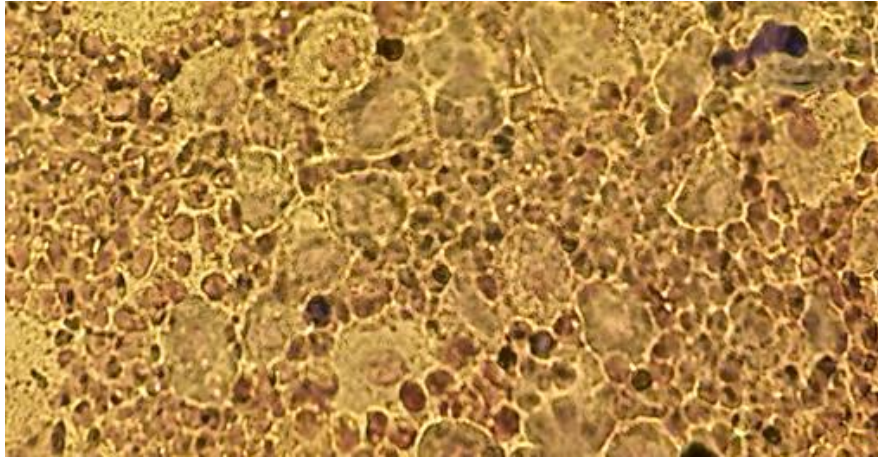


Figura 11. Células intermedias con abundantes eritrocitos características del proestro temprano.

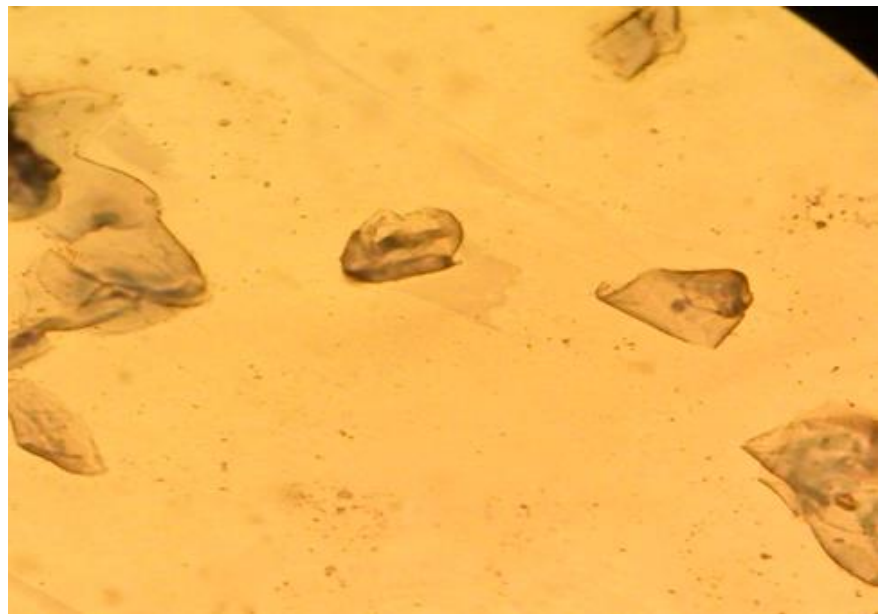


Figura 12. Células superficiales características del estro.

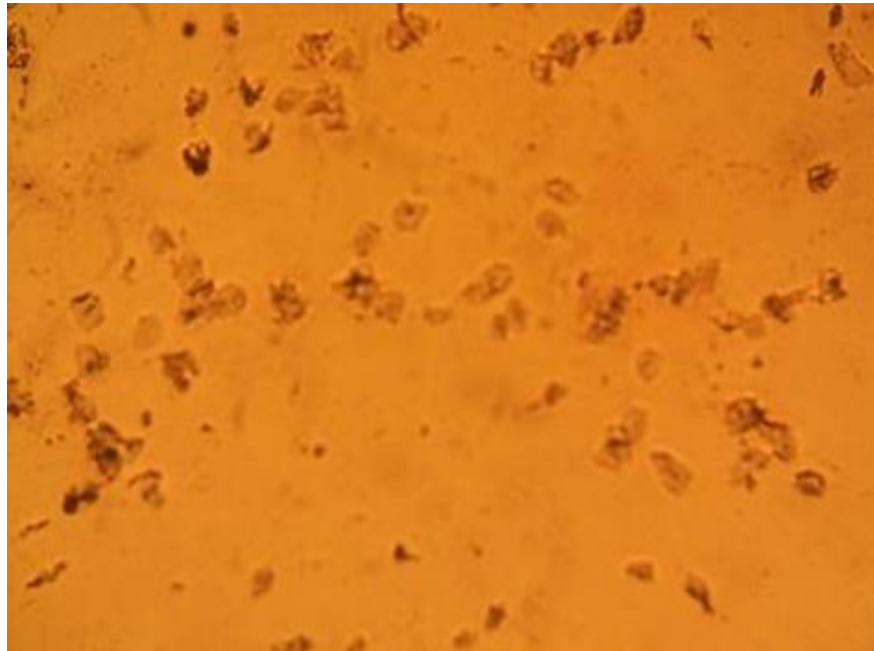


Figura 13. Células superficiales y escamosas (10X).

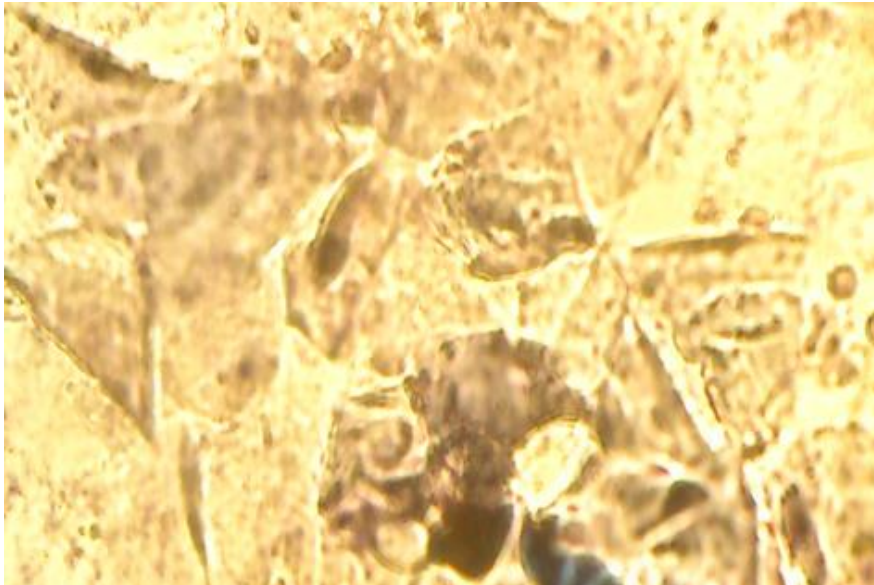


Figura 14. Células anucleadas completamente queratinizadas y amontonadas características en estro durante la más alta concentración de estrógenos.

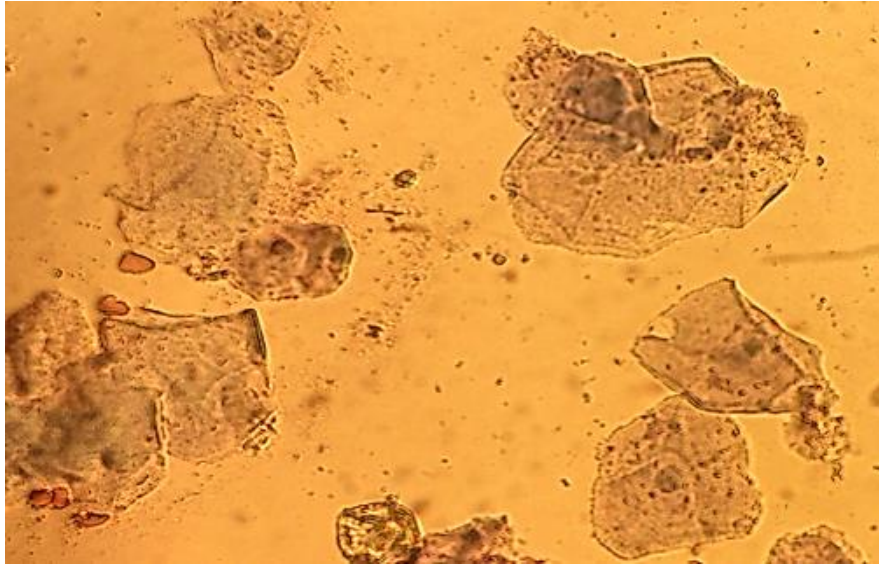


Figura 15. Células anucleadas principalmente y células superficiales aun con presencia de núcleo en lado inferior derecho.



Figura 16. Centrifugación de la muestra sanguínea para detectar el pico preovulatorio de LH en suero.

10.2. Anexo 2. Materiales utilizados.

Material para citología vaginal exfoliativa

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

Material para la determinación de LH con prueba específica para suero sanguíneo

- Guantes
- Algodón con alcohol
- Torniquete
- Jeringa de 5ml
- Tubo de ensayo al alto vacío tapón rojo
- Centrifuga
- Micropipeta
- Prueba inmunocromatográfica comercial (*Witness LH*) uso en caninos

Material para la determinación de funcionalidad de la prueba comercial inmunocromatográfica de uso en humanos.

- Guantes estériles
- Frasco Estéril para toma de muestra
- Micropipeta
- Prueba inmunocromatográfica comercial (just ask) para uso específico en orina de humanos.