

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RELACIÓN COSTO,
BENEFICIO, EXACTITUD DE LAS ALMOHADILLAS DE
OVULACIÓN Y DE LA MEDICIÓN DEL NIVEL SÉRICO DE
PROGESTERONA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA
OVULACIÓN EN HEMBRAS CANINAS EN LA CIUDAD
CAPITAL**

ZULMA JOHANA MAYÉN ESTRADA

Médica Veterinaria

GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 2014

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RELACIÓN COSTO, BENEFICIO,
EXACTITUD DE LAS ALMOHADILLAS DE OVULACIÓN Y DE LA
MEDICIÓN DEL NIVEL SÉRICO DE PROGESTERONA PARA LA
DETERMINACIÓN DE LA OVULACIÓN EN HEMBRAS CANINAS EN
LA CIUDAD CAPITAL**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD

POR

ZULMA JOHANA MAYÉN ESTRADA

Al conferírsele el título profesional de

MÉDICA VETERINARIA

En el grado de licenciada

GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 2014

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
JUNTA DIRECTIVA

DECANO:	MSc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
SECRETARIA:	M.V. Blanca Josefina Zelaya de Romillo
VOCAL I:	Lic. Sergio Amílcar Dávila Hidalgo
VOCAL II:	MSc. Dennis Sigfried Guerra Centeno
VOCAL III:	M.V. Carlos Alberto Sánchez Flamenco
VOCAL IV:	Br. Javier Augusto Castro Vásquez
VOCAL V:	Br. Juan René Cifuentes López

ASESORES

M.V. CARLOS EFRAÍN ALFARO ARGUETA
M.V.M.A. LIGIA ANAITÉ GONZÁLEZ QUIÑÓNEZ
M.V. CARLOS ENRIQUE CAMEY RODAS

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por los reglamentos y normas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de graduación titulado:

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RELACIÓN COSTO, BENEFICIO, EXACTITUD DE LAS ALMOHADILLAS DE OVULACIÓN Y DE LA MEDICIÓN DEL NIVEL SÉRICO DE PROGESTERONA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA OVULACIÓN EN HEMBRAS CANINAS EN LA CIUDAD CAPITAL

Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar al título profesional de

MÉDICA VETERINARIA

ACTO QUE DEDICO

- A DIOS:** Mi Padre Celestial quien guía e ilumina cada paso de mi vida.
- A MI MADRE:** Rosalinda Estrada por darme la vida, guiarme con sus sabios consejos y amarme tanto.
- A MI HERMANA:** Rossy por ser el ángel que confió y creyó en mí, me apoyó y acompañó a lo largo de este camino y se sacrificó para darme siempre lo mejor; porque sin ella no hubiera podido culminar con éxito mi carrera. Y estoy segura que ahora sigue cuidándome desde el cielo.
- A MIS HERMANOS:** Clary, Adelso, Carlos y Luis por estar siempre cuando los necesité.
- A MI SOBRINA:** Hillary por ser el motor que me impulsa a seguir adelante, por aguantarme en los momentos de estrés, por encontrar la manera de hacerme sonreír y siempre ser mi cómplice.

AGRADECIMIENTOS

- A DIOS:** Por mandarme a ese ángel que me apoyó durante toda mi carrera, por darme templanza y sabiduría para enfrentar cada momento de mi vida, las fuerzas necesarias para superar los obstáculos y permitirme alcanzar este gran sueño.
- A MI FAMILIA:** Por su amor incondicional y por compartir a mi lado esos momentos que no se cambian por nada del mundo.
- A LA FMVZ:** Por ser mi casa de estudios durante los seis años de mi carrera.
- A MIS ASESORES:** Por brindarme su apoyo y guiarme en este proyecto.
- A MI PADRINO:** Fredy González, por su invaluable ayuda en las distintas etapas de mi carrera y por su amistad incondicional.
- A MIS AMIGOS:** Alejandra, Paola, Mónica, Conrado, Manuel y Carlos Alfaro por ser parte de mi vida y permitirme ser parte de sus vidas, por su ayuda y por permanecer en las buenas y en las malas.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	2
III. OBJETIVOS	3
3.1 Objetivo General.....	3
3.2 Objetivo Específicos.....	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1 Anatomía del aparato reproductor de la perra.....	4
4.2 Endocrinología del ciclo astral.....	8
4.2.1 Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH, LHRH).....	8
4.2.2 Hormona estimulante de los folículos (FSH).....	8
4.2.3 Hormona luteinizante (LH).....	8
4.2.4 Estrógenos.....	9
4.2.5 Progesterona.....	10
4.2.6 Prolactina.....	10
4.2.7 Andrógenos.....	11
4.2.8 Prostaglandinas.....	11
4.3 Ciclo estral de la perra.....	11
4.3.1 Fase folicular.....	12
4.3.2 Luteinización preovulatoria y ovulación.....	14
4.3.3 Fase luteal.....	15
4.3.4 Anestro.....	16
4.4 Examen de la perra.....	17
4.5 Citología vaginal exfoliativa.....	18
4.5.1 Toma de muestra.....	21
4.5.2 Tinciones de los frotis vaginales.....	21
4.5.2.1 Método de Shorr.....	21
4.5.2.2 Azul de Metileno.....	22
4.5.2.3 Tinción de Leishman.....	22

4.5	Diff-Quick (Merz y Dade).....	23
4.5.3	Interpretación de los frotis vaginales.....	23
4.5.3.1	Determinación del momento óptimo para la cu- brición.....	23
4.6	Ensayo hormonal en perras.....	24
4.6.1	Ensayo de hormona luteinizante (LH).....	24
4.6.2	Ensayos de progesterona.....	25
4.7	Almohadillas de ovulación.....	25
4.7.1	Fundamento de la prueba.....	25
4.7.2	Procedimiento de la prueba.....	26
4.8	"Kit" de ovulación canina para medición de progesterona.....	26
4.8.1	Procedimiento de la prueba.....	26
4.8.2	Directrices para validación de la prueba.....	27
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1	Materiales.....	28
5.1.1	Recursos humanos.....	28
5.1.2	Recursos biológicos.....	28
5.1.3	Recursos físicos y de laboratorio.....	28
5.2	Metodología de las pruebas específicas.....	29
5.2.1	Descripción del área.....	29
5.2.2	Criterios de inclusión.....	30
5.2.3	Metodología.....	30
5.2.3.1	Citología vaginal.....	30
5.2.3.2	Almohadillas de ovulación.....	31
5.2.3.3	"Kit" de progesterona.....	31
5.3	Diseño.....	32
5.4	Análisis estadístico.....	32
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	33
VII.	CONCLUSIONES.....	35

VIII. RECOMENDACIONES.....	36
IX. RESUMEN.....	37
SUMMARY.....	38
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
XI. ANEXOS.....	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1

Porcentaje de edades de perras muestreadas con citología vaginal, almohadillas de oclación P₄ en la Ciudad de Guatemala, julio-agosto 2012..... 42

Cuadro 2

Cuadro de interpretación de colores obtenidos en la realización “Kit” de medición sérica de progesterona en hembras caninas..... 46

Cuadro 3

Ficha para toma de datos del estudio..... 46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1

Porcentaje de edades de perras muestreadas con citología vaginal, almohadillas de ovulación P₄ en la Ciudad de Guatemala, julio-agosto 2012.... 42

Figura 2

Porcentaje de razas de perras muestreadas con citología vaginal, almohadillas de ovulación y P₄ en la Ciudad de Guatemala, julio-agosto 2012.. 43

Figura 3

Días de presencia de LH en mucosa vaginal y porcentaje de células cornificadas según citología vaginal en perras muestreadas en la Ciudad de Guatemala, julio-agosto 2012..... 43

Figura 4

Días de presencia de LH en mucosa vaginal y valores de P₄ encontrados en perras muestreadas en la Ciudad de Guatemala, julio-agosto 2012..... 44

Figura 5

Días de presencia de LH en mucosa vaginal en perras muestreadas en la Ciudad de Guatemala, julio-agosto 2012..... 44

Figura 6

Costos fijos de pruebas para P₄, LH y citología vaginal, realizadas en perras en la Ciudad de Guatemala, julio-agosto 2012..... 45

Figura 7

Comparación de costos fijos y costos variables de las pruebas para P₄, LH y citología vaginal, realizadas en perras en la Ciudad de Guatemala, julio-agosto 2012..... 45

I. INTRODUCCIÓN

Todo programa de reproducción canina necesita que se lleve a cabo la determinación exacta del momento de la ovulación ya que de esta depende que se logre aumentar significativamente la tasa de preñez de las hembras. Para establecer el momento exacto de la ovulación, se debe hacer uso del método más exacto disponible. Existen varios métodos para dicho fin como la medición de los niveles séricos de hormonas, citología vaginal, ecografía y endoscopia vaginal, entre los métodos más confiables, sin embargo, aún existen otros métodos menos confiables que se basan únicamente en los signos externos de celo, tales como la edematización de la vulva, el sangrado vaginal; así como la aceptación del macho. Estos métodos no permiten determinar el momento de la ovulación, como resultado, muchas perras son apareadas en un momento inadecuado y esto constituye una de las causas más comunes de infertilidad aparente en las perras.

La determinación de los niveles de hormonas séricas ha sido por mucho tiempo uno de los métodos más confiables, ya que permiten determinar el momento exacto de la ovulación. Sin embargo, son costosos, difíciles de conseguir, es necesaria la toma de muestra de sangre todos los días, lo cual puede eventualmente causar estrés a la perra y flebitis en el sitio de la toma de muestra. Recientemente se han empezado a utilizar métodos que detectan niveles de hormonas en la mucosa vaginal. Estos métodos a pesar de ser económicos y fáciles de utilizar, por ser relativamente nuevos no han sido evaluados ampliamente.

La importancia del presente estudio radica en promover la implementación de un método confiable, de fácil realización que logre minimizar el estrés en las perras y que sea de bajo costo, como alternativa para el diagnóstico de la ovulación, contribuyendo a que se reduzcan al máximo el tiempo y los costos en dichos diagnósticos.

II. HIPÓTESIS

La prueba de las almohadillas de ovulación permite determinar de una manera confiable el momento de la ovulación, a un bajo costo y en menor tiempo que el requerido por la prueba de medición del nivel sérico de progesterona en hembras caninas.

III. OBJETIVOS

3.1 General

Generar información sobre el uso de dos pruebas para determinar el momento exacto de la ovulación en hembras caninas en la ciudad capital.

3.2 Específicos

- Evaluar la relación costo beneficio de las almohadillas de ovulación comparada con la medición del nivel sérico de progesterona.
- Comparar la facilidad de realización de las almohadillas de ovulación con la medición del nivel sérico de progesterona.
- Evaluar la relación beneficio exactitud de las almohadillas de ovulación comparada con la medición del nivel sérico de progesterona.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Anatomía del aparato reproductor de la perra

Los ovarios tienen funciones tanto gametogénicas como endocrinas. Cada ovario es un cuerpo sólido, básicamente elipsoidal aunque irregular por la proyección desde la superficie de grandes folículos y cuerpos lúteos. Los ovarios se sitúan en la parte dorsal del abdomen, cerca de los extremos de los cuernos del útero. Cada ovario está suspendido dentro de la porción craneal del ligamento ancho del útero, que sostiene al tracto reproductor femenino. Un corte a través del ovario de una hembra madura muestra que consta de una porción central laxa y vascularizada contenida dentro de una envoltura más densa. La zona parenquimatosa está limitada por una túnica albugínea inmediatamente por debajo del peritoneo y salpicada de folículos en varios estadios de desarrollo y regresión. Cada folículo contiene un único óvulo. **(4)**

Las trompas uterinas son estrechas y generalmente muy sinuosas. Capturan los óvulos liberados de los ovarios y los llevan hacia el útero, como también conducen los espermatozoides en su ascenso, la fertilización ocurre normalmente dentro de las trompas uterinas. El extremo craneal libre de cada trompa uterina adopta la forma de un embudo de pared delgada llamado infundíbulo, colocado cerca del polo craneal del ovario. El extremo libre del embudo es desigual y las partes finales llamadas fimbrias, se ponen en contacto con la superficie del ovario. Un pequeño orificio llamado orificio abdominal, en el fondo del embudo, conduce a la porción tubular más larga que está dividida en segmentos más o menos iguales. El segmento proximal se conoce como ampolla, le sigue el istmo que es más estrecho, el cual se une al vértice del cuerno del útero en la unión útero-tubo ovárico, una región de aspecto muy variable. La pared de las trompas uterinas consta de varias túnicas, la serosa externa, la muscular

media y la mucosa interna. Las trompas uterinas son llevadas a un pliegue lateral de la parte del ligamento ancho que sostiene el ovario. **(4)**

El útero es la parte ensanchada del tracto urogenital en la que los embriones se detienen. El útero comprende una porción mediana caudal desde la cual divergen cranealmente un par de cuernos para continuar como las trompas uterinas. En todos los mamíferos la porción media del útero posee dos segmentos, el caudal, que es un segmento de paredes muy gruesas y el cuello uterino que posee un esfínter que controla el acceso a la vagina. Una porción del cuello se proyecta dentro del lumen vaginal con el que se comunica en el orificio externo, en lumen del cuello está casi ocluido con frecuencia por los pliegues mucosos, se abre dentro del cuerpo uterino en el orificio interno. El cuerpo es generalmente un segmento bastante pequeño en las especies domésticas. Los cuernos uterinos son rectos y divergentes, por lo general, el cuello uterino se ubica dentro del piso de la cavidad pélvica, interpuesto entre el recto y la vejiga, pero el cuerpo y los cuernos del útero típicamente se localizan dentro del abdomen por encima de la masa intestinal. El útero posee las tunicas serosa, muscular y mucosa que se conocen respectivamente como perimetrio, miometrio y endometrio. **(4)**

La vagina consta de dos porciones, la porción craneal, es decir, la vagina en sentido estricto, es puramente un pasaje reproductor que transcurre desde el cuello uterino hasta la entrada de la uretra. La porción caudal, el vestíbulo vaginal, se extiende desde el orificio uretral hasta la vulva externa y combina las funciones de reproducción y urinarias. Las dos porciones juntas constituyen el órgano copulador femenino y el canal del parto. La vagina es un ducto relativamente largo y de paredes delgadas distensibles a lo largo y a lo ancho, ocupa una posición mediana dentro de la cavidad pélvica, relacionada a nivel dorsal con el recto y ventralmente con la vejiga y la uretra. El músculo vaginal es débil y tiene una disposición similar al del útero, la mucosa está revestida de epitelio escamoso estratificado que reacciona a los cambios en los niveles hormonales que tienen

lugar durante el ciclo estral. La intrusión del cuello dentro de la porción craneal de la vagina reduce el espacio interno en forma de anillo conocido como el fórnix. **(4)**

El vestíbulo es mucho más corto que la vagina, se ubica principalmente, caudal al arco isquiático, circunstancia que le permite inclinarse a nivel ventral con su abertura en la vulva. Las paredes del vestíbulo son menos elásticas que las de la vagina y en reposo se juntan, reduciendo el lumen a una hendidura vertical. En la perra la abertura uretral se eleva por encima del nivel general del piso vestibular. Más caudalmente, las paredes vestibulares están señaladas por las entradas de los ductos de las glándulas vestibulares, estas glándulas son pequeñas pero numerosas y los orificios de los ductos forman series lineales. Estas glándulas producen una secreción mucosa que lubrica la vagina durante el coito y el parto. Durante el estro, el olor de la secreción tiene un efecto sexual estimulante sobre el macho. La pared vestibular está excepcionalmente bien vascularizada con una concentración de venas que forman una placa lateral de tejido eréctil conocido como el bulbo vestibular y se considera el homólogo del bulbo del pene. El clítoris, el homólogo femenino del pene, se ubica exactamente dentro de la comisura ventral. **(4)**

Los ligamentos anchos son las principales sujeciones del tracto reproductor femenino, son láminas bilaterales que se extienden desde el origen del suelo abdominal y las paredes pélvicas. La porción craneal de cada una cuelga verticalmente y sostiene al ovario, las trompas uterinas y los cuernos uterinos. La porción caudal pasa más horizontalmente para fijarse a los lados del cuerpo del útero, el cuello y la porción craneal de la vagina; las porciones caudales derecha e izquierda con su inclusión visceral dividen así a la cavidad pélvica en dos espacios, uno dorsal y otro ventral. Cuando se sigue distalmente desde su fijación al piso abdominal, el mesovario, que sostiene al ovario, desprende un pliegue lateral (el mesosalpinx) que pasa dentro de la trompa uterina. El mesosalpinx y el mesovario cierran una bolsa, la bolsa ovárica, dentro de la cual sobresale el

ovario. Las paredes de la bolsa pueden contener tanta grasa que el ovario está oculto por completo. El mesovario también sostiene una banda fibromuscular, el ligamento propio del ovario, que se extiende desde el polo caudal del ovario hasta el extremo adyacente del cuerno del útero. **(4)**

Un cordón de tejido fibroso y músculo liso, el ligamento redondo del útero, pasa desde el extremo del cuerno del útero hacia el canal inguinal y a través de éste, sostenido por un pliegue especial del peritoneo desprendido de la superficie lateral del ligamento ancho. **(4)**

La irrigación sanguínea procede de varias fuentes, la arteria ovárica, una rama directa de la aorta, irriga el ovario y las ramas que van a los trompas uterinas y la porción craneal del cuerno uterino. La arteria uterina nace como una rama indirecta de la arteria ilíaca interna y corre hacia craneal dentro del ligamento ancho. Esta arteria emite una serie de ramas que se anastomosan con el cuerpo y cuerno uterino, las más craneales se anastomosan con la arteria ovárica; las más caudales con la arteria vaginal. Las porciones más caudales del tracto urogenital están irrigadas de distinta manera por ramas de la arteria pudenda interna y vaginal. Un plexo venoso prominente y elaborado, presente en la cara ventral del útero y la vagina, drena ambos órganos, permite que la sangre salga por cualquiera de las venas pares ovárica, uterina y vaginal. **(4)**

La inervación de los órganos reproductores femeninos está proporcionada por fibras nerviosas tanto simpáticas como parasimpáticas, a través de rutas que todavía no han sido clarificadas del todo. Las fibras simpáticas corren hacia el ovario junto con la arteria ovárica. Las fibras que llegan a las trompas uterinas, el útero y la vagina siguen principalmente a las otras arterias para formar plexos nerviosos dentro de los ligamentos anchos y los mismos órganos genitales. En la porción caudal de los ligamentos anchos, estas fibras se complementan con otras fibras simpáticas que viajan por la vía de los plexos localizados en el tejido pélvico

retroperitoneal. Las fibras parasimpáticas son ramificaciones de los nervios pélvicos y alcanzan los órganos genitales a través del plexo nervioso pélvico. **(4)**

4.2 Endocrinología del ciclo estral

4.2.1 Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH, LHRH)

Es liberada en forma pulsátil en el hipotálamo, llega a la adenohipófisis por medio de un sistema portal de irrigación y estimula la síntesis y liberación de la hormona estimulante de los folículos (FSH) y la hormona luteinizante (LH). **(6)**

4.2.2 Hormona estimulante de los folículos (FSH)

Una gonadotropina producida y liberada desde la adenohipófisis, actúa en el ovario sobre las células de la granulosa estimulando la síntesis de estrógenos y el desarrollo folicular; en la hembra los esteroides gonadales parecen estar asociados al pico preovulatorio tanto de FSH como de LH, por lo que en este caso ejercería una retroalimentación positiva. **(6)**

4.2.3 Hormona luteinizante (LH)

Una gonadotropina producida y liberada desde la glándula adenohipófisis, liberada en forma de pulsaciones. En la hembra el pico preovulatorio de los niveles plasmáticos de LH es importante para la ruptura folicular y la luteinización. La LH participa en el control del cuerpo lúteo, aunque sus efectos dependen de las especies. **(1,6)**

Las concentraciones circulantes aumentan rápidamente hasta alcanzar el máximo unas 48 horas antes de que se produzca la mayoría de las ovulaciones (las mismas pueden producirse en un período de 72 horas). Este máximo tiene

lugar generalmente al final del proestro o comienzo del estro, hasta ahora es también luteotrófica (mantiene el funcionamiento de los cuerpos lúteos). **(1,6)**

4.2.4 Estrógenos

Hormonas esteroides producidas por los folículos en crecimiento, principalmente *17 α -estradiol*, *17 β -estradiol* y estrona, algunos de los cuales pueden ser conjugados. Las concentraciones circulantes aumentan un poco durante algunos días antes del inicio del proestro, posteriormente se produce un aumento brusco de sus concentraciones en sangre, alcanzando el máximo unas 48 horas antes de la oleada de LH. **(1)**

Los estrógenos causan varias respuestas tisulares importantes: 1) Estimula el crecimiento de las glándulas endometriales, necesario para el mantenimiento del cigoto antes de la implantación; 2) Estimula el crecimiento de los conductos de la glándula mamaria; 3) Causa actividad secretora en las trompas uterinas, lo que favorece la supervivencia del óvulo y el espermatozoide; 4) Inicia la receptividad sexual; 5) Regula la secreción de gonadotropina, incluida la liberación ovulatoria de LH de la adenohipófisis; 6) Son los responsables del desarrollo del tracto genital en la pubertad y los caracteres sexuales secundarios; 7) Inducen el desarrollo del epitelio ciliado y originan un aumento en la vascularización e hiperemia en los órganos reproductores, provocando la congestión y ampliación de las fimbrias para favorecer el proceso de la ovulación; 8) Inducen la formación de edema en útero, vagina y vulva; 9) Regulan la foliculogénesis colaborando con la FSH. 10) Son responsables del crecimiento y queratinización del epitelio vaginal durante el estro, originando una marcada cornificación de éste. **(6,1)**

4.2.5 Progesterona

Una hormona esteroide producida por los cuerpos lúteos, durante la fase lútea del ciclo y por éstos y la placenta durante la gestación. Las concentraciones circulantes empiezan a aumentar cuando los estrógenos alcanzan un máximo. En la mayoría de las especies domésticas, el cuerpo lúteo produce cantidades significativas de progesterona dentro de las 24 horas siguientes a la ovulación. Las concentraciones máximas se alcanzan unos 20 días después de finalizado el estro, se encuentre la perra en gestación o no. Posteriormente se produce un descenso gradual en sus valores hasta ser mínimos unos 60-70 días después de la ovulación. **(1,2,6)**

La progesterona y los estrógenos actúan sinérgicamente. La progesterona modifica el endometrio uterino de la fase proliferativa a la fase secretora, esta última se caracteriza por una mayor ramificación de las glándulas uterinas, las cuales secretan la leche uterina para nutrir al embrión e impedir su expulsión, por lo que la progesterona es necesaria para el mantenimiento de la gestación. **(6)**

4.2.6 Prolactina

Producida y liberada por la adenohipófisis de forma pulsátil, estimula la secreción de leche y provoca el crecimiento de la glándula mamaria durante la preñez. Mantiene tanto el cuerpo lúteo como el de gestación, estimula la síntesis de receptores de LH en el ovario y participa también en el control de la espermatogénesis. La prolactina no es una hormona de origen placentario, pero aumenta durante la última parte de la gestación debido al efecto de los estrógenos sobre su liberación en la adenohipófisis. **(2,6)**

4.2.7 Andr6genos

Se desconocen las funciones de estas hormonas en la perra, las concentraciones de testosterona en sangre alcanzan su m1ximo al mismo tiempo que la LH. Las concentraciones de androstenediona son elevadas durante la etapa final del proestro y la gestaci3n y van seguidas de cerca por las de progesterona. **(1)**

4.2.8 Prostaglandinas

La producci3n espont1nea de prostaglandinas por el 6tero no es responsable de la lisis de los cuerpos l6teos, tal como sucede con otras especies, los cuerpos l6teos de la perra parece ser que dejan de ser funcionales de forma gradual debido bien a la ausencia de un apoyo tr6fico (posiblemente LH y/o prolactina) o porque tienen un ciclo vital limitado. La prostaglandina provoca la lisis final de los cuerpos l6teos de la gestaci3n que en este momento producen muy poca progesterona en comparaci3n con momentos anteriores. **(12)**

4.3 Ciclo estral de la perra

Los perros llegan a la pubertad entre los 6 y 12 meses de edad, las razas peque1as llegan antes a la pubertad que las razas grandes. El intervalo del ciclo estral es excepcional por su duraci3n, cuyo promedio es aproximadamente de 7.5 meses, la raza afecta al intervalo del ciclo estral, la gestaci3n tambi3n afecta la duraci3n de los intervalos entre los ciclos estrales, los intervalos tienden a aumentar junto con el n6mero de gestaciones. Los estadios del ciclo estral son proestro, estro, diestro y anestro. El ciclo estral de la perra se caracteriza por la larga duraci3n de sus etapas, el proestro dura de 7 a 10 d1as, el estro dura de 7 a 10 d1as, el diestro de 75 a 80 d1as y el anestro dura de 75 a 175 d1as. El intervalo interestral puede ser regular o variable para cada perra particular. Luego de los 8

años de edad, la duración y frecuencia de los ciclos se vuelve menos regular y el intervalo interestral se incrementa. **(5,15)**

El proestro se define como el período en el cual la perra es sexualmente atractiva pero rechaza los avances del macho, hasta la primera aceptación del mismo. Sin embargo, los signos conductuales tempranos son indiferenciables. Por lo tanto, como marca el primer día del proestro es frecuente la utilización del comienzo de la secreción vaginal serosanguinolenta e inflamación vulvar. Durante el estro, la vulva comienza a encogerse y ablandarse. La secreción vaginal suele persistir, pero por lo general disminuye. Puede permanecer serosanguinolenta o adquirir un color pajizo. El diestro comienza cuando la perra ya no acepta al macho. **(5)**

Más allá de esta clasificación del ciclo basada en el comportamiento, también es posible concentrarnos en la función ovárica y clasificarlo en fases folicular, de luteinización preovulatoria y ovulación, luteal y anestro. **(5)**

4.3.1 Fase folicular

Los folículos terciarios a medida que se desarrollan en los ovarios producen estradiol, el cual alcanza niveles plasmáticos máximos de 180 a 370 pmol/L en el proestro tardío uno a dos días antes de la secreción preovulatoria de hormona luteinizante (LH). En la inspección laparoscópica, la bolsa ovárica dificulta la visualización del desarrollo folicular. Además hasta la mitad del proestro, el desarrollo folicular se observa solo como áreas claras grisáceas en la superficie ovárica, con límites indefinidos. Dichas zonas gradualmente se transforman en folículos vesiculares diferenciables, llenos de líquido, los cuales protruyen claramente sobre la superficie ovárica. Los signos externos del proestro como la hiperemia, edema de la vulva y secreción vaginal sanguinolenta, son causados por

las concentraciones incrementadas de estradiol. Esto también provoca la elongación e hiperemia de los cuernos uterinos, agrandamiento del cérvix y engrosamiento de la pared vaginal. En los hisopados vaginales, incrementa el porcentaje de células superficiales y desciende el de células parabasales e intermedias pequeñas. Los eritrocitos son numerosos y los leucocitos se observan en la fase folicular temprana, pero desaparecen a medida que progresa la cornificación. **(5)**

A medida que progresa la fase folicular, dominan las células superficiales. Sin embargo, debe comprenderse que a pesar de que la citología vaginal proporciona un indicador del estadio del ciclo, no es confiable para conocer el momento del pico de LH preovulatoria o de la ovulación. Mediante vaginoscopía se puede observar que los pliegues de la mucosa vaginal están inflamados, pálidos y tienen superficies lisas y redondeadas. Las concentraciones elevadas de estradiol con frecuencia provocan hipertrofia del piso de la vagina posterior, inmediatamente en craneal del orificio uretral y por lo tanto, éste se pliega sobre dicho orificio cubriéndolo. **(5)**

Hacia el final de la fase folicular, es decir, durante la declinación de la concentración plasmática de estradiol y el aumento de la progesterona en sangre, comienza el encogimiento vaginal en respuesta a la menor retención de agua dependiente del estradiol. Estos cambios cíclicos son más marcados en el pliegue mediano dorsal y preceden a aquellos que afectan a la mucosa mesovaginal. **(5)**

Tanto la concentración plasmática de LH como la de hormona folículo estimulante (FSH) son relativamente bajas durante la fase folicular. Los niveles plasmáticos de progesterona inicialmente permanecen bajos, pero fluctúan y se incrementan durante la segunda mitad de la fase folicular, como resultado de la luteinización parcial de los folículos. **(5)**

4.3.2 Luteinización preovulatoria y ovulación

Por lo general el pico de LH preovulatoria, comienza uno a dos días después del pico de estradiol y coincide con la declinación de la concentración plasmática de estradiol y el incremento de la concentración de progesterona. Durante el pico de LH preovulatoria ocurre una luteinización rápida y extensa. Por lo tanto, los folículos ovulatorios poseen muchas de las características de los cuerpos lúteos de rápido desarrollo. La mayoría de los óvulos en el canino son liberados en un estadio inmaduro, como oocitos primarios. El proceso de la ovulación puede tener una duración de hasta 24 horas. En los primeros 2 a 3 días luego de la ovulación, los oocitos maduran, es decir, experimentan la primera división meiótica y la extrusión del primer cuerpo polar, luego de lo cual puede ocurrir la fertilización. Las concentraciones plasmáticas de progesterona en el momento del pico de LH son de 6 a 13 nmol/L y el momento de la ovulación, 36 a 48 horas más tarde, de 15 a 25 nmol/L. En forma concurrente con el pico de LH, se produce un aumento preovulatorio de la FSH, que alcanza su concentración máxima 1 a 2 días después de aquel. El comportamiento de estro por lo general comienza de forma sincrónica con el pico de LH preovulatoria, pero algunas perras demuestran este comportamiento algunos días antes o después de dicho pico. Algunas hembras, sin embargo, no exhiben comportamiento de estro durante la fase folicular, ovulación o período de fertilización. El encogimiento de la mucosa vaginal comienza aproximadamente hacia la mitad de la fase folicular y continúa durante la fase de luteinización preovulatoria y ovulación, pudiéndose observar varios pliegues longitudinales. **(5)**

4.3.3 Fase luteal

Las concentraciones de progesterona que se originan a partir de los cuerpos lúteos se incrementan en la sangre periférica durante lo que queda del estro y el comienzo del diestro. Así, se observa comportamiento de estro en el

período de elevación de la concentración de progesterona en plasma. Las concentraciones elevadas de progesterona se estabilizan a los 10-30 días del pico de LH. De allí en más, en las perras no gestantes, la secreción de progesterona declina lentamente y alcanza un nivel basal de 3nmol/L por primera vez alrededor de 75 días después del inicio de la fase luteal. **(5)**

Durante la parte inicial de la fase luteal, toma lugar la transición del estro al diestro. En este período, la citología de la mucosa vaginal cambia de las células superficiales originales, a una mayoría de células intermedias y parabasales y leucocitos. Esto es una indicación de que el período fértil ha expirado. Durante el período de maduración de los oocitos, continúa la contracción de la mucosa vaginal y aparecen cada vez más perfiles apicales de bordes angulosos. En el período de transición del estro al diestro, la mucosa se adelgaza y los perfiles se vuelven redondeados. Al comienzo del diestro, pueden observarse áreas alternadas rojizas y blancas. **(5)**

La prolactina actúa como un factor luteotrófico en la segunda mitad de la fase luteal. Durante la primera mitad de la fase luteal, el cuerpo lúteo canino funciona con independencia del soporte pituitario. Después, la inhibición de la secreción de prolactina produce una disminución aguda en la secreción de progesterona. Si la LH posee o no propiedades luteotróficas en la perra todavía no está claro. Los niveles de LH durante la fase luteal sufren muy pocas modificaciones, con la excepción de un pequeño incremento en la segunda mitad de esta fase. **(5)**

Los factores responsables de la iniciación de la regresión de los cuerpos lúteos en caninos aún se desconocen. La prostaglandina $F_{2\alpha}$ originada a partir del endometrio no es un factor determinante. Esto se ha demostrado por el hecho de que la histerectomía no influye en la duración de la fase luteal. **(5)**

La secreción de prolactina fluctúa. En la mayoría de las perras no gestantes, las concentraciones plasmáticas de prolactina varían muy levemente durante las fases folicular y luteal (alrededor de $7\mu\text{g/L}$). **(5)**

4.3.4 Anestro

El momento del comienzo del anestro depende del criterio que se está utilizando para definir el final de la fase luteal, tales como pasados 2 a 3 meses cuando se interrumpe el desarrollo mamario, primera vez que la concentración plasmática de progesterona alcanza un nivel por debajo de 3nmol/L , o el momento en el cual ya no es evidente la influencia de la progesterona sobre el endometrio. En cualquier caso, la transición de la fase luteal al anestro es gradual y varía de manera considerable entre las hembras caninas. Las concentraciones plasmáticas de estradiol por lo común son bajas y no comienzan a incrementarse hasta la proximidad del siguiente proestro, aunque se observan elevaciones esporádicas. Las concentraciones plasmáticas de FSH por lo general son mayores que las del proestro. Las concentraciones plasmáticas promedio de LH son bajas. Existe un indicio de que se produce un período corto de aumento de los pulsos de la LH al final del anestro. En el anestro avanzado, se incrementa la sensibilidad de las respuestas de la LH a diversas dosis de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). **(5)**

4.4 Examen de la perra

El manejo reproductivo comienza con el examen general, seguido por revisiones secuenciales. Durante la parte ginecológica de la primera revisión se debe poner especial énfasis en la palpación del útero y la evaluación digital de la vagina. Los siguientes ítems deben ser examinados día por medio, comenzando 5 a 6 días luego del inicio del proestro: La vulva (tamaño, tumefacción), secreción vaginal (cantidad, color) y parámetros vaginoscópicos y citológicos. Además se

debe solicitar al propietario que observe los cambios de comportamiento compatibles con el estro. El comportamiento estral por lo general ocurre de manera sincrónica con el pico de LH preovulatoria, pero dicha conducta puede observarse algunos días antes o después del pico de LH, o puede no presentarse, Las revisiones repetidas se llevan a cabo para determinar si el ciclo progresa con normalidad. Las observaciones vaginoscópicas y citológicas que no coinciden con el estadio esperado del ciclo pueden ser signos de una alteración de la fertilidad, la cual puede o no ser seria. **(5)**

Deben llevarse a cabo también revisiones secuenciales para determinar el período de ovulación. Debido a la duración variable del proestro y estro, debe quedar claro que aparear a la hembra en días preestablecidos del ciclo, brindará resultados poco constantes. Aunque el apareamiento de acuerdo al comportamiento estral producirá mejores resultados, aún así algunas perras serán apareadas demasiado pronto y otras demasiado tarde. Por lo tanto, es importante la determinación del período de ovulación. Se han descrito varios métodos para la determinación del período de ovulación y el momento adecuado para el apareamiento. Los métodos principales son la medición de la concentración plasmática de progesterona y la vaginoscopia. Las concentraciones plasmáticas de progesterona deberían, lo mismo que las demás revisiones, ser determinadas día por medio. Las concentraciones plasmáticas de progesterona se incrementan levemente en el momento del pico de LH preovulatoria y rápidamente al comienzo de la ovulación. En este momento, la concentración plasmática de progesterona excede los 16nmol/L. El comienzo del período óptimo para el apareamiento es 24 horas más tarde y está basado en el tiempo necesario para la maduración de los oocitos, capacitación y promedio de vida del espermatozoide. **(5)**

La determinación del pico de LH preovulatoria podría también proveer un parámetro excelente para la estimación del momento de ovulación. Sin embargo, se requieren muestras de sangre más frecuentes que para la progesterona debido

al riesgo de perder el pico de LH preovulatoria. La vaginoscopía también puede utilizarse para tratar de establecer el momento de la ovulación. Sin embargo, los cambios en la mucosa se producen en respuesta a las fluctuaciones hormonales y por lo tanto, son cambios secundarios. Asimismo, la interpretación de dichos cambios es subjetiva. La vaginoscopía entonces, resulta un método menos confiable para la estimación del momento de la ovulación que la medición de los niveles hormonales. La citología vaginal es de utilidad para el diagnóstico del proestro temprano, progresión proestro-estro o diestro. No existen, sin embargo, cambios confiables en el extendido indicativos de la onda de LH preovulatoria o de la ovulación. Por último, la ultrasonografía, no es un método confiable para la determinación del momento de la ovulación. **(5)**

4.5 Citología vaginal exfoliativa

El principio de la citología vaginal exfoliativa se basa en determinar el tipo y cantidad de células de las diferentes etapas del ciclo estral ya que los cambios hormonales que sufre la mucosa vaginal durante el ciclo estral, se refleja en la morfología de sus células epiteliales. Al principio del ciclo la célula epitelial está en contacto con la irrigación sanguínea. Conforme los niveles de estrógenos se incrementan, el epitelio vaginal se va engrosando ocasionando que la célula epitelial se vaya separando del aporte sanguíneo dando como resultado una transformación celular que va de célula parabasal a célula anucleada o escama. **(7)**

La interpretación de los frotis se realiza de acuerdo al predominio de los distintos tipos celulares presentes, los cuales pueden ser orientativos de las diferentes etapas del ciclo estral canino, estos tipos celulares son:

- **Anestro**

- **Células epiteliales:** Son principalmente células redondas con núcleos activos y mucho citoplasma. Las células más pequeñas (células parabasales) proceden de las cercanías de la membrana basal de la mucosa; las células mayores son producidas mediante división celular y se denominan células intermedias.
- **Neutrófilos:** Su número es generalmente entre reducido y moderado.
- **Eritrocitos:** Ausentes.
- **Bacterias:** Generalmente ausentes. **(1)**

- **Proestro**

- **Células epiteliales:** El número de células grandes intermedias aumenta en el frotis inmediatamente antes y también durante el inicio del proestro; hacia el final del proestro aumenta la proporción de células que aparecen queratinizadas, es decir, laterales más rectos y con núcleos menores.
- **Neutrófilos:** Presentes en pequeño número inicialmente, aunque gradualmente desciende su número; ausentes generalmente al final del proestro.
- **Eritrocitos:** Normalmente aparece un gran número hasta el final de esta fase, aunque el número carece de importancia clínica; algunas veces aparecen lisados en las preparaciones procedentes del frotis.
- **Bacterias:** El número de bacterias (solamente visible con determinadas tinciones) aumenta hasta el final del proestro. **(1)**

- **Estro**

- **Células epiteliales:** Al inicio del estro se produce una cornificación (queratinización) máxima, es decir entre el 60 y 90% de las células se presentan laterales rectos y núcleos pequeños (picnóticos) o carecen de núcleos (entonces son llamadas escamas).
- **Neutrófilos:** Generalmente ausentes hasta el final del estro.
- **Eritrocitos:** Pueden estar ausentes, o aparecer pocos o muchos; su número carece de importancia clínica.
- **Bacterias:** Aparece generalmente un gran número hasta el final del estro. **(1)**

- **Diestro**

- **Células epiteliales:** Al final del estro todas las células vaginales son intermedias o parabasales, y aparece un gran número de las mismas; según avanza el metaestro descende el número de células que son similares a las del anestro.
- **Neutrófilos:** Al final del estro se produce un flujo masivo de estas células; según avanza el metaestro descende su número aunque todavía aparecen algunas.
- **Eritrocitos:** Generalmente ausentes aunque pueden verse en el inicio del metaestro y carecen de importancia clínica.
- **Bacterias:** Desaparecen totalmente al final del estro, coincidiendo con el flujo de neutrófilos y la aparición de mucus y residuos. **(1)**

4.5.1 Toma de muestra

Para tomar muestras para una citología vaginal se recomienda el uso de guantes y se introduce un hisopo estéril por la comisura dorsal de los labios vulvares, previa limpieza de éstos. Se debe hacer suavemente hasta atravesar la unión vestíbulo-vaginal para llegar a la porción caudal de la vagina, en la cual, mediante movimientos circulares del hisopo, se colecta el material celular. Hecho esto, se retira el hisopo y se hace un frotis por rodamiento en un portaobjetos, se fija en alcohol al 95% durante 5-10 minutos y se tiñe para observarla al microscopio. (7)

4.5.2 Tinciones de los frotis vaginales

Todas las tinciones para procesar las muestras pueden ser de utilidad. Sin embargo, el Médico Veterinario debe usar aquella técnica que resulte práctica, barata, que no se deteriore al almacenar los frotis por mucho tiempo y que proporcione una buena observación de la morfología celular para llegar a un diagnóstico efectivo. (7)

4.5.2.1 Método de Shorr

- **Ventajas**

- Permite diferenciar células epiteliales queratinizadas (color naranja) y no queratinizadas (color azul).
- A partir de esto puede calcularse un índice de queratinización (índice eosinofílico).

- **Desventajas**

- No existe un valor absoluto del índice eosinofílico que indique el momento de la ovulación.

- El método de tinción es complicado si se realizan tinciones individuales y los componentes deben ser filtrados o renovados con regularidad. **(1)**

4.5.2.2 Azul de Metileno

Verter el colorante sobre una extensión secada al aire durante 5-20 minutos; arrastrar con agua el exceso de colorante y examinar inmediatamente.

- **Ventajas**

- Muy simple.
- Rápida.

- **Desventajas**

- El examen de extensiones húmedas a grandes aumentos provoca muchas veces condensaciones sobre las lentes del objetivo. **(1)**

4.5.2.3 Tinción de Leishman

Cubrir la extensión secada al aire con 2 ml de colorante y dejar en reposo durante 2-3 minutos. Añadir 2 ml de tampón fosfato con suavidad de forma que la tensión superficial evite el goteo; se descubrirá un brillo metálico sobre la superficie del colorante diluido. Transcurridos 20 minutos lavar el colorante con agua y dejar secar.

- **Ventajas**

- Relativamente simple.
- Rápida.

- **Desventaja**

- La extensión se secará si se deja olvidada. **(1)**

4.5.2.4 Diff-Quik (Merz y Dade)

La extensión secada al aire se baña seis veces en cada una de las tres soluciones, se lava inmediatamente con agua y se deja secar.

- **Ventajas**

- Rápida.
- Proporciona resultados firmes.

- **Desventajas**

- Es un procedimiento caro.
- Una de las soluciones (fijador) se evapora con rapidez, incluso sin utilizarla.
- Las soluciones deben cambiarse con frecuencia. **(1)**

4.5.3 Interpretación de los frotis vaginales

4.5.3.1 Determinación del momento óptimo para la cubrición

Constituye un método indirecto de control de los acontecimientos hormonales, resulta limitada la posibilidad de anticipar cambios futuros. Se debe realizar el primer frotis unos 5 días después de observar las manifestaciones iniciales de proestro, ya que algunas perras pueden estar próximas a ovular en este momento. Dependiendo del contenido celular, se debe repetir los frotis cada 2-3 días. **(1)**

Probablemente no sea importante la determinación del día exacto en que se recomiende el apareamiento debido a la longevidad de los óvulos de la perra y del semen del perro; la ausencia de neutrófilos y la queratinización de la mayoría de las células epiteliales junto con la presencia de muchas bacterias indican que el apareamiento se realizará en 2 días. La inseminación artificial puede realizarse el primer día de la afluencia de neutrófilos si los frotis son examinados diariamente; la perra no permitirá una cubrición normal en este momento. **(1)**

4.6 Ensayo hormonal en perras

El ensayo hormonal es la medición más exacta del momento de la ovulación en las perras. Las dos hormonas analizadas comúnmente para manejo de servicio son la hormona luteinizante (LH) y la progesterona. La muestra preferida es suero, la misma no debe ser lipémica ni hemolizada. La prueba debe ser ejecutada el mismo día que se colecta el suero, si no es posible, el suero debe ser refrigerado hasta que la prueba pueda ser ejecutada. **(10)**

4.6.1 Ensayo de hormona luteinizante (LH)

La LH es una hormona proteica que puede ser medida por medio de ensayos cualitativos o semi-cuantitativo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), esta última es una prueba que ha demostrado dar resultados consistentes con un radioinmunoanálisis preciso (RIA). Debido a que la duración del pico de LH es corto en las perras, las muestras se deben tomar diariamente, aproximadamente a la misma hora. Por lo general los fabricantes recomiendan que esta prueba sea verificada por la medición de progesterona sérica. **(10)**

4.6.2 Ensayos de progesterona

La determinación de la progesterona por ensayos cuantitativos, tales como RIA o quimioluminiscencia, permite la predicción de la ovulación. El tiempo para obtener los resultados puede ser tan corto como 24 horas en algunos laboratorios de diagnóstico veterinario. La medición de progesterona por medio de ensayos semi-cuantitativos de ELISA, también se pueden utilizar para estimar el momento de la ovulación en la perra. La ventaja primaria de éstos, es su tiempo corto de análisis, los resultados pueden estar disponibles tan rápido como 20 minutos después de tomada la muestra de sangre. **(10)**

4.7 Almohadillas de ovulación

Estas almohadillas de ovulación se utilizan para determinar la presencia de hormona luteinizante (LH) en la secreción vaginal de las perras. Solamente funcionan en las perras, ya que la LH es específica para cada especie. Al realizar la prueba, se lleva a cabo un cambio de coloración de rosa a púrpura en las almohadillas cuando éstas entran en contacto con las secreciones vaginales conteniendo la LH. **(3)**

4.7.1 Fundamento de la prueba

Durante el ciclo estral de la perra, ocurre un sangrado que se origina de la preparación del endometrio para la implantación de los huevos fertilizados. Existe un gran desarrollo de las glándulas endometriales y de los vasos sanguíneos, lo que provoca una filtración de glóbulos rojos hacia la luz uterina llamada diapédesis. Junto con esta gran cantidad de glóbulos rojos, son transportadas además considerables cantidades de hormonas. Las almohadillas de ovulación se basan en la detección de los niveles de hormona luteinizante (LH), que se elimina en el exudado vaginal. **(13)**

4.7.2 Procedimiento de la prueba

Se procede a limpiar el área de la vulva y alrededor de la misma, se coloca la almohadilla de ovulación suavemente de lado dentro de la vulva de 1 a 3 centímetros aproximadamente durante 10 a 15 segundos, sacar la almohadilla y esperar de 30 a 60 segundos más y observar la coloración obtenida. **(3)**

Se recomienda no tocar la parte rosada de la almohadilla, ya que puede haber un resultado falso o incorrecto. Si la almohadilla comienza a cambiar de color rosado a púrpura, incluso si solo hay una pequeña mancha en una esquina, se trata de un resultado positivo. **(3)**

4.8 “Kit” de ovulación canina para medición de progesterona

Con este “kit” es posible detectar el aumento de la progesterona en sangre. El nivel de progesterona antes de la ovulación es bajo (entre 0 a 1.0 ng/ml), esto corresponde a un resultado azul brillante de la prueba; cuando el aumento de la progesterona se produce, el resultado de la prueba es azul claro hasta llegar a blanco, todo esto se puede determinar comparándolo en la carta de colores de la prueba. **(8)**

4.8.1 Procedimiento de la prueba

La muestra de sangre se puede colectar en un tubo con EDTA o heparina o bien en un tubo seco, inmediatamente después de tomada la muestra se gira suavemente el tubo con el fin de mezclar bien los componentes con la muestra. **(8)**

Se puede dejar que la sangre se coagule a temperatura ambiente por media a 1 hora o bien utilizar una centrífuga. Luego se vierte el suero colectado en un tubo de vidrio estéril. Si la prueba no se ejecuta inmediatamente, se debe

almacenar refrigerada, si es a largo plazo se debe congelar. Se debe permitir que todos los componentes de la prueba y la muestra alcancen la temperatura ambiente para poder realizar la prueba. **(8)**

4.8.2 Directrices para validación de la prueba

- Una muestra de suero se debe realizar en los primeros días del proestro, con el fin de determinar el nivel de progesterona de referencia. El nivel de partida de progesterona varía entre 0-1 ng/ml y da un resultado azul brillante, el cual deberá compararse con la carta de colores del “kit”.
- Comenzar las pruebas para determinar el aumento inicial de progesterona entre 11-13 días después de observar el primer día de sangrado vaginal e inflamación vulvar, si el primer resultado es de color azul brillante, entonces los niveles de progesterona son aún muy bajos.
- Repetir cada dos días la prueba hasta que los resultados den color azul claro comparado en la carta de colores. El cambio de azul brillante a azul claro representa el aumento inicial en el nivel de progesterona, produciéndose la ovulación 1-2 días después.
- Cuando los resultados son azul claro por varios días, significa que el óvulo comienza a madurar y el período fértil comienza 2-3 días después. Luego de obtener un color azul aún más claro, casi blanco, se debe realizar la monta natural o inseminación con semen fresco en 2-3 días y repetir en dos días. Si se insemina con semen congelado, se repite cada dos días para un total de 3 veces.
- Si el resultado que se obtiene es blanco, el apareamiento o inseminación debe realizarse inmediatamente. **(8)**

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Recursos humanos

- 1 estudiante investigadora
- 3 asesores Médicos Veterinarios de Trabajo de Graduación

5.1.2 Recursos biológicos

- Hembras caninas de diferente raza en celo.

5.1.3 Recursos físicos y de laboratorio

- Almohadillas de ovulación
- “Kit” de progesterona, el cual consta de:
- 1 pipeta pequeña
- 1 copa
- 1 gotero
- 1 frasco de enzima con gotero
- 1 frasco de solución de lavado con gotero
- 1 frasco de sustrato A con gotero
- 1 frasco de sustrato B con gotero
- 1 frasco estéril pequeño
- Tabla de interpretación de la prueba
- Papel absorbente
- Guantes de látex
- Hisopos estériles de madera
- Portaobjetos

- Alcohol
- Tinción azul de metileno
- Pinzas plásticas
- Bandeja de acero inoxidable
- Cronómetro
- Microscopio
- Jeringas descartables
- Tubos de ensayo secos
- Hielera
- Hielo seco
- Ficha de toma de datos
- Lápiz y lapicero
- Cámara fotográfica
- Bolsas para basura
- Material y equipo de oficina (computadora, impresora, calculadora, papel bond)
- Vehículo

5.2 Metodología

5.2.1 Descripción del área

La ciudad capital de Guatemala se encuentra localizada en el área sur-centro del país, en el Valle de la Ermita. Con alturas que varían entre 1500-1600 msnm, posee temperaturas entre los 12 y 28°C. Goza de un clima caracterizado como Bosque húmedo subtropical templado según la clasificación de Holdridge. El departamento de Guatemala limita al norte con Baja Verapaz, al este con El

Progreso, Jalapa y Santa Rosa; al sur con Escuintla y al oeste con Sacatepéquez y Chimaltenango. **(9,14)**

5.2.2 Criterios de inclusión

Se utilizó un grupo de 27 hembras caninas de diferente raza, con edades comprendidas entre 3 a 5 años, sin antecedentes de problemas reproductivos; en etapa de celo, según la citología vaginal (60% a 90% de células cornificadas), localizadas en clínicas veterinarias y casas particulares de la ciudad de Guatemala.

5.2.3 Metodología de las pruebas específicas

Del grupo de hembras caninas, se tomó un total de veintisiete muestras para evaluar dos métodos de ELISA, uno de los cuales mide niveles de hormona luteinizante (LH) en la mucosa vaginal, el cual fue comparado con un método que mide los niveles séricos de progesterona. La determinación del celo se llevó a cabo previa citología vaginal, como se describe en el inciso 5.2.2. Se midió la exactitud de ambas pruebas, así como la facilidad de su realización y el costo.

5.2.3.1 Citología vaginal

Para la realización de la citología vaginal se utilizaron guantes de látex. Se procedió a la limpieza de la vulva con papel absorbente, luego se introdujo un hisopo estéril de madera suavemente por la comisura dorsal de los labios vulvares hasta atravesar la unión vestíbulo-vaginal para llegar a la porción caudal de la vagina, mediante movimientos circulares con el hisopo, se colectó el material celular.

Hecho esto, se retiró el hisopo y se realizó un frotis por rodamiento en un portaobjetos, se fijó con alcohol al 95% durante 7 minutos y se tiñó con azul de metileno por 12 minutos y luego se lavó con agua, se dejó secar al medio ambiente para observarla al microscopio. En el momento de observar un 60% a 90% de células cornificadas, se procedió a la realización de las dos pruebas siguientes.

5.2.3.2 Almohadillas de ovulación

Se procedió a realizar a cada perra la prueba de las almohadillas de ovulación para la determinación de la presencia de LH en la mucosa vaginal. Para la realización de la prueba, se procedió a limpiar el área de la vulva y alrededor de la misma, con papel absorbente, luego se introdujo de lado suavemente de 1 a 3 centímetros a través de la vulva la almohadilla de ovulación, durante aproximadamente 10 a 15 segundos, se sacó la almohadilla y se esperó de 30 a 60 segundos más y se procedió a observar la coloración obtenida, la cual debe pasar de color rosa a púrpura y así determinar la presencia de LH.

5.2.3.3 “Kit” de progesterona

Procedimiento

- Se procedió a tomar una muestra de sangre a cada perra de la vena cefálica, dicha muestra se colectó en un tubo de ensayo seco.
- Inmediatamente después se colocó cada tubo a temperatura ambiente por una hora aproximadamente para colectar el suero.
- Con una pipeta nueva se añadieron 4 gotas de la muestra en el centro de la copa y se esperaron dos minutos.
- Se agregaron dos gotas de solución de lavado y se esperó a que la solución se filtrara, este paso se repitió una vez.

- Luego se añadió una gota de enzima y se esperó un minuto.
- Se volvió a llenar la copa con la solución de lavado.
- Se preparó una mezcla de solución fresca de los sustratos A y B, adicionando un gotero de cada uno en un frasco estéril y se agitó bien para mezclar.
- Se agregaron dos gotas del sustrato recién preparado en el centro de la copa y se esperaron 9 minutos para ver los resultados.
- Para la determinación del nivel sérico de progesterona se utilizó la tabla No. 2 que se encuentra en anexos.

5.3 Diseño

No requiere de diseño estadístico por ser un estudio de tipo descriptivo.

5.4 Análisis estadístico

Los datos del presente estudio se analizaron mediante diferencia de porcentajes para evaluar la facilidad de realización y la relación beneficio-exactitud. El análisis económico se realizó a través de la Tasa Marginal de Retorno, con el fin de determinar la relación costo-beneficio de ambas pruebas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente estudio se realizó en la ciudad capital de Guatemala, utilizando un grupo de 27 hembras caninas en período de celo de diferente raza con edades comprendidas entre 3 a 5 años, sin antecedentes de problemas reproductivos de las cuales un 29%, fue de 3 años, un 42% de 4 años y el 29% restante de 5 años. (Cuadro 1, Figura 1). En cuanto a las razas un 25% fue Bulldog Inglés, un 15% Basset Hound, un 15% Pastor Alemán, un 15% Pug, un 15% Caniche y el 15% restante Westie. (Figura 2)

En general hubo presencia de LH en mucosa vaginal a los 7.45 días de inicio del sangrado, cuando la citología vaginal estuvo en promedio de 72.67% de células cornificadas y los niveles de progesterona estuvieron en promedio de 13.28 nmol/L. (Figuras 3 y 4) Dicho patrón endocrino y celular es similar a lo descrito por Ettinger y Feldman, 2002, Allen, 1992 y Morrow, 1986; quienes explican que el incremento en la onda pulsátil de LH parece estar mediada por el descenso en la concentración sérica del 17β estradiol con un incremento concomitante de las concentraciones de P_4 . La duración de la oleada preovulatoria de LH en las perras varía con períodos que oscilan de 24 a 96 horas. La ovulación en la perra puede ocurrir inmediatamente hasta 96 horas después del pico de LH, sin embargo muchas ovulaciones pueden ocurrir entre 24 y 72 horas después de las concentraciones máximas de LH. Como se menciona previamente las concentraciones séricas de P_4 inician su incremento en el proestro tardío, la perra tiene la particularidad única en la cual, el comportamiento estral se exhibe en la etapa de las altas concentraciones de P_4 . La presencia de un patrón de células maduras cornificadas representa el período fértil en perras normales, situación que pudo detectarse en el presente estudio. Esto es un fenómeno natural en esta especie animal, desarrollado con el fin de mejorar la tasa de concepción, ya que debe tomarse en cuenta que antes de que ocurra la ovulación, tiene que ocurrir el fenómeno de capacitación de los espermatozoides para que puedan fertilizar al

óvulo. Además, Morrow, 1986, menciona que se ha visto que los resultados más exitosos en la reproducción de las perras ocurren en los tres días siguientes a la ovulación, momento en que ocurre la fertilización, por lo que las máximas tasas de concepción se alcanzan al cubrir a las perras en este período.

En cuanto a la evaluación de la facilidad de realización utilizando la prueba de Diferencia de Porcentajes se pudo determinar que, las almohadillas de ovulación son de más fácil utilización, reducen el estrés por manipulación y a la luz de los presentes resultados, deben realizarse en promedio entre los 7 y 8 días de iniciado el sangrado en las perras. (Figura 5)

El análisis económico medido a través de la Tasa Marginal de Retorno de las almohadillas de ovulación para la detección de LH comparada con el “kit” para la medición sérica de P_4 fue de 1,828.57%, esto significa que por cada quetzal invertido en la prueba de las almohadillas de ovulación para la detección de LH, se recobró el quetzal invertido más un retorno adicional de Q.18.28. Esto comprueba que la utilización de la prueba de las almohadillas de ovulación para la detección de LH, resultó en mayor beneficio económico que la utilización del “kit” para la detección de progesterona sérica. (Figuras 6 y 7)

Bajo las condiciones del presente estudio y en base al análisis de los datos con diferencia de porcentajes, ambas pruebas tuvieron un comportamiento similar en cuanto a la eficiencia para predecir el momento de la ovulación en perras que ya completaron su madurez sexual.

Los resultados del presente estudio demostraron que la prueba de las almohadillas de ovulación es confiable, más económica y requiere de menor tiempo que el requerido por la prueba de medición del nivel sérico de progesterona en hembras caninas.

VII. CONCLUSIONES

- En cuanto a la facilidad de la realización, las almohadillas son de más fácil utilización y deben realizarse en promedio entre los 7 y 8 días de iniciado el sangrado en las perras.
- La utilización de la prueba de las almohadillas de ovulación, para la detección de LH, resultó en mayor beneficio económico que la utilización del “kit” para la detección de progesterona sérica.
- Ambas pruebas tuvieron un comportamiento similar en cuanto a la eficiencia para predecir el momento de la ovulación en perras que ya completaron su madurez sexual.

VIII. RECOMENDACIONES

- Las pruebas de P₄ deberán ser realizadas en un laboratorio especializado de preferencia veterinario a elección del Médico Veterinario, ya que el uso del “kit” para la detección de P₄ resultó en costos muy elevados.
- Utilizar las almohadillas de ovulación para detección de LH en mucosa vaginal, ya que resultó en costos bajos y de fácil realización.
- Realizar la prueba de las almohadillas de ovulación en promedio entre los días 7 y 8 de iniciado el sangrado en las perras.
- Continuar con nuevos estudios para confirmar la ovulación de las perras que fueran inseminadas o montadas naturalmente, mediante ultrasonido abdominal, para confirmar o no la preñez.

IX. RESUMEN

Se evaluó la utilización de las almohadillas de ovulación para la detección de LH en mucosa vaginal *vs* la medición de P₄ sérica, en hembras caninas de diferente raza, de la ciudad capital de Guatemala, sin antecedentes de problemas reproductivos con edades comprendidas entre tres a cinco años.

En promedio hubo presencia de LH en mucosa vaginal a los 7.45 días de inicio del sangrado, cuando la citología vaginal estuvo en promedio de 72.67% de células cornificadas y los niveles de progesterona estuvieron en promedio de 13.28 nmol/L.

La utilización de la prueba de las almohadillas de ovulación resultó ser de más fácil utilización y deben realizarse en promedio entre los 7 y 8 días de iniciado el sangrado en las perras.

El análisis económico medido a través de la Tasa Marginal de Retorno de las almohadillas de ovulación para la detección de LH comparada con el “kit” para la medición sérica de P₄ determinó que, la utilización de las almohadillas de ovulación, resultó en mayor beneficio económico que la utilización del “kit” para la detección de P₄ sérica.

Bajo las condiciones del presente estudio y en base al análisis de los datos con diferencia de porcentajes, ambas pruebas tuvieron un comportamiento similar en cuanto a la eficiencia para predecir el momento de la ovulación en perras que ya completaron su madurez sexual.

SUMMARY

The use of pads for detecting ovulation LH in vaginal mucosa vrs measuring serum P4 in female dogs of different breed, the capital city of Guatemala, whit out history of reproductive problems aged three to five years was evaluated.

On average there LH on vaginal mucosa to 7.45 days to begin bleeding, when the vaginal cytology was on average 72.67 % of cornified cells and progesterone levels were averaged 13.28 nmol / L.

The use of test pads ovulation proved easier to use and must be made on average between 7 and 8 days to began bleeding in female dogs.

Measured through the Marginal Rate of Return of pads ovulation to detect LH compared with the " kit " for serum measurement of P4 determined that the use of pads ovulation resulted in greater economic benefit economic analysis that the use of " kit " for detecting serum P4 .

Under the conditions of this study and based on the analysis of data with percentage difference , both tests performed similarly in terms of efficiency to predict the time of ovulation in bitches who have completed their sexual maturity.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allen, WE. 1992. Fertilidad y obstetricia canina. Trad. PD Maluenda. Zaragoza, España, ACRIBIA. 248 p.
2. Cunningham, JG. 1999. Fisiología veterinaria. 2 ed. México, D.F. McGraw-Hill Interamericana. p. 513-536
3. Dog breeding pre-mate test pads. (en línea). Consultado 20 dic. 2010. Disponible en <http://www.lapdog.co.nz/DBPMTS.php>
4. Dyce, KM; Sack, WO; Wensing, CJ. 2007. Anatomía veterinaria. 3 ed. México, D.F., El Manual Moderno. p. 215-222
5. Ettinger, SJ; Feldman, EC. 2002. Tratado de Medicina Interna Veterinaria: Enfermedades del perro y el gato. Trad. RA Taibo. 5 ed. Buenos Aires, República Argentina, Inter-Médica, S.A. v. 2, p.1680-1689
6. García, A. 1995. Fisiología veterinaria. Madrid, España, McGraw-Hill Interamericana. p. 678-852
7. Gobello, C. s.f. Citología vaginal canina. Diagnóstico del ciclo estral en la perra. (en línea). Consultado 17 dic. 2010. Disponible en http://www.foyel.com/cartillas/20/confirmando_la_gestacion_en_la_perra.html
8. Hamilton Research Inc. 2003. Target canine ovulation kit. (en línea). Consultado 15 dic. 2010. Disponible en <http://www.equitainer.com/Canine/Target-Canine.htm>

9. Holdridge, LR. 1967. Life Zone Ecology. Tropical Science Center. Ecología basada en zonas de vida. Trad. H Jiménez. San José, Costa Rica. 216 p.
10. Kustritz, R. 2002. Uso de kits comerciales para ensayos de hormonas luteinizante y de progesterona en el manejo reproductivo canino. (en línea). Ithaca, New York, USA. Consultado 14 dic. 2010. Formato PDF. Disponible en <http://www.ivis.org/>
11. Olson, PN; Nett, TM. 1986. Reproductive endocrinology and physiology of the bitch. In Morrow, DA. eds. Current therapy in Theriogenology. Philadelphia, USA. Saunders Company. p. 455-461.
12. Pineda, MH; Dooley, MP. 2003. McDonald's veterinary endocrinology and reproduction. 5 ed. Iowa, USA. Iowa States Press. 624 p.
13. Richard, WN; Couto, CG. 2009. Small animal internal medicine. 4 ed. Missouri, USA. Mosby Elsevier. 1384 p.
14. Scribd Inc. 2012. Departamentos de Guatemala. (en línea). Consultado 17 ago. 2012. Disponible en <http://es.scribd.com/doc/55326543/Los-22-Departamentos-de-Guatemala>
15. Swesson, MJ; Reece, WO. 1999. Fisiología de los animales domésticos de Dukes. Trad. AL Weckman. 5 ed. México, D.F., Limusa, S.A de C.V. p. 678-696

XI. ANEXOS

Cuadro 1. Porcentaje de edades de perras muestreadas con citología vaginal, almohadillas de ovulación y P₄ en la Ciudad de Guatemala, julio-agosto 2012.

Edad en años	%
3	29
4	42
5	29

Figura 1. Porcentaje de edades de perras muestreadas con citología vaginal, almohadillas de ovulación y P₄ en la Ciudad de Guatemala, julio-agosto 2012.

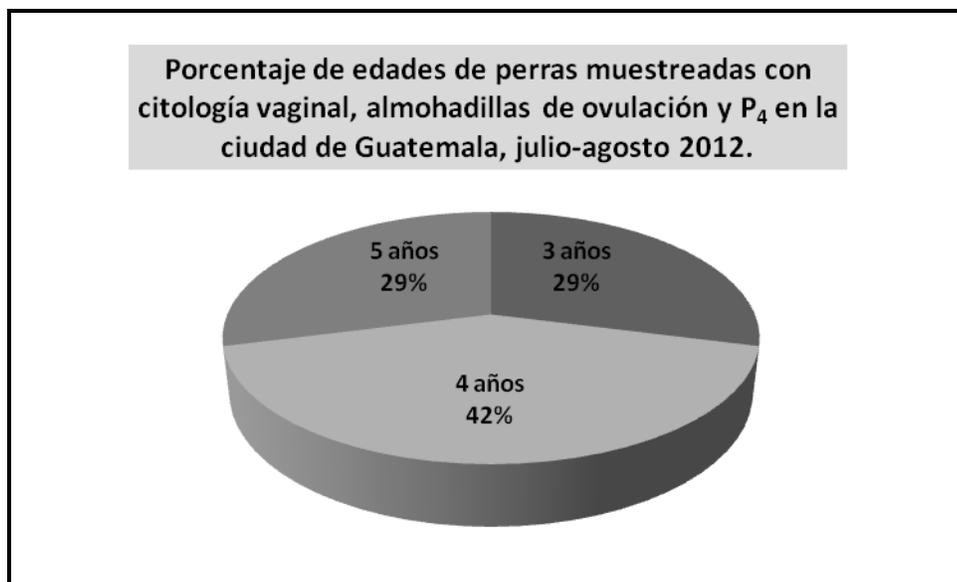


Figura 2. Porcentaje de razas de perras muestreadas con citología vaginal, almohadillas de ovulación y P₄ en la Ciudad de Guatemala, julio-agosto 2012.

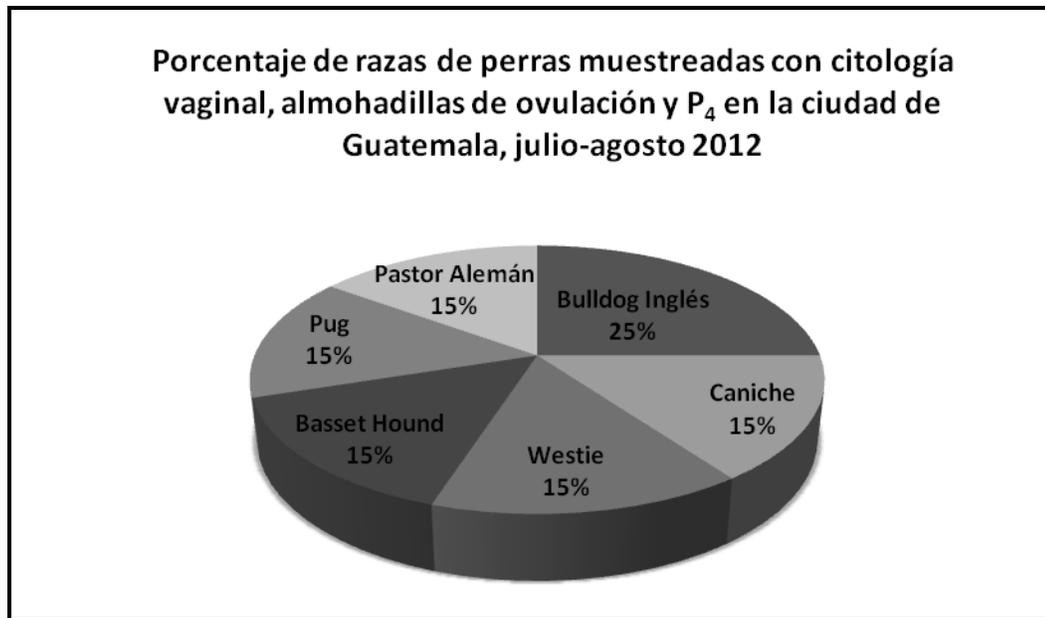


Figura 3. Días de presencia de LH en mucosa vaginal y porcentaje de células cornificadas según citología vaginal en perras muestreadas en la Ciudad de Guatemala, julio-agosto 2012

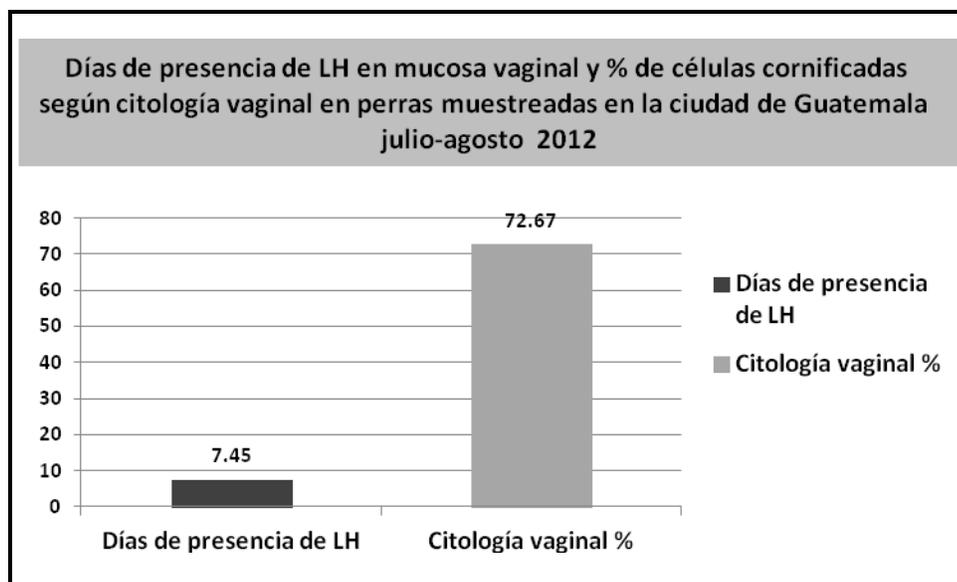


Figura 4. Días de presencia de LH en mucosa vaginal y valores de P₄ encontrados en perras muestreadas en la Ciudad de Guatemala, julio-agosto 2012

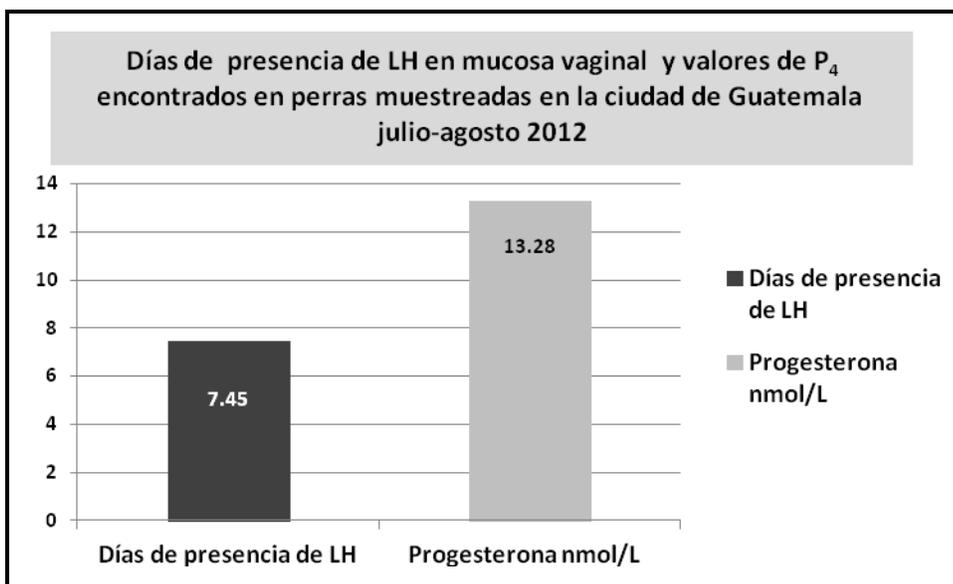


Figura 5. Días de presencia de LH en mucosa vaginal en perras muestreadas en la Ciudad de Guatemala, julio-agosto 2012

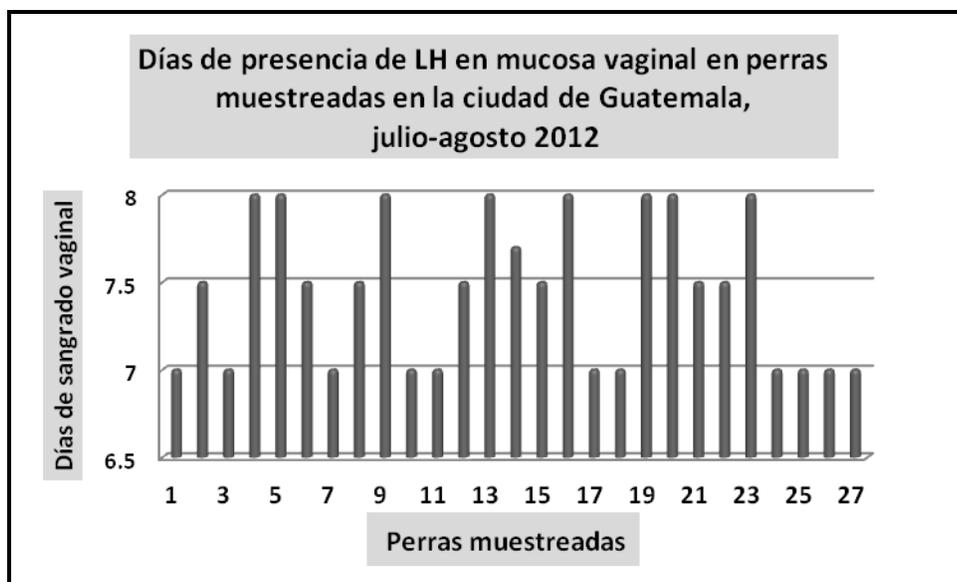


Figura 6. Costos fijos de pruebas para P₄, LH y citología vaginal, realizadas en perras en la Ciudad de Guatemala, julio-agosto 2012

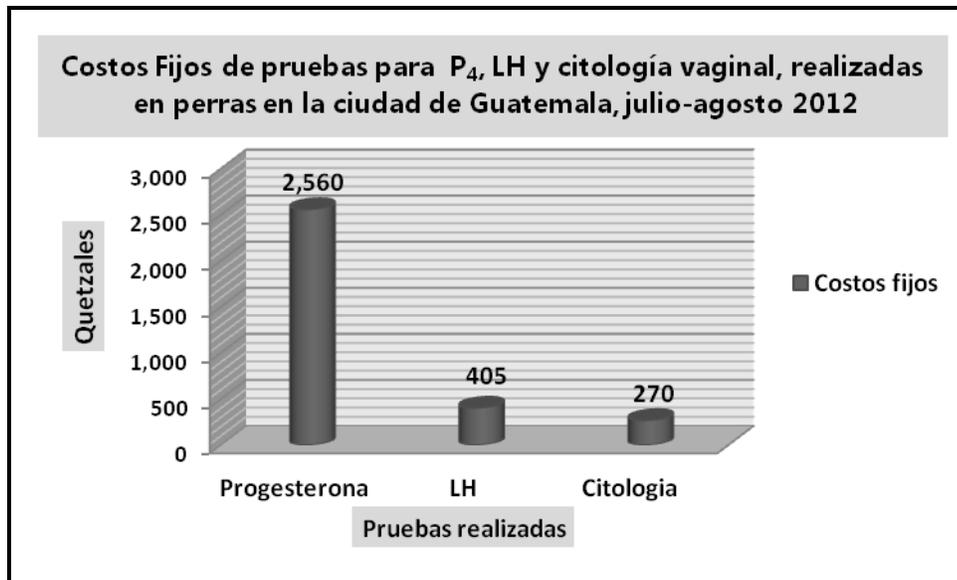
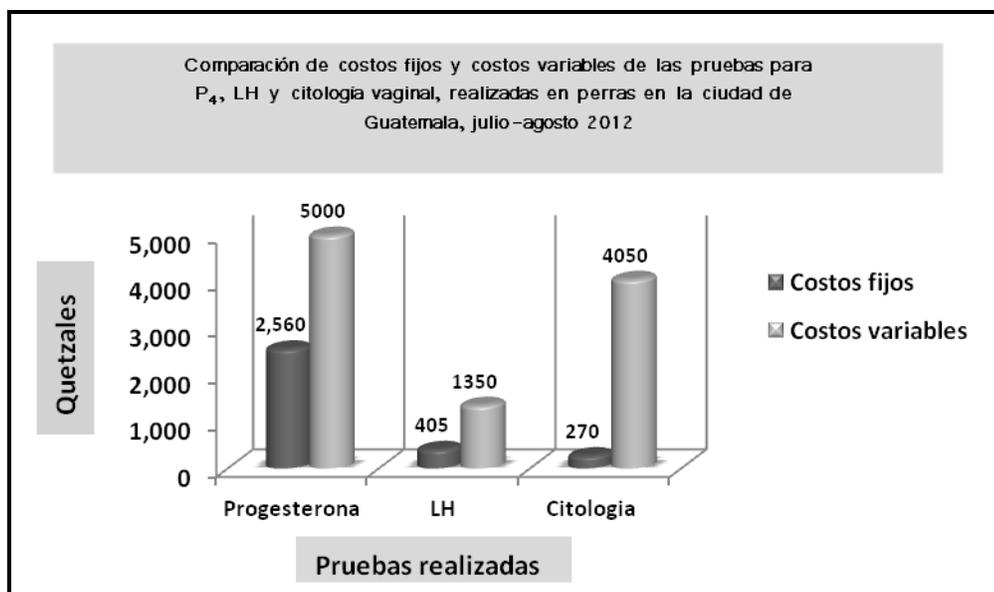


Figura 7. Comparación de costos fijos y costos variables de las pruebas para P₄, LH y citología vaginal, realizadas en perras en la Ciudad de Guatemala, julio-agosto 2012



Cuadro 2. Tabla de interpretación de colores obtenidos en la realización del “kit” de medición sérica de progesterona en hembras caninas.

Color	Progesterona nmol/L	Recomendaciones
Azul brillante (C1)	0 – 3.18	Rechequear cada dos días hasta obtener un azul claro (C2)
Azul claro (C2)	3.18 – 7.95	Rechequear todos los días hasta obtener un azul pálido (C3). Plan para inseminación en 4 a 6 días
Azul pálido (C3)	7.95 – 15.9	Repetir la prueba diariamente. Montar o inseminar en 3 días aproximadamente
Blanco (C4)	> 15.9	Montar o inseminar inmediatamente

Cuadro 3. Ficha para toma de datos del estudio.

FICHA DE DATOS

Número: _____

Nombre del propietario: _____

Dirección: _____

NOMBRE	EDAD	RAZA

Fecha	Días de iniciado el sangrado	Citología vaginal	“Kit” de Progesterona	Almohadillas de ovulación

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RELACIÓN COSTO, BENEFICIO,
EXACTITUD DE LAS ALMOHADILLAS DE OVULACIÓN Y DE LA
MEDICIÓN DEL NIVEL SÉRICO DE PROGESTERONA PARA LA
DETERMINACIÓN DE LA OVULACIÓN EN HEMBRAS CANINAS EN
LA CIUDAD CAPITAL**

ZULMA JOHANA MAYÉN ESTRADA

**M.V. Carlos Efraín Alfaro Argueta
ASESOR PRINCIPAL**

**M.V. Mario Estuardo Llerena Quan
EVALUADOR**

**M.A. M.V. Ligia Anaité
González Quiñónez
ASESORA**

**M.V. Carlos Enrique Camey Rodas
ASESOR**

IMPRÍMASE

**MSc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
DECANO**