



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“COMPARACIÓN DE TRES MÉTODOS UTILIZADOS PARA ELEGIR EL
MOMENTO ÓPTIMO PARA LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN HEMBRAS
CANINAS DE LA RAZA BULLDOG INGLÉS”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA Y ZOOTECNISTA

PRESENTA:

METZTLI XANAT RUVALCABA HERNÁNDEZ

ASESORA:

M en C. ALICIA ALCÁNTAR RODRÍGUEZ

COASESOR:

DR. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

UNIVERSIDAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDEERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

Comparación de tres métodos utilizados para elegir el momento óptimo para la inseminación artificial en hembras caninas de la raza bulldog inglés

Que presenta la pasante: **Metztli Xanat Ruvalcaba Hernández**
Con número de cuenta: **311200924** para obtener el título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de marzo de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Fernando Osnaya Gallardo	
VOCAL	M.V.Z. Hugo Bernal Zepeda	
SECRETARIO	M. en C. Alicia Alcántar Rodríguez	
1er. SUPLENTE	Dra. María del Carmen Espejel Del Moral	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Francisco Javier Carbajal Merchant	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

Comparación de tres métodos utilizados para elegir el momento óptimo para la inseminación artificial en hembras caninas de la raza bulldog inglés

Que presenta la pasante: **Metzli Xanat Ruvalcaba Hernández**
Con número de cuenta: **311200924** para obtener el título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de marzo de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Fernando Osnaya Gallardo	
VOCAL	M.V.Z. Hugo Bernal Zepeda	
SECRETARIO	M. en C. Alicia Alcántar Rodríguez	
1er. SUPLENTE	Dra. María del Carmen Espejel Del Moral	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Francisco Javier Carbajal Merchant	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

Comparación de tres métodos utilizados para elegir el momento óptimo para la inseminación artificial en hembras caninas de la raza bulldog inglés

Que presenta la pasante: **Metzli Xanat Ruvalcaba Hernández**
Con número de cuenta: **311200924** para obtener el título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de marzo de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Fernando Osnaya Gallardo	_____
VOCAL	M.V.Z. Hugo Bernal Zepeda	_____
SECRETARIO	M. en C. Alicia Alcántar Rodríguez	
1er. SUPLENTE	Dra. María del Carmen Espejel Del Moral	_____
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Francisco Javier Carbajal Merchant	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

Comparación de tres métodos utilizados para elegir el momento óptimo para la inseminación artificial en hembras caninas de la raza bulldog inglés

Que presenta la pasante: **Metzli Xanat Ruvalcaba Hernández**
Con número de cuenta: **311200924** para obtener el título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de marzo de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Fernando Osnaya Gallardo	
VOCAL	M.V.Z. Hugo Bernal Zepeda	
SECRETARIO	M. en C. Alicia Alcántar Rodríguez	
1er. SUPLENTE	Dra. María del Carmen Espejel Del Moral	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Francisco Javier Carbajal Merchant	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

Comparación de tres métodos utilizados para elegir el momento óptimo para la inseminación artificial en hembras caninas de la raza bulldog inglés

Que presenta la pasante: **Metzli Xanat Ruvalcaba Hernández**

Con número de cuenta: **311200924** para obtener el título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de marzo de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Fernando Osnaya Gallardo	_____
VOCAL	M.V.Z. Hugo Bernal Zepeda	_____
SECRETARIO	M. en C. Alicia Alcántar Rodríguez	_____
1er. SUPLENTE	Dra. María del Carmen Espejel Del Moral	_____
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Francisco Javier Carbajal Merchant	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

DEDICATORIAS

A mi madre

Gracias por ser mi mayor soporte, por nunca dejarme caer, jamás terminaré de agradecerte todo lo que has hecho por mi hermano y por mí, eres el ejemplo perfecto de la mujer que quiero llegar a ser. Y sobre todo quiero agradecerte por enseñarme que de todo lo malo siempre hay que sacar lo bueno y continuar. Todo esto es gracias a ti.

A mi hermano

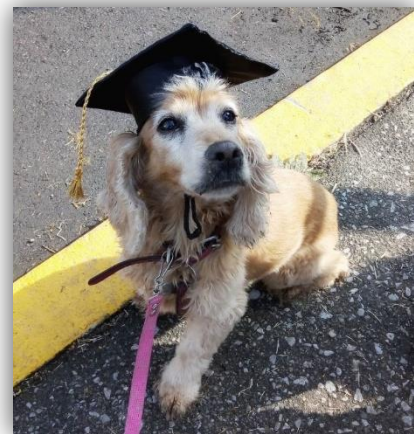
Por darme ánimos siempre, por cuidarme y nunca dejarme sola. Por aguantarme cuando no estoy de humor, hacerme reír para que no me enoje, pero sobre todo ser el apoyo que mi mamá y yo siempre necesitamos.

Gracias a los dos por creer en mí cuando ni siquiera yo lo hacía. Los amo.

A Zyanya (La Gordi)

Mi primera compañera de vida durante mi niñez, te agradezco por cuidarnos a mi hermano y a mí, gracias por aguantar hasta que este camino llegara a su final, te amo.

Y a los que han sido parte de mi variada manada: Leyla, Daisy, Sonia, Maya, Clayton, Flocky y Bucky.



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alicia Alcántar Rodríguez, por no dejarme sola durante este largo proyecto, por apoyarme en todo momento, por darme siempre consejos muy acertados y darme siempre la seguridad de que todo saldría bien. Gracias por darme la confianza de ser mi asesora, y por compartirme sus conocimientos durante las clases y ahora durante este proyecto.

Al Dr. José Alfredo Medrano Rodríguez, gracias por apoyarme durante este proyecto y otros que realicé en la UIM. Por siempre darme ánimos cuando me sentía muy estresada y quería tirar la toalla. Pero sobre todo gracias por esas pláticas amenas con el resto del equipo del L2 de la UIM.

Al Dr Fernando Osnaya Gallardo, Dr. Hugo Bernal Zepeda, Dra María del Carmen Espejel Del Moral, y al Dr Francisco Javier Carbajal Merchant, miembros del jurado, por brindarme su valioso tiempo para leer este trabajo, darme sus observaciones e incluso reunirnos por zoom para enriquecer este trabajo.

Al Dr. Eyner Rikvan Contreras Díaz y Dra. Emma Lilian Cervantes Delgado, así como a la clínica veterinaria World Tiny Pets. Por abrirme camino a la reproducción animal y por las facilidades brindadas para la realización de este proyecto.

A mi amada Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, y a la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Laboratorio 2, UNAM.

Se agradece el apoyo a los siguientes proyectos: Estudio de la asociación entre la fibrosis periglandular con lesiones inflamatorias endometriales en vacas lecheras (PAPIIT IN219620), Variación estacional de los niveles de melatonina en plasma seminal y su relación con la susceptibilidad de los espermatozoides de caprino a la crioconservación (PAPIIT IN205421), Fisiología de la reproducción (PIAPI 2030).

RESUMEN

En el presente estudio se determinó la etapa del ciclo estral de 50 perras de la raza Bulldog Inglés, mediante citología vaginal exfoliativa (CVE), detector electrónico de ovulación (Draminski®) y la concentración de progesterona sérica con el objetivo de conocer cuál de estos métodos es el más eficiente para determinar el momento óptimo para realizar la inseminación artificial. El estudio se realizó en la Clínica Veterinaria “World Tiny Pets” y en el laboratorio de Reproducción Animal de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios superiores Cuautitlán, UNAM. Las perras fueron llevadas a la clínica para el monitoreo de su ciclo estral cuando los propietarios observaron los signos clínicos propios del celo. De cada perra se obtuvieron al menos tres muestras de epitelio vaginal para CVE, tres lecturas de Draminski®, y sólo una de sangre para la determinación de la concentración de progesterona. Los niveles de Progesterona se clasificaron en 3 categorías, i) <math><4\text{ng/ml}</math>, ii) $4\text{-}12\text{ ng/ml}$ y iii) $>12\text{ ng/ml}$, considerando a la primera como preovulatoria, a la segunda como ovulatoria y la tercera como post ovulatoria. Los valores obtenidos por Draminski® se agruparon de acuerdo con los intervalos de valores ya establecidos de Progesterona. Se hizo estadística descriptiva y comparación de medias de los valores de Progesterona y Draminski® mediante pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Wilcoxon. Se analizaron los valores de Draminski® y Progesterona de acuerdo a cada etapa del ciclo estral, determinada mediante la celularidad vaginal característica de cada etapa. Los valores de Draminski® durante el Estro (601.2 ± 30.37 Ohmios) fueron diferentes ($P<0.05$) de los obtenidos en el Diestro (183.1 ± 38.77 Ohmios) y en el Proestro (374.8 ± 32.61 Ohmios). Los valores más altos de progesterona se presentaron en el Estro ($9.0 \pm 0.46\text{ ng/ml}$) y el Diestro ($12.5 \pm 2.00\text{ ng/ml}$), estos valores no fueron diferentes entre sí, sin embargo, fueron diferentes ($P<0.05$) de los observados en el Proestro ($6.3 \pm 0.59\text{ ng/ml}$). El tamaño de camada, de acuerdo con la concentración de progesterona, fue 6.3 ± 1.20 cachorros para la categoría de $4 - 12\text{ ng/ml}$, y 5.3 ± 0.46 cachorros para la categoría de $> 12\text{ ng/ml}$, estos valores no fueron diferentes entre sí. Las diferentes etapas del ciclo estral, determinadas por la celularidad obtenida de las CVE de cada perra, fueron graficadas para evaluar de mejor manera el avance de cada hembra durante su ciclo estral; en cada grafica se indicó el tipo de inseminación que se realizó. En conclusión, el uso coordinado de la citología vaginal exfoliativa y la determinación de la concentración de progesterona es la mejor combinación para elegir el momento para llevar a cabo la inseminación artificial. El Draminski® es un buen auxiliar, pero tiene el inconveniente de que no es fácil la separación de los valores correspondientes al estro y al diestro, por esto se requiere el apoyo de las otras pruebas.

PALABRAS CLAVE: Citología vaginal exfoliativa, Draminski®, Progesterona, Inseminación artificial.

ABSTRACT

In the present study, the stage of the oestrous cycle of 50 bitches (English Bulldog) was determined by means of (i) exfoliative vaginal cytology, (ii) serum progesterone concentration, and (iii) electronic ovulation detector (Draminski®) to determine the optimal time to perform artificial insemination, and to compare the efficiency of each of these methods. The study was carried out at the “World Tiny Pets” Veterinary Clinic, and at the laboratory of Animal Reproduction of the Unit of Multidisciplinary Research from the Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Females were taken to the clinic for monitoring of their oestrous cycle when the owners observed the first clinical signs of heat. At least three samples of vaginal epithelia, and three readouts of Draminski®, but only one blood sample for progesterone, from each female were taken. Progesterone concentration was classified into 3 categories, i) <4 ng/ml, ii) 4-12 ng/ml, and iii) > 12 ng/ml, considering them as preovulatory, ovulatory, and postovulatory respectively. Values obtained by Draminski® were grouped according to the established categories of Progesterone. Data from Progesterone and Draminski® readouts were analysed by non-parametric statistic (Kruskal-Wallis and Wilcoxon tests) based on each stage of the oestrus cycle, determined by CVE. Values of Draminski® during estrus (601.2 ± 30.37 Ohms) were different ($P < 0.05$) from those in dioestrus and proestrus (183.1 ± 38.77 , 374.8 ± 32.61 Ohms respectively). The highest values of progesterone were found in estrus and dioestrus (9.0 ± 0.46 and 12.5 ± 2.00 ng/ml, $P > 0.05$), and those values were different ($P < 0.05$) from those of proestrus (6.3 ± 0.59 ng/ml). Litter size, according to progesterone categories, was 6.3 ± 1.20 pups for 4 - 12 ng/ml *versus* 5.3 ± 0.46 pups for > 12 ng/ml progesterone, these values were no different from each other ($P > 0.05$). In conclusion, combined use of exfoliative vaginal cytology, and serum progesterone concentration provides the best determinant to select the optimal time to carry out artificial insemination. Draminski® presents the inconvenient that values obtained during estrus and the beginning of dioestrus are not clearly different, for this it can not be employed alone without the support of the other tests.

KEYWORDS: Exfoliative vaginal citology, Draminski®, Progesterone, Artificial Insemination.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS	5
ÍNDICE DE GRÁFICAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	6
INTRODUCCIÓN	7
MARCO TEÓRICO	10
ANATOMÍA	10
ENDOCRINOLOGÍA	10
CICLO ESTRAL Y ETAPAS DEL CICLO ESTRAL	14
PROESTRO	15
ESTRO	17
DIESTRO	20
ANESTRO	22
CITOLOGÍA VAGINAL EXFOLIATIVA	23
TIPOS DE CELULARIDAD	26
TINCIÓN DE PAPANICOLAU	32
DETECTOR ELECTRÓNICO DE OVULACIÓN	34
INTERPRETACIÓN	36
PRUEBAS HORMONALES	37
MOMENTO DEL SERVICIO E INSEMINACIÓN ARTIFICIAL (IA)	39
MÉTODOS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	43
TÉCNICAS DE IA	45
OBJETIVOS	48
MATERIALES Y MÉTODOS	49
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS	52
RESULTADOS	53
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIÓN	58
REFERENCIAS	59
ANEXO	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vista lateral y dorsal del aparato reproductor de la perra.....	10
Figura 2. CVE en etapa de proestro.....	17
Figura 3. CVE en etapa de proestro.....	17
Figura 4. CVE en etapa de estro.....	19
Figura 5. CVE en etapa de estro.....	19
Figura 6. CVE en etapa de diestro.....	22
Figura 7. C.V.E. Célula espumosa.....	22
Figura 8. Esquema para toma de CVE.....	26
Figura 9. Secuencia de hisopado en perras.....	26
Figura 10. CVE. Células basales.....	27
Figura 11. CVE. Células parabasales.....	27
Figura 12. CVE. Células parabasales.....	27
Figura 13. CVE. Células intermedias.....	28
Figura 14. CVE. Células intermedias.....	28
Figura 15. CVE. Células superficiales.....	29
Figura 16. CVE. Células anucleadas.....	30
Figura 17 CVE. Células anucleadas.....	30
Figura 18. CVE. Células de la fosa del clítoris.....	30
Figura 19. CVE. Eritrocitos.....	31
Figura 20. CVE. Eritrocitos.....	31
Figura 21. CVE. Neutrófilo intracitoplasmático.....	32
Figura 22. Interpretación de resultados de la medición de la resistencia eléctrica del moco vaginal.....	37

ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS

Cuadro 1. Algunas ventajas de la IA.	40
Cuadro 2. Fertilidad obtenida tras la IA.	47
Cuadro 3. Tinción Diff-Quick®.....	50
Cuadro 4. Tinción de Papanicolaou	50
Cuadro 5. Comparación de valores (Ohmios) obtenidos del detector electrónico de ovulación (Draminski®) en tres intervalos de concentración de Progesterona y tamaño de camada en perras Bulldog Inglés.	53
Cuadro 6. Valores del detector electrónico de ovulación (Draminski®) y niveles séricos de progesterona obtenidos durante las diferentes etapas del ciclo estral de perras de raza Bulldog Inglés.....	54

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Fases del ciclo estral	14
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Ω	Ohmios
CVE	Citología vaginal exfoliativa
E₂	Estrógenos
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de Gonadotropinas
IA	Inseminación artificial
LH	Hormona luteinizante
ng	Nanogramos
pg	Picogramos
PL	Prolactina
P₄	Progesterona
RIA	Radioinmunoensayo
SNC	Sistema nervioso central

INTRODUCCIÓN

La relación entre el hombre y el perro es una práctica milenaria y se remonta a unos 15,000 años desde que los humanos como cazadores comenzaron a vivir en grupos. La cría del perro ayudó al humano a cazar, y a proteger a los animales domésticos de depredadores. Las adaptaciones sociales de humanos y perros son bastante similares, y tanto humanos como perros pueden convivir perfectamente el uno con el otro. En la era prehistórica, se descubrió una tumba con los restos de un perro dentro de ésta, se sabe que estuvo enfermo durante mucho tiempo y fue atendido, por lo que se dice que ésta es la tumba más antigua conocida donde los humanos y perros fueron enterrados juntos, y representa la evidencia más temprana de domesticación de los perros como animal de compañía (Janssens *et al.*, 2018).

Habiendo adquirido una diversidad incomparable en fenotipo y comportamiento, se cree que los perros descienden de un gran progenitor similar al lobo gris que ahora está extinto. Los perros, por lo tanto, se parecen a los lobos en algunas características y comportamiento social, como que son territoriales y cazan en grupo. Los estudios de genómica sobre el origen de los perros modernos han inferido que los perros fueron domesticados hace unos 20,000 a 40,000 años (Parker *et al.*, 2017).

La primera inseminación artificial (IA) registrada en perras fue realizada en Italia por Spallanzani, resultando en una gestación y el nacimiento de tres crías. El progreso en esta área se mantuvo lento hasta que en 1969 se produjo el primer cachorro del mundo a partir de IA con semen congelado-descongelado (Farstad, 2000).

Actualmente, el conocimiento de la fisiología reproductiva del perro doméstico, *Canis familiaris*, se ha incrementado marcadamente, siendo una actividad fundamental para la academia, criadores y propietarios (Escobedo, 2008). Muchos criadores confían en el recuento de los días desde el inicio del proestro, y creen que las perras ovulan siempre en un número determinado de días desde este evento (aproximadamente 12 días desde el inicio de éste). Sin embargo, esto no

es preciso; por lo tanto, el apareamiento entre los días 11 y 15 del ciclo, común en la práctica reproductiva, no siempre culmina en una gestación (Root, 2012).

A lo expuesto, debemos sumar que en la perra a menudo existe una pobre correlación entre los eventos endócrinos y los observados clínicamente, hecho que impide usar los signos conductuales para determinar el momento óptimo de cubrición (Root, 2012). Estas actividades traen como consecuencia diversos problemas, uno de gran interés, es la infertilidad canina, convirtiéndose en un motivo de consulta veterinaria cada vez más frecuente para determinar las causas y posibles soluciones (Escobedo, 2008).

En la perra doméstica, la pubertad se inicia entre los 6 a 12 meses de edad, aunque puede extenderse hasta los 24 meses en algunas razas, a partir de este momento, la hembra presenta su primer ciclo estral o reproductivo (Ajala *et al.*, 2012).

El ciclo estral se encuentra dividido en 4 etapas: el proestro y el estro, forman parte de la fase folicular rica en estrógenos, mientras que el diestro y el anestro forman fase lútea; en esta fase, la progesterona se encuentra en niveles elevados y los estrógenos se encontrarán disminuidos (Concannon, 2011).

De los animales domésticos, la perra presenta aspectos particulares en comparación con las demás especies mamíferas: se le considera monoéstrica no estacional, puede presentar de uno a tres ciclos por año, con intervalos entre 3 y 9 meses, y probablemente la característica más significativa es la ovulación de ovocitos inmaduros en estado de vesícula germinativa, y por tanto sin reinicio meiótico a nivel folicular, alcanzando el estado de metafase II en el oviducto, 56 a 72 horas luego de su ovulación (Chastant-Maillard, 2010; De los Reyes *et al.*, 2011).

Existen razas caninas como el Bulldog Inglés en la que la reproducción se lleva a cabo generalmente por inseminación artificial, esto debido a su tipo de cráneo (braquiocefálico), se cansa fácilmente, puede presentar golpe de calor o no puede llevar a cabo la cópula (Zamora, 2016). Otras razones pueden ser: defectos de conformación o debilidad los miembros posteriores o problemas de cadera que

impidan la cópula, así como peculiaridades en la anatomía cervical y vaginal de la perra, como la orientación de la vulva, la presencia del pliegue paracervical mediano dorsal y el hecho de que el canal cervical apunta dorsalmente (Watts & Wright, 1995).

El Bulldog Inglés es una raza que generalmente muestra muchos problemas de salud causados por su conformación anatómica específica. Los rasgos que se deseaban cuando la raza fue diseñada para la lucha contra el toro en el siglo XIII, han llevado a la cría selectiva a extremos conformacionales (Jackson, 1995).

Por razones productivas, en los caninos existe una gran variedad de razas, y cada una tiene una función determinada por lo que es necesario conservar sus características de acuerdo con su trabajo, económicamente interesante debido al valor que adquieren los animales de razas muy selectas cuando provienen de padres campeones (Zamora, 2016).

Existen numerosos métodos para detectar el momento de la ovulación en la perra; la citología vaginal exfoliativa (CVE), la cual basa su funcionalidad en la respuesta del epitelio vaginal a los estrógenos, como el engrosamiento y descamación de la pared vaginal y cambios específicos en la morfología de células vaginales de acuerdo a la etapa del ciclo estral; la vaginoscopía, que se basa en el mismo principio de la CVE al observar cambios morfológicos en respuesta a hormonas; ultrasonido, con el que se monitorea la imagen del ovario y el ciclo folicular hasta la liberación de óvulos; pruebas hormonales, que detectan progesterona (P_4) y hormona luteinizante (LH), como la prueba inmunoenzimática ligada a enzimas (ELISA), con diferentes variables para su uso en la clínica, entre ellos la inmunocromatográfica o prueba de inmuno-migración rápida (González, 2014).

En este trabajo se usaron tres métodos: (i) citología vaginal exfoliativa, (ii) concentración de progesterona sérica y (iii) detector electrónico de ovulación, para determinar el momento óptimo de la IA en hembras de la raza Bulldog Inglés. El costo de estas tres pruebas no es elevado, por lo que se podrán disminuir los problemas de infertilidad, así como facilitar un monitoreo de celo exitoso, y por ende lograr una gestación.

MARCO TEÓRICO

ANATOMÍA

El aparato reproductor de la hembra se divide en ovarios, oviducto, útero, cérvix, vagina, clítoris y vulva (Páramo & Balcázar, 2005). Entre las funciones que cumple se encuentra la producción de hormonas y ovocitos, transporte de gametos para la fecundación, mantenimiento y nutrición del organismo en desarrollo, expulsión del feto desarrollado al ambiente externo (parto) y proporcionar nutrición a la cría recién nacida (lactancia) (Banks, 1996).

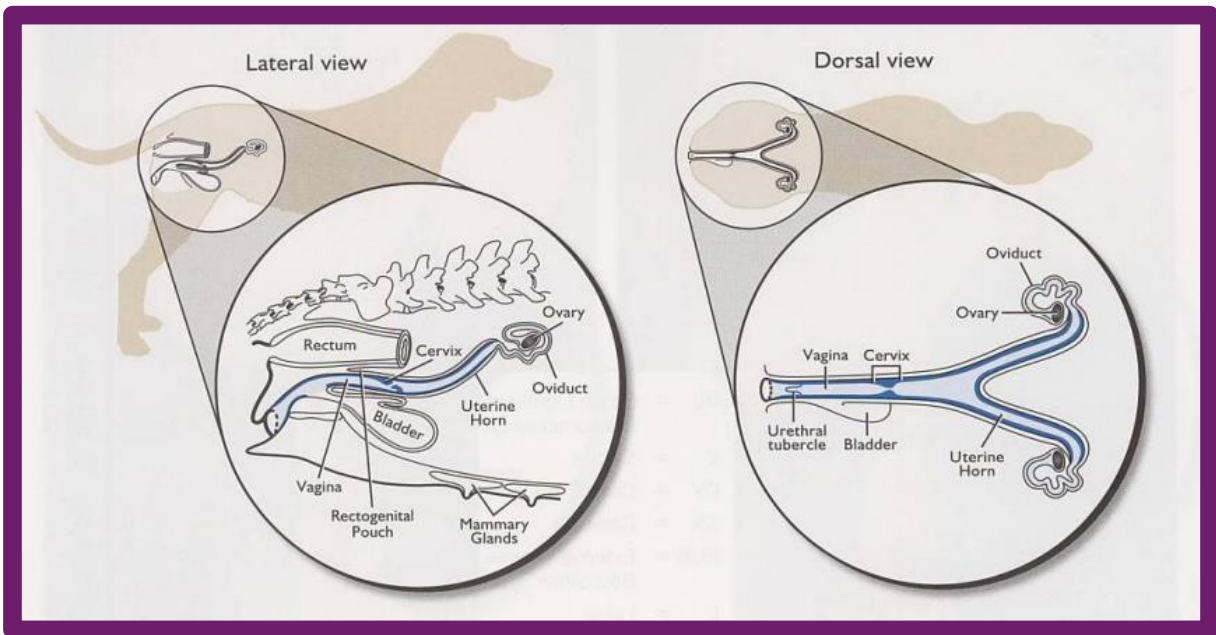


Figura 1. Vista lateral y dorsal del aparato reproductor de la perra (Senger, 2005).

ENDOCRINOLOGÍA

El ciclo estral se refiere al ciclo reproductivo que expresan las hembras de la mayoría de los mamíferos; comprende una serie de eventos altamente regulados, que dan como resultado la liberación de un óvulo en condiciones para ser fecundado. En la perra el ciclo estral consta de 4 estadios; proestro, estro, diestro y anestro.

Este es regulado por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, también llamado eje reproductivo, específicamente la adenohipófisis, es considerada como el centro de la actividad sexual, procesando y regulando todos los estímulos de los sentidos, del Sistema Nervioso Central (SNC), sistema vegetativo, hipófisis, ovario,

glándulas adrenales, tiroides y otras, regulando la actividad sexual según la intensidad y variabilidad de los estímulos (Adler, 2012; Paccola, 2013).

El sistema nervioso, induce respuestas a partir de un estímulo recibido del entorno, como parte de señales sensoriales del entorno, tenemos la información recibida mediante la vista (luz, otros animales de la misma especie), el olfato (olores significativos sexualmente) y el tacto (proximidad de otros animales), transmitiendo a los nervios óptico, olfatorio y sensoriales los mensajes al cerebro. El cerebro traduce la información y envía impulsos por fibras nerviosas a un órgano diana las veces que sean necesarias mediante el eje hipotálamo hipófisis gonadal (Norman & Litwack, 1997).

Tras el estímulo del SNC, las neuronas endócrinas del hipotálamo producen una de sus hormonas liberadoras: la hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH). Ésta es transportada vía sistema porta hipotálamo-hipofisiario a la adenohipófisis, su órgano diana. Aquí la adenohipófisis es estimulada para que se secrete de manera pulsátil FSH y LH (Norman & Litwack, 1997).

Durante las 2-3 semanas previas al inicio del proestro, la adenohipófisis secreta FSH en pulsos de frecuencia creciente. La FSH controla el desarrollo de los folículos ováricos que, a su vez, secretan principalmente estrógenos (E_2), pero también, a medida que alcanzan la madurez, P_4 . Las concentraciones bajas de E_2 ejercen una retroalimentación positiva sobre la hipófisis anterior, lo que estimula que se secrete más FSH, lo que da como resultado un mayor crecimiento folicular y unas mayores concentraciones de E_2 . Este proceso sigue hasta que los folículos son maduros y están a punto de romperse (Okkens *et al.*, 2011).

Al comenzar el proestro, los estrógenos se encuentran en aumento provocando un efecto de retroalimentación negativa a nivel hipotálamo-hipofisiario para FSH, la cual disminuye notoriamente en esta etapa y, por otra parte, el alza de estrógenos desencadena la retroalimentación positiva para la LH (Parvizi, 2000).

El aumento de los E_2 continua hasta alcanzar su máximo 1 a 2 días antes del pico de LH, que generalmente ocurre hacia el fin del proestro. Los niveles sanguíneos de E_2 superan los 15 pg/mL hasta llegar a un pico 24 a 48 horas antes de la

presentación del estro, luego comienzan a declinar progresivamente durante 5 a 9 días (Feldman & Nelson, 2000) y alcanzan a más de 70 pg/ml hacia el final de este (Wanke, 2006).

La Progesterona (P_4), en cambio, se encuentra en niveles bajos (menos de 0.5 ng/ml) aumentando 2 a 3 días antes del fin del proestro (Badinand *et al.*, 1993). Este aumento de P_4 hacia fines del proestro, estaría relacionado a una luteinización de los folículos preovulatorios.

En el momento del pico de LH (con duración aproximada de 24-72 horas) hay un cambio en los E_2 desde muy altas concentraciones a concentraciones progresivamente bajas, combinadas con el ascenso concomitante de las concentraciones de P_4 , que se eleva por encima de la meseta crítica de 0.5 ng/ml, a la vez que la estrogenemia disminuye (Feder, 1981; Feldman & Nelson, 2000; Cunningham, 2003).

El estro se inicia con el alza preovulatoria de LH. El incremento de P_4 , que ha subido de sus niveles basales, previo al alza de LH, continúa aún después del pico de LH, teniendo un rápido aumento los siguientes 10 días. Un efecto de esta alza es aumentar y prolongar la intensidad de la conducta estral (McCann *et al.*, 1989).

La P_4 que había alcanzado 2 ng/ml durante el mismo, continúa ascendiendo hasta la ovulación y luego de que ésta se produce, aumenta bruscamente a valores superiores a 30 ng/ml. Un valor superior a 8 ng/ml indica que la ovulación ya ha ocurrido. Los estrógenos disminuyen después de la ovulación hasta llegar a niveles basales hacia el final del estro (Wanke, 2006).

La P_4 tiene su máxima concentración (15 a 90 ng/ml, promedio 25 ng/ml) 20 a 30 días post ovulación, es decir 2 a 3 semanas después de comenzado el diestro y conserva esta meseta por 1 a 2 semanas, para luego ir decreciendo en forma gradual hasta un cese brusco de la actividad lútea como parte del comienzo del parto en caso de que la hembra haya sido preñada. Ninguna perra pare hasta la progesteronemia declina por debajo de los 2 ng/ml (Feldman & Nelson, 2000).

La secreción de FSH y LH durante el diestro se considera episódica. Los niveles elevados de P_4 inician el desarrollo glandular en el tejido mamario el cual se hace

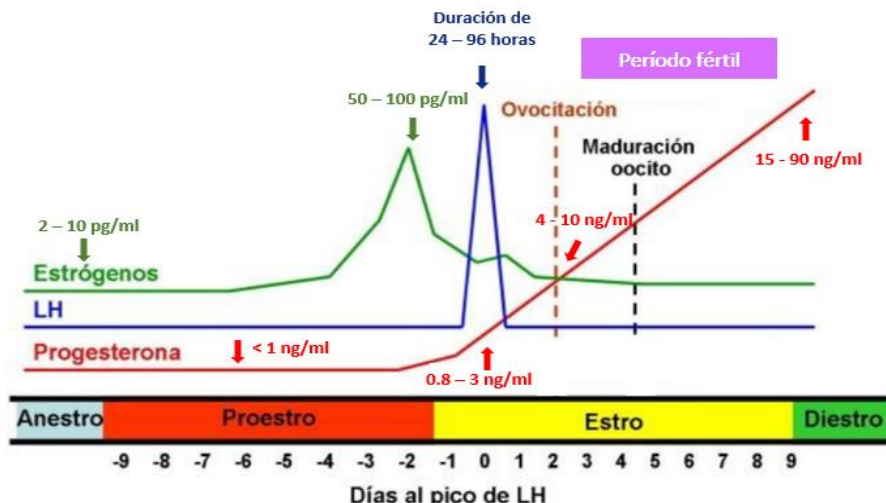
más evidente cuando aumenta la prolactinemia hasta las últimas semanas de gestación (1 a 3 semanas) desencadenando la lactancia. Los E₂, a su vez, promueven el desarrollo mamario y tal vez colaboran en la relajación del cuello uterino. Las concentraciones circulantes de LH permanecen bajas durante la preñez (Feder, 1981; Feldman & Nelson, 2000; Cunningham, 2003).

El anestro comienza con el final de la etapa progestacional (regresión de los cuerpos lúteos) y termina con el inicio de la etapa estrogénica (comienzo del proestro) (Feldman & Nelson, 2000). La progresión desde el anestro temprano hasta el tardío se asocia con el incremento en la concentración plasmática de FSH, luego de un aumento de la pulsatilidad de GnRH, siendo este evento crítico para la iniciación de la foliculogénesis (Kooistra, 1999).

Durante la mayor parte del anestro, la LH permanece en valores basales, ≤ 1 ng/ml, y a medida que se acerca el anestro tardío los pulsos son de 2-25 ng/ml cada 6 a 24 horas y en los últimos 14 días si bien mantienen la amplitud, disminuyen los intervalos que ahora son de 60-90 minutos, para finalmente elevarse por encima de 3 ng/ml. 60 días antes del proestro ocurre un aumento mucho menos pronunciado de FSH (Concannon, 2009).

Justo antes del inicio del proestro, se produce una declinación en las concentraciones plasmáticas de estrógenos, mientras que la progesterona mantiene sus concentraciones extremadamente bajas durante todo el anestro (Feder, 1981; Feldman & Nelson, 2000; Cunningham, 2003). Lo anterior se visualiza en la siguiente gráfica.

Gráfica 1. Fases del ciclo estral (Tomada y adaptada de Root, 2012).



CICLO ESTRAL Y ETAPAS DEL CICLO ESTRAL

La pubertad puede definirse como el momento a partir del cual un individuo es capaz de reproducirse. En la perra la pubertad puede reconocerse por el comienzo del primer proestro. El inicio de la pubertad se correlaciona con el momento en que la perra alcanza la talla adulta (Sokolowski, 1977). En la perra doméstica, la madurez sexual inicia alrededor de los 6-12 meses de edad, aunque puede extenderse hasta los 24 meses de edad en algunas razas, a partir de este momento, la hembra presenta su primer ciclo estral o reproductivo (Ajala *et al.*, 2012).

La perra, puede definirse como monoéstrica no estacional, es decir, presentan un solo ciclo estral e inicia un periodo de anestro (Galina & Valencia, 2008), y puede ciclar independientemente de la estación del año (Sokolowski, 1977), con una fase lútea de larga duración seguida de un anestro obligado (Concannon, 2011). Si se compara con otros animales domésticos, se puede observar que la perra posee varias características reproductivas que la distingue de otras especies, ya que presenta escasa o nula estacionalidad (Hoffman *et al.*, 1996).

Las perras experimentan ciclos ováricos durante todo el año, aunque con mayor frecuencia en otoño y principio de la primavera. La estacionalidad reproductiva en la perra se puede afectar por el tamaño, edad, condición corporal y enfermedades, así como factores ambientales (temperatura, fotoperiodo y estrés) (Moon, 2000).

Perros criados en casas muestran poca estacionalidad, mientras que el perro callejero puede retener cierta estacionalidad, muy similar a la de los cánidos silvestres. Por otro lado, la pérdida de la condición corporal extrema puede afectar la actividad reproductiva de la perra, y la mala condición corporal en forma constante puede bloquear la actividad estral por periodos prolongados (Feldman & Nelson, 2000).

Los cambios estructurales cíclicos ocurridos en los ovarios generan cambios endocrinos, los cuales tienen efectos en el cerebro (cambios conductuales) y en todos los órganos del aparato genital. Esta serie de sucesos se conocen como ciclo ovárico o ciclo estral (Feldman & Nelson, 2000).

El ciclo estral en esta especie tiene una fase folicular seguida por una fase lútea a partir de una ovulación espontánea (Wanke, 2006). Ovulan espontáneamente en cualquier etapa del año, con un intervalo inter estral de 5 a 12 meses, generalmente de 6 a 7 meses; en algunas razas pequeñas pueden presentar de 3 – 4 ciclos estrales en un año, mientras que las razas grandes presentan uno solamente (Ajala *et al.*, 2012).

La duración y las características del proestro y el estro pueden diferir entre las perras púberes y maduras. Es probable que las perras púberes demuestren un comportamiento de estro menos manifiesto durante la ovulación pudiendo ser menor la duración del proestro y el estro (Wildt *et al.*, 1981).

En la actualidad el ciclo reproductivo de la perra doméstica puede describirse con base a los cambios de comportamiento, clínicos, fisiológicos, citológicos y endocrinológicos ocurridos en ella (Concannon, 2011).

PROESTRO

- **Duración**

Tiene una duración promedio de 9 días, con un rango de 3 a 21 días (De los Reyes & Sánchez, 2000).

- **Signos clínicos**

El comienzo de éste se define como el momento en que hay salida de líquido sero-sanguinolento a través de la vulva, además de ser considerado como el inicio

de un nuevo ciclo reproductivo. Este momento no es evidente en todas las perras, especialmente en aquellas razas de pelo largo o en aquellas que lamen frecuentemente su zona genital (De los Reyes & Sánchez, 2000). Este líquido es el resultado de la diapédesis y ruptura capilar subepitelial dentro del endometrio (Feldman & Nelson, 2000).

- **Cambios conductuales**

Las hembras se vuelven atractivas para los machos durante el proestro debido a las feromonas liberadas en las secreciones vaginales y la orina. A pesar de eso, la hembra durante el proestro no aceptará al macho para el apareamiento (Pineda, 1991).

En el proestro temprano, la hembra desalienta activamente todo intento de cópula por parte del macho, puede reaccionar gruñendo, mostrando los dientes y manteniendo la cola pegada contra el periné, entre los miembros posteriores cubriendo la vulva (Dumon & Fontbone, 1992). Este patrón de conducta cambia gradualmente a medida que avanza el proestro y la perra se torna más pasiva en su resistencia a la aproximación del macho (Feldman & Nelson, 2000).

A medida que avanza el proestro la vulva se agranda, esto se asocia al edema y tumefacción de los labios vulvares. En el proestro tardío la vulva estará edematizada y turgente para luego ablandarse de manera notable en el estro al disminuir la misma (Concannon, 2003).

- **Cambios citológicos**

La apariencia de las células exfoliadas de la vagina refleja el aumento de las concentraciones séricas de E_2 . En esta fase del inicio del ciclo estral se pueden encontrar un número variable de eritrocitos, células parabasales de pequeño tamaño, escaso citoplasma y núcleo redondo basófilo, e intermedias pequeñas y grandes en menor proporción. El fondo de estos extendidos (frotis) a menudo tiene aspecto sucio debido a la presencia de secreciones cervicales y vaginales viscosas (Johnston *et al.*, 2001).

A medida que va avanzando esta fase, el epitelio de la mucosa vaginal se va engrosando por efecto estrogénico de los folículos (proestro intermedio y proestro

final) empezando a exfoliar células intermedias de mayor volumen y tamaño citoplasmático, el núcleo va evolucionando de manera que aumenta la basofilia y tiende a ser más pequeño. En el proestro medio, el primer indicio de un efecto estrogénico continuo sobre la CVE es la desaparición de los neutrófilos. Estas células entran a la luz vaginal a través del epitelio vaginal pero luego ya no pueden atravesar la pared vaginal de múltiples capas inducidas por los E₂, los neutrófilos no deberían ser observados nuevamente hasta el diestro (Johnston *et al.*, 2001).

Así que, la proporción de células parabasales disminuye más que las intermedias. Al final de esta fase existirá un predominio de las células intermedias grandes. Además, aparecen células queratinizadas de epitelio más superficial mostrando bordes irregulares, romos y angulosos, con núcleo pequeño picnótico. Pueden detectarse conjuntamente eritrocitos, neutrófilos no degenerados en cantidad variable y bacterias libres en el fondo de la preparación en poca concentración, no teniendo significado patológico en esta fase (Fernández, 2012).

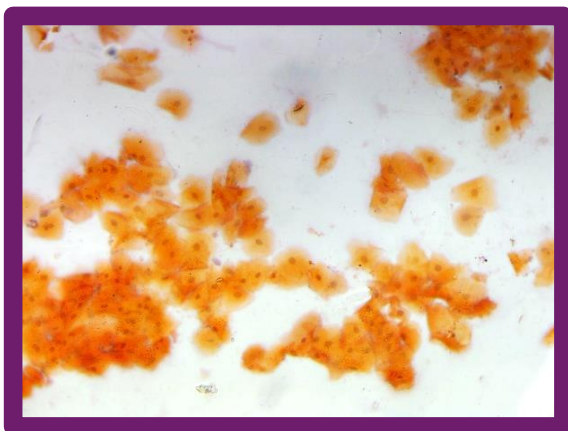


Figura 2. CVE en etapa de Proestro. Se observan cúmulos de células, en su mayoría intermedias pequeñas y grandes. Tinción Papanicolaou (Foto tomada con microscopio óptico en el Lab. 2 UIM, FESC-4, UNAM).

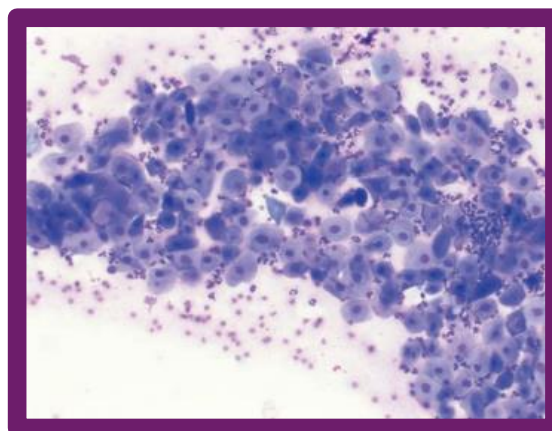


Figura 3. CVE en etapa de Proestro. Se observa gran cantidad de eritrocitos, característicos de esta etapa, así como células parabasales e intermedias pequeñas. Tinción no referida. (Fuente: Martínez de Merlo, 2008).

ESTRO

- **Duración**

La duración de este período es de 9 días en promedio, con un rango que va de 3 a 21 días (Concannon, 2009).

- **Signos clínicos**

La vulva permanece aumentada de tamaño, aunque no es tan evidente como sucede en la fase de proestro, la descarga sero-sanguinolenta es menos abundante, hay una secreción de moco cervical que tiene como finalidad favorecer el desplazamiento de los espermatozoides al útero (Galina & Valencia, 2008), pierde turgencia progresivamente a causa del descenso de E₂, que produce una menor retención de líquido (Wanke & Gobello, 2006).

Es importante destacar que el comportamiento de las perras varía muchísimo de un ejemplar a otro: hay perras que no aceptan al macho en ningún momento de su celo, aunque su endocrinología y ovulación sean normales, mientras que otras lo aceptan desde 3-4 días antes del pico de LH hasta varios días después de comenzado el diestro. Por lo que es preferible definir el comienzo del estro hormonalmente, coincidiendo con el pico de LH, y su finalización por los cambios observados en CVE (Wanke & Gobello, 2006).

- **Cambios fisiológicos**

En estro temprano, inicia una progresiva contracción de los pliegues de la mucosa acompañados de palidez, esto se debe a un retiro abrupto del efecto edematoso de los estrógenos. Durante los siguientes días, ocurre el encogimiento de la mucosa y para el día 3 o 4 después del pico LH se mantiene angulada y conserva un color cremoso, la contracción notoria de la totalidad de pliegues de la mucosa con obvia angulación es característica del período de fertilización (England *et al.*, 2002).

- **Cambios conductuales**

El comienzo del comportamiento de estro se caracteriza por la receptividad de la hembra que permite el servicio y la aparición de reflejos posturales específicos. El primer día que la hembra permite la cópula es el comienzo del periodo de comportamiento de estro y esta fase finaliza cuando ya no se acepta el servicio (Feldman & Nelson, 2000).

Pueden observarse varios reflejos que facilitan la cópula; si se toca la piel del periné, la vulva se eleva; si el contacto es con uno de los labios de la vulva, ésta

se orienta hacia el mismo lado y la cola se desvía en sentido contrario. Estos reflejos comienzan a notarse al final del proestro y se acentúan durante el estro (Wanke & Gobello, 2006).

- **Cambios citológicos**

Esta es la fase fértil del ciclo estral y adecuada para la monta. Se caracteriza por existir una sustitución en el predominio del tipo celular, de forma que las células queratinizadas exfoliarán de forma mayoritaria y/o absoluta y en gran cantidad (Fernández, 2012).

Las células superficiales nucleadas y anucleadas representan más del 80% de las células vaginales totales y a menudo alcanzan el 100%. No se observan neutrófilos, los eritrocitos pueden o no estar presentes y el fondo del frotis es limpio y libre de detritus celulares. Cuando se realizan frotis seriados durante el estro, un cambio abrupto en el número relativo del tipo de células epiteliales marca el comienzo del diestro. Si bien el porcentaje de células superficiales pueden fluctuar, nunca será menor al 60% (Olson *et al.*, 1982).

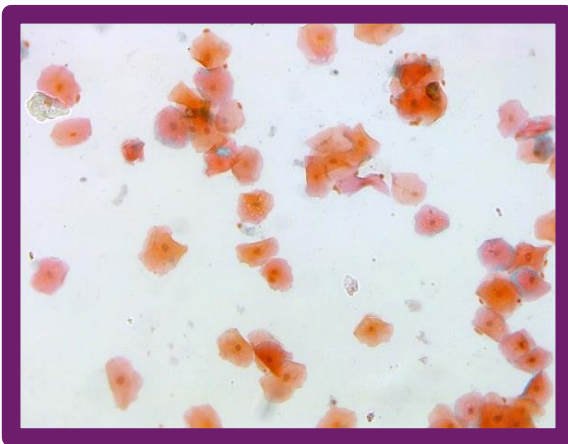


Figura 4. CVE en etapa de Estro. Se observan células bien definidas, en su mayoría células superficiales nucleadas. Tinción Papanicolaou (Foto tomada con microscopio óptico en el Lab. 2 UIM, FESC-4, UNAM).

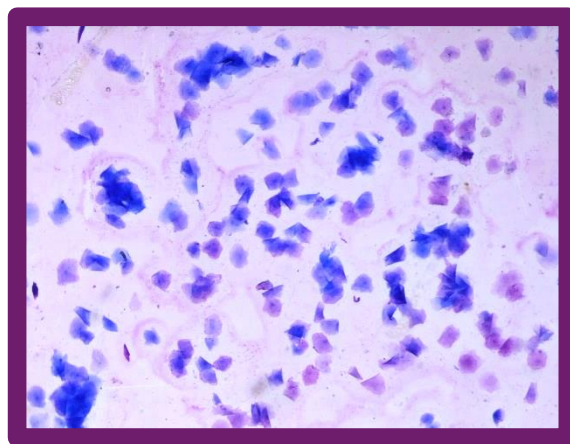


Figura 5. CVE en etapa de Estro. Se observan algunos racimos de células con bordes angulados e irregulares, correspondientes a células superficiales nucleadas y anucleadas. Tinción Papanicolaou (Foto tomada con microscopio óptico en el Lab. 2 UIM, FESC-4, UNAM).

DIESTRO

- **Duración**

Su duración es de 56-58 días en hembra gestante, y de 80 a 100 días en hembra no gestante (Feldman & Nelson, 2000; Páramo & Balcazar, 2005).

- **Signos clínicos**

Para muchos autores el metaestro no está considerada en la hembra canina, sin embargo, algunos autores consideran al metaestro y al diestro como una misma etapa, la cual abarca la mayor parte de la fase luteínica de la perra (Allen, 1995). En las demás especies domésticas, se denomina metaestro al período durante el cual se forma el cuerpo lúteo y se elevan las concentraciones de P_4 . Sin embargo, en la perra durante este fenómeno, continúa la conducta de receptividad que define al estro, por lo cual decimos que la perra pasa directamente del estro al diestro, que es la etapa en la cual el cuerpo lúteo desarrolla su máxima actividad (Wanke & Gobello, 2006).

Esta etapa comienza cuando la perra rechaza la monta por primera vez; la vulva aparece gradualmente menos tumefacta y puede desarrollarse un flujo vulvar mucoide como en la gestación, su duración es de 60 días y termina cuando las concentraciones de P_4 circulante son mínimas (Allen, 1995).

Se completa el desarrollo mamario y sobre el final de esta etapa se puede producir secreción láctea, coincidiendo con el descenso de P_4 y la elevación de la PRL (Wanke & Gobello, 2006).

Además, hay cambios significativos en el útero y la hembra es capaz de mantener la gestación (Feldman & Nelson, 2000).

- **Cambios fisiológicos**

El útero mantiene la hipertrofia de su estructura glandular y la hipervascularización en respuesta a los altos niveles de P_4 en sangre, alcanzando su mayor tamaño, en hembras no gestantes el día 20 o 30 del diestro (Stornelli *et al.*, 2006).

El útero permanece estimulado por la P_4 durante los 2 meses de permanencia de los cuerpos lúteos. Dicha estimulación produce el cierre del cuello uterino y el espesamiento de las secreciones cervicales. A su vez, desensibiliza el miometrio a la acción de la oxitocina, colocando al útero en virtual estado de reposo para permitir la nidación de los embriones y estimula la secreción de la leche uterina. Ésta es necesaria para la alimentación de los embriones hasta que ellos se implanten en la pared uterina (dando comienzo al intercambio nutritivo materno fetal) (Sorribas, 2000).

Las paredes de la vagina se adelgazan y desaparecen los pliegues. Al comenzar el diestro, hay una descamación brusca del epitelio vaginal en colgajos que hace que la mucosa aparezca moteada, con parches rosados y más pálidos. El pliegue dorsal de la vagina se torna reactivo y se contrae ante cualquier contacto, tomando una forma de roseta que se asemeja a la imagen del cérvix de otras especies domésticas. Más adelante el aspecto es el mismo que se encuentra durante el anestro (Wanke & Gobello, 2006).

Todas las perras no gestantes tienen cuerpos lúteos funcionales a pesar de la ausencia de la gestación y en ellas, la fase lútea decae lentamente, prolongando este período por 10 a 20 días más que en la perra gestante (Adler, 2012).

- **Cambios conductuales**

La hembra rechaza al macho es decir no acepta la monta (Páramo & Balcázar, 2005).

- **Cambios citológicos**

El epitelio uterino antes estimulado por los E_2 ahora comienza a tener un proceso de reparación endometrial, conforme disminuye la concentración de esta hormona.

En esta fase existe un cambio brusco en la población celular donde se produce una disminución muy marcada de las células queratinizadas y un aumento importante de las células intermedias. Se vuelven a detectar neutrófilos no degenerados y bacterias libres de forma similar al estadio de proestro intermedio y final, siendo en ocasiones muy difíciles de diferenciar si no se ha realizado un estudio anterior de la mucosa vaginal (Fernández, 2012).

El porcentaje de células superficiales cae hasta casi el 20% y el resto de las células son por lo general intermedias. Pueden observarse células con neutrófilos intracitoplasmáticos y células espumosas. Luego de los primeros días del diestro, la citología vaginal es similar a la del anestro con leucocitos y eritrocitos en cantidades escasas y las células epiteliales corresponden a intermedias y parabasales (Feldman & Nelson, 2000).

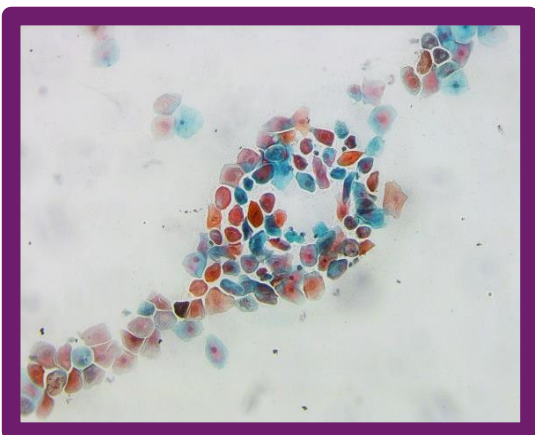


Figura 6. CVE en etapa de Diestro. Se observan células superficiales nucleadas, intermedias grandes y parabasales dispuestas a manera de sábana (Foto tomada con microscopio óptico en el Lab. 2 UIM, FESC-4, UNAM).

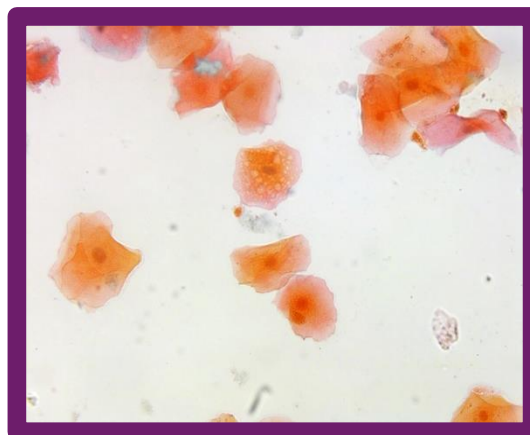


Figura 7. C.V.E. Célula espumosa, característica de esta etapa. Tinción Papanicolaou (Foto tomada con microscopio óptico en el Lab. 2 UIM, FESC-4, UNAM).

ANESTRO

- **Duración**

Promedio de 4.5 meses, el rango puede variar de entre 4 a 10 meses (Feldman & Nelson, 2000).

- **Signos clínicos**

Es difícil detectar el anestro en perras que no quedaron gestantes ya que no existe un cambio perceptible entre la finalización del diestro e inicio del anestro. En cambio, en perras gestantes, es evidente que el parto marca el cambio entre gestación y el inicio del anestro (Esquivel, 2012).

La vulva se halla pequeña y normalmente sin descargas, por su parte las mamas suelen involucionar (Wanke & Gobello, 2006).

- **Cambios fisiológicos**

Se produce la involución uterina. Clínicamente es el período de reposo reproductivo, pero con fluctuaciones hormonales (Páramo & Balcázar, 2005).

- **Cambios conductuales**

La hembra se encuentra en un periodo de inactividad, se puede decir que se observa tranquila (Páramo & Balcázar, 2005).

- **Cambios citológicos**

En esta fase el epitelio de la mucosa vaginal es delgado y la exfoliación celular escasa existiendo como única representación pequeñas células basales o parabasales, núcleos sueltos, los neutrófilos pueden estar o no presentes, si se observan deben ser en poca cantidad y hematíes. Pueden o no observarse bacterias y los eritrocitos están ausentes (Fernández, 2012).

CITOLOGÍA VAGINAL EXFOLIATIVA

El desarrollo de la citología como campo de estudio de la medicina, necesitó dos condiciones: el concepto de célula y la invención del microscopio. A pesar de que la invención del microscopio data del siglo XVI, el concepto de célula logró aceptación hasta el siglo XVIII por lo que la citología como herramienta diagnóstica tiene sus comienzos a partir del siglo XIX. A principios del siglo XVII los hermanos Janssen usaron las lentes para crear el microscopio, lo que permitió observar las estructuras celulares con un aumento de 60 veces en relación con el tamaño normal, sin embargo, los microscopios de esa época producían distorsión de imágenes y tenían bajo poder de resolución por lo que al inicio no tuvieron mucha aceptación y no fueron utilizados. Uno de los padres de la citología fue Johannes Müller, de Berlín, quien en 1838 editó una monografía sobre células tumorales malignas; a principios del siglo XIX Joseph Récamier inventó el espéculo vaginal con el cual podía visualizar el cuello uterino y obtener células de la vagina y del cuello uterino (Nauth, 2004).

La citología ginecológica comienza, en sentido estricto, en 1943 con George N. Papanicolaou, quien nació en 1883 en Grecia, estudió Medicina en Atenas y en 1913 emigró a Estados Unidos de América, trabajó varios años en investigación

en la Universidad de Cornell de Nueva York, donde se dedicó a estudiar, en animales, el comportamiento cíclico hormonal del epitelio vaginal (Varela, 2005).

En 1917 publicó en el “American Journal of Anatomy” su famoso escrito “Existencia de un ciclo típico estrogénico en animales; estudio de los cambios fisiológicos y patológicos” que fue la base del estudio de toda su vida. Durante este estudio descubrió la presencia de células tumorales en algunos frotis. El Dr. Papanicolaou dedicó 45 años al estudio de la citología exfoliativa, desde 1923 la propuso como un método para diagnóstico de cáncer uterino, sin embargo, el método no tuvo aceptación (Varela, 2005).

Continuó estudiando y mejorando las técnicas de extendido vaginal y cervical, así como técnicas de conservación y tinción de las células. La persistencia y dedicación del Dr. Papanicolaou permitió hacer de la citología y del frotis vaginal una herramienta clínica común. Actualmente la citología vaginal con tinción de Papanicolaou constituye el método por excelencia de tamizaje para detección temprana de cáncer de cuello uterino en mujeres (Varela, 2005).

La citología vaginal exfoliativa o colpocitograma es una técnica simple, que se utiliza con mucha eficiencia para determinar el estadio del ciclo estral en perras y gatas, dado que los niveles cambiantes de estrógenos en sangre producen variaciones morfológicas en el epitelio vaginal (Cowell *et al.*, 1999).

Se basa en determinar el tipo y cantidad de células de las diferentes etapas del ciclo estral. Al inicio, 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 (Kirk, 1994).

Otras utilidades incluyen la predicción de la fecha probable de parto, ayuda en la determinación de diagnóstico de vaginitis, tumores vaginales, piómetra, metritis aguda, y orientación para la utilización de anticonceptivos en el momento adecuado del ciclo (Feldman & Nelson, 2000).

En la citología vaginal de la perra encontramos células epiteliales de las diferentes capas del epitelio estratificado plano no queratinizado, en algunas especies se

manifiesta un epitelio vaginal con queratina, ocasionado por los estrógenos (Feldman & Nelson, 2000), también pueden observarse células endocervicales, de reserva y en ocasiones células endometriales así como células no epiteliales como son eritrocitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y espermatozoides entre otros, cuando la hembra se ha apareado previamente (Buen, 2001).

Las células exfoliadas del epitelio vaginal se nombran de acuerdo con su morfología. Los cambios en la morfología de estas células incluyen incremento en el tamaño de la célula, cambios en su forma, observación de precursores de queratina en la célula y degeneración del núcleo (picnosis) (Johnston *et al.*, 2001).

Las células encontradas en frotis vaginales han sido clasificadas como células parabasales, intermedias pequeñas y grandes, y células superficiales nucleadas y anucleadas (Cowell *et al.*, 1999).

Estas células son colectadas usando un hisopo estéril con una longitud de 10-17 cm, humedecidos previamente con suero fisiológico, especialmente si no existe secreción, para favorecer la dispersión celular y mejorar la capacidad. Es importante evitar el contacto del hisopo con el vestíbulo, ya que las células no reaccionan tan rápido al incremento de estrógenos en sangre como la mucosa vaginal (Röttger, 2010).

El hisopo se introduce separando los labios vulvares, dirigiéndolo primero en un ángulo de 45°, pegado a la pared caudodorsal de la vagina para evitar la fosa clitorídea (pues produce dolor y ofrece imágenes erróneas) y posteriormente, se continúa de forma horizontal, intentando llegar al fondo de la vagina, craneal al meato urinario. Después de realizar movimientos giratorios con el hisopo, frotando contra la pared vaginal, se procede a su extracción. Se realizan 2 o 3 trazos sobre un portaobjetos, girando suavemente el hisopo, sin presionar ni pasar dos veces por el mismo sitio para evitar dañar las células. Conviene usar de dos a cuatro portaobjetos para disponer de un mayor campo de observación y, si es necesario, realizar distintas tinciones. Tras secar unos instantes, debe fijarse inmediatamente y proceder a su tinción (Martínez de Merlo, 2008).

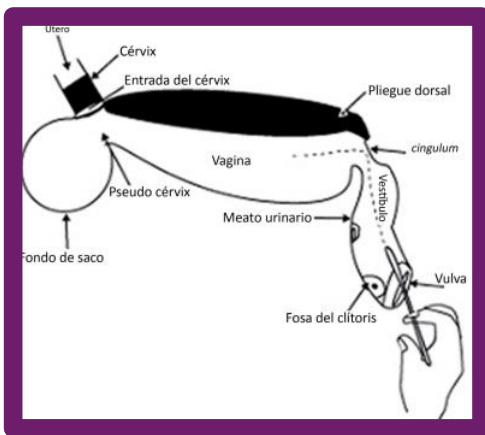


Figura 8. Esquema para toma de CVE.
(Fuente: Páramo & Balcázar, 2005).

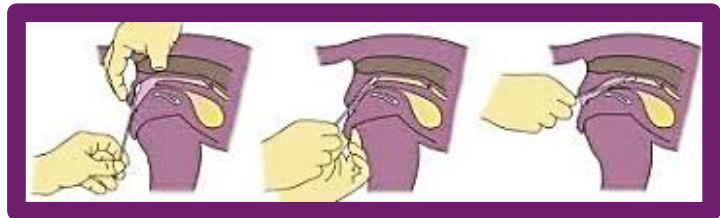


Figura 9. Secuencia de hisopado en perras.
(Fuente: Feldman E.C, Nelson R., 1991).

Los frotis pueden ser teñidos usando tinción tricrómica o de Papanicolaou, pero la técnica es laboriosa (England *et al.*, 2002). También se pueden teñir con azul de metileno y observar inmediatamente después de la aplicación de la tinción, pero los eritrocitos no se tiñen y los frotis no se pueden almacenar para su posterior examen (Johnston *et al.*, 2001). Otras técnicas que pueden ser usadas son May-Grunwald, Boehringer Mannheim, Pappenheim y Test simples (Gunzel & Koivisto, 1984).

Diff-Quick® o Haemacolor® (Merck KGaA) es una tinción modificada de Wright-Giemsa de fácil aplicación en la práctica clínica. El frotis es sumergido en metanol y después es teñido con dos soluciones del tren Diff-Quick®. Estos frotis pueden ser examinados después de muchos años (Chatdarong *et al.*, 2002).

TIPOS DE CELULARIDAD

- **Células basales**

Son las células más pequeñas (10-20µm) en la pared vaginal. El núcleo abarca casi por completo el citoplasma y es raramente identificada ya que se encuentra en la membrana basal. Son células que no se exfolian (Wright & Parry, 1989).

Por lo general se desprenden en pequeños grupos, y tiene afinidad por colores básicos, no suelen observarse en frotis normales, sino en procesos en los que se han lesionado las capas celulares superficiales, por ejemplo; atrofia, vaginitis o ulceraciones de la mucosa (Feldman & Nelson, 2000).

Tienen afinidad por colores básicos, con tinción de Papanicolaou se observan de color azul oscuro (basófilo). Con tinción de Diff-Quick® se observan con una coloración morada para el núcleo y de azul oscuro a azul claro (De Buen *et al.*, 2001).

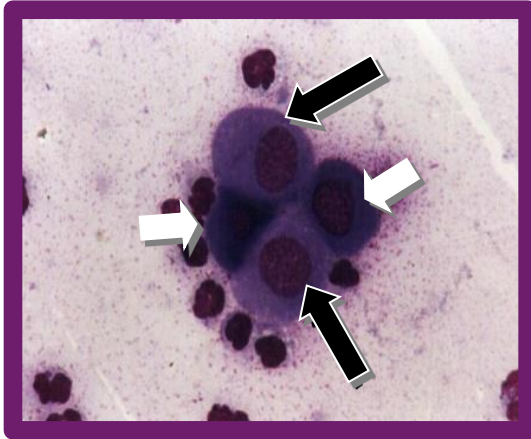


Figura 10. CVE. Células basales (Flechas blancas) Células parabasales (Flechas negras)
(Fuente: Sánchez, 2007).

▪ Células parabasales

Son células pequeñas (15-25 μ m) redondas u ovoides con un núcleo grande. Ocasionalmente contienen vacuolas en el citoplasma. Pueden contener algunos neutrófilos en citoplasma, y estas células pueden presentarse en otras etapas del ciclo estral (Proestro temprano o diestro, por ejemplo). Se desprenden de la capa de células germinales cercana a los vasos sanguíneos (Wright & Parry, 1989). Se tiñen de color azul con tinción de Papanicolaou (De Buen *et al.*, 2001).

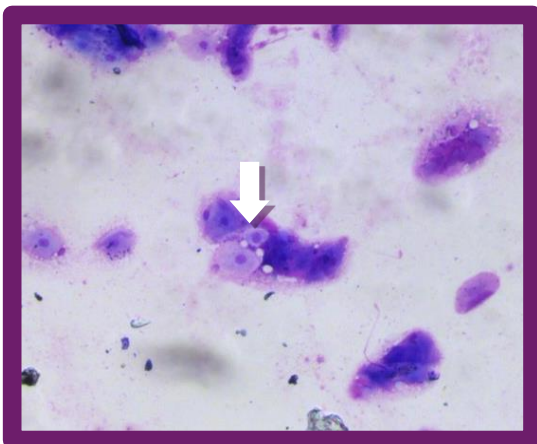


Figura 11. CVE. Célula parabasal. Tinción Papanicolaou. (Foto tomada con microscopio óptico en el Lab. 2 UIM, FESC-4, UNAM).

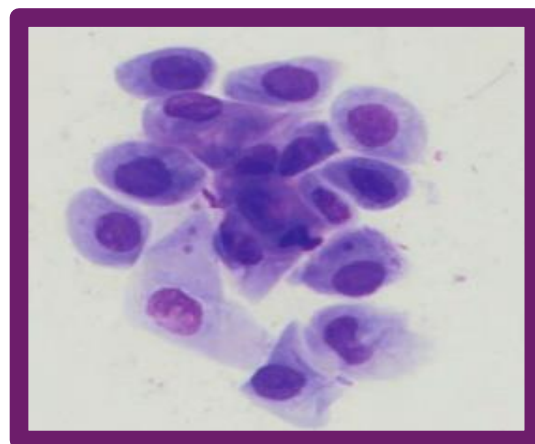


Figura 12. CVE. Células parabasales. Tinción no referida.
(Fuente: Martínez de Merlo, 2008).

▪ Células intermedias

Son de diámetro variable, pequeñas (20µm) y largas (30µm), de contorno y núcleo bien definido (Maneke, 2002). Se originan en el estrato medio del epitelio. Representa la célula más constante y numerosa en los frotis vaginales (Cruz & Fariña, 2003).

Las células intermedias pequeñas son redondas o elípticas, pero también puede tener un contorno poligonal, mientras que las células intermedias grandes tienen un borde citoplasmático irregular y angulado (Christie *et al.*, 1972). Las células intermedias tienen un núcleo prominente. Las intermedias largas a menudo son confundidas con células superficiales porque el tamaño entre ellas es similar (Johnston *et al.*, 2001).

Con la tinción de Papanicolaou suelen presentar citoplasma basófilo, sin embargo, en ocasiones puede ser eosinófilo dependiendo del pH celular y de los colorantes utilizados. Generalmente son encontradas en el final del proestro (De Buen *et al.*, 2001; Feldman & Nelson, 2000).

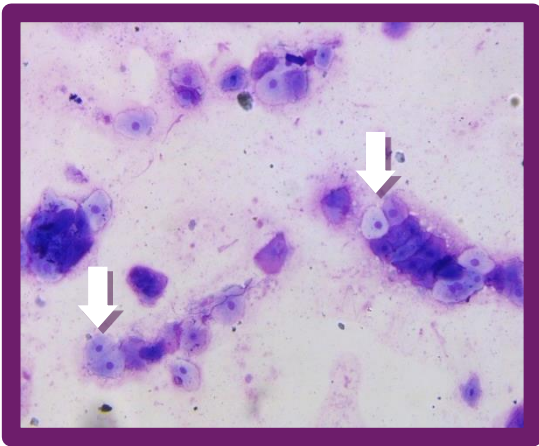


Figura 13. CVE. Células intermedias. Tinción Papanicolaou. (Foto tomada con microscopio óptico en el Lab. 2 UIM, FESC-4, UNAM).

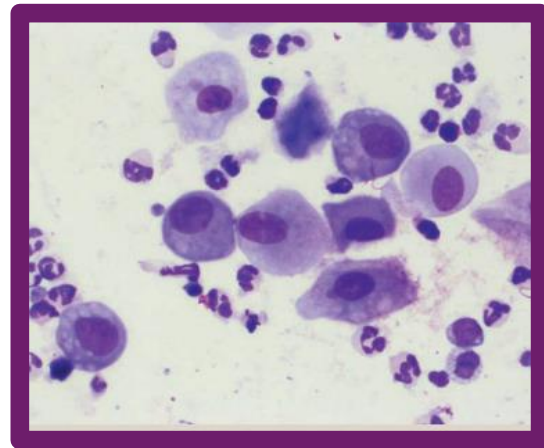


Figura 14. CVE. Células intermedia y abundantes neutrófilos. Tinción no referida. (Fuente: Martínez de Merlo, 2008).

- **Células superficiales**

Son células largas con un rango de diámetro entre 30 μm y 75 μm de forma poligonal, citoplasma transparente (Christie *et al.*, 1972). Tienen ángulos irregulares, y un núcleo picnótico. Las células superficiales alcanzan su máximo momento en el pico de estrógenos (Johnson, 2006).

El citoplasma habitualmente se tiñe de color rosa, puede variar a azul pálido dependiendo del pH celular. La afinidad tintorial de estas células depende del grado de maduración, siendo las eosinófilas más maduras que las basófilas (De Buen *et al.*, 2001).

Se originan de la capa superficial del epitelio escamoso no queratinizado, son las más comunes de la fase preovulatoria y reflejan el mayor grado de madurez. El citoplasma es translúcido, homogéneo, preferentemente eosinófilo y ocasionalmente puede presentar gránulos de queratohialina alrededor del núcleo cuya presencia es estrógeno-dependiente. Los núcleos son pequeños (5-7 μm), centrales y redondos. El criterio decisivo para la identificación de la célula superficial es la picnosis, independientemente de la tinción del citoplasma (Cruz & Fariña, 2003).



Figura 15. CVE. Células superficiales, características de estro. Tinción Papanicolaou. (Foto tomada con microscopio óptico en el Lab. 2 UIM, FESC-4, UNAM).

- **Células anucleadas**

También llamadas escamosas, son células cornificadas largas las cuáles sufrieron degeneración para convertirse en células anucleadas. Estas células escamosas se presentan plegadas, con citoplasmas amarillentos o anaranjados como consecuencias de alto contenido en citoqueratinas y pueden estar centradas por

una zona clara que coincide con la localización de su antiguo núcleo. Éste es un hallazgo patológico que indica hipermaduración epitelial y que puede observarse en casos de prolapso uterino (Cruz & Fariña, 2003).

Se observan en gran cantidad durante el estro debido a la maduración epitelial (De Buen *et al.*, 2001).

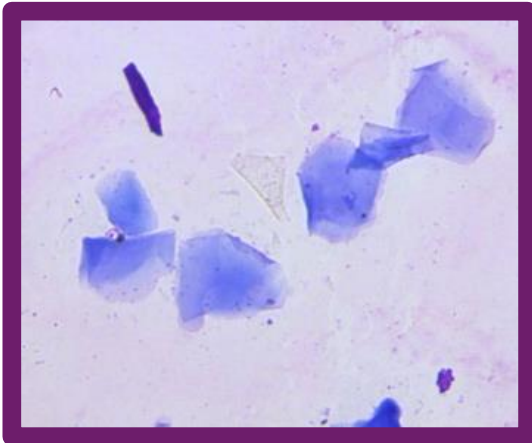


Figura 16. CVE. Células anucleadas. Tinción Papanicolaou. (Foto tomada con microscopio óptico en el Lab. 2 UIM, FESC-4, UNAM).

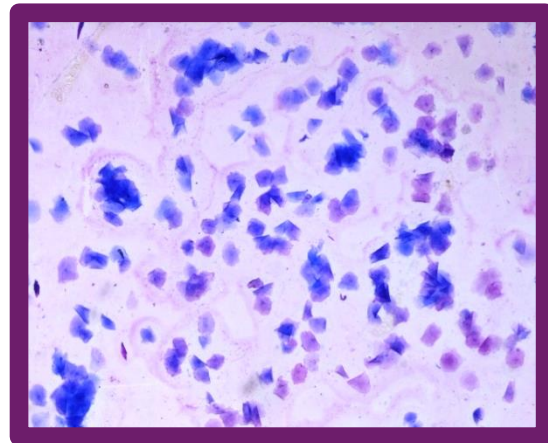


Figura 17. CVE. Células anucleadas. Tinción Papanicolaou. (Foto tomada con microscopio óptico en el Lab. 2 UIM, FESC-4, UNAM).

- **Células de la fosa del clítoris**

Son células queratinizadas, anucleadas y fusiformes (Wright & Parry, 1989), observadas en frotis vaginales normales llegando a ser abundantes si se toma la muestra de la fosa del clítoris más que del vestíbulo vaginal, es decir, son indicativas de una incorrecta toma de muestra (De Buen *et al.*, 2001).

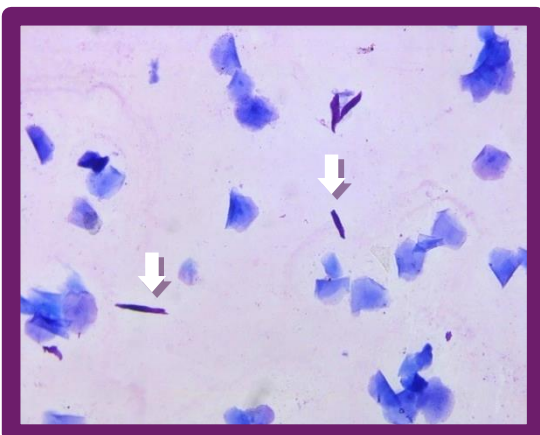


Figura 18. CVE. Células de la fosa del clítoris. Tinción Papanicolaou. (Foto tomada con microscopio óptico en el Lab. 2 UIM, FESC-4, UNAM).

- **Eritrocitos**

Su presencia también está relacionada con procesos traumáticos (lesiones en la toma de muestras citológica o biopsia), período postparto y procesos inflamatorios agudos del endometrio (Brook, 1985).

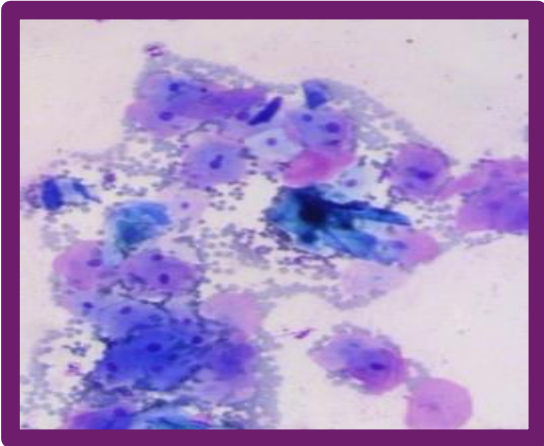


Figura 19. CVE. Eritrocitos, células intermedias pequeñas y algunas células superficiales nucleadas. Tinción Papanicolaou (Foto tomada con microscopio óptico en el Lab. 2 UIM, FESC-4, UNAM).

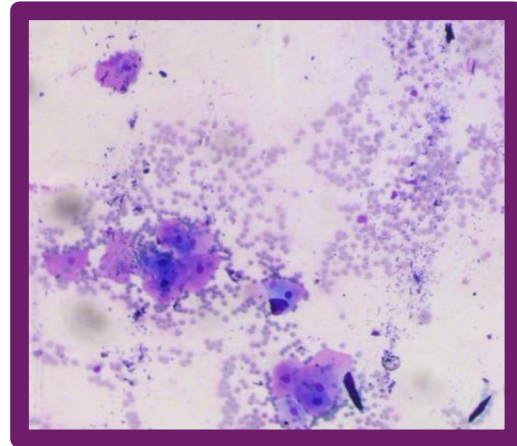


Figura 20. CVE. Abundantes eritrocitos. Tinción Papanicolaou. (Foto tomada con microscopio óptico en el Lab. 2 UIM, FESC-4, UNAM).

- **Neutrófilos**

Son las primeras células que responden ante un estímulo antigénico, por lo tanto, son un buen indicador de un proceso inflamatorio agudo del endometrio, por ello es importante tanto la cuantificación como la evaluación de la morfología celular para clasificar el extendido. Los cambios citoplasmáticos incluyen la basofilia y la vacuolización, entre otros (Dascanio, 1997; Katila, 1995).

- **Neutrófilos intracitoplasmáticos**

Están presentes en células intermedias y se encuentran dentro del citoplasma, normalmente en diestro temprano (Stornelli *et al.*, 2006).

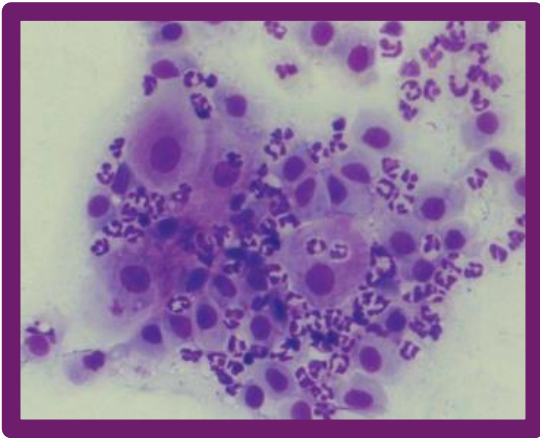


Figura 21. CVE. Neutrófilo intracitoplasmático. Tinción no referida. (Fuente: Martínez de Merlo, 2008).

TINCIÓN DE PAPANICOLAU

▪ Descripción de la tinción

La tinción de Papanicolaou es un método de tinción policrómico que consta de una tinción nuclear y un contraste citoplasmático. Tiene como ventaja una buena definición del detalle nuclear, evidenciando el patrón de cromatina; un aspecto transparente del citoplasma, que permite apreciar los grados de diferenciación celular y actividad metabólica. Esta tinción usa tres colorantes: la Hematoxilina que tiñe selectivamente los núcleos, el Orange G y la Eosina Alcohol 50 que tiñe los citoplasmas. Los pasos de la tinción están entremezclados con soluciones que hidratan, deshidratan y enjuagan las células (Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva, 2006).

La Hematoxilina es un colorante natural que tiene afinidad por la cromatina. Existen dos métodos para teñir el núcleo, el progresivo y el regresivo. En el método progresivo se tiñe el núcleo con la intensidad del color deseado y en el regresivo se sobretiñe con una Hematoxilina no acidificada, luego se remueve el exceso de tinción con ácido clorhídrico diluido. Después de algunos minutos las células son deshidratadas gradual o abruptamente antes de efectuar las tinciones de contraste (Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva, 2006).

La tinción con Orange G es una tinción monocromática que colorea la queratina de un naranja brillante y penetra rápidamente el citoplasma. La queratina no se encuentra en condiciones normales en el epitelio cervical vaginal (se encuentra en

carcinomas queratinizados) (Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva, 2006).

La Eosina Alcohol 50 es una tinción policroma compuesta de Eosina, verde luz y café Bismark. La Eosina tiñe el citoplasma de las células escamosas maduras, núcleos y cilios. La verde luz tiñe las células que son metabólicamente activas, como las células parabasales, intermedias. Las células superficiales se tiñen rosadas con la Eosina y por ello se describen como eosinófilicas. Las células parabasales e intermedias se tiñen de verde azul, dependiendo del tiempo de la tinción EA y se llaman cianofílicas. En el paso final de la tinción se da el aclaramiento, produciéndose la transparencia celular usando Xilol (Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva, 2006).

Tabla 1. Método original de coloración de Papanicolaou (L.Renwick, 2019)

Alcohol etílico 96°	15 segundos
Alcohol etílico 70°	15 segundos
Alcohol etílico 50°	15 segundos
Agua Destilada	15 segundos
Hematoxilina de Harris	6 minutos
Agua destilada	10 inmersiones
Sol ácido clorhídrico 0,5%	1 -2 inmersiones
Agua Destilada	15 segundos
Sol Amoníaco 1,5% en ol 70°	La extensión vira al azul.
Alcohol etílico 50°	15 segundos
Alcohol etílico 70°	15 segundos
Alcohol etílico 96°	15 segundos

OG 6 (orange)	2 minutos
Alcohol etílico 96°	10 inmersiones
Alcohol etílico 96°	10 inmersiones
EA 50 Eosina amarillenta	3 minutos
Alcohol etílico 96°	10 inmersiones
Alcohol etílico 100°	10 inmersiones
Xilol	10 inmersiones
Montaje: Con Bálsamo de Canadá y cubrir con cubreobjetos de vidrio de la medida adecuada para cobertura total de la muestra.	

DETECTOR ELECTRÓNICO DE OVULACIÓN

Se ha informado el uso de la medición de la resistencia eléctrica intravaginal desde 1961, pero la variación entre los resultados obtenidos en diferentes estudios sugirió la necesidad de una evaluación adicional. Durante las últimas tres décadas, se ha prestado mucha atención al monitoreo de la resistencia eléctrica vaginal como un método sencillo para entender el ciclo estral en diferentes animales domésticos (Gupta & Purohit, 2001).

Uno de los elementos más importantes de la reproducción animal es la detección del celo, por la relación entre eficiencia de inseminación y la fecha de su realización. Buscando el método simple y exacto para detectar el celo, se consiguió la relación directa de cambios de resistencia eléctrica en la mucosa vaginal al momento de la presentación del celo. Se le denomina resistencia eléctrica a la igualdad de oposición que tienen los electrones al moverse a través de un conductor. La unidad de resistencia en el Sistema Internacional es el Ohmio, que se representa con la letra griega omega (Ω), en honor al físico alemán Gregor Ohm, quien descubrió el principio que ahora lleva su nombre (Rezac, 2008; Bergeron *et al.*, 2014).

Se detectó que la resistencia es más pequeña en el momento de la presentación del celo; esto se relaciona también con los cambios hormonales como el cambio de LH en sangre. El estro es la fase más visible del ciclo estral. Es caracterizada por la maduración folicular, ovulación y proliferación de la mucosa endometrial, así como su preparación para la aceptación temprana del embrión. Junto con cambios en los ovarios y mucosa uterina, también se producen cambios en el cérvix, con la apertura del canal cervical para facilitar el transporte de esperma y secreción de moco cervical como medio en el cual se pueden mover los espermatozoides (Stancic & Veselinovic, 2002).

Para medir la resistencia del moco vaginal, se realiza una prueba con electrodos circulares colocados en la vagina y se mide la resistencia eléctrica entre los anillos (Günzel *et al.*, 1986; Ruiz *et al.*, 1998).

Durante el estro, el canal cervical se abre, y se encuentra relajado y lleno de moco. El moco en el estro es producido por glándulas del canal cervical, el cual se llena de moco, que se expande en forma de hilos largos a través de la vagina y vulva (Matarugic *et al.*, 2007).

El moco vaginal, contiene algunos electrolitos (Sales de Sodio, Magnesio, Calcio y otros cationes) los cuales determinan su reacción electroquímica. Estos electrolitos en un frotis pueden observarse como cristales. Durante las etapas del ciclo estral ocurren ciertos cambios entre la composición y la relación de algunos electrolitos en el moco vaginal. Durante el estro, los niveles de estrógeno son altos, lo que causa que los niveles de cloruro de sodio se eleven, resultando en niveles de resistencia eléctrica más bajos que los habituales (Talukder *et al.*, 2018). La presencia de electrolitos lleva a la ionización del moco vaginal durante el estro, método por el cual se determina su resistencia eléctrica (Rorie *et al.*, 2002).

Los cambios en la composición del moco vaginal junto con los cambios en la resistencia eléctrica representan la base de este método diagnóstico. Durante el estro, la resistencia eléctrica disminuye, y en la siguiente etapa el valor aumenta, lo cual indica que el momento de la ovulación se aproxima (Tasal *et al.*, 2005).

Algunas condiciones patológicas del aparato reproductor, como vaginitis, pueden dar lecturas de resistencia del moco vaginal similares a valores durante el estro (Firk *et al.*, 2002).

INTERPRETACIÓN

Si el animal está fuera de tiempo de celo, la resistencia tiene valor más o menos de 400 unidades. Si el celo se está acercando, el valor de la resistencia comienza a bajar hasta mínimo de 320 o menos unidades y después otra vez sube hasta el nivel alto para quedarse en este nivel hasta el próximo celo (Draminski®, 2020).

En práctica se debe conseguir el mínimo de la resistencia y después el aumento importante de los resultados. Claro está, que la frecuencia de mediciones en el tiempo de celo tiene que ser adecuada, para no perder el celo. En este tiempo se debería medir la resistencia por lo menos dos veces al día (Draminski®, 2020).

Para la detección del celo es necesario conseguir el mínimo de resistencia y después el momento de aumento de los valores. La ovulación debería presentarse unas horas después del aumento de los valores y éste es mejor momento para el servicio o la inseminación artificial. Los resultados de resistencia 400 unidades fuera del celo y 320 durante el celo son más típicos, pero podemos conseguir animales con resistencia mucho más baja durante el celo y mucho más alta fuera del celo (470 unidades). Si se detecta la resistencia de 320 unidades no significa automáticamente, que el animal está en celo. Se realizan las siguientes mediciones observando al animal y buscando el mínimo de los resultados y después su aumento importante (Draminski®, 2020).

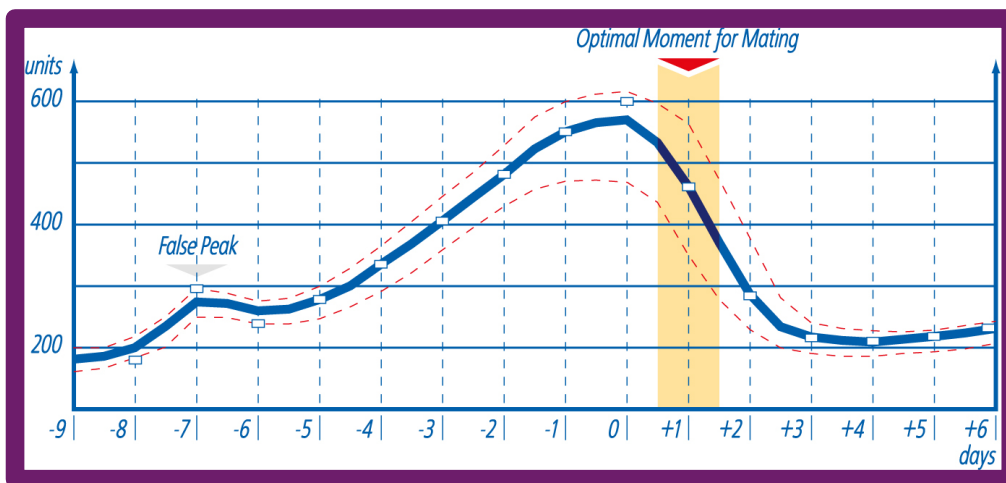


Figura 22. Interpretación de resultados de la medición de la resistencia eléctrica del moco vaginal, según el fabricante (Draminski®,2020).

Si las lecturas están entre 100-200 unidades, no se necesita tomar muestreos diarios. Cuando las lecturas anden cerca de 200, las lectura o muestreos deben ser tomados a diario. Cuando los valores empiezan a elevarse es necesario tomar lecturas más frecuentemente como dos, tres, cuatro veces más al día para determinar el punto preciso de ovulación. Así las lecturas pueden tomarse durante el desayuno, almuerzo o cualquier hora. Esto es precisamente importante en el caso de perra que ovula tempranamente o solo por un límite de tiempo para que acepte al perro (Draminski®, 2020).

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 al 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, 2013).

En los últimos 40 años, la evaluación de la función endócrina ha presentado un avance extraordinario. La introducción del radioinmunoensayo y técnicas relacionadas (Enzima inmunoanálisis, Quimioluminiscencia, y Electroquimioluminiscencia) han permitido medios altamente específicos y sensitivos para medir hormonas en suero, plasma, leche y otros líquidos

corporales. Los inmunoensayos han ayudado a aumentar el conocimiento de eventos endócrinos y metabólicos que ocurren durante el estrés, enfermedades, ciclos reproductivos, crecimiento y desarrollo (Engelking, 2000).

- **Determinación de niveles séricos de Progesterona (P₄)**

Durante el manejo de rutina de la perra, las concentraciones séricas de P₄ preovulatorias se miden a menudo para determinar el tiempo apropiado para la inseminación. Si la inseminación no es apropiadamente cronometrada o el ciclo es anormal, podría haber pérdidas financieras, particularmente si se envía semen. Por lo tanto, es importante determinar las concentraciones de P₄ en muestras de sangre preovulatoria para estimar el día del pico de LH (día 0), no sólo para inseminar con precisión el tiempo y predecir el parto, sino también para identificar ciclos anormales o inusuales que señalen la disfunción ovárica (Kutzler *et al.*, 2003).

El fundamento de la utilización de la determinación hormonal se basa en los niveles de P₄ en sangre. La ovulación ocurre 48 horas (rango de 24-72 horas) después del pico de LH, la maduración ovocitaria se da 2-3 días post-ovulación, y el momento de fertilidad máxima es entre 2 y 5 días post-ovulación. Debido a esto, se necesitará determinar exactamente el momento del pico de LH, pero esto es muy difícil debido a su corta vida media en sangre (1-3 días) (Reimers, McCann & Cowan, 1982).

Por esto anterior, se definió el uso de los niveles de P₄ en sangre como método para determinar el momento óptimo, ya que presenta 0.5 ng/ml en etapas basales y a las 48 horas antes del pico de LH, esta aumenta a niveles entre 2-5 ng/ml a más de 40 ng/ml (en 5 días promedio), manteniéndose elevada durante el estro hasta alcanzar los valores máximos en los 13-28 días de finales esta etapa (Reimers *et al.*, 1991).

Para todas las muestras sanguíneas, es una buena práctica separar el suero o plasma de la sangre total tan pronto como sea posible. Esto minimiza el riesgo de hemólisis. Ciertas hormonas que son bastante estables en humanos no lo son en muestras sanguíneas de animales (Reimers *et al.*, 1991).

Los animales que se consideran adecuados para el análisis de P₄ son aquellos que han entrado en la fase de proestro/estro y que comienzan a presentar una predominancia de células cornificadas en la citología vaginal. La determinación del día aproximado de la ovulación puede realizarse por medio de los niveles de P₄ sérica, porque la concentración de esta hormona aumenta 2 a 3 días antes de la ovulación (Nachreiner, 1996).

Si la historia reproductiva previa es desconocida, la primera muestra de sangre debe ser obtenida a los 4-6 días después del inicio del proestro. Si las concentraciones en esta muestra son menos de 3 nmol/l, las próximas muestras deben ser tomadas cada 3 días, hasta que una concentración interpretable sea detectada (Nachreiner, 1996).

En la actualidad la P₄ se mide por medio del radioinmunoanálisis (RIA) o por Electroquimioluminiscencia realizados en laboratorios o por el uso de kits de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) realizados en la consulta veterinaria. Las mediciones realizadas por inmunoensayos de laboratorio tienen ventajas sobre el ELISA, ya que los primeros dan un valor cuantitativo específico y objetivo en lugar de un valor semicuantitativo basado en la interpretación subjetiva de cambios de color (Nachreiner, 1996).

MOMENTO DEL SERVICIO E INSEMINACIÓN ARTIFICIAL (IA)

Desde que Lazzaro Spallanzani en 1787 realizó la primera IA con semen fresco en caninos, este procedimiento ha sido aplicado y desarrollado a través del tiempo en la reproducción de pequeños animales. Spallanzani había observado que las bajas temperaturas provocaban una reducción reversible de la actividad metabólica de los espermatozoides, lo cual permitía almacenarlos (Wei *et al.*, 2017).

En 1956, Harrop logró la primera preñez con semen refrigerado abriendo las puertas a la criopreservación. Posteriormente, en 1969, se comunicó por primera vez una IA satisfactoria con semen congelado. La IA en caninos ha recorrido un largo camino, llegando hoy a poder realizar IA a bajas dosis con semen sexado (Wei *et al.*, 2017).

Con el avance de la biotecnología, cada vez es más frecuente el uso de IA tanto para realizarla con semen fresco como con semen criopreservado. El estado de salud y nutrición de los reproductores, así como el manejo del momento de inseminación, semen utilizado y técnica de inseminación determinarán el éxito o fracaso de la IA (Stornelli, 2017).

La IA permite la interacción de dos reproductores cuando no se puede llevar a cabo el servicio natural, optimizar el uso de semen de buena calidad (inseminando a 2 o más perras con un mismo eyaculado), utilizar semen sexado y utilizar semen criopreservado (Stornelli, 2017).

Varias son las indicaciones para realizar IA en el perro, sin embargo, deben considerarse algunas cuestiones éticas en relación con los diferentes intereses de grupos específicos (criadores, propietarios y veterinarios). Es una técnica valiosa cuando ciertas anomalías físicas y/o de comportamiento en machos y hembras impiden el apareamiento natural, sin olvidar que nunca debe lograrse descendencia mediante IA en animales con afecciones transmisibles a la descendencia (Stornelli, 2017).

Cuadro 1. Algunas ventajas de la Inseminación artificial (Mason, 2018).

Evitar la transmisión de trastornos genéticos mediante el uso de semen de perros sanos.
Mayores servicios, es decir, se pueden inseminar más perras por eyaculación de un semental.
Disponibilidad de semen en distancias largas.
Uso de semen sano, libre de enfermedades y patógenos para evitar infecciones en las hembras.
Reduce significativamente las enfermedades de transmisión sexual como TVT.
Al evitar montas naturales se mitiga el nivel de estrés en animales con problemas fisiológicos o patológicos.
Evitar los problemas de comportamiento de las hembras, como el rechazo o agresión, hacia el macho.

El período de máxima fertilidad para el servicio natural en animales altamente fértiles se ha determinado empíricamente, y se extiende desde el día del pico de LH hasta 6 días después de éste. Es decir, desde 2 días antes de la ovulación hasta 4 días después de la ovulación. No se detectaron diferencias en la tasa de preñez o tamaño de camada con un solo apareamiento en cualquiera de esos días. Los apareamientos anteriores o tardíos resultan en bajas tasas de preñez, y los servicios tardíos, cuando son exitosos, resultan en camadas más pequeñas (Kustritz, 2001; Echeverría, 2005; Gobello, 2006).

La duración prolongada de la maduración ovocitaria en el oviducto junto con la longevidad del semen del macho en el tracto aparato reproductor de la hembra (espermatozoides viables hasta 7 días), explica que una hembra montada en el primer día del estro pueda quedar preñada. Esto también explica la existencia de la superfecundación, que es la obtención de cachorros de más de un macho en un mismo ciclo (Fila & Berglavaz, 2002).

La IA es una técnica útil, de baja o mediana complejidad, de moderado costo, que brinda grandes posibilidades en la clínica reproductiva diaria y el desarrollo biotecnológico. Sin embargo, si no se tienen en cuenta algunos factores sumamente importantes en su aplicación, puede tornarse una práctica desalentadora (Stornelli, 2017).

El éxito de la IA en caninos está íntimamente relacionado con:

- Estado de salud y nutrición de los reproductores.
- Detección del momento de mayor fertilidad de la hembra.
- Tipo, manejo y calidad del semen utilizado.
- Implementación de una técnica adecuada de IA.

Si se cumplen con estos requisitos, la probabilidad de éxito será alta mientras que, en caso contrario, será una experiencia frustrante (Stornelli, 2017).

En la actualidad la IA se realiza con semen fresco, refrigerado o congelado, cada tipo de semen nos brindará distintas posibilidades de aplicación, así como también exigirá un manejo de diferente complejidad. En Sudamérica la IA con semen fresco se realiza ocasionalmente, aunque, su uso ha ido en aumento en la última

década en relación con el desarrollo de la clínica reproductiva en caninos y al aumento de reproductores de razas en las cuales el servicio natural se dificulta (Stornelli, 2017).

- **Evaluación de la hembra**

La IA debe ser realizada en el momento adecuado para que los espermatozoides puedan interaccionar con óvulos maduros capaces de ser fecundados, de otro modo no será un procedimiento exitoso (Farstad, 2000).

En los caninos la duración del proestro es variable, pudiendo oscilar entre 3 y 21 días. La ovulación ocurre aproximadamente 48 horas luego de ocurrido el pico preovulatorio de LH, al inicio del estro. El ovocito es ovulado al comienzo de la primera división meiótica (ovocito primario), la maduración se completa en el oviducto y requiere aproximadamente 2 días (Farstad, 2000).

El estudio de frotis vaginales seriados desde el comienzo del proestro nos permitirá, junto con la imagen vaginoscópica, aproximar el comienzo del estro (Linde-Forsberg, 1991; Steckler *et al.*, 2013; Bergeron *et al.*, 2014).

Aun así, no podemos identificar exactamente el momento de mayor fertilidad de la hembra. La concentración de P₄ sérica hará posible determinar el momento de la ovulación a través de la estimación indirecta del pico de LH. La P₄ asciende de niveles basales (0.5 ng/ml) a niveles superiores (≥ 2 ng/ml) cuando ocurre el pico preovulatorio de LH. El dosaje sérico Steckler o de LH es el método más exacto para identificar el pico de LH; sin embargo, debido al costo, este método no se utiliza rutinariamente (Concannon *et al.*, 1975).

- **Evaluación del macho**

La motilidad es una variable de gran importancia en la calidad seminal. Se estima que un semen de buena calidad debe poseer no menos del 70% de espermatozoides con motilidad progresiva (Johnston, 1991).

Si bien la relación entre el tipo de defecto y fertilidad no ha sido establecida, se ha observado pérdida de la capacidad fecundante asociada con la presencia de gota citoplasmática proximal. Por el contrario, la presencia de gota citoplasmática distal

no se ha relacionado con pérdida de fertilidad seminal. Ambos defectos disminuyen la resistencia espermática al congelado, por lo cual deben considerarse a la hora de realizar la criopreservación de semen (Morton & Bruce, 1992).

El semen de baja calidad se relaciona no sólo con bajas tasas de preñez sino también con producción de camadas de escaso número de cachorros (Linde-Forsberg & Forsberg 1988; Forsberg, 1991; England & Concannon, 2002).

MÉTODOS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

El conocimiento de la calidad de semen de un reproductor nos permitirá estimar las probabilidades de éxito en la utilización de este para realizar IA con semen fresco o criopreservado. En el perro la información disponible sobre la relación entre calidad del semen y fertilidad es escasa comparada con otras especies. Se ha estimado que la cantidad mínima de espermatozoides necesarios para preñar una hembra es de 150 a 200 x 10⁶ (Dumon & Fontbone, 1992).

En el perro se estima que 200 X 10⁶ espermatozoides viables al descongelado son necesarios para obtener tasas aceptables de preñez (Johnston *et al.*, 2001).

▪ Inseminación artificial con semen fresco

La IA con semen fresco es una práctica sencilla y poco costosa que puede implementarse sin inconvenientes en la clínica reproductiva diaria. La utilización de IA con semen fresco brindará resultados comparables (tasas de preñez y tamaño de la camada) con los obtenidos mediante servicio natural (Linde-Forsberg, 1996).

La obtención de semen se realiza rutinariamente por manipulación digital, aunque puede utilizarse electro eyaculación en animales muy agresivos o en los que no logran eyacular por la técnica manual. La recolección de la fracción espermática es suficiente para realizar la IA, parte de la fracción prostática puede recolectarse sólo para asegurarse que se ha recolectado toda la segunda fracción. Si el volumen de la fracción espermática es escaso, la fracción prostática puede servir para aumentarlo y facilitar el manejo del semen. Una vez colectado en un recipiente adecuado, el semen es aspirado con una jeringa y depositado

inmediatamente luego de la extracción en la vagina craneal, mediante una sonda de longitud variable según el tamaño de la hembra (Ettinger *et al.*, 2017).

Mediante IA con semen fresco se podrá obtener descendencia cuando no es posible realizar servicio natural por diferentes causas pudiendo ser aprovechados estos animales como reproductores. Esta práctica no debe ser llevada a cabo cuando la imposibilidad del servicio se relacione con problemas de transmisión hereditaria como por ejemplo displasia de cadera (Stornelli, 2017).

- **Inseminación artificial con semen refrigerado**

Mediante el agregado de diluyentes, el semen puede ser refrigerado y de esta manera conservado y transportado. Las bajas temperaturas disminuyen las tasas metabólicas del espermatozoide y prolongan su longevidad (Watson, 1995).

Los diluyentes protegen a las membranas del espermatozoide del daño causado por los cambios de temperatura, proveen energía y mantienen estables el pH y la osmolalidad (Marshall & Hugh, 1990). Los antibióticos agregados a los diluyentes evitan la proliferación bacteriana, en especial en los que contiene yema de huevo (Rota *et al.*, 1995).

Para la conservación de semen a 4°C se han usados diferentes diluyentes. Dentro de los más utilizados se encuentra el Tris-Buffer con el agregado de 20% de yema de huevo y diluyentes compuestos por yema de huevo y crema o leche descremada (Kirk, 1994).

Para la refrigeración se colecta la fracción espermática del semen y se la mezcla con el diluyente elegido, el cual debe encontrarse a la temperatura del semen en el momento de la dilución. Entre semen y diluyente debe respetarse una relación 1:3 o 1:4, una proporción excesiva de diluyente tendrá influencias negativas sobre la motilidad. El semen así preparado puede refrigerarse a 4°C y utilizarse para IA lográndose tasas de preñez aceptables durante las primeras 24-48 horas. Previo a la IA el semen refrigerado debe alcanzar lentamente la temperatura ambiente (Linde-Forsberg, 1996).

Esto hace posible la IA de una hembra con el semen de un macho que se encuentre en otra provincia u otro país limítrofe o cercano con mínimo gasto y baja

complejidad de manejo. De esta manera se amplían las posibilidades de uso de un reproductor, permitiendo la comercialización de semen y facilitando el intercambio genético entre diferentes establecimientos. La simplicidad de manejo del semen refrigerado y su bajo costo, lo convierten en una excelente opción para nuestro país. (Stornelli, 2017).

- **Inseminación artificial con semen congelado**

Mediante la congelación es posible el uso del semen de un macho cuando este ya no puede ser usado como reproductor, inseminar una hembra que se encuentre en una localización geográfica distante y almacenar semen en épocas en las cuales el reproductor no sea requerido para servicios. Así mismo un banco de semen constituye un importante reservorio genético para la cinofilia y la conservación de razas en las que la población pueda disminuir drásticamente en el futuro (Stornelli, 2017).

Se requiere tener un control periódico del termo de almacenamiento que asegure un volumen de nitrógeno que permita una buena conservación del semen, y una reducida exposición de este a temperatura ambiente fuera del nitrógeno, para conservarlo en buenas condiciones para su uso posterior (Stornelli, 2017).

Si bien el proceso de congelación de semen canino requiere un moderado costo, equipamiento, infraestructura y entrenamiento del operador, su utilización mediante IA puede ser aplicada en la práctica diaria mediante el uso de técnicas de IA intrauterinas sencillas (IA quirúrgica) que no requieren más entrenamiento que el necesario para realizar una ovariectomía, práctica de rutina en el ejercicio profesional diario (Stornelli, 2017).

Los resultados obtenidos por los diferentes autores son muy variables, esto puede explicarse por la variabilidad existente entre diluyentes, envasado y metodología de congelación y descongelación utilizadas (Stornelli, 2017).

TÉCNICAS DE IA

- **Inseminación artificial intravaginal**

En la IA intravaginal el semen será depositado en la vagina craneal de la hembra mediante un catéter de longitud acorde al tamaño del animal. La vagina de la

hembra canina es de una longitud apreciable (10 a 12 cm en una Beagle de 10 kg de peso), y varía enormemente con la raza considerada. Es así como el tamaño de los catéteres también tendrá gran variación. El catéter se introducirá a través de los labios vulvares, evitando la fosa del clítoris, dirigiéndose primero hacia dorsal para luego dirigirse hacia craneal adecuándose a la anatomía de la hembra canina. Una vez que el catéter se encuentra en el fondo de la vagina, el semen es impulsado a través de él mediante una jeringa y depositado en vagina craneal. Luego el catéter es retirado y la hembra es mantenida 10 a 15 minutos con el tren posterior elevado (England *et al.*, 2016).

La estimulación dorsal de la vagina con un dedo enguantado durante la inseminación aumentará las contracciones uterinas y ayudará al transporte del semen del semen depositado (England *et al.*, 2016).

- **Inseminación artificial intrauterina transcervical**

La IA intrauterina puede realizarse mediante la cateterización del cuello uterino con catéteres de 20 a 50 cm de longitud y 0.5 mm de diámetro, con la punta protegida por una cubierta de nylon. Con la hembra en cuadripedestación, el operador fija el cérvix entre sus dedos a través de la pared abdominal, con la otra mano introduce el catéter hasta la región del cuello, retira la cubierta de nylon y penetra el cuello uterino para depositar el semen en el cuerpo del útero. No es necesario sedar al animal, pero el operador necesita entrenamiento previo para realizar correctamente la técnica (Linde-Forsberg, 1991).

Este método permite al operador visualizar el cuello facilitando la maniobra de cateterización uterina. La hembra no necesita sedación, el operador requiere cierto entrenamiento y el equipamiento posee un costo considerable. La cateterización del cuello puede realizarse visualizando el cérvix con ayuda de un endoscopio (Tsutsui, 1989).

- **Inseminación artificial intrauterina quirúrgica**

Puede realizarse mediante laparotomía, con anestesia general o epidural. Se deposita lentamente el semen en el cuerpo o cuernos uterinos mediante una jeringa y una aguja calibre 21, con el bisel hacia arriba y una inclinación de 45°. Es

una práctica sencilla pero el número de inseminaciones es limitado y deben extremarse las medidas para evitar infecciones (Held, 1997).

También puede realizarse mediante laparoscopia, técnica utilizada rutinariamente en ginecología humana. Sin embargo, el costo de los equipos hace que esta técnica haya sido utilizada ocasionalmente. La IA intrauterina puede realizarse depositando el semen en el útero, a través de la cateterización de cérvix o inoculándolo directamente en el cuerpo o cuernos uterinos en forma quirúrgica. La elección de la técnica dependerá de la calidad y tipo de semen utilizado y de los equipos disponibles (Stornelli, 2017).

Cuadro 2. Fertilidad obtenida tras la IA (England, 2012).

SEMEN	TIPO DE IA	TASA DE FERTILIDAD (%)
Fresco	Vaginal	80 ± 16
	Intrauterina	95 ± 4
Refrigerado	Vaginal	47 ± 9
	Intrauterina	81 ± 19
Congelado	Vaginal	45 ± 24
	Cervical	60 ± 15
	Intrauterina	70 ± 11

OBJETIVOS

▪ **Objetivo general**

Comparar los datos de la citología vaginal exfoliativa, concentración de progesterona sérica, y del detector electrónico de ovulación, para determinar cuál de los métodos es el más eficiente para determinar el momento óptimo para realizar la inseminación artificial en perras de la raza Bulldog Inglés.

▪ **Objetivos particulares**

- Identificar la etapa del ciclo estral en el que se encuentra la hembra, al momento de la toma de muestra mediante la revisión de citologías vaginales exfoliativas.
- Determinar la concentración de progesterona sérica.
- Medir la resistencia del moco cervical por medio de un detector electrónico de ovulación (Draminski®)
- Comparar los tres métodos para determinar si uno es más eficiente que los otros en términos de fertilidad (tamaño de camada).

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en la clínica veterinaria “World Tiny Pets” ubicada en Boulevard Coacalco 658, Villa de las Flores, 55710, San Francisco Coacalco, Estado de México y en el laboratorio 2 de Reproducción Animal (L2) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), localizado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4 (FESC C-4), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ubicada en el Km 2.5 de la carretera Cuautitlán-Teoloyucan, Municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

▪ **Material biológico**

Se emplearon 50 perras de raza Bulldog Inglés que fueron llevadas por sus propietarios a la clínica veterinaria “World Tiny Pets” para el monitoreo de su ciclo estral e inseminación artificial, durante el periodo del 26 de junio del 2018 al 15 de julio del 2019. Antes de la toma de muestras, se hizo una sencilla anamnesis de la paciente canina la cual tenía los siguientes datos: fecha, nombre de la perra, edad y color. De cada perra se tomaron muestras del epitelio vaginal para CVE, así como la toma de sangre para la determinación de P_4 y la lectura del detector electrónico de ovulación Draminski®. La toma de muestras para CVE fue variada, ya que en algunas perras fue a diario durante 10 días, mientras que en otras fue aleatorio, pero obteniendo al menos 3 muestras por cada perra.

▪ **Obtención de la citología vaginal**

Una vez llena la hoja con anamnesis y realizado el examen físico general, se procedió a realizar la CVE, el proceso para toma de muestras se describe en el apartado de CVE. Una vez obtenida la muestra se hizo impresión por rodamiento en un portaobjetos limpio. Esto hizo por duplicado, ya que una citología vaginal se fijaba en seco y se teñía en la clínica veterinaria “World Tiny Pets” con la tinción de Diff-quick® (Cuadro 3), ya que era necesaria la evaluación de la citología, en ese momento, para determinar si se debía tomar la muestra de sangre, y la otra se fijaba en húmedo con alcohol durante 10 minutos para su posterior tinción con Papanicolaou (Cuadro) en el Laboratorio 2 de la UIM (FES Cuautitlán, UNAM).

Cuadro 3. Tinción Diff-Quick®

TINCIÓN	TIEMPO
Fijador (Metanol)	1 minuto
Tinción I (Eosina Y)	10 pases
Tinción II (Tiazina+Azul de Metileno+Azure A)	10 pases
Agua destilada	

Cuadro 4. Tinción de Papanicolaou

TINCIÓN	TIEMPO
Hematoxilina	3 minutos
Alcohol 96	10 pases
Alcohol 96	10 pases
OG6	4 minutos
Alcohol 96	10 pases
Alcohol 96	10 pases
EA50	4 minutos
Alcohol 96	10 pases
Alcohol 96	10 pases
Alcohol 100	10 pases
Alcohol 100	10 pases
Xilol	2 minutos

Pasados los 2 minutos de la citología vaginal en el Xilol, se sacó con unas pinzas y se puso a secar en la campana de extracción hasta que seicara por completo. Se observó cada citología con un microscopio óptico, se realizó una lectura rápida con el objetivo de 20x, y después, con el objetivo 10x, se leyeron 6 campos por citología, 3 dorsales y 3 ventrales; el conteo de células se realizó con un contador de teclas, teniendo un conteo total de 100 células. También se observó la distribución de las células, presencia de moco, eritrocitos, neutrófilos, o bacterias,

una vez leídos los 6 campos, se registraron los datos en una bitácora, y así se determinó la etapa del ciclo estral en que se encontraba la perra en ese momento.

- **Lecturas con el detector electrónico de ovulación**

El aparato se desinfectó antes de cada uso, enseguida se procedió a introducirlo en la vagina de la perra. Para esto, los labios vulvares fueron separados uno de otro para introducir cuidadosamente la sonda del aparato dentro de la vagina, se dieron de 2 a 3 giros de media vuelta con la sonda del aparato para cubrir los electrodos con la mucosa vaginal. Se encendió el aparato y se presionó el botón hasta que salieron los números, 1, 2, 3, y en la última presión del botón, se dio el resultado, el cual se registró en el formato disponible para cada paciente. Una vez realizado esto, se sacó el aparato de la vagina de la perra y se limpió. Estas lecturas se realizaron cada vez que se tomó alguna muestra para citología vaginal de cada hembra.

- **Toma y procesamiento de la muestra de sangre para la detección de P₄**

Se puncionó la vena cefálica, y en algunos casos la vena safena, obteniendo como mínimo 1 ml de sangre. Una vez obtenida, se centrifugó a 2500-3000 rpm durante 5-10 minutos. Se transfirieron 30 µl de suero, evitando burbujas en la muestra, con una pipeta a un tubo con buffer de detección. Se cerró la tapa del tubo buffer de detección y se mezcló la muestra por agitación. Se pasaron 75µl de la mezcla de muestra y reactivo, y se colocó en la ventana de muestra del cartucho. Se dejó el cartucho con la muestra a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después se insertó en la bandeja de cartucho del ichroma™. Se pulsó el botón 'Select' en el lector para iniciar el proceso de captura, y se leyó el resultado de la prueba en la pantalla de visualización. El resultado se interpretó en términos de ng/ml de P₄, si el resultado se obtuvo en nmol/l se hizo una conversión a ng, considerando que 1 ng/ml = 3.18 nmol/l.

El criterio para la toma de la muestra de sangre fue el siguiente: la celularidad correspondiente a la etapa de estro en la CVE, y los niveles de Draminski® sugerentes de ovulación.

- **Evaluación de la fertilidad**

Cabe señalar que para este trabajo no se tienen datos de calidad seminal de cada macho, y tampoco si las 50 hembras muestreadas en este estudio lograron una gestación, por ende no se conoce el tamaño de camada en aquellas donde no se tuvo el registro (17 hembras). Nuestro indicador de fertilidad fue el resultado positivo de gestación en las 33 hembras en las que se realizó la IA en la clínica, así como los datos de tamaño de camada.

Posterior a la inseminación artificial se registró la fecha de nacimiento de las crías y el tamaño de camada, este último dato se empleó como medida de la fertilidad.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS

Los niveles de Progesterona se clasificaron en 3 categorías: i) <4 ng/ml, ii) 4-12 ng/ml y iii) >12 ng/ml. La razón de estas agrupaciones fue que algunos autores mencionan que la P₄ se encuentra entre los 4 -5 ng/ml cuando ocurre la ovulación, sin embargo, no hay un número fijo, por lo que se decidió tomar el valor de 4 ng/ml como línea de corte.

Los valores obtenidos (Ohmios) del Detector electrónico de ovulación se clasificaron de acuerdo con los criterios ya establecidos de la Progesterona (<4 ng/ml, 4-12 ng/ml y >12 ng/ml). De acuerdo con esta última clasificación, se calcularon las medias y error estándar de Progesterona y Draminski®. Los datos se analizaron mediante las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Wilcoxon para determinar si había diferencias estadísticas significativas.

En cuanto a las citologías vaginales, ya clasificadas en las 3 etapas del ciclo estral encontradas, se obtuvieron los promedios y error estándar de Draminski® y Progesterona, de acuerdo con la etapa del ciclo estral en la que se obtuvieron las mediciones.

Esto se realizó con los datos agrupados de 2 diferentes maneras: en la primera, se incluyeron los datos de todas las perras, aunque hiciera falta alguna lectura (Draminski® o Progesterona); en la segunda, sólo se incluyeron las perras en que se tenían todas las lecturas de citología vaginal exfoliativa, Draminski® y

progesterona. La razón de esto fue determinar si existía diferencia cuando se tienen todos los datos completos del monitoreo del ciclo estral de la hembra o no.

En cuanto al tamaño de camada, se clasificaron de acuerdo con los niveles de Progesterona en los que se realizó la inseminación artificial (4-12 ng/ml y < 12ng/ml) y sólo se sacaron valores promedio de ambas clasificaciones. Los datos se analizaron utilizando el programa de estadística SPSS v15.0 (2006, Chicago, USA).

RESULTADOS

En el cuadro 5 se presentan los valores promedio (Ohmios) del aparato Draminski® agrupados en tres intervalos de los niveles de progesterona. Los valores del detector electrónico de ovulación para el intervalo de $P_4 \leq 4$ fueron diferentes ($P < 0.05$) a los obtenidos en el intervalo 4 a 12, siendo estos últimos más altos (563.3 ± 30.71). En contraste, los valores del Draminski® fueron similares entre los intervalos ≤ 4 y de 4 a 12 de P_4 .

Cuadro 5. Comparación de valores (Ohmios) obtenidos del detector electrónico de ovulación (Draminski®) en tres intervalos de concentración de Progesterona y tamaño de camada en perras Bulldog Inglés.

	INTERVALOS DE PROGESTERONA (ng/ml)		
	≤ 4	4 a 12	≥ 12
Draminski® (Ohmios)	$335.9 \pm 49.04a$	$563.3 \pm 30.71b$	$507.6 \pm 57.59ab$
Tamaño de camada (número de cachorros)	-	6.3 ± 1.20	5.3 ± 0.46

Los valores son medias \pm error estándar. Valores con letras distintas en renglones difieren significativamente ($P < 0.05$). El intervalo de $\leq 4 P_4$ está vacío porque no se hace IA en ese momento.

En el cuadro 6 se presentan las lecturas (valores promedio) del detector electrónico de ovulación (Draminski®), los niveles séricos de P_4 , y las diferentes etapas del ciclo estral, determinadas por citología vaginal exfoliativa. Los valores obtenidos del detector Draminski® en la etapa de proestro, fueron diferentes ($P < 0.05$) a los obtenidos en la etapa de estro, siendo estos últimos más altos

(601.23 ± 30.37 Ohmios). En contraste, los valores del Draminski® fueron similares entre proestro y diestro.

En cuanto a niveles séricos de P₄ (ng/ml), los valores obtenidos en proestro fueron diferentes (P<0.05) a los obtenidos en las etapas de estro y diestro, siendo en estas últimas etapas, los valores similares.

Cuadro 6. Valores del detector electrónico de ovulación (Draminski®) y niveles séricos de progesterona obtenidos durante las diferentes etapas del ciclo estral de perras de raza Bulldog Inglés.

ETAPA DEL CICLO ESTRAL	DRAMINSKI® (Ohmios)	PROGESTERONA (ng/ml)
Proestro	374.8 ± 32. 61a	6.3 ± 0. 59a
Estro	601.2 ± 30.37b	9.0 ± 0.46b
Diestro	183.1 ± 38. 77a	12.5 ± 2.00b

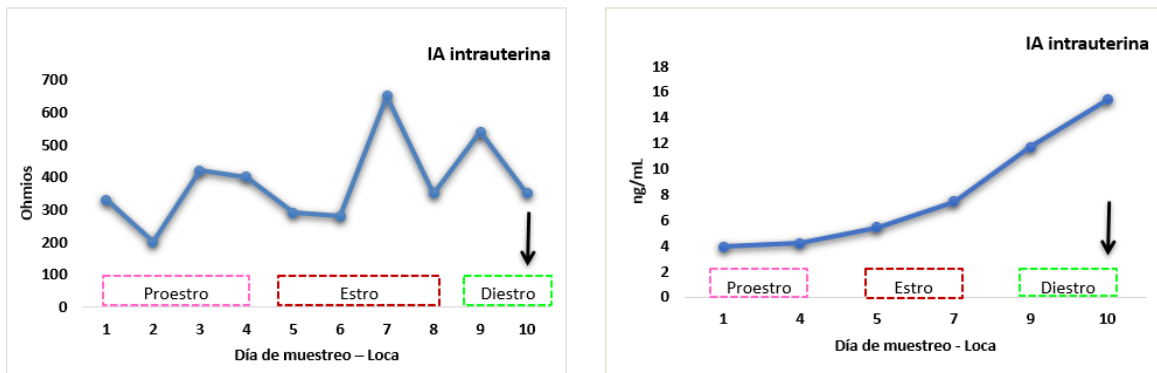
Los valores son medias ± error estándar. Valores con letras distintas en columnas difieren significativamente (P<0.05).

En las siguientes gráficas se muestran los valores Draminski®, niveles de progesterona, el día y tipo de inseminación de una de las perras que forman parte de este estudio, con la finalidad de mostrar de manera integral el comportamiento de dichas variables; el resto de las gráficas se presenta en el anexo I. Las hembras fueron agrupadas de acuerdo con las etapas del ciclo estral determinadas por la citología vaginal exfoliativa; primero se presentan las de 3 etapas (n=2. Gráfica 1), las de 2 (n=21. Gráficas 2-12) y finalmente las de una sola etapa (n=27. Gráficas 13-26).

Se puede observar que en la mayoría de las perras los niveles de Draminski® más altos se presentan en la etapa de estro, mientras que en proestro y diestro, los niveles son más bajos. En cuanto a la P₄, en algunas perras el aumento en las concentraciones séricas es constante, sin embargo, en otras perras se da un aumento mayor a lo mostrado durante el celo, de un muestreo a otro.

En estas gráficas se muestra además el día en que se llevó a cabo la inseminación artificial y el sitio en que se depositó el semen (intrauterina o vaginal), utilizando como criterios para ello los valores del Draminski®, el nivel de

progesterona sérica, así como la etapa del ciclo estral en la que se realizó la inseminación artificial.



DISCUSIÓN

Existen diversos métodos para determinar la etapa del ciclo estral, así como la ovulación en perras, sin embargo, en este trabajo se utilizaron tres: citología vaginal exfoliativa, detector electrónico de ovulación y niveles séricos de progesterona. La toma de muestras fue variada, ya que en algunas perras fue a diario durante 10 días, y en otras aleatorio, pero obteniendo 3 muestras al menos de cada perra. Cada muestreo iba acompañado por CVE y medición de la resistencia eléctrica del moco vaginal; una vez que en la CVE se observó celularidad correspondiente a la etapa de estro y los niveles de Draminski® sugerían ovulación, se procedió a tomar muestra de sangre para evaluar los niveles séricos de P₄. Como punto final de evaluación de estos métodos se registró el tamaño de camada como parámetro de fertilidad.

Las técnicas de IA realizadas en estas perras fueron: inseminación vaginal e inseminación artificial intrauterina quirúrgica. La elección de la técnica fue a petición de los dueños, en su mayoría se realizó la inseminación intrauterina quirúrgica ya que la justificación de los dueños es que consideran que es un método que asegura una gestación exitosa; la razón para elegir la Inseminación vaginal es porque en algunas perras era su primer servicio o porque consideran que realizar la IA intrauterina quirúrgica es demasiado invasiva ya que es un proceso quirúrgico, y una vez realizado, se tiene que someter a la perra a otro

proceso quirúrgico 2 meses después ya que se debe realizar la operación cesárea.

También se analizó el tamaño de camada, para esto se hicieron 2 grupos de acuerdo con el valor de P_4 . En el grupo cuyo rango fue de 4 a 12 ng/ml de P_4 , el valor promedio de camada fue 6.3 ± 1.20 cachorros; en el grupo > 12 ng/ml de P_4 , el tamaño de camada fue 5.3 ± 0.46 cachorros. Es conveniente aclarar que de las 50 perras incluidas en este estudio sólo se tenían los datos de tamaño de camada de 33 hembras (6 vs 27, del primer y segundo grupo respectivamente). Esta disparidad en el número de datos evita obtener conclusiones sólidas respecto a este parámetro.

En cuanto al tamaño de camada, Christiansen (1989) reporta que en Bulldog el tamaño promedio de camada es de 5.9 cachorros, mientras que Borge *et al.*, (2011), reportan un promedio de 5.4 cachorros, siendo ambos valores similares a los obtenidos en este trabajo. Sin embargo, en este último trabajo no se especifica la técnica de inseminación que se utilizó, sólo se menciona que fue con semen fresco y semen congelado respectivamente.

Los resultados se ordenaron de dos diferentes maneras: en la primera agrupación se incluyó a todas las hembras donde no se tenía alguno de los datos recopilados durante el monitoreo (citología vaginal exfoliativa, nivel de la resistencia eléctrica del moco vaginal o nivel sérico de Progesterona); las hembras en la etapa de **proestro** tuvieron niveles promedio de Draminski® de $374.82 \pm 32.51 \Omega$, datos similares a los obtenidos por Jong-Soo *et al.*, (2013) a inicios del proestro, $376.20 \pm 105.63 \Omega$. En contraste, Pérez (2016) reportó valores de entre $159.41 \pm 144.37 \Omega$ y $1061.35 \pm 133.22 \Omega$, al inicio y al último día del proestro, respectivamente. Por otro lado, Leidl y Stolla (1976) reportan valores diferentes de $226 \pm 98 \Omega$. En este mismo grupo de hembras en proestro, los niveles de progesterona fueron 6.25 ± 0.59 ng/ml, a diferencia de Pérez (2016) que obtuvo valores de 4.72 ± 1.27 ng/dL,

En las hembras en **estro** los niveles del Draminski® fueron $601.23 \pm 30.37 \Omega$, similares a los reportados por Rocha-Fonseca (2016), 700Ω , en perras cuya citología indicaba estro. En cambio, Leidl y Stolla (1976), y Jong-Soo *et al.*, (2013) reportaron valores menores a los anteriores: $373 \pm 200 \Omega$ y $438 \pm 132 \Omega$,

respectivamente. Estas variaciones tan grandes podrían deberse al día del estro en que se realizó la lectura; la duración del estro es muy variable. Nuestros resultados concuerdan con los de Mshelia y Amin (2000) quienes concluyen que la fase del ciclo estral donde los valores de resistencia del moco vaginal son más altos es el Estro.

Los niveles de progesterona en nuestro estudio se encontraron en 9.03 ± 0.46 ng/ml, hallazgo similar al encontrado por Cortés y Gil (2014), 8.3 - 14.8 ng/ml, con predominio de células superficiales. Jong-Soo *et al.*, (2013) mencionan que el estro se da cuando las concentraciones de P_4 aumentan por encima de los 5 ng/ml; Mayén (2014) tomó en cuenta una etapa de estro citológico con 60-90% de células cornificadas y los valores de progesterona promedio fueron de 13.28 nmol/l, cabe señalar que las unidades son diferentes a los datos anteriores ya que se usó un kit de medición diferente y utiliza esas unidades. Arcila *et al.*, (2005) consideraron un estro citológico observando más de 75% de células superficiales, encontrando niveles inferiores a 10 ng/ml en la fase de estro temprano y en un estro más avanzado los fueron de 10 a 20 ng/ml.

En nuestro trabajo, durante la etapa de **diestro**, los niveles de Draminski® fueron $183.08 \pm 38.77\Omega$ y la progesterona 12.51 ± 2.00 ng/ml, en contraste con el trabajo reportado por Cortés y Gil (2014) quienes reportaron un rango de 5.1 a 16.5 ng/mL. Sin embargo, nuestros valores están dentro de ese rango.

En la segunda agrupación sólo se seleccionaron hembras donde se tenían los datos completos: en la etapa de **proestro** los niveles de Draminski® estaban en $381.62 \pm 41.90 \Omega$ y de Progesterona 6.23 ± 0.58 ng/ml; en **estro** los niveles de Draminski® se encontraron en $631.98 \pm 34.33\Omega$ y los niveles de Progesterona en 9.03 ± 0.45 ng/ml, y en **diestro** los niveles de Draminski® en $314.00 \pm 68.23\Omega$ y de progesterona en 12.5 ± 2.00 ng/ml. De acuerdo con lo observado en el presente trabajo y con los antecedentes de nuestros dos grupos de investigación podemos afirmar que los valores más altos de resistencia del moco vaginal se obtuvieron en la etapa de estro; sin embargo, la curva esperada (de acuerdo al fabricante del aparato Draminski®) sólo se observó en algunas perras.

Quesada (2016) menciona que una de las observaciones más relevantes en su práctica, fue que las primeras mediciones de P₄ en 27 hembras se encontraban en niveles tan bajos como 0.5 ng/ml, a pesar de mostrar CVE con una celularidad típica de estro; estos hallazgos se pueden comparar con nuestro trabajo, ya que la celularidad observada en la CVE no siempre tuvo relación con los niveles séricos de P₄, ya que en algunos casos cuando se observó un estro citológico, los niveles de P₄ estaban por debajo de los 5 ng/ml. Concannon *et al.*, (1977) mencionan que la elevación de la concentración de P₄ antes de la ovulación en perras, es un evento bastante peculiar, ya que la concentración encontrada por el método de RIA fue de 5.44 ± 0.93 ng/ml al momento de la ovulación.

Las mediciones de la resistencia del moco vaginal han sido utilizadas para predecir el momento de la inseminación en algunos animales de granja, principalmente en ganado bovino y porcino, con diferentes grados de éxito. La variación en la medición de la impedancia del moco vaginal puede tener causas físicas y biológicas como la inestabilidad del contacto entre la mucosa vaginal y los electrodos debido a los cambios en el tono de la vagina, el atrapamiento de aire en la vagina durante la inserción de una sonda de electrodo o la presión de la mano en forma desigual, infecciones, y el temperamento del animal pueden causar lecturas de resistencia imprecisas o erróneas (Pugh *et al.*, 2000). Otras fuentes de variación en las lecturas de la resistencia del moco vaginal son factores estresantes como limitación en el ejercicio, peleas por territorio y períodos de celo, entre otros, asociados con las alteraciones hormonales ocurridas durante el ciclo (Scipioni & Foote, 1999; Ziarrusta, 2002; Rezac, 2008; Jong-Soo *et al.*, 2013).

CONCLUSIÓN

El uso coordinado de la citología vaginal exfoliativa y la determinación de la concentración de progesterona es la mejor combinación para elegir el momento para llevar a cabo la inseminación artificial, esto con base en los resultados de fertilidad expresados como tamaño de camada. El Draminski® es un buen auxiliar, pero tiene el inconveniente de que no es fácil la separación de los valores correspondientes al estro y al diestro, por esto se requiere el apoyo de las otras pruebas.

REFERENCIAS

- Adler NT. 2012. Neuroendocrinology of reproduction: physiology and behaviour. Springer Science & Business Media. New York London.
- Ajala O, Fayemi O, Oyeyemi M. 2012. The Oestrous cycle of the Nigerian local bitch. *Global veterinara*. 574-582 pp.
- Allen E. 1995. Fertility and Obstetrics in the Dog. Blackwell Scientific Publications. England.
- Alonso P, Larios N, Lorenzana R, Serrano M. 1981. Compendio citología ginecológica. Ed Médicos S.A. México D.F.
- Andersson H, Rehm S, Stanislaus D. 2013. Scientific and Regulatory Policy Committee (SRPC) Paper: Assessment of Circulating Hormones in Nonclinical Toxicity Studies III. Female Reproductive Hormones. *SAGE Journals*. 41(6):921-934.
- Arcila-Quiceno V, Serrano- Novoa C, Hernández M, Meza L. 2005. Estandarización de la citología vaginal exfoliativa correlacionando los niveles séricos de progesterona en perras durante la peri-ovulación. Repositorio Institucional UCC.
- Badinand F, Fontbonne A, Murel MC, Siliart B. 1993. Fertilization time in the bitch relation to plasma concentration of estradiol, progesterone and luteinizing hormone and vaginal smears. *Journal of Reproduction and Fertility*. 47:63-67.
- Banks WJ. 1996. Histología veterinaria aplicada. Ediciones, El manual moderno.
- Bergeron LH, Nykamp SG, Brisson BA, Madan P, Sears W, Gartley CJ. 2014. Vaginal impedometry for detection of optimal breeding time in bitches. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 245(12):1360-1366.
- Brook D 1985. Cytological and bacteriological examination of the Mare's endometrium. *Journal of Equine Veterinary Science*. 5(1):16-22.
- Buen D. 2001. Citología diagnóstica veterinaria. Ediciones, El Manual Moderno.

- Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva. Secretaría de Salud. 2006. Manual de Procedimientos: Tinción e interpretación de la Muestra de Citología Cervical. Primera edición. México.
- Chastant-Maillard S, Viaris de Lesegno C, Chebrou M, Thoumire S, Meylheuc T, Fontbonne A, Chodkiewicz M, Saint-Dizier M, Reynaud K. 2010. The canine oocyte: uncommon features of in vivo and in vitro maturation. *Reproduction, Fertility and Development*. 23(3):391-402.
- Chatdarong K, Kampa N, Axner E, Linde-Forsberg C. 2002. Investigation of Cervical Patency and Uterine Appearance in Domestic Cats by Fluoroscopy and Scintigraphy. *Reproduction in Domestic Animals*. 37(5):275-281.
- Christiansen Ib J. 1989. Reproducción en el Perro y en el Gato. Inter-Vet. Buenos Aires.
- Christie DW, Bailey JB, Bell ET. 1972. Classification of cell types in vaginal smears during the canine oestrus cycle. *British Veterinary Journal*. 128(6):301-310.
- Concannon PW. 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science*. 124(3-4):200-210.
- Concannon PW. 2003. Reproductive biology and breeding management of the female dog. *Revista Brasileira de Reproducao Animal*. 27(2)157-165.
- Concannon PW. 2009. Endocrinologic control of normal canine ovarian function. *Reproduction in Domestic Animals*. 2:3-15.
- Concannon PW, Hansel W, Visek WJ. 1975. The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biology of Reproduction*. 3(1)112-121.
- Concannon PW, Castracane VD, Temple M, Montanez A. 2009. Endocrine control of ovarian function in dogs and other carnivores. *Reproduction in Domestic animals*. 6(1):172-193.
- Concannon PW, Hansel W, Mcentee K. 1977. Changes in LH, Progesterone and Sexual Behavior Associated with Preovulatory Luteinization in the Bitch. *Biology of Reproduction*. 17(4):604-613.

- Concannon PW, McCann JP, Temple M. 1989. Biology and Endocrinology of Ovulation, Pregnancy and parturition in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility*. 39:3-25.
- Cortés-Ramírez N, Gil-López L. 2014. Comparación de dos métodos para determinar el momento óptimo de la fertilización, en hembras caninas en la ciudad de Bogotá. Tesis de licenciatura. Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia.
- Cruz-Pelea C, Fariña González J. 2003. Citología ginecológica. *Revista española de Patología*. 37(4)
- Cunningham J. 2009. Fisiología veterinaria. Cuarta edición. Elsevier. España
- Dascanio JJ, Parker NA, Ley WB, Bailey TL, Purswell BJ, Bowen JM, Digraissie WA. 1997. Diagnostic procedures in mare reproduction: uterine evaluation, hysteroscopy, oviductal patency and scintigraphy. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*. 19(9):1069-1076.
- De los Reyes M, Sánchez A. 2000. Fisiología reproductiva de la perra. *Tópicos de reproducción en pequeños animales*. Editorial, Corrion & Green Ltda. Santiago, Chile.
- De los Reyes M, Palomino J, Parraguez VH, Hidalgo M, Saffie P. 2011. Mitochondrial distribution and meiotic progression in canine oocytes during in vivo and in vitro maturation. *Theriogenology*. 75(2):346-353.
- DRAMINSKI® Detector de celo. 2020. Polonia.
- Dumon C, Fontbone A. 1992. *Reproduction du chien et du chat*. Collection "Les indispensables de l'animal de compagnie". Editorial, PMCAC. Paris.
- Echeverría J. 2005. Aspectos farmacológicos en el manejo reproductivo de la perra. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*. 6(3):1-21.
- England G, Concannon PW. 2002. Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations. In: *Recent Advances in Small Reproduction*. Concannon PW, England G, Verstegen J, Linde-Forsberg C. IVIS. International Veterinary Information Service. New York, USA.

- England GCW, Moxon R, Freeman SL. 2012. Stimulation of mating-induced uterine contractions in the bitch and their modification and enhancement of fertility by prostatic fluid. *Reproduction in Domestic Animals*. 47(6):1-5.
- England GC, Russo M, Freeman SL. (2016). Artificial insemination in dogs and cats 1. Collection and preservation of canine semen. *In practice*. 36(2):77-83.
- Escobedo Herrera, Wilmer Servando. 2008. Diagnóstico del estro por medio de citología vaginal en perras. Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Esquivel C. 2012. Ciclo estral en la perra y técnicas utilizadas para su seguimiento. *Vanguardia Veterinaria*. 52:6-25.
- Ettinger SJ, Feldman EC, Cote Etienne. 2017. *Textbook of Veterinary Internal: Medicine Expert Consult*. Elsevier health sciences. United States: Saunders Philadelphia.
- Farstad W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*. 53(1):175-186.
- Feder H. 1981. Estrous Cyclicity in mammals. In: *Neuroendocrinology of reproduction. Physiology and behaviour*. Adler N. Plenum Press. New York.
- Feldman E, Nelson R. 2000. *Endocrinología y Reproducción en Perros y Gatos*. Ediciones, McGraw-Hill Interamericana. México, D.F.
- Fila D, Berglavaz A. 2002. Fisiología reproductiva de la perra. En: *Reproducción en los animales domésticos*. Ungerfeld R. Montevideo, Melibea.
- Firk R, Stamer E, Junge W, Krieter J. 2002. Automation of oestrus detection in dairy cows: a review. *Livestock Production Science*. 75(3):219-232.
- Galina C, Valencia J. 2008. *Reproducción de los animales domésticos*. Ediciones Limusa. México.
- Günzel AR, Koivisto P, Fougner JA. 1986. Electrical resistance of vaginal secretions in the bitch. *Theriogenology*. 25(4):559-570.
- Gunzel AR, Koivisto P. 1984. Aktuelles zum Sexualzyklus der Hundindiagnostische Möglichkeiten durch vaginalzytologische Untersuchungen mittels Testsimplets. *Praktische Tierarzt*. 65(2):161-172.

- Gupta KA, Purohit GN. 2001. Use of vaginal electrical resistance (VER) to predict estrus and ovarian activity, its relationship with plasma progesterone and its use for insemination in buffaloes. *Theriogenology*. 56(2):235-245.
- Hase M, Hori T, Kawakami E, Tsutsui T. 2000. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 62(3):243-248.
- Held JP. 1997. Critical evaluation of the success and role of chilled and frozen semen in today's veterinary practice. *Proceedings of Canine Reproduction Symposium. Theriogenology and American College of Theriogenologist*. 197,49-59.
- Hoffmann B, Riesenbeck A, Klein R. 1996. Reproductive endocrinology of bitches. *Animal Reproduction Science*. 42(1-4):275-288.
- Hori T, Matsuda Y, Kobayashi M, Kawakami E, Tsutsui T. 2011. Comparison of fertility on intrauterine insemination between cryopreserved ejaculated and cauda epididymal sperm in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 1685-1688.
- Jackson PG. 1995. *Handbook of Veterinary Obstetrics*. Segunda edición.
- Janssens L, Giemsch L, Schmitz R, Street M, Van Dongen S, Crombé P. 2018. A new look at an old dog: Bonn-Oberkassel reconsidered. *Journal of Archaeological Science*. 92,126-138.
- Johnston S, Root Kustritz MV, Olson PS. 2001. *Canine and feline theriogenology*. Saunders.
- Jong-Soo J, Ill-Hwa K, Kee-Chang L, Hyun-Gu K. 2013. The relationship between vaginal mucous electric resistance and plasma progesterone concentration for optimal mating time in Beagle bitches. *Journal of Biomedical Research*. 14(1):18-22.
- Katila, T. 1995. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biology of Reproduction*. 52 515-517.
- Kirk R. 1994. *Terapéutica veterinaria de pequeños animales*. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid España.

- Kooistra HS, Okkens AC. 2002. Secretion of growth hormone and prolactin during progression of the luteal phase in healthy dogs: a review. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 197(1-2):167-172.
- Kooistra HS, Okkens AC, Bevers MM, Popp-Snijders C, Van Haften B, Dieleman SJ, Schoemaker J. 1999. Bromocriptine –induced premature oestrus is associated with changes in the pulsatile secretion pattern of follicle-stimulating hormone in beagle bitches. *Journal of Reproduction and Fertility*. 117(2):387-393.
- Kustritz, M. 2001. Uso de kits comerciales para ensayos de hormona luteinizante y de progesterona en el manejo reproductivo canino. In *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Editors Concannon PW, England E, Verstegen J. USA.
- Kutzler MA, Mohammed HO, Lamb SV, Meyers-Wallen VN. 2003). Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. *Theriogenology*. 60(6):1187-1196.
- L.Renwick, É. 27 de Julio de 2019. Sociedad Argentina de Citología. Obtenido de <http://sociedaddecitologia.org.ar/sac/fichas-coloracion-de-papanicolau/>
- Leidl W, Stolla R. 1976. Measurement of electric resistance of the vaginal mucus as an aid for heat detection. *Theriogenology*. 6(2-3):237-249.
- Linde-Forsberg C. 1991. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 21(3):467-485.
- Linde-Forsbeg C, Forsberg M. 1988. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *Journal of Reproduction and fertility*. 39:299-310.
- Maneke N. 2002. Investigación para describir las células vaginales del perro como contribución al diagnóstico del ciclo estral. Tesis de doctorado. Departamento de medicina veterinaria. Universidad libre de Berlín.
- Marshall F, Hugh A. 1990. Reproduction in the male in Marshalls physiology of reproduction. Ed. Churchil Livingstone. New York. 27:769-775

- Martínez de Merlo EM. 2008. Atlas de citología clínica del perro y del gato. Edit. Servet. Zaragoza, España.
- Mayén Estrada, Z. 2014. 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. Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Morton DB, Bruce SG. 1999. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 39:311-316.
- Mshelia GD, Amin JD. 2000. Vaginal mucus electrical resistance measurements in Nigerian bitches in different stages of the reproductive cycles. *Nigerian Veterinary Journal*. 21:10-17.
- Nachreiner R. 1996. New canine same-day progesterone test. *Vet. Diag. Newsletter*. 13(2):2-3.
- Nauth HF. 2005. Citodiagnóstico ginecológico. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Norman AW, Litwack G. 1997. Hormones. Academic Press. San Diego, California.
- Okkens AC, Bevers MM, Dieleman SJ, Williemse AH. 2011. Evidence for prolactin as the main luteotrophic factor in the cyclic dog. *Veterinary Quarterly*. 12(4):193-201.
- Olson PN, Bowen RA, Behrendt MD, Olson JD, Nett TM. 1982. Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. *Biology of reproduction*. 27(5):1196-1206.
- Páramo-Ramírez RM, Balcázar-Sánchez JA. 2005. Manual de prácticas de manejo reproductivo en caninos. Departamento de Reproducción. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México.
- Parker HG, Dreger DL, Rimbault M, Davis BW, Mullen AB, Carpintero-Ramírez G, Ostrander EA. 2017. Genomic analyses reveal the influence of geographic origin, migration, and hybridization on modern dog breed development. *Cell Reports*. 19(4):697-708.

- Parvizi N. 2000. Neuroendocrine regulation of gonadotropins in male and the female. *Animal Reproduction Science*. 60-61:1-47.
- Pérez-Salinas R. 2016. Estudio comparativo para determinación del periodo fértil en *Canis familiaris* mediante la resistencia eléctrica del moco vaginal y progesteronemia. Tesis de licenciatura. Universidad Privada Antenor Orrego.
- Pineda M. 1991. Patrones reproductivos en perros. En *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. McDonald LE. Interamericana Mcgraw-Hill. México, DF.
- Pugh ML, Pence M, Caamano JN, Robbe S, Timms LL, Thomson JU, Bredahl R, Youngs CR. 2000. The use of a vaginal conductivity probe to influence calf sex ratio via altered insemination time. *Reproduction and Physiology*. 1(1).
- Quesada Segura M. 2016. Pasantía en La Clínica de Reproducción Canina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México y Clínica Sanatorio Animal. Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria. Universidad Nacional de Costa Rica.
- Reimers TJ, McCann JP, Cowan RG, Concannon PW. 1982. Effects of storage times and temperatures, hemolysis, and freezing and thawing on concentrations of T4, cortisol, and insulin in blood samples from dogs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 170(4):509-516.
- Reimers TJ, Lamb SV, Bartlett SA, Matamoros RA, Cowan RG, Engle JS. (1991). Effects of hemolysis and storage on quantification of hormones in blood samples from dogs, cattle, and horses. *American Journal of Veterinary Research*. 52(7):1075-1080.
- Rezac, P. 2008. Potential applications of electrical impedance techniques in female mammalian reproduction. *Theriogenology*. 70(1):1-14.
- Rocha-Fonseca, B. 2016. Estudio comparativo para detección de ovulación en hembras caninas por citología vaginal, progesterona sérica y detector

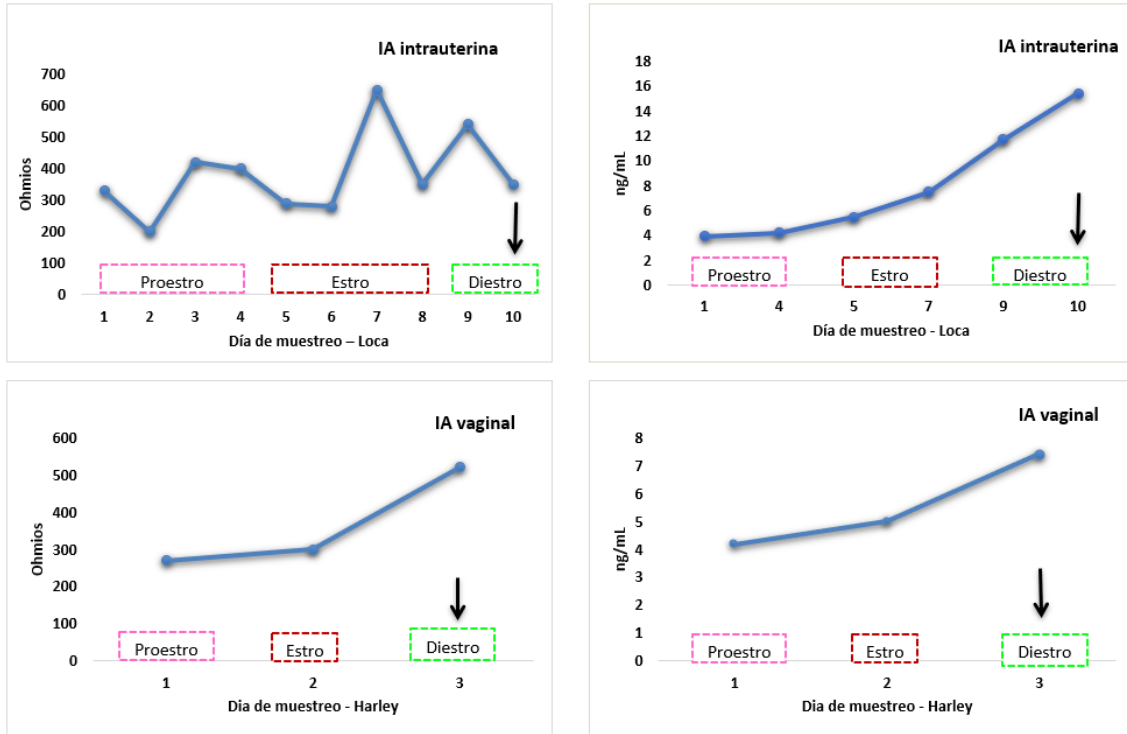
Draminski Julio-Diciembre 2015. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Agraria.

- Root Kustritz MV. 2012. Reproducción clínica de caninos y felinos. Intermédica. 177-179 pp.
- Rorie RW, Bilby TR, Lester TD. 2002. Application of electronic estrus detection technologies to reproductive management of cattle. *Theriogenology*. 57(1):137-148.
- Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*. 44(6):885-900.
- Ruiz ME, Rivera B, Ruíz A. 1998. Reproducción Animal: métodos de estudio en sistemas. RISPAL. San José de Costa Rica.
- Scipioni RL, Foote RH. 1999. Short communication: an electronic probe versus milk progesterone as aids for reproductive management of dairy herds. *Journal of Dairy Science*. 82(8):1742-1745.
- Senger PL. 2005. Pathways to pregnancy and parturition. Current Conceptions, Inc. 9-43 pp.
- Shirley D, Johnston DVM. 1991. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 21(3):545-551.
- Sokolowski JH. 1977. Reproductive patterns in the bitch. *The Veterinary clinics of North America*. 7(4):653-666.
- Sorribas CE. 2000. Reproducción en los animales pequeños. Inter-Médica. Buenos Aires.
- Stan F, Guidea A, Chirilean-Ioana, Damian A, Papuc I, Dezdrobitu C, Bochiș I. 2010. Identifying the lymphatic vascular model of the mammary gland in bitches. *Faculty of Veterinary Medicine*. 43(2):356-363.
- Stancic B, Veselinovic S. 2002. Reproduction in Domestic Animals. University in Novi Sad. Faculty of Agriculture.
- Steckler D, Nöthling JO, Harper C. 2013. Prediction of the optimal time for insemination using frozen-thawed semen in a multi-sire insemination trial in bitches. *Animal Reproduction Science*. 142(3-4):191-197.

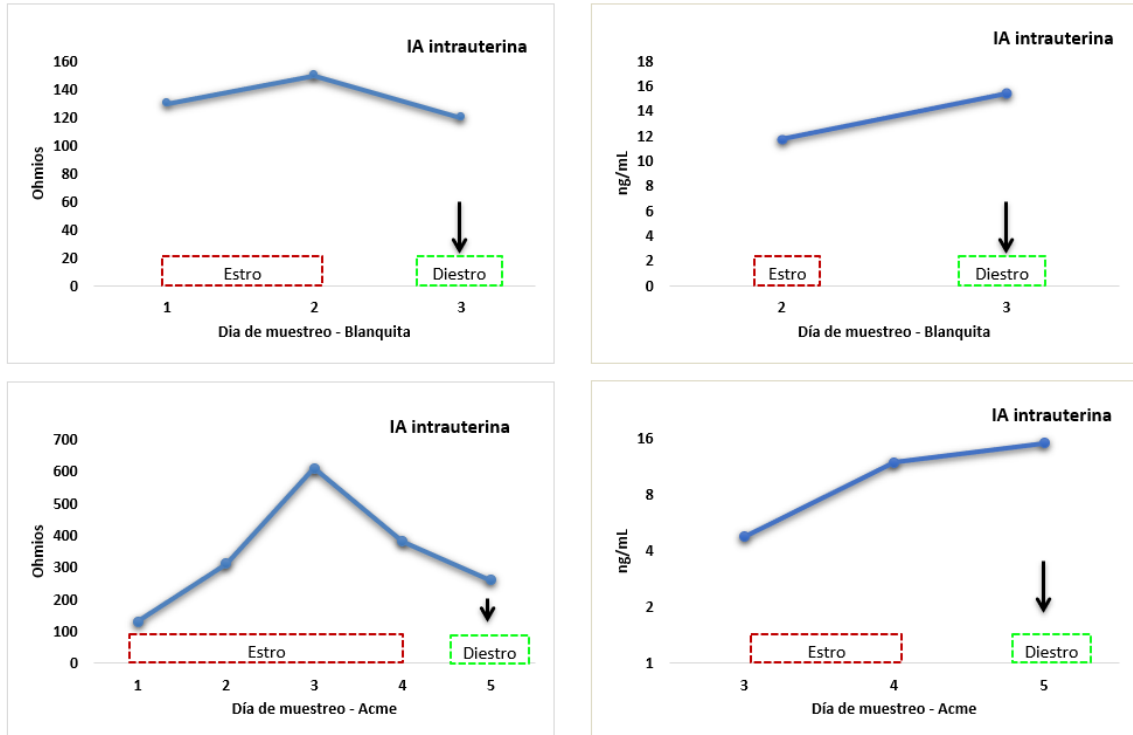
- Stornelli MC. 2012. Utilización combinada de eCG y hCG para inducir ciclos fértiles en perras en anestro. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.
- Stornelli MC, Savignone CA, Giménez, F, Tittarelli CM, Luzbel de la Sota R, Stornelli MA. 2006. Particularidades del ciclo estral canino, aspectos clínicos y endocrinológicos. *Veterinaria cuyana*. 1(2):26-35.
- Stornelli MA. 2017. Avances en inseminación artificial en caninos. *Spermova*. 7(2):77-84.
- Stornelli MA, Savignone CA, Tittarelli CM, Stornelli MC. 2006. Citología vaginal en caninos: metodología y aplicaciones clínicas. *Vet Cuyana*. 1:15-21.
- Mason SJ. 2018. Current review of artificial insemination in Dogs. *Veterinary clinics: Small Animal Practice*. 48(4):567-580.
- Talukder MRI, Hasan M, Rosy TA, Bari FY, Juyena NS. 2018. Monitoring vaginal electrical resistance, follicular waves, and hormonal profile during oestrous cycle in the transition period in Bangladeshi sheep. *Journal of Veterinary Research*. 62(4):571-579.
- Tasal I, Ataman MB, Aksoy M, Kaya A, Karaca F, Tekeli T. 2005. Estimation of early pregnancy by electrical resistance values of vaginal mucosa in cows and heifers. *Revue Méd. Vét.* 156:91-94.
- Tsutsui T. 1989. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 39:269-275.
- Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH. 1999. Citología y hematología diagnóstica en el perro y el gato. Mosby. Barcelona, España.
- Varela S. 2005. Citología cervical. *Rev Med Hondur.* 131-136.
- Wanke M, Gobello C. 2006. Reproducción en caninos y felinos domésticos. *Intermédica*. Buenos aires Argentina. 157-201 pp.
- Watson PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*. 7(4):871-891.

- Watts JR, Wright PJ. 1995. Investigating uterine disease in the bitch: uterine cannulation for cytology, microbiology and hysteroscopy. *Journal of Small Animal Practice*. 36(5):201-206.
- Wei YF, Chen FL, Tang SS, Mao AG, Li LG, Cheng LG, Chen C, Li FX, Wang B, Xu T, Zhang YJ, Li J, Wan JS. 2017. Birth of puppies of predetermined sex after artificial insemination with a low number of sex-sorted, frozen-thawed spermatozoa in field conditions. *Animal Science Journal*. 88(8):1231-1238.
- Wildt DE, Seager SWJ, Chakraborty PK. 1981. Behavioral ovarian and endocrine relationships in the pubertal bitch. *Journal of animal science*. 53(1):182-191.
- Wright PJ, Parry BW. 1989. Cytology of the canine reproductive system. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 19(5):851-874.
- Zamora A. 2016. Inseminación artificial en caninos como alternativa para mejorar características genéticas. Trabajo presentado para especialidad en mejoramiento genético. Escuela de Ciencias Agrícolas Pecuarias del Medio Ambiente.
- Ziarrusta GB. 2002. Vulvovaginitis candidiásica. *Rev Iberoam Micol*. 19:22-24.

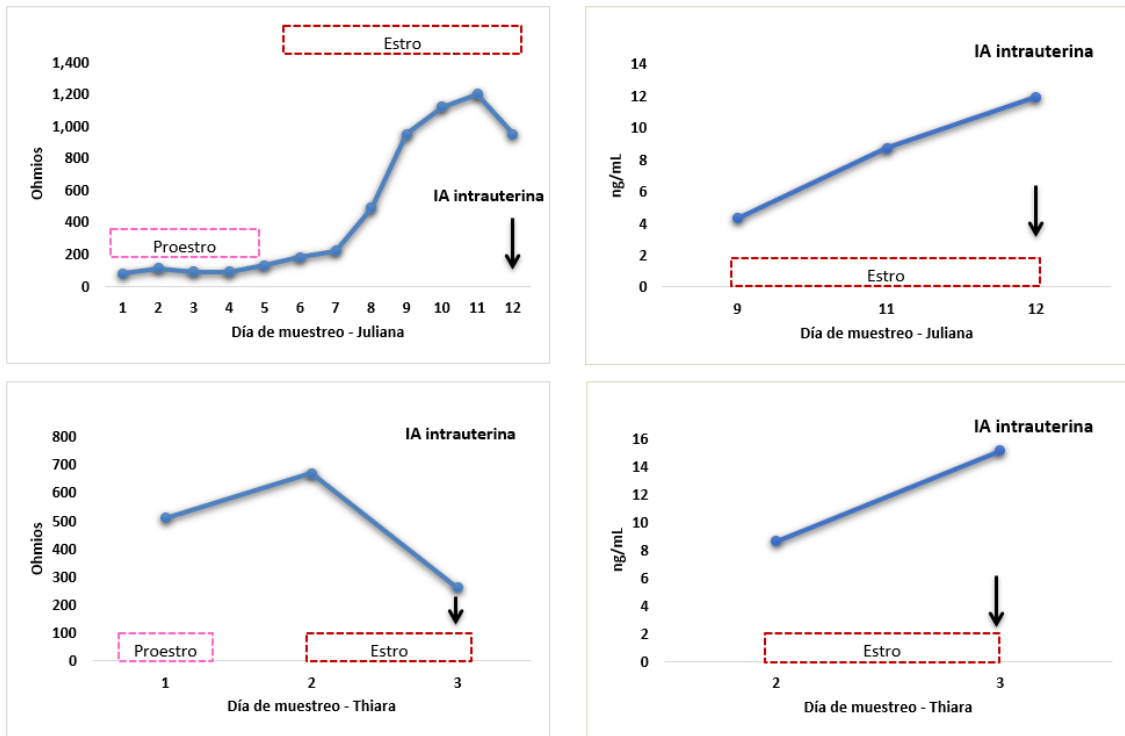
ANEXO 1



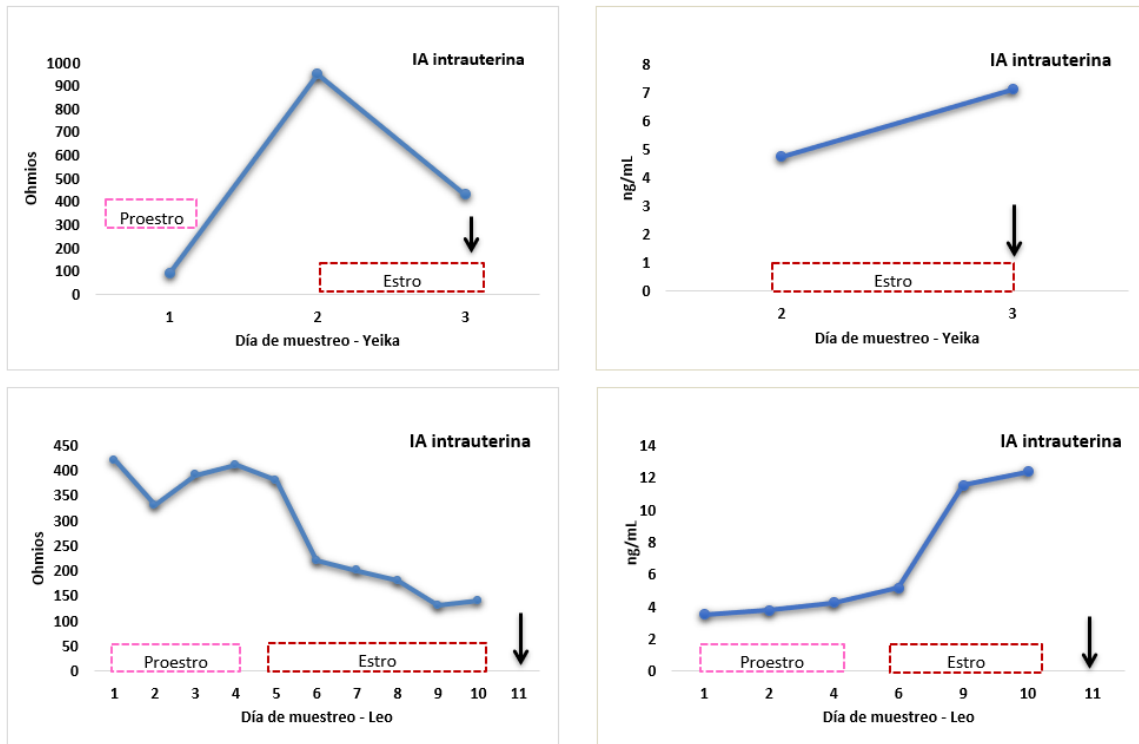
Gráfica 1. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de 2 perras en tres etapas del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



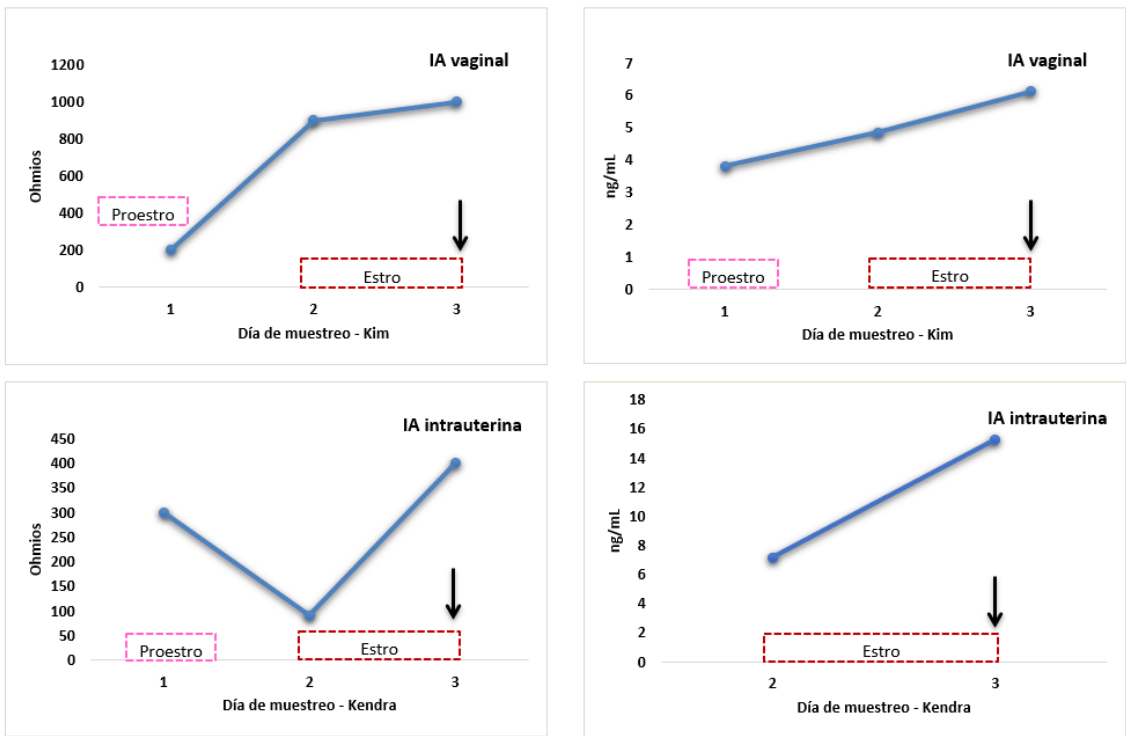
Gráfica 2. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en dos etapas del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



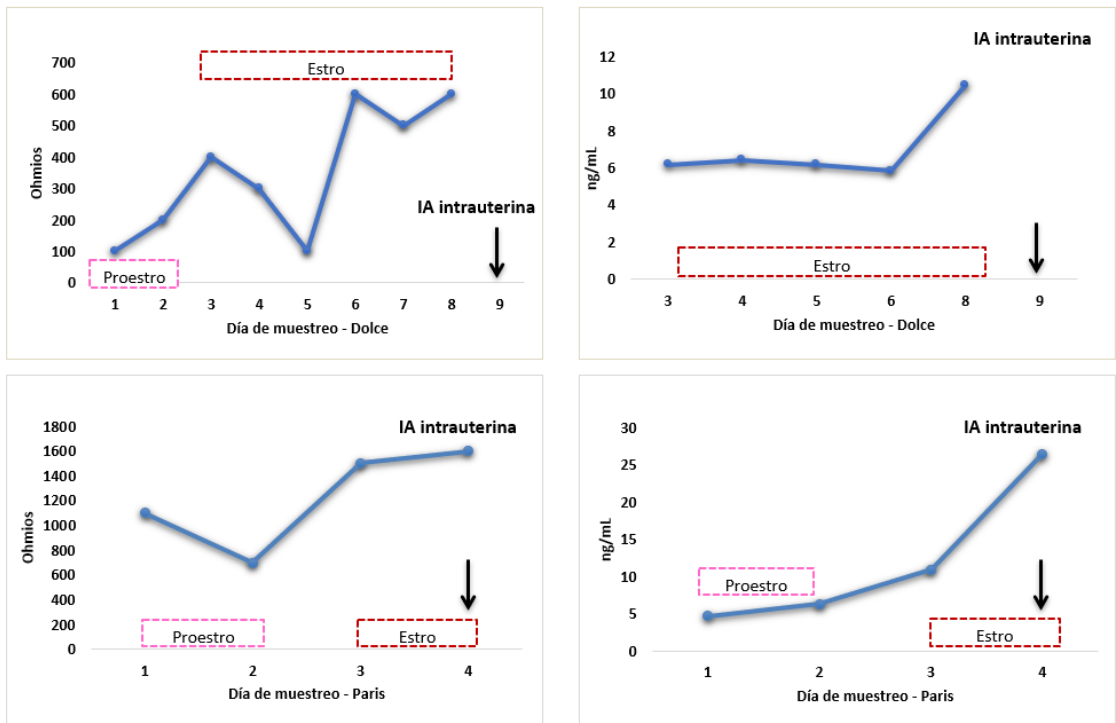
Gráfica 3. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en dos etapas del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



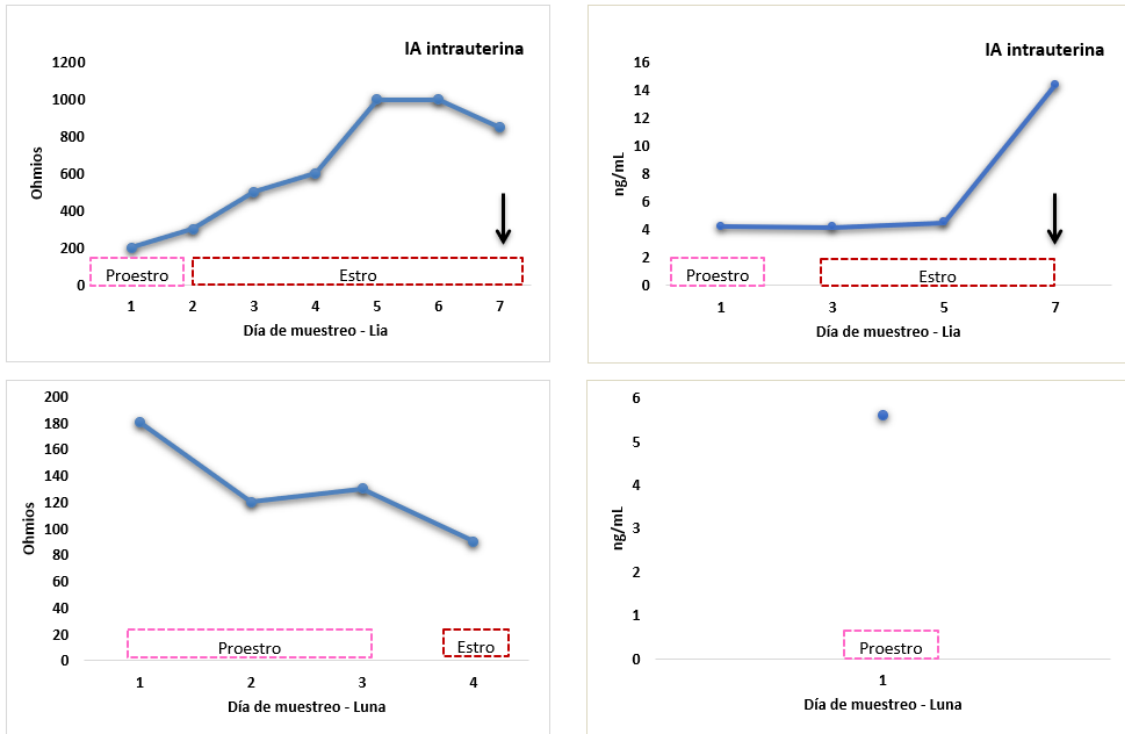
Gráfica 4. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en dos etapas del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



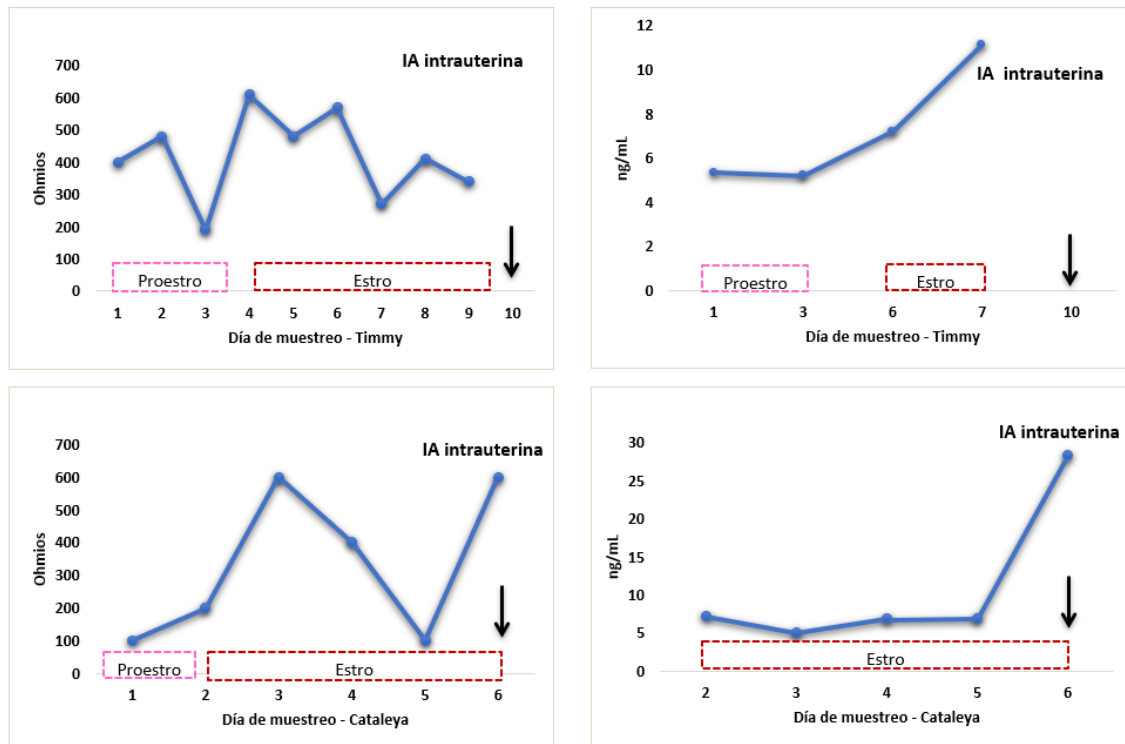
Gráfica 5. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en dos etapas del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



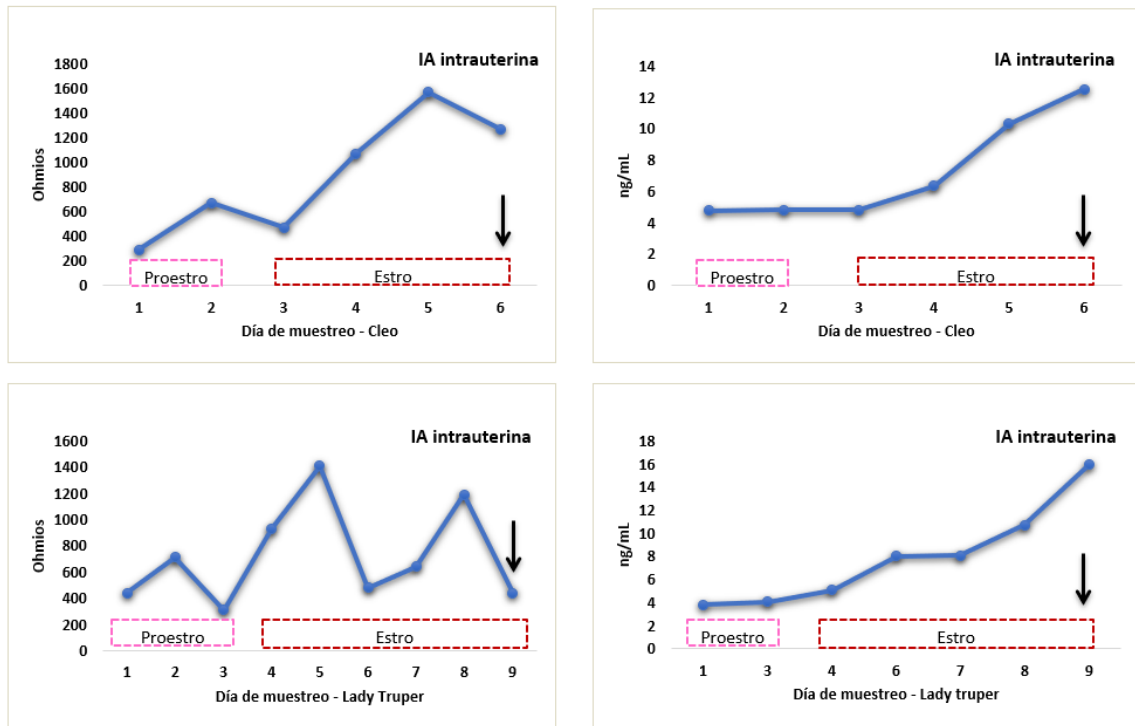
Gráfica 6. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en dos etapas del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



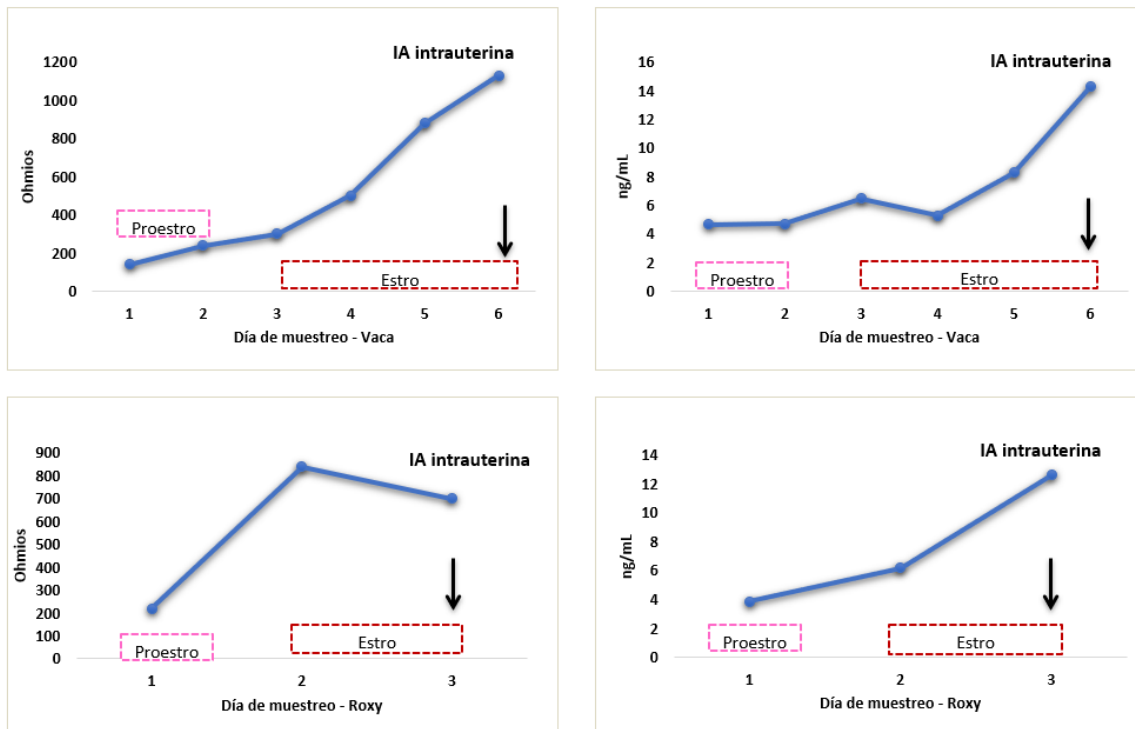
Gráfica 7. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en dos etapas del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



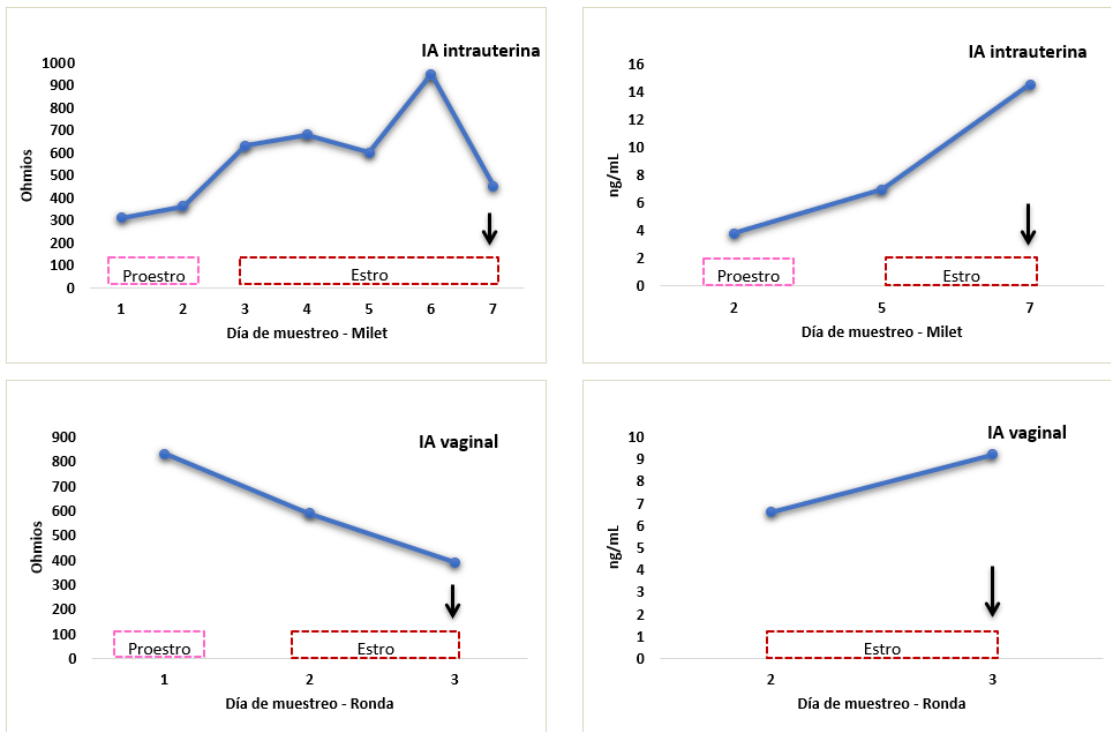
Gráfica 8. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en dos etapas del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



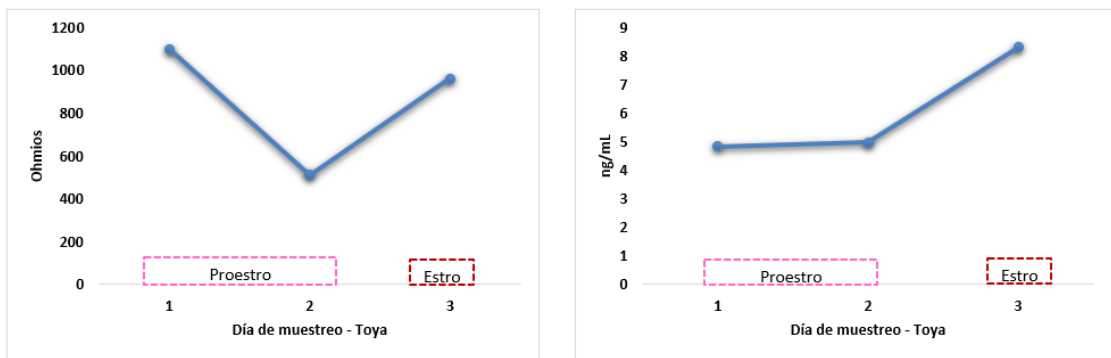
Gráfica 9. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en dos etapas del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



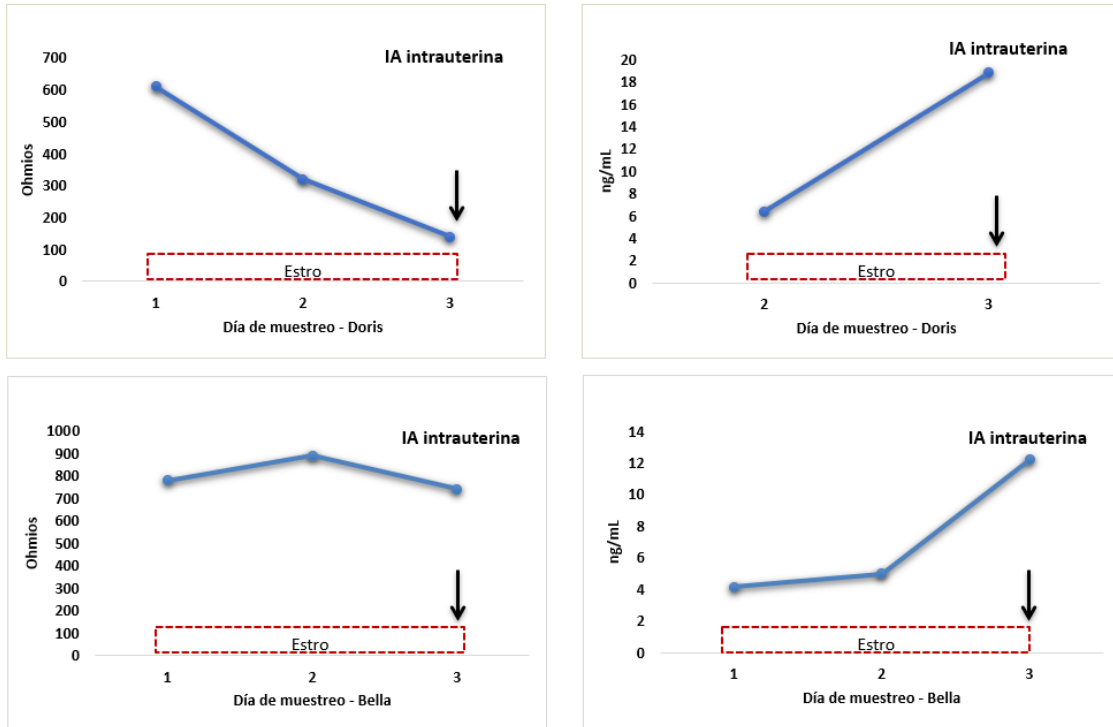
Gráfica 10. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en dos etapas del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



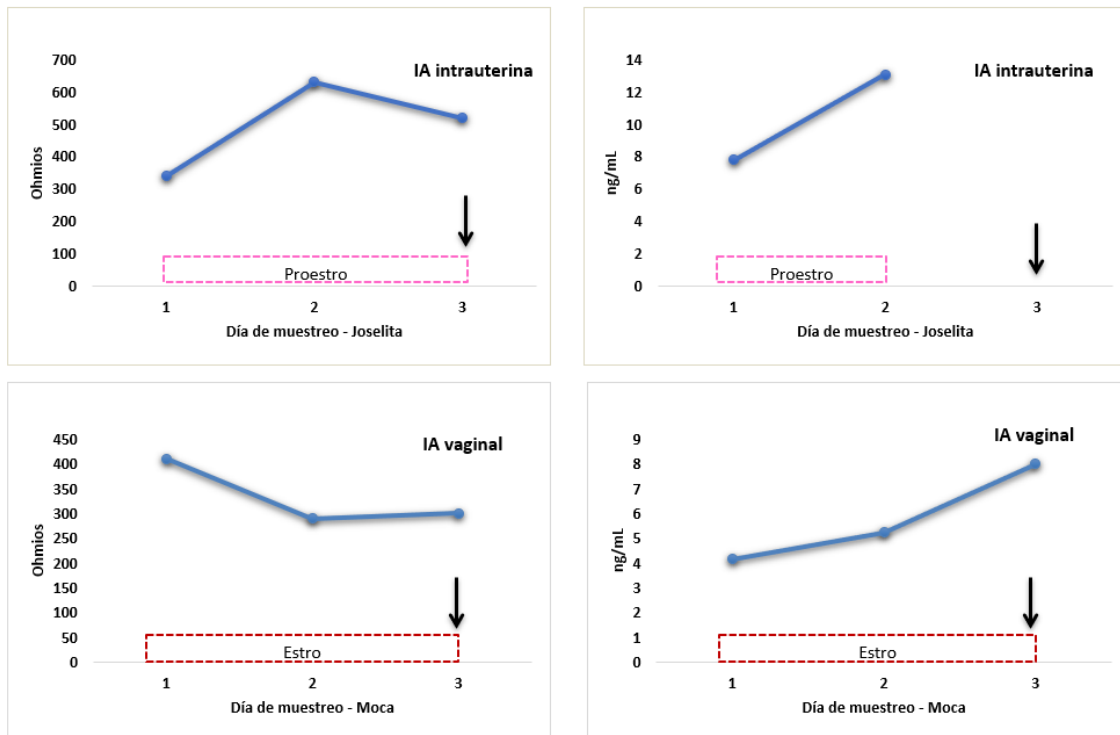
Gráfica 11. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en dos etapas del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



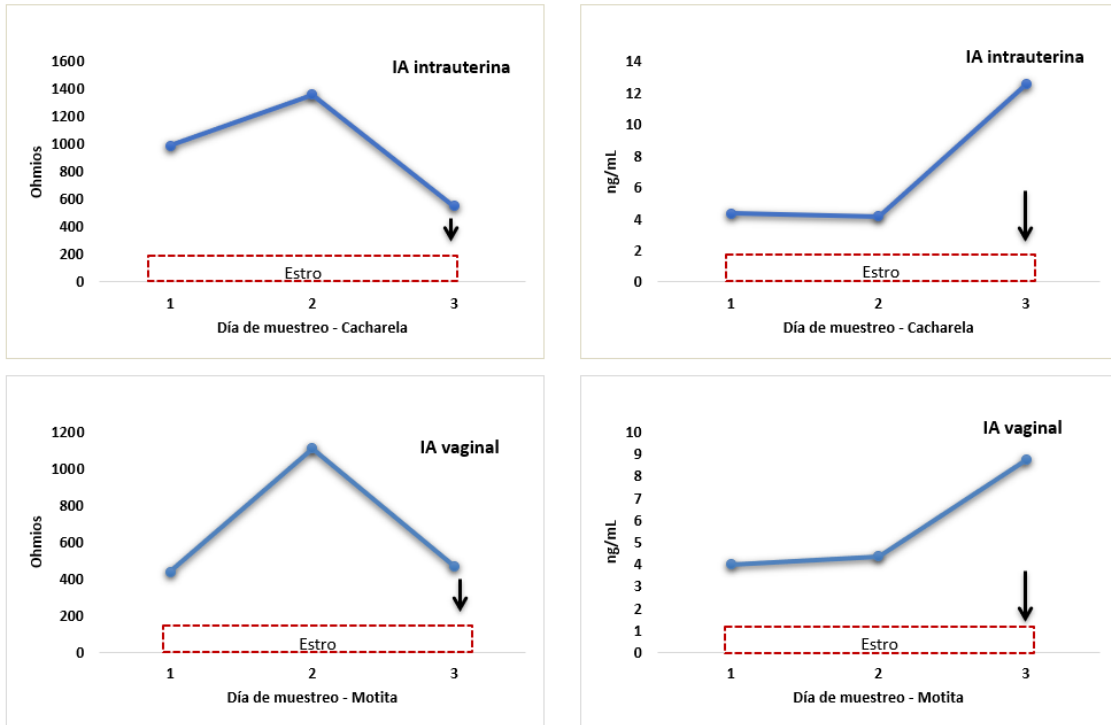
Gráfica 12. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en dos etapas del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



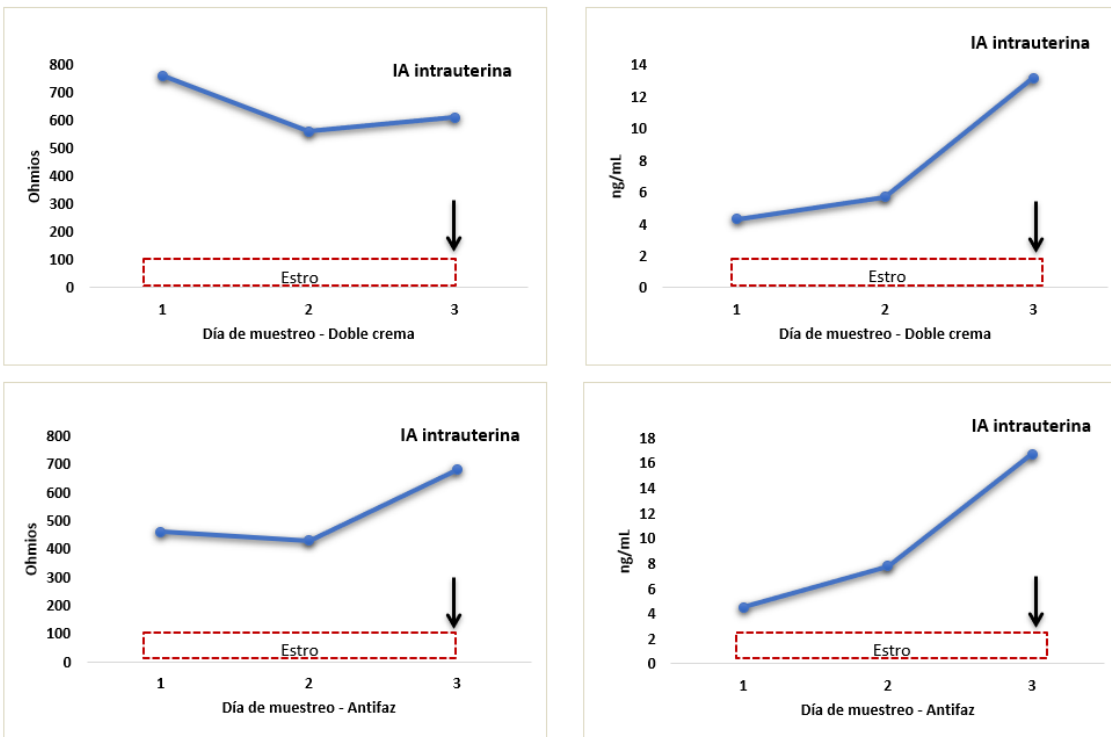
Gráfica 13. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en una etapa del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



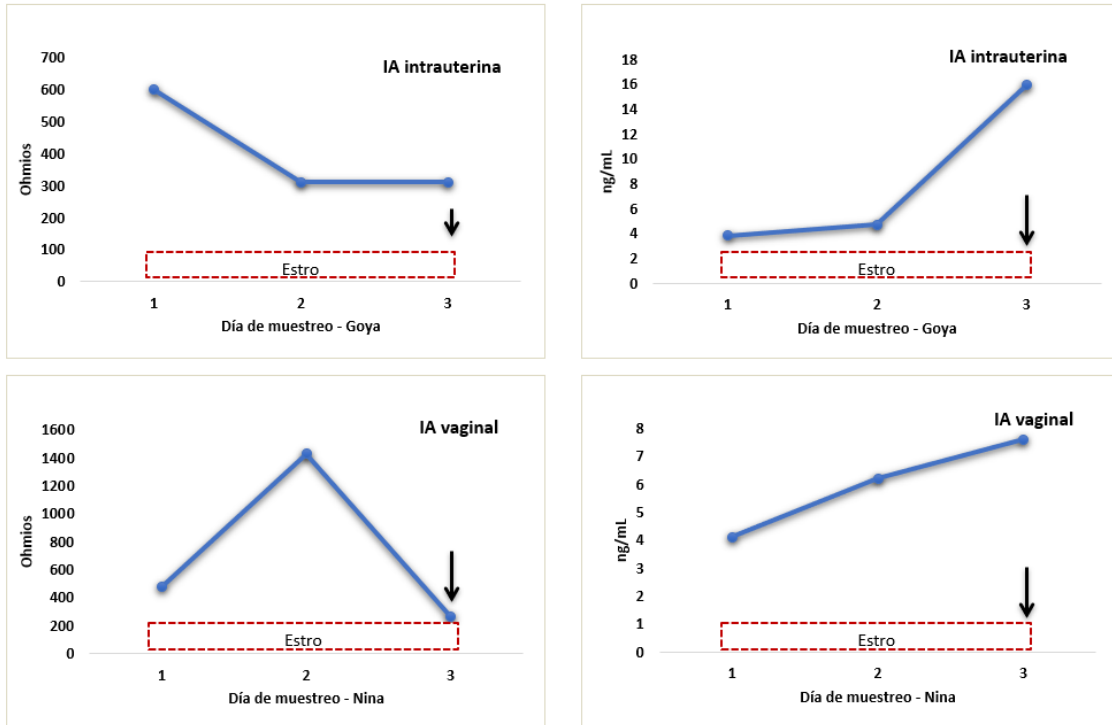
Gráfica 14. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en una etapa del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



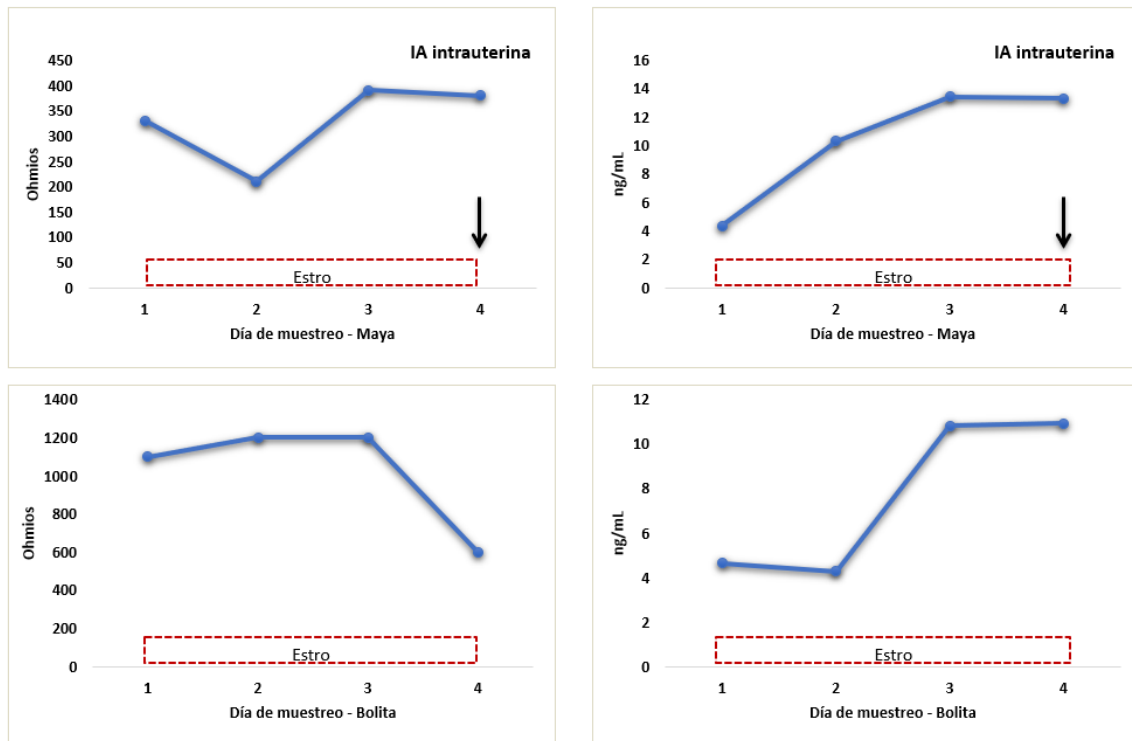
Gráfica 15. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en una etapa del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



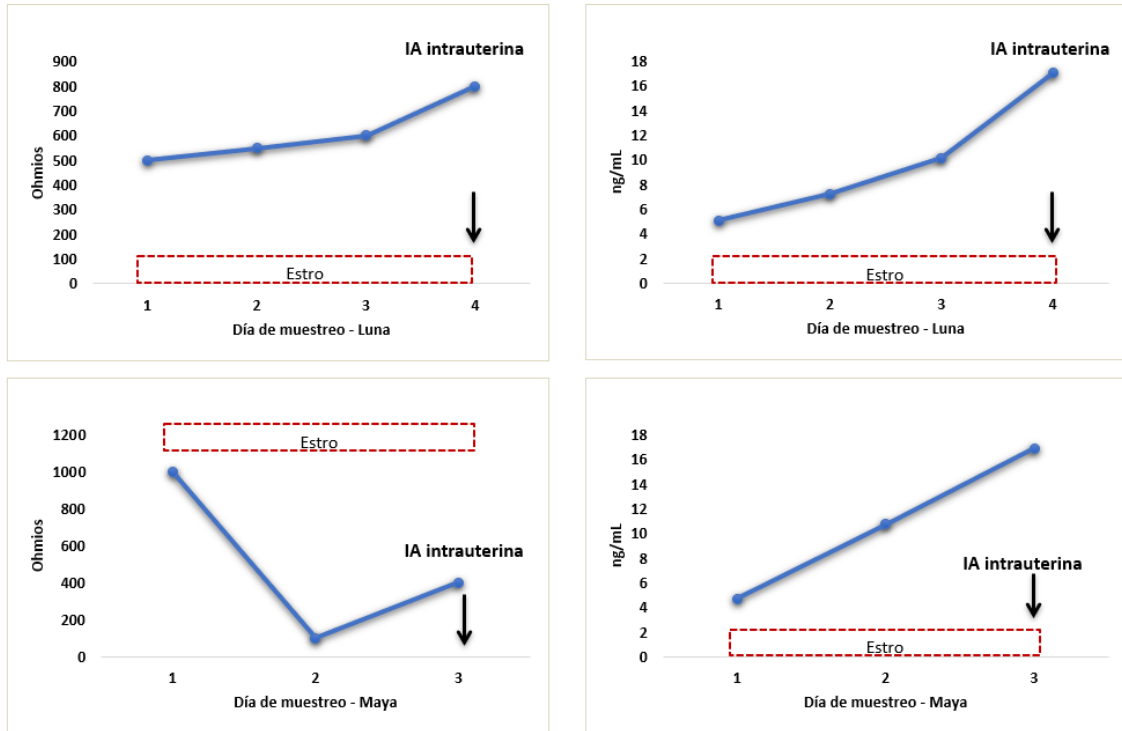
Gráfica 16. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en una etapas del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



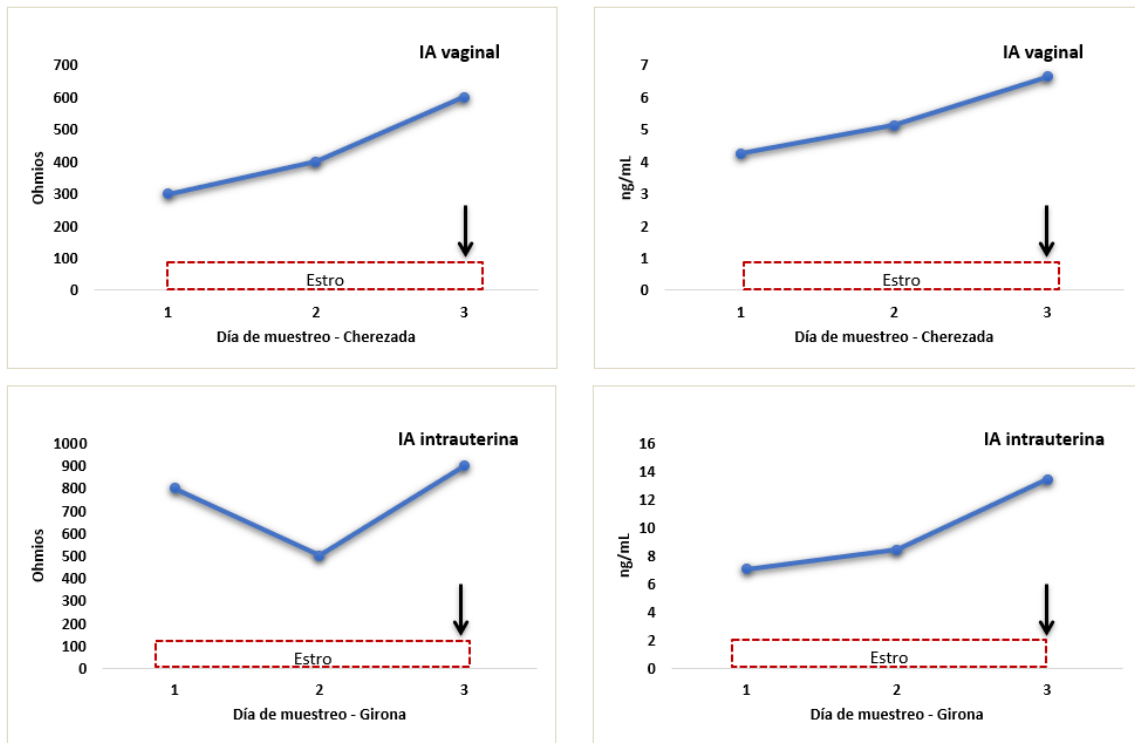
Gráfica 17. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en una etapas del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



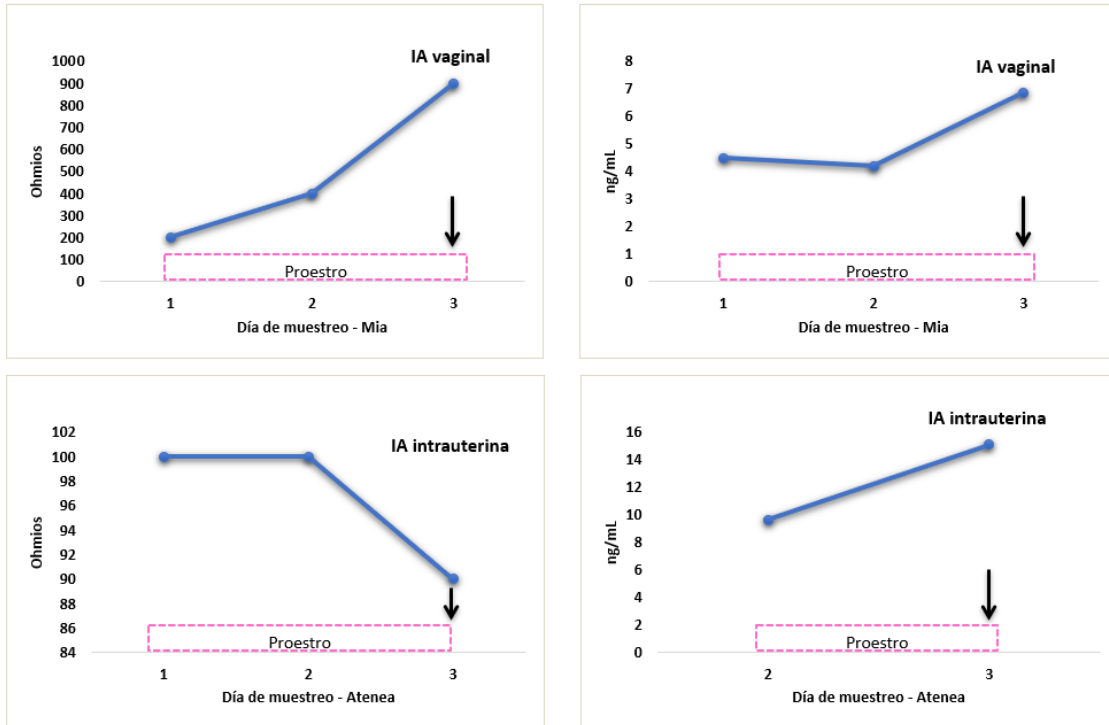
Gráfica 18. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en una etapa del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



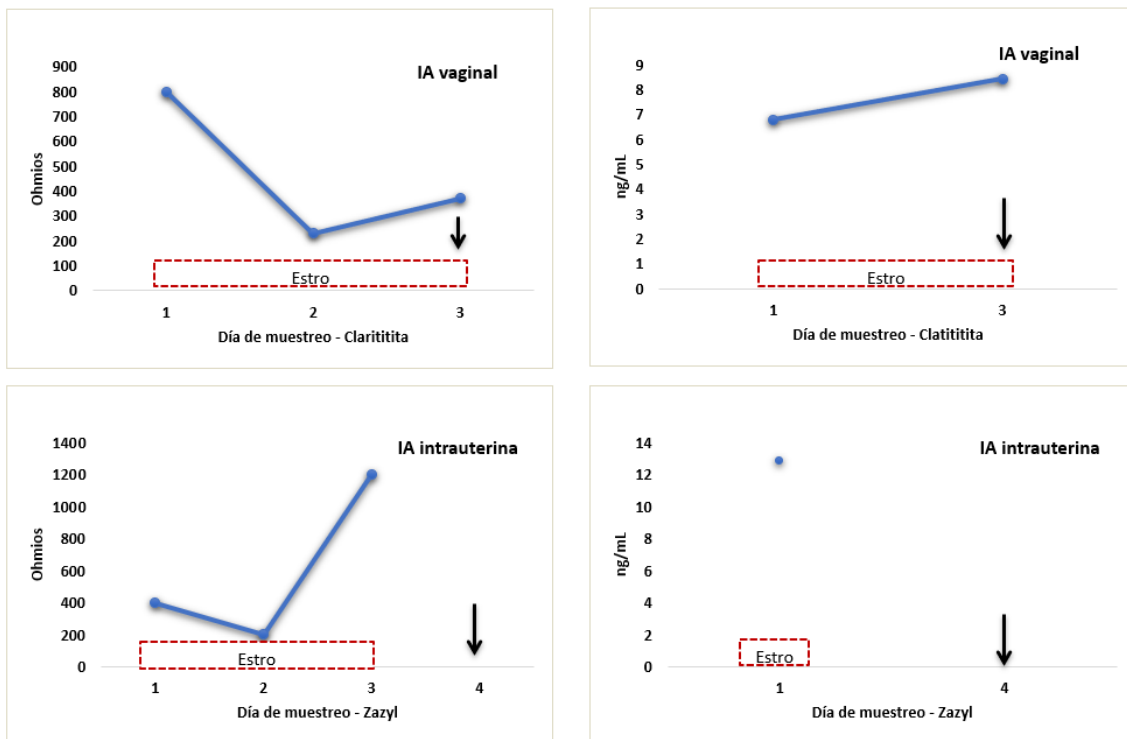
Gráfica 19. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en una etapa del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



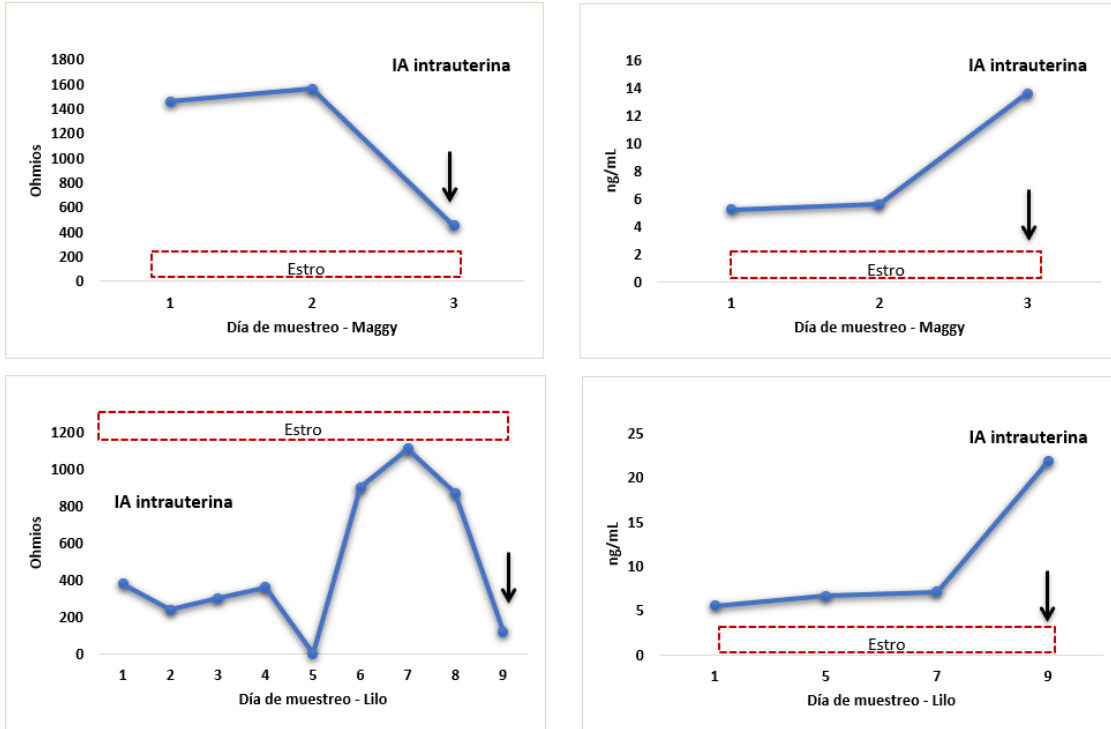
Gráfica 20. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en una etapa del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



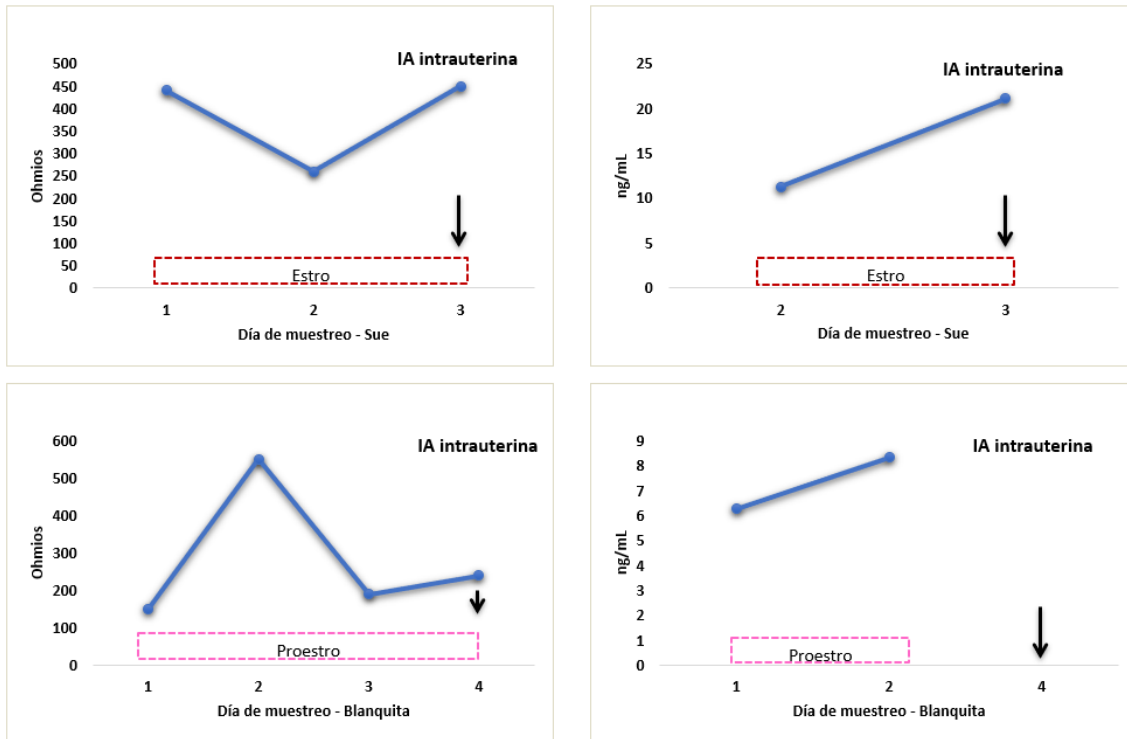
Gráfica 21. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en una etapa del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



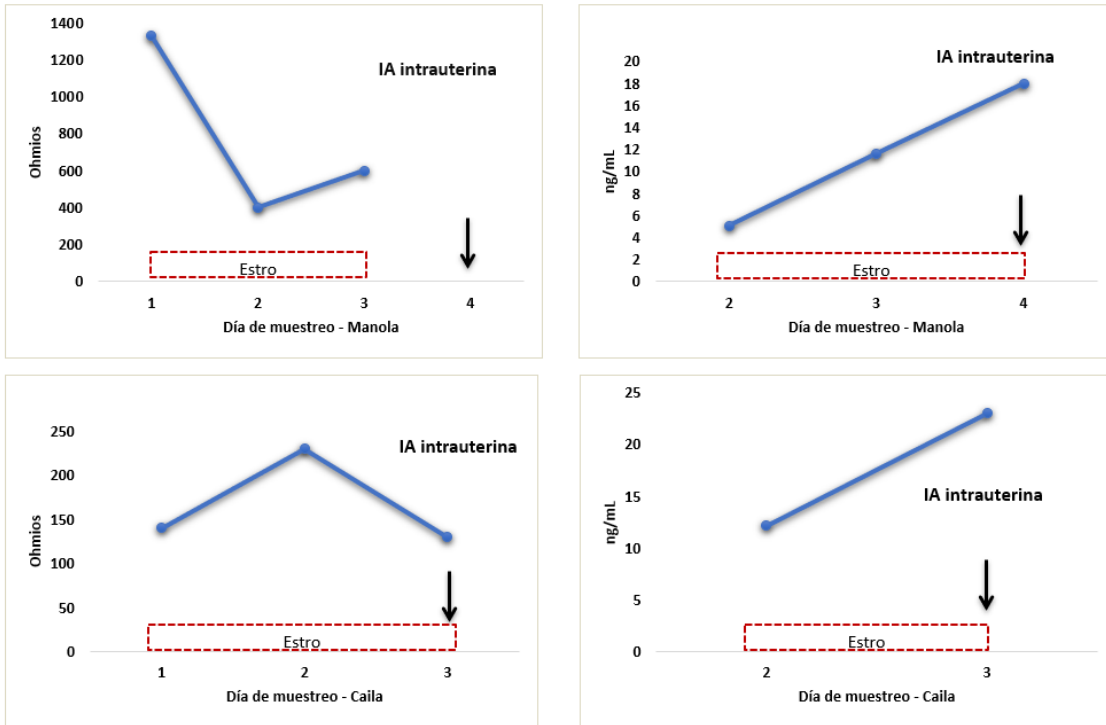
Gráfica 22. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en una etapa del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



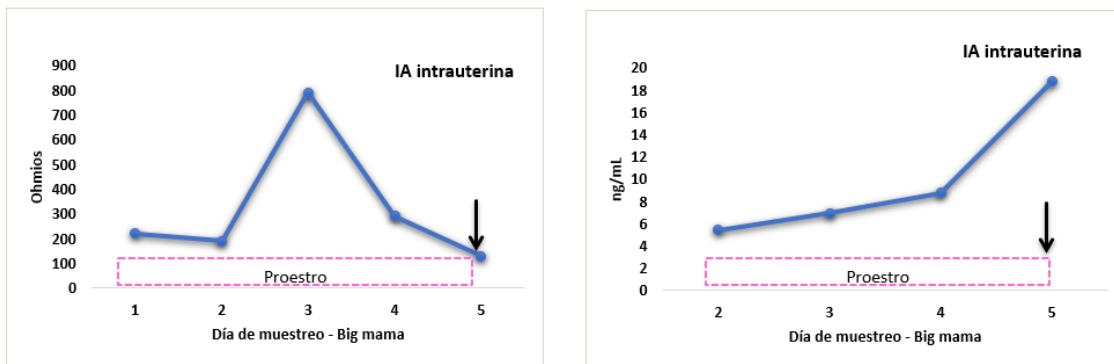
Gráfica 23. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en una etapa del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



Gráfica 24. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en una etapa del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



Gráfica 25. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en una etapa del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.



Gráfica 26. Valores Draminsky (Panel izquierdo), niveles de Progesterona (Panel derecho), día y tipo de inseminación de perras en una etapa del ciclo estral determinado por citología vaginal exfoliativa.