



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Cambios periovulatorios observados por evaluación clínica, citología vaginal, endoscopía y ultrasonografía para estimar el pico de LH en caninos

Edna Catherine Guerrero Noguera

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Departamento de Salud Animal
Bogotá, Colombia

2020

Cambios periovulatorios observados por evaluación clínica, citología vaginal, endoscopia y ultrasonografía para estimar el pico de LH en caninos

Edna Catherine Guerrero Noguera

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Salud Animal

Directora

DVM MSc DVSc DACT Claudia Jiménez Escobar

Codirector

DVM MPVM PhD DACT Jorge Luis Zambrano Varón

Línea de Investigación

Reproducción Animal y Salud de Hato

Grupo de Investigación

Reproducción Animal y Salud de Hato

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

Departamento de Salud Animal

Bogotá, Colombia

2020

A mis padres, mi hijo Juan Diego, Diana Fuentes, maestros y amigos por acompañarme y apoyarme en cada paso de mi vida

Agradecimientos

Terminar el programa de posgrado en la Universidad Nacional es motivo de gran orgullo y satisfacción para mí y mi familia. Se termina una etapa académica que permitirá dar inicio a nuevos proyectos personales y laborales.

Quiero agradecer a mi hijo Juan Diego, por ser mi compañero incondicional en este proceso y mi fuerza para avanzar con compromiso y dedicación para lograr esta meta.

A mis padres Román y Gloria, quienes me han enseñado a trabajar para lograr los objetivos que uno se propone y a superar los obstáculos con persistencia y valentía.

A mi amiga y hermana Diana Zulima Fuentes Corredor, por ser mi mano derecha durante el desarrollo de esta investigación. Por confiar en mí de manera incondicional y ayudarme a hacer realidad mis proyectos.

A mi maestra, la Doctora Claudia Jiménez, por aportar todos sus conocimientos y experiencia en la elaboración de este trabajo de investigación, y a los doctores Jorge Zambrano, Humberto Guáqueta y Vladimir Galindo por sus consejos y sugerencias durante la realización de este proyecto.

Al Doctor Harvey Lozano, por aportar el kit de Progesterona para este trabajo y al Doctor Alejandro Castellanos por poner a disposición su laboratorio y equipos para realizar las pruebas de progesterona.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue estimar el pico de LH mediante la evaluación de los cambios clínicos y paraclínicos que se presentan durante el proestro, estro y diestro temprano en la perra. Se estableció la sensibilidad (SEN), especificidad (ESP) y el valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) de cada uno de los métodos diagnósticos, también como la determinación de la sensibilidad neta y la especificidad neta usando dos pruebas en paralelo.

Se utilizaron 22 hembras entre 1 y 6 años de edad, de diferentes razas, las cuales se evaluaron diariamente desde el inicio del proestro hasta el inicio del diestro (diestro citológico). Los parámetros que se evaluaron fueron conducta de aceptación, turgencia vulvar, tamaño de la vulva, citología vaginal, color del hisopado, cantidad de secreción vaginal, evaluación vaginal por endoscopio (color de la mucosa vaginal y apariencia de los pliegues de la mucosa vaginal), seguimiento ultrasonográfico de los ovarios y niveles de progesterona (P4) medidos por inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA) y ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzima (ELISA).

La progesterona medida por CLIA fue usada como “prueba de oro” para estimar el pico de LH y fue comparada con los otros métodos para determinar el nivel de concordancia para estimar el pico de LH. La P4 medida por ELISA tuvo la mejor SEN (82,4%) y el mejor VPP (93,3%). La apariencia de los pliegues de la mucosa vaginal observados por endoscopio obtuvo 76,5% (SEN) y 81,3% (VPP), seguido por la turgencia vulvar (SEN: 70,6% y VPP: 85,7%) y la citología vaginal (SEN: 70,6% y VPP: 80,0%). No fue posible diferenciar entre folículos y cuerpos lúteos por medio de la ultrasonografía de los ovarios.

Cuando se usaron dos pruebas en paralelo, la sensibilidad neta aumentó a 96% para P4 (ELISA) + apariencia de los pliegues vaginales, a 95% para P4 (ELISA) + citología vaginal y 94% para P4 (ELISA) + turgencia vulvar. El uso de pruebas clínicas *in situ* también aumentó la SEN neta a 93% para la turgencia vulvar + apariencia de los pliegues de la mucosa vaginal. En conclusión, la interpretación simultánea de las pruebas incrementó la SEN y VPP para estimar el pico de LH.

Los cambios clínicos pueden ser interpretados para predecir el pico de la LH pero para obtener una SEN más alta es necesario incluir la medición de P4.

Palabras clave: Pico de LH preovulatorio, cambios periovulatorios, pruebas diagnósticas, sensibilidad, especificidad.

Abstract

The objective of this study was estimate the preovulatory LH peak through the evaluation of clinical and paraclinical changes that occur during proestrus, estrus and early diestrus of the bitch. Sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive values (PPV) and negative predictive values (NPV) of the diagnostic tests used were established; as well as the determination of net sensitivity and net specificity using two simultaneous tests.

Twenty-two healthy bitches of different breeds, between 1 and 6 years old, were used in this study. All dogs were evaluated daily starting early proestrus until the beginning of diestrus (cytologic diestrus). The tests used were assessment of the behavior of the bitch, quantity of vaginal discharge, vulvar size, turgidity of the vulva, vaginal cytology, swab color, vaginal endoscopic examination (vaginal mucosal color and vaginal mucosal fold appearance), ovary ultrasound examination and plasma progesterone concentration chemiluminescence immunoassay (CLIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The progesterone measured by CLIA was used as the gold standard to estimate LH peak and it was compared with the others tests to establish the agreement level to estimate the preovulatory LH peak. The progesterone measured by ELISA had the best Se (82,4%) and the best PPV (93,3%). The vaginal mucosal fold appearance by endoscopy obtained 76,5% (Se) and 81,3% (PPV), followed by turgidity of the vulva (Se:70,6% and PPV:85,7%) and vaginal cytology (Se: 70,6% and PPV:80,0%). It was not possible to differentiate between follicles and corpus luteum by ultrasonography of the ovaries.

When two parallel tests were used, net sensitivity increased when progesterone was included; 96% for P4 (ELISA) + vaginal mucosal fold appearance, 95% for P4 (ELISA) + vaginal cytology and 94% for P4 (ELISA) + turgidity of the vulva. The use of clinical in situ examination also increased net Se; turgidity of the vulva + vaginal mucosal fold appearance resulted in (93% of Se). In conclusion, simultaneous interpretation of tests increased the Se and PPV to estimate the LH peak. Clinical changes can be used to predict de LH surge but to obtain higher Se is necessary to include a progesterone measurement.

Keywords: Preovulatory LH peak, periovulatory changes, diagnostic tests, sensitivity, especificity.

Contenido

	Pág.
Agradecimientos.....	VIII
Resumen.....	IX
Lista de figuras.....	XV
Lista de tablas.....	XVI
Lista de abreviaturas.....	XVII
Introducción.....	1
1. Ciclo estral y evaluación reproductiva.....	3
1.1 Generalidades del ciclo estral y endocrinología.....	3
1.2 Determinación del pico de LH, ovulación y momento óptimo para realizar la inseminación artificial.....	6
1.3 Medición de la hormona luteinizante (LH):.....	7
1.4 Manifestaciones clínicas del proestro y estro:.....	9
1.4.1.1 Secreción vaginal:.....	9
1.4.1.3 Conducta de aceptación.....	10
1.5 Citología vaginal:.....	12
1.6 Vaginoscopía.....	15
1.7 Determinación de los niveles de progesterona sérica.....	17
1.8 Ultrasonografía de ovario:.....	21
2. Materiales y métodos.....	25
2.1 Material experimental.....	25
2.2 Evaluación de los cambios periovulatorios para estimar el pico de LH.....	26
2.3 Conducta de receptividad.....	26
2.4 Turgencia vulvar.....	27
2.5 Tamaño de la vulva.....	28
2.6 Citología vaginal.....	29
2.7 Color de la secreción vaginal o color del hisopo.....	29
2.8 Secreción vaginal.....	30
2.9 Color de la mucosa vaginal observado por endoscopio.....	31
2.10 Grado de edematización de la mucosa vaginal observado por endoscopio ...	32
2.11 Ecografía de ovario.....	32
2.12 Medición de progesterona por ELISA (ng/ml) y CLIA (ng/ml):.....	33
2.13 Análisis estadístico.....	34

3. Resultados	36
4. Discusión.....	44
5. Conclusiones y recomendaciones	59
5.1 Conclusiones.....	59
5.2 Recomendaciones.....	60
A. Anexo: Resultados de la sensibilidad y la especificidad al realizar las pruebas en paralelo.....	63
B. Anexo: Resultados de la progesterona medida por CLIA y ELISA en los días 0, 2 y 4.....	65
C. Anexo: Gráfica comparativa de los valores de progesterona medidos por CLIA y ELISA en los días 0, 2 y 4	66
D. Resultado de la prueba t de student para comparar la concentración de progesterona en los días 0, 2 y 4.....	67
Bibliografía	69

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2-1: Medidas utilizadas para evaluar el tamaño de la vulva	26
Figura 2-2: Color de la secreción vaginal	27
Figura 2-3: Drenaje de la secreción vaginal por medio de un vaginoscopio	28
Figura 2-4: Clasificación del color de la mucosa vaginal	29
Figura 2-5: Clasificación del grado de edematización de la mucosa vaginal	30
Figura 2-6: Ubicación del ovario detrás del polo caudal del riñón ipsilateral	31
Figura 2-7: Duración en días del seguimiento de cada paciente	36
Figura 2-8: Porcentaje de acuerdo de cada prueba utilizada para estimar el pico de LH	37
Figura 2-9: Valores promedio de P4 durante los días 0 (Pico de LH), 2 (Ovulación) y 4 (maduración) medidos por las pruebas de CLIA y ELISA	38

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Medidas utilizadas para evaluar el tamaño de la vulva	8
Tabla 1-2: Características de comportamiento evaluadas cuando hay un macho presente durante el proestro y estro	10
Tabla 1-3: Score para la evaluación de la mucosa vaginal de Jeffcoate y Lindsay	16
Tabla 1-4: Niveles de P4 para estimar el pico de LH, ovulación y el día de la IA	19
Tabla 2-1: Clasificación de la conducta de receptividad	24
Tabla 2-2: Grado de edematización de la mucosa vaginal	25
Tabla 2-3: Clasificación de las células en la citología vaginal	27
Tabla 2-4: Clasificación de la cantidad de secreción vaginal	28
Tabla 2-5: Información de los animales	35
Tabla 2-6: Hallazgos ultrasonográficos de los ovarios, número de folículos y diámetro folicular	39
Tabla 2-7: Número de animales en los cuales se presentó algún cambio en la forma o desaparición de estructuras compatibles con folículos durante el periodo periovulatorio	39
Tabla 2-8: Sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos y valor kappa de las diferentes pruebas diagnósticas utilizadas para estimar el pico de LH	40
Tabla 2-9: Cambios en la sensibilidad y especificidad de algunas de las pruebas realizadas para la estimación del pico de LH al interpretar los resultados de las pruebas en paralelo	41

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
CLIA	Chemiluminescence immunoassay
ELISA	Enzyme- linked immunosorbent assay
ESP	Especificidad
E2	Estrógenos séricos
FSH	Hormona folículo estimulante
IA	Inseminación artificial
LH	Hormona luteinizante
P4	Progesterona sérica
RIA	Radioinmuno ensayo
SEN	Sensibilidad
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

Introducción

En los últimos años se ha incrementado la necesidad en caninos de optimizar la fertilidad de las hembras debido a que el intervalo interestral es prolongado, generalmente mayor a seis meses. Adicionalmente, el proestro y el estro son etapas largas donde el periodo fértil no se puede detectar visualmente y por esta razón es frecuente la realización de montas o inseminaciones repetidas para conseguir una fertilidad aceptable. Esto generalmente no es posible con semen refrigerado, congelado o semen de baja calidad o cuando la disponibilidad del macho es restringida; en estos casos se debe tratar de buscar el momento más fértil de la perra para lograr esa fertilidad disminuyendo el número de montas naturales o inseminaciones a 1 o 2 veces por celo (Macedo et al., 2012, Bergeron et al., 2013).

Para lograr lo anteriormente mencionado es indispensable estimar el momento en que ocurre el pico de LH y así determinar el momento óptimo para realizar el apareamiento o la inseminación artificial, el cual ocurre 2 a 5 días después de la ovulación, ya que los oocitos son ovulados de forma inmadura y el proceso de meiosis (maduración) termina en el oviducto (Hase et al., 2000, England et al., 2002). Existen varias herramientas que ayudan a monitorizar los eventos periovulatorios y determinar el intervalo de tiempo más apropiado para lograr la fertilización y posterior gestación de la perra (Bergeron et al., 2013; Hori et al., 2014). Sin embargo, muchas de estas herramientas presentan limitaciones al ser subjetivas; son poco específicas, invasivas, retrospectivas, costosas y/o pobremente relacionadas con los eventos periovulatorios lo cual se ve reflejado en una aparente infertilidad o reducido tamaño de camada (Bergeron et al., 2013).

Varios estudios describen los cambios clínicos y paraclínicos utilizados para detectar el pico de LH, pero no se han establecido medidas de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de las pruebas, ni la utilidad de utilizar varias pruebas en paralelo para predecir el pico de LH. Adicionalmente, existe poca información acerca de cómo

monitorear los eventos periovulatorios por medio de la endoscopia vaginal y la ecografía del ovario durante el proestro, estro e inicio del diestro (Moxon et al., 2012).

Por estas razones, el objetivo de este estudio fue estimar el pico de LH mediante la evaluación de los cambios clínicos y paraclínicos que se presentan durante el proestro estro y diestro temprano de la perra. para establecer la sensibilidad, especificidad y el valor predictivo positivo y negativo de cada uno de los métodos diagnósticos y de las pruebas en paralelo para posteriormente interpretar la utilidad del uso de las pruebas en conjunto.

1. Ciclo estral y evaluación reproductiva

1.1 Generalidades del ciclo estral y endocrinología

La hembra canina se caracteriza por tener un ciclo estral no estacional, monoéstrico y con ovulación espontánea. El intervalo interestral tiene una duración promedio de 6-7 meses, pero se puede extender hasta 12 meses. El ciclo estral canino está dividido en 4 fases: Proestro, estro, diestro y anestro. La fase luteal tiene una duración promedio de 57 ± 1 días en hembras en gestación, seguido por una etapa de anestro obligado de 80-240 días (Reynaud et al., 2006, Groppetti et al, 2015).

Proestro: En el estudio realizado por Groppetti et al., (2015) esta fase se definió como el periodo comprendido entre el primer día de aparición de secreción vaginal sanguinolenta y justo antes del pico de LH. El aumento en los niveles de estrógenos séricos produce signos externos como edema de la vulva usualmente acompañado con secreción vulvar serosanguinolenta. Esta etapa tiene una duración de 5-15 días y está caracterizada por un progresivo aumento de la turgencia y tamaño de la vulva, proliferación del epitelio vaginal, cornificación de las células vaginales, edema de la mucosa vaginal y secreción de feromonas. La secreción serosanguinolenta está compuesta por un fluido seroso que contiene eritrocitos que migran por diapédesis del útero y no se ha observado que existan características confiables relacionadas con su volumen o apariencia (Concannon, 2011).

El proestro es la fase folicular del ciclo e involucra el crecimiento de una cohorte de 2-8 folículos por ovario que secretan la cantidad suficiente de E2 para producir los cambios en el tracto reproductivo. Durante el proestro, el estradiol sérico (E2) incrementa desde 5-15pg/ml hasta lograr un pico de 40-120pg/ml. En la investigación realizada por Groppetti et al (2015) en un grupo de 40 hembras caninas donde se realizó una descripción de la morfometría histológica de las estructuras ováricas durante las diferentes etapas del ciclo estral se encontró que durante el proestro hay folículos medianos ($2,4 \pm 0,3$ mm) y

grandes ($3,6 \pm 0,4\text{mm}$) los cuales sufren una preluteinización de las células de la granulosa que a su vez generan un aumento en los niveles de progesterona a 2 ng/ml (promedio de $1,7 \pm 0,3 \text{ ng/ml}$) al final del proestro.

Esta etapa termina cuando se presenta el pico preovulatorio de LH que se asocia a comportamiento de receptividad en la hembra; de acuerdo al estudio realizado por Gier et al., (2006) el pico preovulatorio de LH siempre está acompañado por un pico preovulatorio de FSH. Sin embargo, la duración promedio del pico preovulatorio de FSH (110 ± 8 horas) fue significativamente más largo que el pico preovulatorio de LH (36 ± 5 horas) ($P < 0,001$) y la concentración promedio de FSH durante el pico fue de $13,8 \pm 2,0$ U/L.

Estro: Se inicia con el pico de LH y se caracteriza por un comportamiento de receptividad a la monta, disminución del edema y aumento de la crenulación de la mucosa vulvar y vaginal; estos cambios se dan por la rápida disminución en los niveles de E2 y el ascenso de la progesterona (Hahn et al., 2017).

Durante el estro los niveles de E2 continúan disminuyendo desde los valores más altos que se presentaron durante el proestro tardío hasta valores intermedios de $10\text{-}20\text{pg/ml}$. De acuerdo al estudio de Groppetti et al., (2015), los niveles de progesterona aumentan gradualmente durante el estro; encontrándose valores preovulatorios de $2,9 \pm 0,4 \text{ ng/ml}$, periovulatorios de $6,1 \pm 1,7 \text{ ng/ml}$ y post ovulatorios de $16,7 \pm 5,9 \text{ ng/ml}$. También se reportó la evaluación histológica de los ovarios; justo antes de la ovulación el promedio de folículos fue de $14,6 \pm 8,2$ por perra con un predominio de folículos grandes ($4,1 \pm 0,7 \text{ mm}$). Los cuerpos hemorrágicos empezaron a ser detectados junto con los folículos desde el periodo periovulatorio y post ovulatorio con un diámetro de $6 \pm 1,2\text{mm}$ y $6,1 \pm 1,1\text{mm}$ respectivamente. En el estudio realizado por Thomassen et al., (2006) se utilizó como parámetro para estimar la ovulación un nivel de progesterona entre $15 - 20 \text{ nmol/L}$ ($4,7$ a $6,2 \text{ ng/ml}$) y se encontró que el nivel de progesterona aumentó progresivamente durante el estro; de tal manera que 2 días antes de la inseminación la concentración de progesterona fue de $20,5 \pm 0,5 \text{ nmol/L}$ ($4,7 \text{ ng/ml}$) ($n = 180$), 1 día antes de la inseminación la concentración aumentó a $35,0 \pm 0,9 \text{ nmol/L}$ ($10,9 \text{ ng/ml}$) ($n = 171$) el primer día de la inseminación los valores llegaron a $43,5 \pm 0,8 \text{ nmol/L}$ ($13,6 \text{ ng/ml}$) ($n =$

177) y el último día de las inseminaciones los valores llegaron a $66,8 \pm 1,4$ nmol/L ($20,9$ ng/ml) ($n = 140$).

Los oocitos primarios son ovulados 48-60h después del pico de LH en una etapa diploide inmadura (vesícula germinal) y realizan un proceso de maduración meiótica de 96-108h en el oviducto; los oocitos secundarios permanecen viables por 24-48h. El periodo de máxima fertilidad cuando se realiza una sola monta comprende el periodo entre el pico de LH y los 6 días posteriores; después de este intervalo se presenta el “cierre del cérvix” (8 días después del pico de LH). En inseminaciones artificiales (IA) con semen congelado o semen de baja calidad se obtienen mejores resultados si el proceso se realiza 5-6 días posterior al pico de LH, es decir; cuando los oocitos ya están madurados (Reynaud, et al., 2006).

Esta etapa termina cuando en la citología vaginal se observa un cambio en la morfología celular, de células cornificadas a células no cornificadas y presencia de neutrófilos que han migrado desde el lumen. Este cambio ocurre en promedio 8 días después del pico de LH (Concannon, 2011).

Diestro: Desde el punto de vista comportamental se inicia con rechazo a la receptividad al macho, pero desde un criterio morfológico, se inicia cuando se presenta un cambio en las células observadas en la citología vaginal. En el estudio de Gloria et al., (2018) se definió el diestro citológico como el primer día en que se observa en el frotis vaginal una disminución en el porcentaje de células epiteliales cornificadas y la presencia de células intermedias y parabasales. En el estudio de Groppetti et al., (2015) se estableció que el inicio del diestro citológico estuvo caracterizado por una disminución abrupta en el porcentaje de células superficiales anucleares junto con un incremento de las células intermedias y la aparición de neutrófilos. Durante el diestro los niveles de P4 incrementan hasta llegar a un pico de 15-80ng/ml y luego disminuyen de forma gradual hasta niveles menores de 1ng/ml.

En el estudio histológico de los ovarios de Groppetti et al., (2015), se determinó que el inicio del diestro estuvo caracterizado por la aparición de cuerpos lúteos ($7 \pm 3,2$ por perra), coexistiendo con folículos pequeños ($2,1 \pm 5,7$ por perra) y cuerpos hemorrágicos ($3,5 \pm 3,5$ por perra). Los cuerpos lúteos tuvieron un diámetro de $5,6 \pm 1,7$ mm y los niveles de progesterona aumentaron a $73,9 \pm 9,9$ ng/ml. Sin embargo, las hembras que

tuvieron más de 6 cuerpos lúteos en ambos ovarios tuvieron un valor promedio de progesterona más alto ($67,5 \pm 20,5$ ng/ml) que aquellas hembras que tuvieron menos de 6 cuerpos lúteos en las cuales el valor promedio de progesterona fue de $49,9 \pm 24,9$ ng/ml.

Cuando hay gestación, la implantación ocurre hacia el día 21 y el parto hacia el día 65 ± 1 días posterior al pico de LH. Pero, cuando no se puede establecer el pico de LH, el parto puede ocurrir tan pronto como 55 días después de la monta o tan tarde como 68 días después de la monta, ya que el semen canino de buena calidad puede sobrevivir hasta 7 días en el útero. El diestro termina cuando los niveles de P4 disminuyen a niveles basales de 1-2ng/ml (Concannon, 2011).

Anestro: Se caracteriza por la ausencia de actividad ovárica, en caninos se presenta un anestro obligado de mínimo 7 semanas y se inicia cuando los niveles de P4 se encuentra por debajo de 1-2ng/ml y tiene una duración promedio de 18-20 semanas (Concannon, 2011).

Durante el anestro los niveles de E2 son bajos (5-10pg/ml), la LH es basal ($<1-2$ ng/ml), aunque puede presentar algunos pulsos (3-30ng/ml) en intervalos de 7-18 horas; los niveles de P4 se encuentran por debajo de 1ng/ml y en la citología vaginal se observa una baja celularidad conformada principalmente por células individuales o pequeños grupos de células parabasales (Concannon, 2011, Groppetti et al., 2015).

En la evaluación histológica de los ovarios realizada por Groppetti et al., (2015), se encontró que los cuerpos lúteos en regresión persistieron durante el anestro y el diámetro promedio de dichas estructuras fue de $2,9 \pm 0,9$ mm. Durante esta etapa también se observó un promedio de $4 \pm 5,6$ folículos por perra con un diámetro de $1,3 \pm 0,3$ mm y un nivel de progesterona de $1,3 \pm 0,5$ ng/ml.

1.2 Determinación del pico de LH, ovulación y momento óptimo para realizar la inseminación artificial

Existen varios parámetros clínicos y paraclínicos que pueden ser evaluados en una hembra en celo para determinar el momento óptimo para realizar la inseminación artificial. La mayoría de los estudios toman como punto de referencia el día del pico de

LH, para poder determinar el día en que se puede usar una sola inseminación con semen congelado y obtener tasas de gestación elevadas (Steckler et al., 2013).

Thomassen et al., (2006) realizó un estudio retrospectivo durante 10 años donde evaluó 685 ciclos estrales de hembras caninas que fueron inseminadas con semen congelado y encontró que las perras que fueron inseminadas en el momento óptimo (nivel de P4 entre 5 y 18 ng/ml) tuvieron una tasa de gestación mayor ($P < 0,01$) que aquellas hembras que se inseminaron en un periodo tardío (nivel de P4 mayor a 18 ng/ml). Adicionalmente el tamaño de la camada también se vio afectado por el momento donde se realizó la inseminación; durante un periodo de inseminación óptimo se obtuvo un promedio en el tamaño de la camada de $5,8 \pm 0,2$ cachorros comparado con $4,5 \pm 0,5$ cachorros durante el periodo tardío ($P < 0,01$).

Los parámetros que pueden ser evaluados para determinar el pico de LH o la ovulación son los siguientes:

1.3 Medición de la hormona luteinizante (LH):

El éxito en determinar el momento óptimo para realizar una inseminación artificial está basado en la identificación de forma directa o indirecta del momento en que se presenta el pico de LH; ya que el pico de LH es el evento de referencia del ciclo estral debido a que está relacionado con todos los eventos reproductivos, desde la ovulación hasta el parto (England et al., 2006; Macedo et al., 2012, Hollinshead et al., 2019). Aunque hay limitada información con respecto a la dinámica folicular en la perra, está bien establecido que el pico de LH induce la ovulación aproximadamente 2-3 días después de presentarse. A diferencia de otras especies, los oocitos son liberados al oviducto como oocitos primarios inmaduros y 2 a 3 días después de la ovulación, los oocitos alcanzan la metafase de la segunda división meiótica y en este punto se considera que pueden ser fertilizados (Hase et al., 2000, England et al., 2006, Steckler et al., 2013, Groppetti et al., 2015).

El pico de LH puede ser determinado por medio de la medición directa de los niveles de LH en plasma o suero por Radioinmunoensayo (RIA), la cual es considerada la prueba de oro debido a su precisión y repetibilidad. Sin embargo, debido a los residuos radioactivos, esta técnica no es frecuentemente utilizada; además, la medición por RIA

es costosa, el tiempo de respuesta puede ser demorado y representa riesgo para el personal de laboratorio por la manipulación de reactivos restringidos. También se utilizan pruebas inmunoabsorbentes ligadas a enzimas semicuantitativas (Witness^R LH, Zoetis, USA), pero estos kits tienen una vida media corta y no se consiguen en Colombia. Por otra parte, la medición de los niveles de LH requiere toma de muestras de sangre diarias y preferiblemente a la misma hora (Hollinshead, et al., 2019).

En la investigación realizada por Gier et al., (2006), se midió la concentración de LH por medio de RIA en 6 perras y se encontró que el incremento preovulatorio de los niveles de LH tuvo una duración promedio de 36 ± 5 horas con un pico promedio de $18,7 \pm 5,8$ ug/L, en cuatro de los seis animales se presentó un patrón bifurcado durante el incremento de la hormona. Por otra parte, en un estudio realizado por Hase et al., (2000) se encontró que durante el pico de LH los niveles séricos de la hormona aumentan hasta $24,8 \pm 3,1$ ng/ml; 6 a 12 horas antes del pico, los niveles están en $14,7 \pm 4,4$ ng/ml y $7 \pm 2,1$ ng/ml respectivamente y 6 a 12 horas después del pico de LH los niveles están en $14,2 \pm 4,1$ ng/ml y $5,8 \pm 2,4$ ng/ml. De tal manera que, los niveles de LH se mantuvieron por encima de 10 ng/ml solamente durante un periodo de 24 horas; esto implica que para poder establecer el pico de LH se deben tomar al menos una muestra al día, lo cual puede ser impráctico a nivel clínico. En la tabla 1 se resume los parámetros usados en algunos estudios para determinar el momento de la ovulación y la maduración teniendo en cuenta el pico de LH.

Tabla 1-1: Momento de la ovulación y maduración después del pico de LH

DURACION DEL PICO DE LH	OVULACIÓN	MADURACION	AUTOR
36 ± 5 horas	2 días después del pico de LH		Gier et al., 2006
	1-4 días después del pico de LH	2-3 Días después de la ovulación	England et al., 2006
Pico de LH: 13.6-42.4ng/ml. Media: $24.8 \pm 3,1$ ng/ml Duración 24 horas	24 a 48 horas después del pico de LH. Media: $38 \pm 4,4$ horas	60 horas después de la ovulación	Hase et al., 2000
	44 horas después del pico de LH		Concannon et al., 1997

1.4 Manifestaciones clínicas del proestro y estro:

Durante el proestro clínicamente hay evidencia de aumento de tamaño de la vulva, edema vulvar, secreción vaginal serosanguinolenta y atracción de los machos, pero la hembra no permite la monta (Kutzler, 2005^a, Chapwanya et al., 2008).

Durante el estro clínicamente se observa que la hembra permite la monta, la secreción vaginal es menos sanguinolenta y hay disminución de la edematización de la mucosa vulvar (Kutzler, 2005^a, Chapwanya et al., 2008). Se debe tener en cuenta que el período de receptividad sexual es muy variable entre individuos (England et al., 2006).

Los cambios clínicos del proestro y del estro presentan períodos de duración variables de un individuo a otro. En la investigación realizada por Moxon et al., (2012) se encontró que el tiempo de duración desde el inicio del proestro hasta el inicio del diestro determinado por citología vaginal fue de 18 a 23 días (promedio $20,1 \pm 1,9$ días) y que el día de la ovulación se presentó en un rango de 10 a 15 días después del inicio del proestro.

Las pruebas clínicas y paraclínicas in situ que se utilizan para estimar el pico de LH son:

1.4.1.1 Secreción vaginal:

La secreción vaginal sanguinolenta observada durante el proestro usualmente se aclara durante el estro, pero puede persistir durante todo el estro. En un estudio donde se comparó la relación que existe entre los días desde el inicio del sangrado vaginal y los niveles de progesterona sérica, se encontró que las muestras de sangre para medir progesterona se pueden tomar entre 7 y 14 días después del inicio del sangrado vaginal, ya que en este intervalo de tiempo ocurre el pico de LH y la ovulación. Sin embargo, también se encontró que la valoración de la secreción vaginal de forma independiente es una prueba poco confiable para poder predecir el pico de LH o la ovulación. Por esta razón, es aconsejable utilizar otros parámetros como citología vaginal y niveles de progesterona en conjunto durante la evaluación reproductiva (Hahn et al., 2017).

1.4.1.2 Tamaño de la vulva

El incremento en los niveles de estrógenos durante el proestro produce un aumento en el tamaño y turgidez de la vulva y cuando los estrógenos disminuyen también se presenta una disminución del tamaño y grado de edematización de la vulva (Moxon et al, 2012).

En el estudio realizado por Moxon et al., (2012) se registró el ancho (área de mayor dimensión en dirección horizontal) y alto de la vulva (área de mayor dimensión en dirección vertical) en 9 hembras caninas durante el celo y se reportó un incremento en la altura de la vulva antes de la ovulación y una disminución 7 días después de la ovulación. Los resultados entre las hembras fueron variables pero se presentó un periodo de meseta en la altura de la vulva desde el día -6 hasta el día 7. El alto de la vulva incrementó a los valores más altos entre el día -2 y el día 5. No se encontraron diferencias significativas en la altura o el ancho vulvar entre el día -5 y el día 2, ni tampoco entre el día 2 y el día 5. Adicionalmente, la altura y el ancho de la vulva no estuvieron correlacionados con la concentración de progesterona, la saturación del color en la endoscopía vaginal o el ancho de los pliegues de la mucosa vaginal. En otro estudio, se registró la medida horizontal de la vulva durante el proestro y estro en 12 hembras caninas y se encontró que en las 9 hembras que estaban gestantes se presentó una disminución del 20% en la medida del ancho vulvar 2 días después del pico de LH, lo cual permitió en este estudio estimar el pico de LH por medio de la medición del tamaño de la vulva (Nishiyama et al, 2000).

1.4.1.3 Conducta de aceptación

La conducta de receptividad de una hembra puede ser evaluada observando diferentes características como la desviación de la cola hacia los lados y contracción de los músculos de la zona perivulvar cuando se presenta un estímulo en la zona perineal; también se puede evaluar el grado de interés hacia el macho (permite que el macho se acerque y se deja montar) cuando hay la posibilidad de tener un macho presente. En la investigación realizada por Moxon et al., (2012) se evaluaron cuatro características a las cuales se les dio una calificación de 1 a 5. Un resultado de 5 indicaba comportamientos propios del estro, mientras que una calificación de 1 indicaba que la hembra no presentaba conducta de receptividad tal como se describe en la tabla 1-2. Al utilizar este score se encontró que el comportamiento sexual no puede ser utilizado como un indicador del periodo de fertilización, ni tampoco para estimar la ovulación; porque aunque se observó un incremento en el puntaje del score durante el celo, no se presentaron diferencias significativas entre los días -5, 2 y 5. Además, también se pudo observar que muchas de las hembras estuvieron receptivas desde antes del periodo fértil

y permanecieron receptivas después de finalizar este periodo, de tal manera que no fue posible establecer un periodo óptimo de monta por medio de esta prueba.

Tabla 1-2: Características de comportamiento evaluadas cuando hay un macho presente durante el proestro y estro (Moxon et al., 2012).

CARACTERÍSTICA	SCORE	DESCRIPCIÓN
Interés en el macho	1	No se acerca al macho
	2	El macho se aproxima pero ella muestra resistencia
	3	Permite que el macho se aproxime pero la postura corporal de la hembra es desconfiada
	4	Permite que el macho se aproxime y juega
	5	Permite que el macho se aproxime, busca su atención activamente, se queda de pie y muestra la región anogenital
Desviación de la cola	1	No hay desviación
	2	Leve movimiento de desviación
	3	Desviación lateral de la cola <45°
	4	Desviación lateral de la cola >45°
	5	Desviación lateral de la cola >45° con lordosis
Permite que el macho huelo o lama la región anogenital	1	No permite acercarse al macho
	2	Permite que el macho se acerque y huelo su cuerpo
	3	Permite que el macho huelo la región anogenital
	4	Permite que el macho huelo y lama la región anogenital
	5	Busca al macho para que huelo y lama la región anogenital
Resistencia	1	Agresiva hacia el macho
	2	Comportamiento sumiso o intenta escapar
	3	Periodos de aceptación
	4	Juega con el macho, permite acceso intermitente a la

	región anogenital
5	Permite la monta

1.5 Citología vaginal:

La citología vaginal es una prueba que permite evaluar la etapa del ciclo estral en la que se encuentra la perra. Se evalúa la cantidad de células epiteliales presentes en el frotis, y el tipo de celularidad observado (células parabasales, intermedias y superficiales). La citología vaginal es una prueba simple, rápida, poco invasiva y económica que se ha utilizado desde hace muchos años. Sin embargo, algunas hembras presentan pocos cambios celulares en el frotis y el pico de cornificación puede presentarse desde 1 hasta 6 días antes del pico de LH (Hahn et al., 2017).

Durante el anestro, el epitelio vaginal tiene pocas capas de células y la citología vaginal se caracteriza por una escasa celularidad, donde se observan principalmente células parabasales solas o en pequeños grupos (Groppetti et al., 2015).

Durante el proestro, los E2 estimulan el crecimiento del epitelio vaginal, el cual desarrolla varias capas celulares, generándose una población de células epiteliales heterogénea y un aumento de descamación celular. Inicialmente se caracterizan como células intermedias pequeñas y grandes, pocas superficiales y una reducción en el número de células parabasales; al final del proestro, los niveles máximos de E2 llevan al mayor engrosamiento del epitelio vaginal, detectándose un aumento de las células intermedias grandes y superficiales, junto con eritrocitos, leucocitos y bacterias (Concannon, 2011, Groppetti et al., 2012). En un estudio realizado por Gloria et al., (2018) se definió que el proestro tardío iniciaba cuando en el frotis vaginal se presentaba por primera vez más del 70% de células cornificadas.

Cuando inicia el estro, el porcentaje de células superficiales aumenta hasta que ocurre un pico de cornificación (pérdida de núcleos), el cual coincide con el aumento de los niveles de progesterona y el pico de LH; se pueden observar eritrocitos pero es raro encontrar neutrófilos y bacterias (Groppetti et al., 2012). En la investigación de Gloria et

al., (2018) se definió el inicio del estro como el primer día en que se presentó un porcentaje de cornificación mayor al 90%.

El inicio del diestro es determinado por un cambio abrupto en la morfología de células epiteliales con respecto al día anterior; de tal manera que se presenta una disminución en el porcentaje de células superficiales y un aumento en el porcentaje de células provenientes de las capas más profundas del epitelio vaginal como es el caso de las células parabasales (Groppetti et al., 2015, Cramer et al., 2017). En el estudio realizado por Groppetti et al., (2015) se encontró que el inicio del diestro estuvo caracterizado por una disminución evidente de las células superficiales anucleares (<40%), junto con un incremento de las células intermedias y parabasales y la reaparición de neutrófilos; mientras que los cambios que se presentaron durante el paso del proestro al estro fueron variables y subjetivos.

Para obtener la muestra de células se debe introducir un hisopo de algodón hasta la parte anterior de la vagina. Las células obtenidas de la citología vaginal se colocan sobre una lámina portaobjetos para posteriormente realizar una tinción como Diff-quick® (International Reagent Corp., Kobe, Japan) y luego se observa en el microscopio de luz en una magnificación de 100X para realizar la clasificación de las células (Hahn et al., 2017).

En el estudio de Hahn et al., (2017) se tuvieron en cuenta dos factores para clasificar el resultado de las citologías vaginales: la proporción de células cornificadas y el índice de cornificación. La proporción de células cornificadas es la relación de la suma de las células intermedias y superficiales sobre el número total de células epiteliales. El índice de cornificación representa la relación entre el número de células picnóticas y células anucleares sobre el total de células epiteliales. De tal manera que, cuando se presenta una proporción de células cornificadas mayor al 50% y un índice de cornificación mayor al 80% se puede establecer que la hembra está en estro; si la proporción de células cornificadas es mayor al 50% pero el índice de cornificación es menor al 80% la hembra está en proestro tardío. En este estudio se encontró que existe una correlación positiva más alta entre el índice de cornificación y la concentración de progesterona sérica (Pearson $r = 0,613$, $p < 0,001$); que entre la proporción de células cornificadas y la concentración de progesterona (Pearson $r = 0,501$, $p = 0,001$). Estos hallazgos permiten concluir que el uso de la citología vaginal junto con la medición de niveles de

progesterona son una buena combinación para estimar el periodo fértil de la perra y adicionalmente que la medición de progesterona se debe iniciar cuando se presente un índice de cornificación mayor al 80% en la citología vaginal para disminuir costos. En el estudio realizado por Groppetti et al., (2015) también se encontró que la citología vaginal por sí sola, no es capaz de detectar los eventos periovulatorios como el pico de LH o la ovulación; pero en combinación con la medición de progesterona se puede definir la etapa del ciclo estral con una mayor precisión. En conclusión, cuando la hembra se encuentra en estro, el porcentaje de células superficiales o cornificadas debe ser alto (Kutzler, 2005a).

En la investigación de Gloria et al., (2018) se utilizó la fecha del inicio del diestro citológico para establecer de forma retrospectiva el periodo preovulatorio (9 a 8 días antes), el periodo ovulatorio (7 a 5 días antes) y el periodo de maduración de los oocitos (4 a 1 día antes). La determinación del primer día de diestro por citología vaginal también se ha utilizado como un predictor periestral de la fecha del parto. En un estudio donde se utilizaron 242 hembras gestantes se encontró que la fecha de inicio del diestro predijo el inicio de la dilatación cervical (etapa I del parto) con una precisión de ± 1 día, ± 2 días y ± 3 días en un 88%, 99% y 100% respectivamente. Adicionalmente, se observó que la fecha de inicio del diestro fue mejor predictor del parto que otras pruebas periestrales como la medición del pico de LH y la determinación de niveles de progesterona durante el estro (Cramer et al., 2017).

En un estudio realizado por Moxon et al., (2010), se encontró que puede existir una gran variabilidad en los resultados de las citologías vaginales dependiendo de la experiencia del técnico que realiza la lectura de los frotis. Se presentó una mayor precisión en los resultados cuando los frotis fueron evaluados por técnicos experimentados que por técnicos no experimentados o cuando las muestras fueron remitidas a otros laboratorios. La interpretación de la etapa del ciclo estral fue la adecuada en 19 de los 32 frotis vaginales por parte de los técnicos experimentados, mientras que los técnicos sin experiencia tuvieron aciertos menores y más variables (14, 16 y 18 aciertos de los 32 frotis vaginales). Adicionalmente, los frotis que fueron interpretados correctamente con mayor frecuencia fueron los de diestro ($n = 10$, 100% de láminas identificadas tanto por los técnicos experimentados como por los no experimentados) y los que fueron

interpretados incorrectamente con mayor frecuencia fueron los de estro ($n = 4$, el 50% de las láminas no fueron identificadas correctamente por los técnicos experimentados y 75% de las láminas no fueron identificadas correctamente por los técnicos no experimentados).

1.6 Vaginoscopía

Es una prueba que permite observar la superficie de la mucosa vaginal por medio de un vaginoscopio o un endoscopio. De acuerdo con la etapa del ciclo estral se pueden observar cambios en la mucosa que se encuentran relacionados con los cambios hormonales.

De esta manera, cuando la hembra se encuentra en proestro y sus niveles de estrógenos son altos, se observa la mucosa vaginal edematosa, se presenta un cambio progresivo de color de rosado a pálido, con fluido serosanguinolento en la superficie y en los pliegues vaginales (Concannon, 2011). Cuando la hembra se encuentra en estro, disminuyen progresivamente los niveles de estrógenos, se produce el pico de LH y los niveles de progesterona empiezan a aumentar; por esta razón, en la vaginoscopía se observa la mucosa vaginal arrugada y rosa pálida. Durante el diestro y el anestro, la mucosa vaginal se observa delgada y roja con capilares visibles; la superficie se puede traumatizar con facilidad y se puede presentar dificultad para realizar esta prueba (Barstow et al., 2018). La evaluación a través de vaginoscopía para determinar el cambio de proestro a estro y por lo tanto el momento óptimo para la inseminación se debe hacer de forma seriada cada 48 horas (Lulich, 2006).

La vaginoscopía también se utiliza para el diagnóstico de patologías reproductivas, como la presencia de cuerpos extraños, neoplasias, lesiones de la mucosa, hiperemia, sangrado y anormalidades anatómicas, así como para determinar el origen de secreciones vaginales y realizar inseminación artificial transcervical. La utilización de un vaginoscopio tiene la desventaja de no poder generar distensión de la vagina y esto limita la visualización de la región craneal. Alternativamente, se puede utilizar un endoscopio rígido o flexible, que permite una mejor observación del vestíbulo y la vagina, debido a la facilidad de generar distensión de la vagina con aire o dióxido de carbono y adicionalmente permite registrar las imágenes de forma digital (Lulich, 2006).

En el estudio de Nóthling et al., (2006) se utilizó la vaginoscopia junto con la medición sérica de la progesterona para determinar la etapa del ciclo estral y se determinó que los animales que presentaban los pliegues vaginales edematosos, grandes y redondos estaban en la fase folicular temprana; los animales en los cuales se observaba una disminución en el edema de los pliegues se clasificaron en una fase folicular tardía y aquellos animales donde se observaba una disminución muy evidente del edema y formas angulares en los pliegues vaginales se clasificaron como animales que ya habían ovulado. Esta clasificación se realizó con el propósito de realizar la ovariectomía en las diferentes etapas del ciclo estral para posteriormente evaluar los ovarios por resonancia magnética.

En la investigación realizada por Moxon et al., (2012) se utilizó un endoscopio rígido de 280mm de longitud y 6mm de diámetro para realizar la vaginoscopia en nueve hembras caninas. En las imágenes obtenidas se evaluó la saturación del color de forma objetiva a través de un programa digital y de forma subjetiva al observar el color y clasificándolo en cuatro categorías (rojo, rosado, rosado pálido y rosado muy pálido) y también se evaluaron las características de la mucosa vaginal de forma subjetiva por medio del score para mucosa vaginal reportado por Jeffcoate y Lindsay (Tabla 1-3).

Tabla 1-3: Score para la evaluación de la mucosa vaginal de Jeffcoate y Lindsay (1989)

SCORE	CARACTERISTICA
1	Edematización de la mucosa vaginal
2	Disminución del edema con inicio de angulación de la mucosa
3	Disminución del edema con formación evidente de pliegues en la mucosa
4	Mucosa sin edematización

Con respecto a la observación del color de la mucosa vaginal; Moxon et al., (2012) encontraron que cinco de las 9 hembras presentaron un color rosado al inicio del proestro y luego pasó a rosado pálido, sin embargo el día en que se presentó el cambio de color fue variable entre el día -3 y el día 3. Al medir la saturación del color no se encontraron diferencias significativas entre el día -5 y el día 2, ni tampoco entre el día 2 y el día 5 ($P = 0,005$). Además, la saturación del color no estuvo correlacionada con otros parámetros que se midieron tales como la concentración sérica de progesterona, las

medidas de la vulva y las medidas de los pliegues de la mucosa vaginal. Al realizar la evaluación subjetiva de la apariencia de los pliegues vaginales se encontró una diferencia significativa entre el día -5 y el día 2 ($P = 0.004$), y entre el día 2 y el día 5 ($P = <0,001$). La evaluación por medio del score estuvo positivamente correlacionada con la concentración de progesterona ($r = 0,92$, $P < 0,001$) y la medición del ancho de los pliegues de la mucosa no estuvo correlacionada con la concentración de progesterona, las medidas de la vulva ni la saturación del color de la mucosa. De tal manera que se pudo concluir que la evaluación subjetiva del edema y posterior arrugamiento de la mucosa por medio del score de Jeffcoate y Lindsay es un método efectivo para identificar el periodo de fertilización, ya que los cambios observados están relacionados con los cambios hormonales. Pero, los cambios en el color de la mucosa y la evaluación objetiva de los pliegues de la mucosa por medio de la medición del ancho de los mismos no fueron efectivos para determinar el periodo de fertilización.

1.7 Determinación de los niveles de progesterona sérica

La perra es la única especie que presenta un aumento significativo en los niveles de P4 sérica antes del inicio del pico de LH (de Gier et al., 2006), debido a que se presenta una luteinización folicular preovulatoria que consiste en una transformación metaplásica de las células de la granulosa en células luteales grandes y pequeñas. Este aumento inicial en la concentración de progesterona sérica (1,5 a 2 ng/ml) ha sido usado universalmente para estimar de forma indirecta el momento en que ocurre el pico de LH (Suwa et al., 2009, Macedo, et al., 2012). Se estima que la ovulación ocurre aproximadamente 2 días después del pico de LH y está asociada con un incremento abrupto de la concentración de progesterona (4-10 ng/ml), reflejo de la luteinización generada por la ovulación de múltiples folículos. Posteriormente los niveles incrementan rápidamente hasta 15-90ng/ml a los 15-30 días después del pico de LH (Chapwanya et al., 2008, Steckler et al., 2013, Hollinshead, et al., 2019). En el estudio realizado por Groppetti et al., (2015) se encontró que el número de cuerpos lúteos puede afectar los valores de progesterona ya que en aquellas hembras que tenían más de 6 cuerpos lúteos se reportaron valores de progesterona de $67,5 \pm 20,5$ ng/ml; mientras que en las hembras que tenían menos de 6 cuerpos lúteos se reportaron valores de $49,9 \pm 24,9$ ng/ml. Sin embargo, independientemente del número de cuerpos lúteos, los niveles séricos de progesterona

aumentan rápidamente después del pico de LH, por lo tanto, la medición de esta hormona es un parámetro útil para predecir la ovulación en perras (Hase et al., 2000).

La medición de progesterona sérica es la mejor forma de monitorear la luteinización (Hollinshead, et al., 2019). Esta medición se realiza de forma seriada en sangre periférica de las perras en proestro y estro para estimar el pico de LH, predecir el momento de la ovulación y también para decidir el momento óptimo para cruzar una perra con una sola inseminación (Chapwanya et al., 2008). Adicionalmente, la progesterona también sirve para estimar la fecha de parto y el manejo del hipoluteidismo (Cramer et al., 2017, Gloria et al., 2018).

Existen diferentes métodos para medir las concentraciones de progesterona sérica. El RIA es considerado la prueba de oro porque tiene una alta precisión; sin embargo, su uso a nivel clínico es limitado debido a que tiene la desventaja de su alto costo, riesgo incrementado por el uso de isotopos radioactivos y demora en la entrega de resultados (Gloria et al., 2018).

En la actualidad existen varios estudios que han validado la precisión de otros métodos de inmunoensayo como las pruebas de ELISA, quimioluminiscencia (CLIA- Inmunolite^R) y pruebas de fluorescencia ligada a enzimas (ELFA) que proporcionan resultados cuantitativos o semi- cuantitativos, son menos costosas y fáciles de desarrollar (Chapwanya et al., 2008, Suwa et al., 2009, Hollinshead, et al., 2019). Las limitaciones de estas pruebas radican en las variaciones intra e inter-ensayo que puede presentar entre diferentes pruebas y laboratorios (Gloria et al., 2018, Hollishead, et al., 2019).

Existen muchos estudios donde se ha logrado demostrar que la medición seriada de los niveles de progesterona es un método confiable para estimar el pico de LH, la ovulación y el periodo fértil; de esta manera se facilita determinar el momento óptimo para realizar las inseminaciones artificiales, en especial cuando se utiliza semen congelado. Por ejemplo, en el estudio realizado por Hollinshead et al., (2019) se realizó una descripción detallada del comportamiento de la progesterona durante el estro en perras de diferentes razas, edades y pesos. En este estudio, se utilizaron 1300 hembras y se determinó que la concentración de progesterona en el pico de LH fue de $2,7 \pm 0,6\text{ng/ml}$, la ovulación se estimó 2 a 3 días después del pico de LH y se obtuvieron niveles de progesterona de $4,8 \pm 0,9\text{ng/ml}$ en el día 2 y de $7,2 \pm 1,3\text{ng/ml}$ para el día 3. Adicionalmente, no se

presentaron diferencias significativas en los niveles de progesterona con respecto a la raza o peso de los animales. Pero si hubo diferencias significativas en los promedios de concentración de progesterona en hembras de diferentes edades; de tal manera que, por cada año de incremento en la edad, el promedio de la concentración de progesterona aumentó 0,1ng/ml ($P=0.02$).

En el estudio realizado por Gloria et al., (2018) se comparó la concentración de progesterona durante el proestro y el estro usando 3 técnicas diferentes (RIA, ELISA y CLIA). Se midieron los niveles de progesterona con las tres técnicas en 23 hembras y se observó un incremento significativo de los niveles de progesterona durante la progresión del estro. Se encontraron diferencias significativas en los valores cuando se usaron los diferentes métodos, con valores más bajos para RIA, valores intermedios con CLIA y los valores más altos con ELISA. Sin embargo, se encontró una alta correlación (Coeficiente de correlación de Pearson =0.978) y un fuerte nivel de acuerdo (Coeficiente de correlación de Lin= 0,966) entre los valores obtenidos usando CLIA y RIA. Por lo tanto, el método usado para medir la concentración de progesterona durante la fase periovulatoria afecta los valores de progesterona y siempre debería ser utilizado el mismo método en un seguimiento reproductivo para IA.

A pesar de las variaciones de progesterona entre perras, es útil medirla para determinar el momento de la inseminación con semen congelado. Así, por ejemplo, Thomassen et al. (2006) concluyó que las perras deberían ser inseminadas con semen congelado 2 -3 días después de que la concentración de progesterona en suero ha incrementado a 15-20nmol/L (4,7-6,3 ng/ml) (Steckler et al., 2013).

Tsumagari et al., (2003) utilizaron valores de 2 ng/ml para estimar el pico de LH e inseminaron 20 hembras con semen congelado el día 5 y 7 posterior al pico de LH para evaluar cual día tenía una mayor tasa de concepción. La tasa de concepción total fue del 80% (16/20 hembras). Con la inseminación realizada solamente el día 5 se obtuvo una tasa de concepción de 43,8%, con la IA realizada el día 7 se obtuvo una tasa de concepción de 31,3% y con la IA realizada los dos días un 25% y se concluyó que el momento óptimo para realizar IA con semen congelado es 2 a 5 días después de la ovulación, es decir 5 a 7 días después del pico de LH.

Tsutsui (1975) y Bysted et al., (2001) demostraron que el desarrollo embrionario es sincronizado entre los embriones, sugiriendo que la fertilización ocurre en un periodo corto de tiempo en la perra. Además, hay una correlación lineal positiva entre el intervalo desde el pico de LH y la etapa de desarrollo embrionario, con el primer oocito potencialmente fertilizado y el cigoto identificado 7 días después del pico de LH (Steckler et al., 2013).

En la siguiente tabla se resume el nivel de progesterona sérica establecido por diferentes autores para estimar el pico de LH y el momento de mayor efectividad para realizar las inseminaciones artificiales. Tener en cuenta que 1ng/ml equivale a 3.18 nmol/ml.

Tabla 1-4: Niveles de P4 para estimar el pico de LH, ovulación y el día de la IA.

Nivel de P4	IA	Autor
4-10ng/ml: Día de la ovulación	14-19ng/m con semen fresco	Chapwanya et al., 2008
5ng/ml: Día de la ovulación		Hoffmann et al., 2004
2ng/ml: Día del pico de LH	6 días después del pico de LH con semen congelado	Suwa et al., 2009
	30-75 nmol/L 4 a 7 días después del pico de LH	Linde-Forsberg et al., 1999
6nmol/L	5 días después del pico de LH	Tsumagari et al., 2003
2-4ng/ml	5 días después del pico de LH con semen congelado	Hayashi et al. 2013
2ng/ml	>4ng/ml con semen fresco	Macedo et al., 2012
6-9nmol/L	6 días después del pico de LH con semen congelado	Steckler et al., 2013
	2-3 días después de estimado el día de la ovulación con semen congelado	Thomassen et al., 2006
9.8nmol/L		Bergeron et al., 2013
0.59-1.23ng/ml. Media 0.9 ng/ml (SD=0.06ng/ml)	3 a 5 días después de la ovulación.	Hase et al., 2000
4-7 ng/ml: Ovulación	72 horas después de la ovulación	Pretzer et al., 2006
5ng/ml: Ovulación		Moxon et al., 2012
2-4ng/ml: Pico de LH 4-10ng/ml: Ovulación	Inicio de inseminaciones con progesterona >4ng/ml y repetir 2 días después	Hahn et al., 2017
1,38 ± 0,21ng/ml: Pico de		Gloria et al., 2018

LH 4,61 ± 1,8ng/ml: Ovulación		
2,9 ± 0,4ng/ml: Pico de LH 6,1 ± 1,7ng/ml: Ovulación		Groppetti et al., 2015

1.8 Ultrasonografía de ovario:

La detección de la ovulación en la perra por medio de la ultrasonografía de ovarios es una herramienta diagnóstica no invasiva que busca detectar de manera directa la ovulación a través del seguimiento de los folículos y su transformación en cuerpos lúteos (Hollinshead, et al., 2019).

Aunque se han utilizado varios métodos para estudiar el momento en que ocurre la ovulación en perras; como por ejemplo la observación directa de los ovarios por laparotomía, laparoscopia e histología de los ovarios, hay pocos reportes basados en la observación directa de la maduración folicular y la ovulación. En un estudio realizado en 11 perras raza Beagle se llevó a cabo ultrasonografía de los ovarios con un equipo lineal de 7,5 MHz, tres veces al día con el objetivo de encontrar un método para poder predecir la ovulación y encontraron que los folículos tenían un diámetro de 0,3 – 0,5 cm ($0,4 \pm 0,02$ cm) al inicio del proestro y que entre los días 6 a 12 ($9,1 \pm 0,6$ días) después del inicio del sangrado vaginal lograron su mayor tamaño 0,5 – 0,8 cm ($0,58 \pm 0,03$ cm). También se determinó que el pico de LH se presentó $8,2 \pm 0,4$ días después del inicio del sangrado vaginal con un valor de 13,6 – 42,4 ng/ml ($24,8 \pm 3,1$ (SE) ng/ml). De tal manera que se pudo concluir que los folículos alcanzan su mayor tamaño uno a dos días después del pico de LH. En este mismo estudio también lograron detectar la ovulación en el 54,5% (6/11) de los animales al detectar un cambio en la forma y disminución en el tamaño del folículos; sin embargo, este hallazgo se presentó por un lapso de tiempo corto y luego las estructuras observadas en el ovario tenían la misma forma y tamaño que antes de la ovulación. Se pudo concluir que el periodo de tiempo entre el pico de LH y la ovulación en estas 6 hembras fue de 24 a 48 hr ($38,0 \pm 4,4$ hr) (Hase et al., 2000).

Otra forma de evaluar los eventos periovulatorios de una manera subjetiva es observando la ecotextura folicular a través de ultrasonografía. Los folículos preovulatorios se han descrito como estructuras anecoicas con una delgada pared ecoica. Durante la luteinización preovulatoria, la pared folicular aumenta su grosor y en la ovulación el antro

anecoico desaparece. Los cuerpos lúteos formados se ven llenos de fluido, así que son muy similares a los folículos preovulatorios (anecoicos), haciendo difícil detectar la ovulación. Es por esta razón que no se han reportado métodos precisos para determinar la ovulación por medio de los cambios en la ecogenicidad observados por ultrasonido (Hase et al., 2000, Bergeron et al., 2013, Hollinshead, et al., 2019). Otro motivo que ha limitado el uso de la ultrasonografía a nivel clínico es que se requiere una evaluación frecuente (1 a 3 veces por día) del paciente con evaluadores experimentados en la observación de estructuras y cambios ováricos y desafortunadamente hasta la fecha no se ha establecido un patrón específico con respecto a los cambios de ecotextura o morfología de las estructuras ováricas que permitan estimar la ovulación. Sin embargo, si se ha reportado el uso del ultrasonido en conjunto con otras pruebas como la medición de progesterona sérica (Hase et al., 2000, Hollinshead, et al., 2019).

El ultrasonido con Doppler color puede medir el flujo de sangre en el ovario de humanos, yeguas y vacas. En caninos se ha utilizado para detectar varianzas en el flujo sanguíneo del ovario, que ocurre por la congestión y aumento de diámetro de los vasos (Bergeron et al., 2013). En este estudio, se encontró que hubo un incremento en el flujo sanguíneo del ovario desde el día del pico preovulatorio de LH hasta 1 día después de este pico. En este estudio también se observó que no hubo cambios significativos en la ecotextura de los folículos y los cuerpos lúteos. Por lo tanto, la ultrasonografía con Doppler color realizada una vez al día fue más precisa para identificar el pico preovulatorio de LH que el ultrasonido en modo B.

En el estudio realizado por Nöthling et al., (2006) se evaluaron por medio de resonancia magnética los ovarios de 15 hembras Pastor Alemán después de haber realizado ovariectomía en diferentes etapas del ciclo estral (Fase folicular, periodo periovulatorio, diestro temprano y diestro tardío) con el objetivo de contar el número de folículos y cuerpos lúteos y posteriormente los ovarios fueron disectados para verificar el número de folículos, cuerpos lúteos y quistes. Las imágenes obtenidas fueron evaluadas por 3 técnicos experimentados pero ninguno logró diferenciar morfológicamente los folículos de los cuerpos lúteos. En la segunda fase del estudio se realizó la resonancia magnética en 3 hembras anestesiadas en la fase periovulatoria con el objetivo de obtener imágenes de los ovarios y poder contar los folículos; sin embargo, no fue posible observar ningún tipo de estructura a través de este medio diagnóstico por lo cual se

concluyó que no es una prueba confiable para la evaluación de las estructuras ováricas. Al realizar la disección de 12 ovarios en fase folicular se obtuvo un promedio de $6,8 \pm 0,7$ folículos y $0,3 \pm 0,2$ quistes por ovario, de los 10 ovarios en fase luteal temprana se obtuvo $4,6 \pm 0,6$ cuerpos lúteos y $1,0 \pm 0,6$ quistes por ovario y de los 8 ovarios en fase luteal tardía se obtuvo $4,1 \pm 0,6$ cuerpos lúteos y $0,5 \pm 0,3$ quistes por ovario.

CONCLUSIONES:

En la mayoría de los estudios determinan los niveles de progesterona sérica para estimar el pico de LH. Sin embargo, es importante evaluar los otros métodos que existen para monitorizar los eventos periovulatorios y así detectar con mejor precisión este evento. No se han realizado estudios determinando la sensibilidad ni la especificidad de las pruebas clínicas y paraclínicas in situ. Por esta razón, sería importante determinar la sensibilidad y especificidad de los métodos y si al utilizar varios métodos de evaluación para predecir el momento óptimo para la inseminación se mejora la precisión y de esta manera realizar una sola inseminación como es requerido con el semen congelado.

2. Materiales y métodos

2.1 Material experimental

Se utilizaron 22 hembras caninas entre 1 y 6 años (promedio $2,5 \pm 1,7$ años), de diferentes razas (16 Bulldog inglés, 3 Bulldog francés, 2 Golden retriever y 1 Criollo) y pesos entre 10 y 30Kg (promedio $20,5 \pm 5,2$ Kg), las cuales ingresaron a la Clínica Veterinaria “Centro de Reproducción Canina- CRC” (Tabio, Cundinamarca) para evaluación reproductiva. A todos los animales se les realizó una evaluación clínica completa y solamente los pacientes clínicamente sanos al momento de esta evaluación fueron incluidos en el estudio. Todos los individuos tenían los planes de vacunación y desparasitación vigentes y el consentimiento de los propietarios para ingresar al estudio. El tamaño de la muestra fue seleccionado por conveniencia, considerando la aceptación a participar en el estudio dentro de un periodo de seis meses.

El seguimiento reproductivo se empezó en el momento en que el propietario observó el inicio del sangrado vaginal. Se evaluaron los siguientes parámetros siempre en el mismo orden: conducta de receptividad, turgencia vulvar, tamaño de la vulva, citología vaginal, color del hisopado, secreción vaginal, color y edematización de la mucosa vaginal por endoscopia vaginal, ecografía abdominal de los ovarios y medición sérica de progesterona (ELISA y CLIA- ng/ml). Todas las pruebas diagnósticas fueron realizadas por el mismo clínico cada 24 horas desde el proestro hasta cuando se detectó el diestro. La fecha de inicio del diestro se definió como un cambio abrupto en la morfología de las células epiteliales con respecto al día anterior donde se observa un descenso en el número de células superficiales y un incremento de las células intermedias y/o parabasales (Cramer et al., 2017).

2.2 Evaluación de los cambios periovulatorios para estimar el pico de LH

La fecha de inicio del diestro citológico fue usada de manera retrospectiva para estimar el pico de LH (8 días antes), la ovulación (6 días antes) y la maduración de los oocitos (4 días antes) y fue comparada con los otros métodos para determinar el nivel de concordancia para estimar el pico de LH. El inicio de diestro también fue utilizado para programar la fecha de la ecografía para el diagnóstico de la gestación en las perras que fueron inseminadas y la fecha de la cesárea electiva en los casos en los cuales las pacientes la requirieran (Gloria et al., 2018).

2.3 Conducta de receptividad

Se observó el bandereo de la cola y la elevación de la vulva al estimular la zona perivulvar cada 24 horas desde el inicio del celo hasta el día de inicio del diestro y se clasificó de acuerdo con la tabla 2.1 (Moxon et al., 2012).

Se consideró que el pico de LH se presentó cuando se observó por primera vez que la paciente levantó y desvió la cola más de 45° y/o elevó la vulva al realizar un estímulo alrededor de la misma (Grado 3).

Tabla 2-1: Clasificación de la conducta de receptividad (Modificado de Moxon, et al., 2012)

GRADO	CONDUCTA RECEPTIVIDAD
1	No hay desviación de la cola ni elevación de la vulva
2	Leve desviación de la cola <45° y/o leve respuesta a estímulos perivulvares
3	Desviación de la cola >45° y/o eleva la vulva al estimular la zona perivulvar

2.4 Turgencia vulvar

Se evaluó el grado de edematización de la mucosa interna de la vulva y se clasificó de acuerdo a la tabla 2-2 (Moxon et al., 2012). Se consideró que el pico de LH se presentó cuando se detectó por primera vez una disminución en la turgencia vulvar, es decir que la edematización empezó a disminuir y se observó la formación de pliegues o crenulaciones de la mucosa vaginal (Grado 2).

Tabla 2-2: Grado de edematización de la mucosa vaginal (Moxon et al., 2012)

GRADO	IMAGE	DESCRIPCION
1		Edematosa
2		Reducción de la edematización sin angulación (crenulaciones)
3		Reducción de la edematización con angulación (crenulaciones)

4		Sin edematización (lisa)
---	---	--------------------------

2.5 Tamaño de la vulva

Se utilizó como instrumento de medición un calibrador para medir el tamaño de la vulva en tres zonas diferentes de la siguiente forma (Figura 2-1): Largo A: Medida en milímetros desde la comisura ventral de la vulva hasta el sitio donde se inicia la edematización de la región peri-vulvar en la región dorsal. Largo B: Medida en milímetros desde la comisura ventral hasta la comisura dorsal de la vulva. Ancho: Medida en milímetros de la parte horizontal más ancha de la vulva (Moxon et al., 2012). Se consideró el pico de LH cuando se presentó por primera vez una disminución del largo A, B o ancho de la vulva (reducción del edema vulvar).

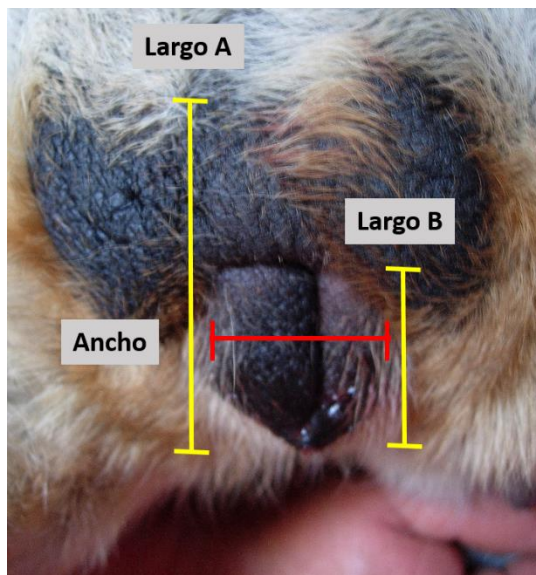


Figura 2-1: Medidas utilizadas para evaluar el tamaño de la vulva.

2.6 Citología vaginal

Se tomó la muestra de células exfoliadas del epitelio de la porción anterior de la vagina usando un hisopo de algodón. Para el procedimiento se separaron los labios de la vulva y se introdujo el hisopo desde la comisura dorsal de la vulva evitando la fosa del clítoris, hasta la región anterior de la vagina, donde se giró varias veces el hisopo para asegurar su contacto con el epitelio vaginal (Groppetti et al., 2012). Inmediatamente después se realizó un extendido sobre una lámina portaobjetos y se utilizó una tinción con Diff-Quick® para posteriormente proceder a evaluar la citología (Fay et al., 2003, Hahn et al., 2017).

Las citologías fueron observadas por el mismo clínico en un microscopio con una magnificación de 400X, realizando un conteo de 100 células para identificar las diferentes poblaciones celulares y determinar el porcentaje de células parabasales, intermedias y superficiales de acuerdo a la tabla 2-3 (Groppetti et al., 2012, Macedo et al., 2012, Moxon et al., 2012). Se consideró que el pico de LH se presentó cuando el porcentaje de células superficiales llegó al 80%.

Tabla 2-3: Clasificación de las células en la citología vaginal (Moxon et al., 2010)

Tipo celular	Características
Superficiales	Forma irregular, bordes angulados, con núcleo picnótico o sin núcleo
Intermedias	Forma elipsoidal, bordes uniformes, con núcleo definido
Parabasales	Forma redonda, bordes regulares, con núcleo bien definido

2.7 Color de la secreción vaginal o color del hisopo

Se observó el color del hisopado después de realizar la citología vaginal y se clasificó como rojo, rojo pálido, blanco o café. Se consideró que el pico de LH se presentó cuando se presentó por primera vez una disminución del color rojo y se observó de color rojo pálido.

Rojo	Rojo pálido	Blanco	Café
------	-------------	--------	------



Figura 2-2: Color de la secreción vaginal

2.8 Secreción vaginal

El inicio del proestro se definió como el primer día en que se observó secreción vaginal serosanguinolenta (Groppetti et al., 2010) y luego se evaluó la cantidad de secreción vaginal que había en la parte craneal de la vagina (Tabla 2-4) cuando se introducía el endoscopio cada 24 horas hasta el día de inicio del diestro (Macedo et al., 2012).

Tabla 2-4: Clasificación de la cantidad de secreción vaginal

VALOR	PRESENCIA DE SECRECIÓN VAGINAL SEROSANGUINOLENTA
1	No hay fluido y la pared vaginal se observa seca
2	Leve: Solo se observa adherida a la mucosa vaginal
3	Moderada: Presencia de secreción, pero no es posible drenar el contenido
4	Severa: La secreción impide la observación a través del endoscopio. Es necesario drenar el contenido y se obtiene más de 1ml.

En los casos donde la secreción vaginal fue abundante se realizó drenaje del mismo a través de un vaginoscopio (Fay et al., 2003, Macedo et al., 2012) y posteriormente se realizó nuevamente la endoscopía vaginal (Figura 2-3). Se consideró que el pico de LH se presentó cuando se observó por primera vez una clasificación de 2 en la evaluación.



Figura 2-3: Drenaje de la secreción vaginal por medio de un vaginoscopio.

2.9 Color de la mucosa vaginal observado por endoscopio

Se realizó la evaluación de la mucosa vaginal con un endoscopio rígido (Karl Storz®) cada 24 horas desde el inicio del proestro hasta el inicio del diestro. El endoscopio se introdujo en la vagina siguiendo la anatomía normal del tracto reproductivo, evitando la fosa del clítoris y el orificio uretral, hasta llegar a la región anterior de la vagina (Lulich, 2006, Moxon et al., 2012).

El color de la mucosa vaginal se clasificó como rojo, rosado o rosado pálido (Moxon, et al., 2012). Se consideró el pico de LH cuando se observó por primera vez el cambio de color de la mucosa vaginal de rojo a rosado (Figura 2-4).

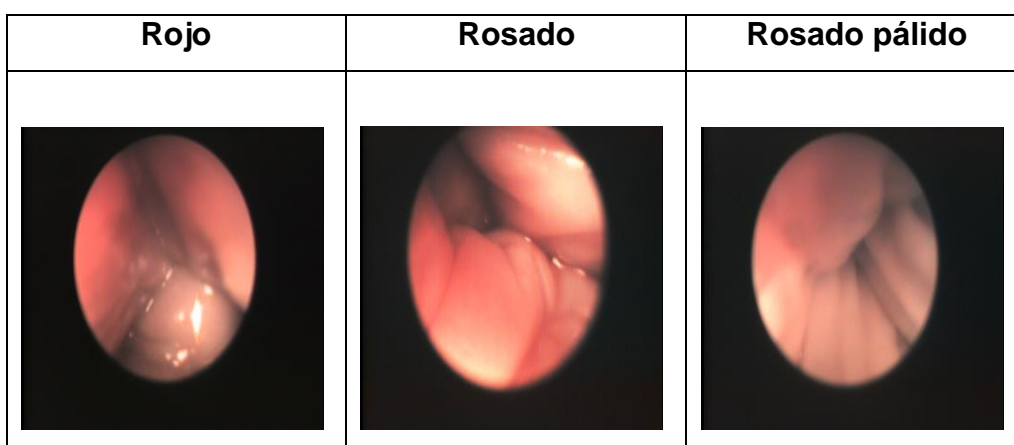


Figura 2-4: Clasificación del color de la mucosa vaginal.

2.10 Grado de edematización de la mucosa vaginal observado por endoscopio

Para evaluar la mucosa vaginal con el endoscopio se utilizó la versión modificada del score para la mucosa vaginal de Jeffcoate y Lindsay (1989) y Nöthling et al., (2006) (Figura 2-5):

- 1) Para la mucosa edematosa y con pliegues redondeados.
- 2) Para la mucosa con arrugamiento leve, pliegues sin angulación pero con signos de que el edema está disminuyendo.
- 3) Para la mucosa con arrugamiento severo, pliegues con angulación debido a que el edema ha disminuido lo suficiente como para observar la mucosa arrugada.
- 4) Para la mucosa lisa.

Se estimó el pico de LH cuando se presentó por primera vez una calificación de 2. El procedimiento se realizó de acuerdo al método descrito por Lulich (2006).

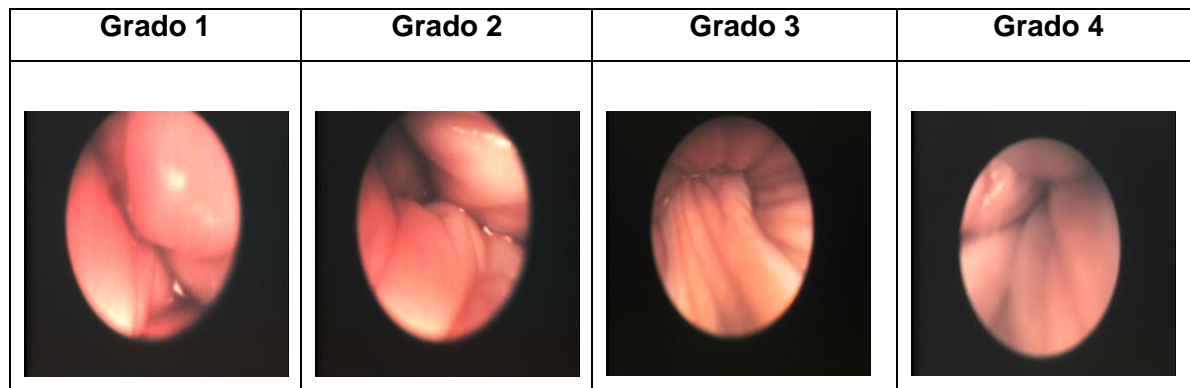


Figura 2-5: Clasificación del grado de edematización de la mucosa vaginal.

2.11 Ecografía de ovario

Para la evaluación ultrasonográfica se utilizó un escáner de ultrasonido veterinario modelo 180V equipado con un transductor convex de 20R/5MHz en modo B. La ecografía fue realizada en el flanco derecho e izquierdo y los ovarios fueron ubicados detrás del polo caudal del riñón ipsilateral (Polisca et al., 2013). El transductor se ubicó varias veces sobre los ovarios hasta obtener una imagen clara de las estructuras

compatibles con folículos y/o cuerpos lúteos (Figura 2-6). Los folículos se identificaron como estructuras esféricas anecoicas; la aparente ovulación se identificó como la desaparición del antro anecoico y los cuerpos lúteos fueron identificados como estructuras anecoicas y pared de mayor grosor que en algunos casos podían protruir de la superficie del ovario (Hase et al., 2003, Eker et al., 2006). Todas las imágenes fueron almacenadas como archivos JPEG. La observación ultrasonográfica fue realizada cada 24 horas desde el inicio del sangrado vaginal hasta el día de inicio del diestro citológico.



Figura 2-6: Ubicación del ovario detrás del polo caudal del riñón ipsilateral.

Se registró el número de folículos o cuerpos lúteos observados por ovario por día, el tamaño de los folículos fue estimado midiendo el diámetro más largo (Bergeron et al., 2013). Se consideró el día de la ovulación cuando se detectó una disminución significativa en el tamaño de al menos una de las estructuras y cuando se presentaron cambios en la ecogenicidad y se estableció que el pico de LH se presentó 48 hr antes del día de la ovulación (Hase et al., 2003).

2.12 Medición de progesterona por ELISA (ng/ml) y CLIA (ng/ml):

Se tomó una muestra de sangre por venopunción de la vena cefálica anterior cada 24 horas desde el inicio del celo hasta el primer día de diestro. Las muestras fueron transferidas a tubos sin anticoagulante, centrifugadas a 1500rpm por 15 minutos y almacenadas a -20°C (Polisca et al., 2013, Tahir et al., 2013). La medición de progesterona en sangre se realizó con dos técnicas, por ELISA (DS-EIA-STERIOD-PROGESTERONE DSI Srl- Milán, Italy), con un rango de detección de 0 a 100nmol/L (0 a 31,5 ng/ml), una sensibilidad analítica de 0,5nmol/L (0,1 ng/ml) y un coeficiente de

variación intra-ensayo e inter-ensayo de 4,5% y 5,3%, respectivamente; y por CLIA (Kit Accualite CLIA microwells, Monobind Inc. Lake Forest, USA), con un rango de detección de 0 a 60ng/ml, una sensibilidad analítica de 0,208ng/ml, coeficiente de variación intra-ensayo e interensayo de 5,9% y 2,2%, respectivamente. Las muestras fueron procesadas en un laboratorio de referencia (Cidagro).

De cada paciente se utilizaron al menos 3 muestras de sangre para medir la concentración de progesterona el día 0 (Pico de LH), día 2 (Ovulación) y día 4 (Maduración) del ciclo celo. El día 0 (pico de LH) se estableció de forma retrospectiva teniendo como punto de referencia la fecha de inicio del diestro citológico, de tal forma que se midió el nivel de progesterona -8, -6 y -4 días antes del diestro (Gloria et al., 2018). Se estimó que se presentó el pico de LH cuando los niveles de progesterona estuvieron entre 2-5ng/dl (Tsumagari et al., 2003).

2.13 Análisis estadístico

Para determinar la validez de las pruebas evaluadas se determinó la sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo de cada una de ellas: conducta de receptividad, turgencia vulvar, tamaño de la vulva, citología vaginal, color del hisopado, secreción vaginal, color y edematización de la mucosa vaginal por endoscopía vaginal, ecografía abdominal de los ovarios y medición sérica de progesterona (ELISA y CLIA). La citología vaginal de diestro fue usada para estimar el pico de LH de manera retrospectiva (8 días antes) y fue comparada con los otros métodos para estimar el nivel de concordancia para determinar el pico de LH. El día del pico de LH se consideró como el día 0 del ciclo. Para el análisis estadístico se calificó cada prueba como 1 cuando coincidió su resultado para estimar el pico de LH (± 1 día) y como 0 cuando el resultado de cada prueba no coincidió. La progesterona medida por quimioluminiscencia fue utilizada como “prueba de oro”, debido a que fue la prueba que identificó en mayor número de veces el pico de LH.

La sensibilidad se definió como la habilidad de cada una de las pruebas para identificar el momento en el cual se presenta el pico de LH; la especificidad como la habilidad de cada una de las pruebas para identificar el momento en el cual no hay pico de LH (es decir,

que los niveles séricos de LH son basales); el valor predictivo positivo como la probabilidad que tiene cada una de las pruebas de detectar el pico de LH en el momento en el cual efectivamente se presenta y el valor predictivo negativo como la probabilidad de que cada una de las pruebas sea capaz de detectar la ausencia del pico de LH cuando en realidad los niveles séricos de la hormona son basales (Gordis, L. 2000).

$$\text{SEN} = \text{VP} / \text{VP} + \text{FN}$$

$$\text{ESP} = \text{VN} / \text{VN} + \text{FP}$$

$$\text{VPP} = \text{VP} / \text{VP} + \text{FP}$$

$$\text{VPN} = \text{VN} / \text{VN} + \text{FN}$$

Donde SEN = Sensibilidad, ESP = Especificidad, VPP = Valor predictivo positivo, VPN = Valor predictivo negativo, VP = Verdadero positivo, VN = Verdadero negativo, FN = Falso negativo y FP = Falso positivo.

Como no siempre es posible utilizar pruebas de alta sensibilidad y especificidad, se debe recurrir con frecuencia al uso simultáneo de dos o más pruebas diagnósticas *in situ* (usadas de manera simultánea y aplicadas a los mismos animales); su interpretación en conjunto permite incrementar tanto la sensibilidad como el valor predictivo positivo. En esta investigación, la sensibilidad de las pruebas en simultánea se definió como la habilidad de dos pruebas usadas al mismo tiempo para identificar el momento en el cual se presenta el pico de LH y la especificidad como la habilidad de dos pruebas usadas al mismo tiempo para identificar el momento en el cual no hay pico de LH. De esta manera, se evaluó el efecto aditivo del uso de dos de las mencionadas pruebas y su efecto sobre la sensibilidad y especificidad de las mismas para evaluar qué pruebas son las mejores para utilizar al mismo tiempo y mejorar la estimación del pico de LH (Gordis, L. 2000).

Finalmente, se realizó una prueba Kappa ($p < 0.05$) para establecer el nivel de acuerdo entre la prueba más sensible y las demás pruebas:

$$K = \text{Po} - \text{Pe} / 1 - \text{Pe}$$

Donde Po = proporción de observaciones para las cuales ambas pruebas concordaron y Pe = acuerdo esperado por pura casualidad.

Un acuerdo perfecto es obtenido cuando ambas pruebas estiman el pico de LH en la misma fecha. El criterio de interpretación sugiere que un valor de kappa < 0.40 representa un pobre nivel de acuerdo, un kappa entre 0.40 a 0.75 representa un grado mediano de acuerdo y un kappa ≥ 0.75 representa un grado de acuerdo entre bueno y excelente (Gordis, L. 2000).

Por medio de un modelo general de medidas repetidas en el tiempo se compararon los dos métodos (CLIA y ELISA) utilizados para medir los niveles de progesterona y se determinó si hubo diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de progesterona utilizando los dos métodos durante el día 0, día 2 y día 4 y también se determinó si hubo diferencias significativas entre los días de la comparación. Los datos fueron normalizados con base en el momento de la detección del pico de LH y solo se incluyeron aquellos animales en los que por el valor de progesterona se consideró que estaban en pico de LH. El nivel de confianza fue del 95% y una significancia del 5% ($\alpha=0.05$) (Martínez et al., 2011).

Para la evaluación de los resultados obtenidos por medio de la ultrasonografía también se utilizó la prueba T de Student para determinar si había diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de las variables tamaño de los ovarios, número de folículos y tamaño de los folículos durante los días -1, -2, 0, 1, 2 y 3 del ciclo. El nivel de confianza fue del 95% y una significancia del 5% ($\alpha=0.05$) (Martínez et al., 2011).

3.Resultados

Un total de 22 hembras fueron evaluadas desde el inicio del proestro hasta el inicio del diestro cada 24 horas. Aunque se incluyeron varias razas en este estudio, se presentó un predominio de la raza Bulldog inglés con un 73% del total de la población; 14% bulldog francés, 9% golden retriever y 4% la raza criolla. Se excluyeron 4 hembras del estudio

debido a que ya estaban en estro o diestro cuando fueron llevadas por los propietarios a la primera evaluación reproductiva. En la tabla 2-5 se describe la información de cada una de las pacientes.

Seis de los 22 casos tuvieron peculiaridades que no afectaron el seguimiento y por eso se incluyeron en el análisis. En los casos 4 y 11 se presentó secreción vaginal abundante y fue necesario realizar el drenaje con un vaginoscopio previo a la evaluación con el endoscopio y la inseminación artificial. La fertilidad no se vio afectada pues estas dos hembras se inseminaron y se confirmó la gestación. Los casos 6 y 12 fueron diagnosticados con piómetra por medio de ecografía abdominal y se realizó ovariectomía. En los casos 7 y 9 se presentó prolapso vaginal tipo I, ambas hembras fueron inseminadas y una de ellas tuvo una gestación normal.

Tabla 2-5: Información de los animales

No. caso	Edad (años)	Raza	Peso (Kg)	Inseminación artificial	Confirmación de preñez	Tamaño de la camada	Días al parto desde el diestro	Observación
1	5	Golden	30	No	No	0	0	
2	1	Bulldog inglés	21	Si	Si	8	56	
3	1	Bulldog inglés	20	Si	Si	8	57	
4	1	Bulldog inglés	18	Si	Si	5	57	Secreción vaginal abundante
5	1	Bulldog inglés	19	Si	Si	8	57	
6	5	Bulldog inglés	24	Si	No	0	0	Piómetra
7	2	Bulldog francés	10	Si	Si	3	56	Prolapso vaginal
8	4	Bulldog inglés	20	Si	No	0	0	
9	1	Bulldog inglés	18	Si	No	0	0	Prolapso vaginal
10	3	Bulldog inglés	22	Si	Si	6	57	
11	2	Bulldog inglés	26	Si	Si	2	57	Secreción vaginal abundante
12	6	Bulldog inglés	22	Si	No	0	0	Piómetra
13	2	Bulldog inglés	22	Si	Si	6	57	
14	2	Bulldog inglés	20	Si	Si	7	57	
15	2	Bulldog inglés	20	Si	Si	6	57	
16	2	Bulldog inglés	23	Si	No	0	0	
17	6	Golden	28	No	No	0	0	
18	2	Bulldog francés	11	Si	Si	4	56	
19	3	Bulldog inglés	26	Si	Si	9	56	
20	1	Criollo	18	No	No	0	0	
21	1	Bulldog francés	10	No	No	0	0	
22	2	Bulldog inglés	23	Si	Si	4	56	
				82% (18/22)	72% (13/18)	5,8±2,1	56,6±0,5	

La cantidad de días de seguimiento estuvo entre 8 y 17 días (en promedio $12,82 \pm 2,72$ días), los cuales fueron contados desde el momento en que el propietario reporta el inicio del sangrado hasta el día en que se determinó el inicio del diestro por citología vaginal. El proestro tuvo una duración de $4,6 \pm 2,4$ días y el estro tuvo una duración de 8 días ya que se estimó el pico de LH de forma retrospectiva desde el inicio del diestro citológico. En la figura 2-7 se resume la duración de cada uno de los seguimientos.

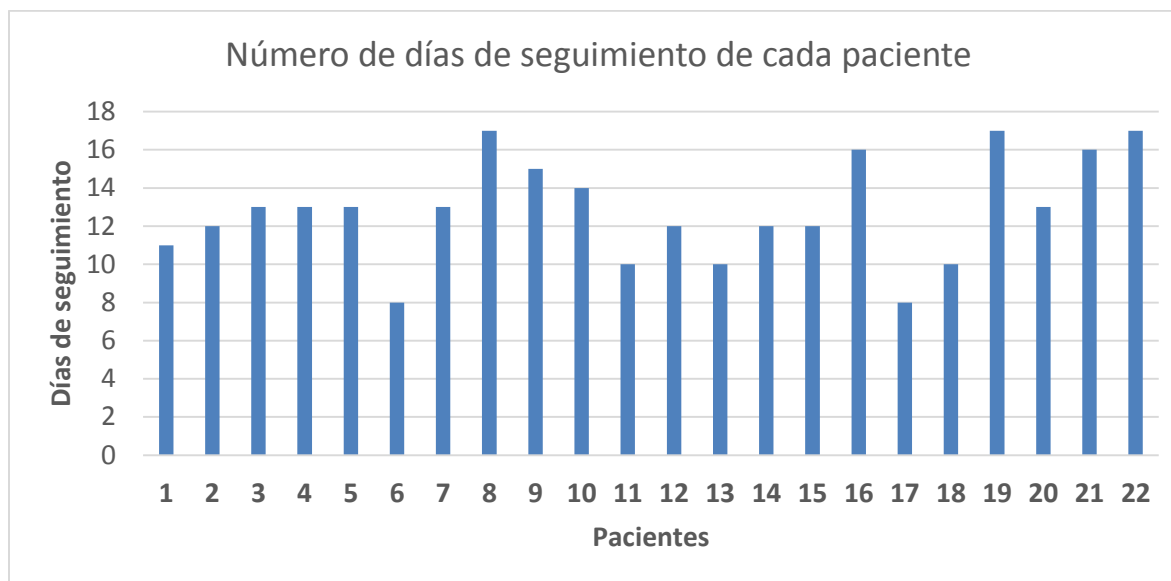


Figura 2-7: Duración en días del seguimiento de cada paciente

De las 22 pacientes que fueron evaluadas se realizó inseminación artificial con semen fresco de diferentes machos de fertilidad comprobada en el 82% (18/22) de ellas y se confirmó la gestación en el 72% (13/18) de las mismas. El promedio del tamaño de las camadas fue de $5,85 \pm 2,15$.

Se confirmó la gestación por medio de ecografía abdominal 25 días después de la fecha de inicio de diestro; todas las hembras inseminadas eran de la raza Bulldog por la cual se programó la cesárea electiva el día 57 después del inicio del diestro y se registró el tamaño de la camada. El inicio del trabajo de parto se presentó un día antes de la fecha programada de la cesárea en el 38% (5/13) de las pacientes, las cuales fueron remitidas para cesárea ese mismo día y se obtuvieron cachorros vivos con características propias de los cachorros a término; en el otro 62% (8/13) de las pacientes se realizó la cesárea en la fecha programada, obteniendo cachorros vivos y a término. Es decir que el 100%

de las hembras tuvieron crías viables después de la cesárea, con una duración promedio de la gestación de $56,62 \pm 0,51$ días contados a partir del primer día de diestro.

En la figura 2-8 se observa el porcentaje de acuerdo de cada una de las pruebas con respecto al pico de LH, teniendo como punto de referencia la fecha del inicio del diestro por citología vaginal y calculando que el pico de LH ocurrió 8 días antes. El día estimado del pico de LH se estableció como el día 0 del ciclo (Gier et al., 2006)

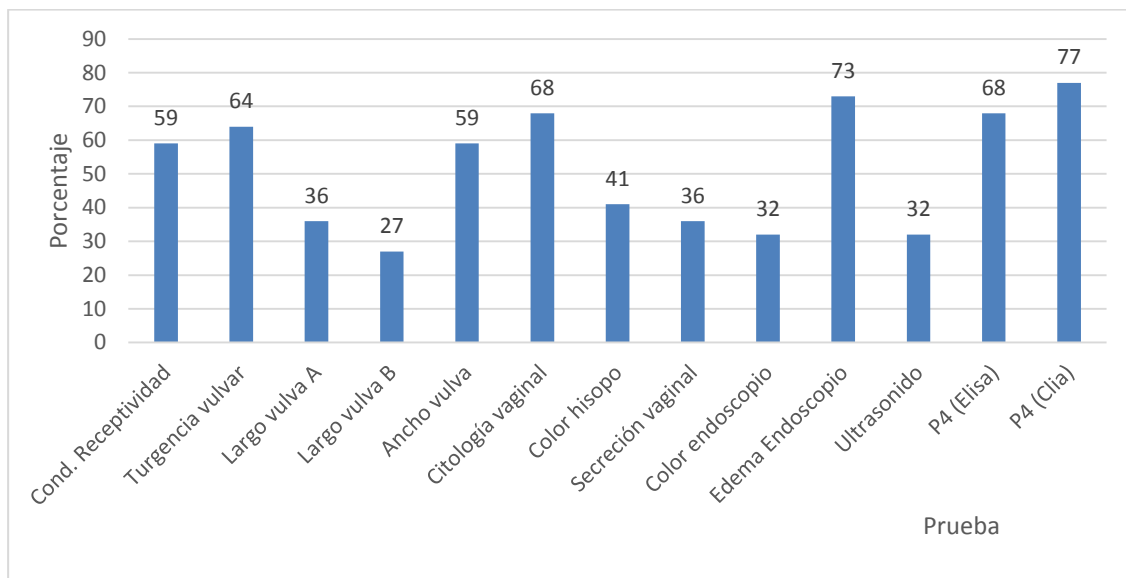


Figura 2-8: Porcentaje de acuerdo de cada prueba utilizada para estimar el pico de LH.

Teniendo en cuenta que la prueba que obtuvo un mayor porcentaje de aciertos para estimar el pico de LH fue la medición de progesterona sérica por quimioluminiscencia (CLIA) (77%), se estableció como la Prueba de Oro para determinar la sensibilidad y especificidad de las otras pruebas.

Al utilizar un modelo general de medidas repetidas en el tiempo para comparar los dos métodos de medición fue necesario normalizar los datos con base en el momento de la detección del pico de LH. De tal manera que sólo se incluyeron aquellos animales en los que se consideró que estaban en pico de LH de acuerdo a su valor de progesterona en el día 0. Los resultados se muestran en la tabla 2-6.

Tabla 2-6: Promedio de progesterona sérica durante el día 0, 2 y 4 y comparación de los 2 métodos de medición (ELISA y CLIA).

Evento	Método	Promedio \pm DE Progesterona Sérica (ng/ml)	Valor P
Día 0 Pico LH	CLIA	2.7 \pm 0.85	0.685
	ELISA	2.8 \pm 1.06	
Día 2 Ovulación	CLIA	3.7 \pm 3.05	0.157
	ELISA	5.8 \pm 4.95	
Día 4 Maduración	CLIA	13.2 \pm 13.40	0.719
	ELISA	11.8 \pm 8.52	

Las comparaciones de los promedios de P4 utilizando los dos métodos en los tres momentos muestran que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los métodos de medición de progesterona ni entre los días de la comparación.

Como se esperaba, en este estudio la concentración de progesterona medida por CLIA aumentó desde el día 0 (Pico de LH = 2,7 \pm 0,85ng/ml) hasta el día 2 (Ovulación = 3,7 \pm 3,05 ng/ml) y desde el día 2 hasta el día 4 (Maduración = 13,2 \pm 13,4 ng/ml); lo mismo ocurrió con la prueba de ELISA donde se obtuvieron resultados de 2,8 \pm 1,06 ng/ml para el día 0, 5,8 \pm 4,95 ng/ml para el día 2 y 11,8 \pm 8,52 ng/ml para el día 4. Este aumento progresivo en los niveles de progesterona es indicativo de que se presentó la ovulación y posterior formación de cuerpos lúteos.

Los resultados de las ecografías realizadas para monitorizar los cambios a nivel ovárico con respecto al tamaño de los ovarios, número de folículos y diámetro folicular se

resumen en la tabla 2-6. También se realizó la prueba T de Student para establecer si habían diferencias estadísticamente significativas entre los promedios del tamaño de los ovarios, número de folículos y diámetro folicular entre los días -2, -1, 0, 1, 2 y 3; pero para todas las variables se obtuvo un valor $P > 0,05$; de tal manera que no se logró establecer ningún parámetro que pudiera estimar el pico de LH o la ovulación de forma precisa.

Tabla 2-6: Hallazgos ultrasonográficos de los ovarios, número de folículos y diámetro folicular

Días	Tamaño ovario (mm)		Número folículos	Tamaño folículos (mm)
	Largo	Ancho		
Día -2	17,35 ± 1,98	13,63 ± 1,83	3,25 ± 1,89	3,5 ± 2,27
Día -1	17,15 ± 2,04	13,93 ± 2,14	3,20 ± 1,88	3,99 ± 2,43
Día 0	17,82 ± 1,32	14,30 ± 1,89	3,41 ± 1,53	3,94 ± 2,35
Día 1	17,18 ± 1,82	14,02 ± 1,28	3,32 ± 1,52	3,81 ± 2,17
Día 2	17,07 ± 2,00	14,07 ± 1,83	3,05 ± 1,46	3,85 ± 2,21
Día 3	17,32 ± 1,97	13,98 ± 2,18	2,68 ± 1,52	3,40 ± 2,42

Adicionalmente también se registró si se presentaba algún cambio en la forma de los folículos, desaparición de las estructuras observadas o cambios en la ecogenicidad durante el día que se estimó que se presentó la ovulación y el día anterior y posterior a la ovulación, estos resultados se describen en la tabla 2-7. Donde se observó que en el día anterior a la ovulación se presentó una mayor desaparición de estructuras (27,2%) comparado con el día de la ovulación (18,1%) y el día posterior a la ovulación (0%). La mayor cantidad de cambios en la forma de las estructuras compatibles con folículos se presentó el día de la ovulación (9%) comparado con el día anterior de la ovulación (4,5%) y el día posterior de la ovulación (0%). Con respecto a los cambios en la ecogenicidad de las estructuras no se observó ningún tipo de cambio durante el periodo periovulatorio.

Tabla 2-7: Número de animales en los cuales se presentó algún cambio en la forma o desaparición de estructuras compatibles con folículos durante el periodo periovulatorio.

ESTRUCTURAS COMPATIBLES CON FOLICULOS	DIA 1	DIA 2 (OVULACION)	DIA 3
Desaparición de estructuras	6 (27,2%)	4 (18,1%)	0 (0%)
Cambio de forma de las estructuras	1 (4,5%)	2 (9,0%)	0 (0%)
Cambio de la ecogenicidad	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Las pruebas que presentaron una mayor sensibilidad fueron: medición de progesterona por ELISA donde se diagnosticaron adecuadamente 15 de los 22 animales, con una sensibilidad del 82,4% y una especificidad de 80%; la evaluación de la mucosa vaginal por endoscopio permitió diagnosticar adecuadamente el pico de LH en 16 de los 22 animales, con una sensibilidad del 76,5% y una especificidad del 40%; con la citología vaginal se diagnosticaron correctamente 15 de los 22 animales, con una sensibilidad de 70,6% y especificidad del 40% y la turgencia vulvar en la que se diagnosticaron 14 de los 22 animales, con una sensibilidad del 70,6% y especificidad del 60%: adicionalmente; las pruebas que tuvieron los valores predictivos positivos más altos fueron la medición de progesterona por ELISA (93,3%), turgencia vulvar (85,7%), tamaño de la vulva – largo B (83,3%), evaluación de la mucosa vaginal por endoscopio (81,3%) y citología vaginal (80,0%), como se puede apreciar en la tabla 2-8.

Tabla 2-8: Sensibilidad (SEN), especificidad (ESP) y valores predictivos positivos y negativos (VPP y VPN) de las diferentes pruebas diagnósticas utilizadas para estimar el pico de LH.

PRUEBAS	n	N	SEN (%)	ESP (%)	VPP (%)	VPN (%)	Kappa
Progesterona (ELISA)	15	22	82,4	80,0	93,3	57,1	0,55
Edema mucosa por endoscopio	16	22	76,5	40,0	81,3	33,3	0,15
Turgencia Vulvar	14	22	70,6	60,0	85,7	37,5	0,25
Citología vaginal	15	22	70,6	40,0	80,0	28,6	0,09
Tamaño vulva: Ancho	13	22	58,8	40,0	76,9	22,2	0,09
Conducta de aceptación	13	22	52,9	20,0	69,2	11,1	0,21
Secreción Vaginal	8	22	35,3	60,0	75,0	21,4	0,03
Tamaño vulva: Largo A	8	22	35,3	60,0	75,0	21,4	0,02
Tamaño vulva: Largo B	6	22	29,4	80,0	83,3	25,0	0,05
Color del hisopo	9	22	29,4	20,0	55,6	7,7	0,32
Ultrasonografía de los ovarios	7	22	23,5	40,0	57,1	11,8	0,25
Color mucosa por endoscopio	7	22	23,5	40,0	57,1	13,3	0,21

Utilizando la medición de progesterona por CLIA como prueba de oro, los resultados de progesterona por ELISA, estimaron correctamente el pico de LH en 14 de los 22 casos (verdaderos positivos), mientras que 3 casos fueron incorrectamente diagnosticados (falsos negativos). Por otra parte, 4 casos fueron adecuadamente definidos como verdaderos negativos, mientras que 1 individuo fue mal diagnosticado al estimar el pico de LH en el momento inapropiado (falso positivo).

Las pruebas que presentaron la sensibilidad más baja fueron la ultrasonografía de los ovarios (23,5%) y el cambio de color de la mucosa por el endoscopio (23,5%); similarmente también tuvieron un VPP bajo (57,1% para ambas pruebas); lo cual indica que estas pruebas no son lo suficientemente confiables para estimar el pico de LH.

Utilización de pruebas en paralelo para estimar el pico de LH:

Al analizar los resultados de dos pruebas en paralelo para la estimación del pico de LH, se observó un incremento en la sensibilidad y una disminución en la especificidad frente a la realización individual de cada una de estas pruebas por separado. En la tabla 2-9 se muestran los resultados de las pruebas que tuvieron los más altos valores de sensibilidad al realizar las pruebas en paralelo.

Tabla 2-9: Cambios en la sensibilidad y especificidad de algunas de las pruebas realizadas para la estimación del pico de LH al interpretar los resultados de las pruebas en paralelo.

PRUEBAS	SEN(%)	ESP(%)
Edema de la mucosa por endoscopio + Progesterona (ELISA)	96	32
Citología vaginal + Progesterona (ELISA)	95	32
Turgencia vulvar + Progesterona (ELISA)	94	48
Ancho de la vulva + Progesterona (ELISA)	93	32
Turgencia vulvar + Edema de la mucosa por endoscopio	93	24
Citología vaginal + Edema de la mucosa por endoscopio	93	16
Turgencia vulvar + Citología vaginal	92	24
Conducta de aceptación + Progesterona (ELISA)	92	16
Edema de la mucosa por endoscopio + Ancho de la vulva	90	16

Utilizar la medición de progesterona y otra prueba (*in situ*) mejoró la sensibilidad para detectar el pico de LH. En el caso de hacer el diagnóstico por medio del edema de la mucosa por endoscopia y la progesterona (ELISA) se obtuvo un 96% de sensibilidad, frente al 76,5% del cambio de la mucosa vaginal por endoscopia o el 82,4% de la progesterona (ELISA) evaluados de forma individual. Muy similar fue la combinación de la citología vaginal con la progesterona (ELISA) donde la sensibilidad aumentó a 95%, mientras que de manera individual tenían 70,6% y 82,4% de sensibilidad

respectivamente. También se obtuvo una sensibilidad similar con la combinación de turgencia vulvar y progesterona (ELISA) con una valor de sensibilidad de 94%, frente a 70,6% de la turgencia vulvar y 82,4% de la progesterona (ELISA) observados de forma individual.

Otro aspecto que vale la pena resaltar es que también se pueden utilizar pruebas de manera simultánea sin que sea necesario utilizar siempre la medición de progesterona. Tal es el caso de la combinación de turgencia vulvar y el edema de la mucosa por endoscopia que obtuvieron un 93% de sensibilidad, frente a un 70,6% de la turgencia vulvar y un 76,5% evaluados de manera individual; también la combinación de citología vaginal y edema de la mucosa por endoscopia, que obtuvieron 93% de sensibilidad, en comparación a sus sensibilidades de forma independiente (70,6% y 76,5% respectivamente).

Valor Kappa:

La única prueba que presentó un nivel de acuerdo bueno fue la medición de progesterona (ELISA) con un kappa de 0,55; con respecto a la prueba de oro que fue la medición de progesterona (CLIA). En general, cuando las pruebas se evaluaron de forma individual presentaron un pobre nivel de acuerdo frente a la medición de progesterona (CLIA); ya que todas las pruebas presentaron un nivel de acuerdo Kappa menor a 0,32.

4. Discusión

El presente estudio buscó establecer la sensibilidad, especificidad y los valores predictivos positivo y negativo de las diferentes pruebas diagnósticas que se utilizan rutinariamente para estimar el pico de LH en caninos; así como determinar el efecto sobre los mismos cuando la interpretación de los resultados se realizó en paralelo. Se estableció como punto de referencia la fecha de inicio del diestro citológico y se estimó

de manera retrospectiva que la fecha del pico de LH ocurrió 8 días antes. Se determinó que la prueba que fue capaz de detectar con mayor precisión el pico de LH fue la medición de progesterona por CLIA (77% de acuerdo) y por lo tanto fue usada como “prueba de oro”. En estudios realizados previamente se ha establecido que la medición de progesterona es un buen indicador para estimar el pico de LH y la ovulación (Hase et al., 2000, Gier et al., 2006, Tahir et al., 2012, Gloria, et al., 2018), sin embargo no se ha establecido la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la progesterona, ni tampoco de las otras pruebas que se utilizan a nivel clínico para estimar el pico de LH.

El intervalo de tiempo en que se realizó el seguimiento durante este estudio fue entre 8 y 17 días ($12,82 \pm 2,72$ días); el proestro tuvo una duración de $4,6 \pm 2,4$ días y el estro tuvo una duración fija de 8 días ya que se calculó de forma retrospectiva el pico de LH a partir del inicio del diestro citológico. En el estudio de Gier et al., (2006) se reportó una duración del seguimiento reproductivo similar (12 a 20 días), donde definieron tres etapas: fase folicular temprana (desde el inicio del proestro hasta inicio del arrugamiento de la mucosa vaginal por vaginoscopía), fase folicular tardía (desde el inicio del arrugamiento hasta el día estimado de la ovulación) y fase luteal (desde el día de la ovulación hasta el final del diestro). Se encontró que la fase folicular temprana fue la etapa más variable, ya que se estableció que el seguimiento inició entre 5 y 12 días antes de que se presentara el pico de LH. En el estudio de Moxon et al, (2012) se reportó una duración de 18 a 23 días ($20,1 \pm 1,9$ días) desde el inicio del proestro hasta el inicio del diestro, y el día de la ovulación se presentó 10 a 15 días ($12 \pm 1,4$ días) después del inicio del proestro. En el estudio realizado por Hase et al., 2000 el intervalo entre el inicio del sangrado vaginal y el pico de LH fue de 6 a 10 días ($8,2 \pm 0,4$ días). Estos resultados se relacionan con los resultados de nuestro estudio, donde se puede explicar que la variación en el número de días del seguimiento de una paciente a otra puede deberse a dos factores: 1. El proestro es una etapa de duración variable en los caninos y 2. El inicio del celo no siempre es detectado por los propietarios desde el primer día del proestro. Esto se evidenció en nuestro estudio ya que fue necesario excluir cuatro animales debido a que cuando llegaron a la evaluación inicial ya estaban en estro o inclusive en diestro. Esta situación se presenta por la falta de conocimiento de los signos de celo por parte de las personas encargadas de la detección, variación en la cantidad de secreción vaginal serosanguinolenta que se produce en las diferentes hembras y también al

comportamiento de lamido durante el celo que impide la observación de secreción vaginal en los caniles o en la zona perivulvar.

Las 13 hembras de este estudio que se diagnosticaron en gestación fueron programadas para realizar cesárea electiva debido a que todas eran de raza Bulldog Inglés o Bulldog Francés. La cirugía se realizó 57 días después del inicio del diestro citológico en el 62% de las hembras y en el día 56 en el 38% de los casos, obteniendo cachorros viables. Lo cual se relaciona con los resultados obtenidos en un estudio donde se evaluó la precisión de cuatro predictores peri-estrales del parto (pico de LH, niveles de progesterona en 2 ng/ml, niveles de progesterona en 5 ng/ml y día de inicio del diestro por citología vaginal), se encontró que el día de inicio del diestro por citología vaginal es la prueba que mejor predice la fecha del parto, teniendo en cuenta que dicha prueba fue capaz de predecir el inicio del parto (medida por el inicio de la dilatación cervical) con una precisión de ± 1 día, ± 2 días y ± 3 días en 88%, 99% y 100% de 242 gestaciones, mientras que los niveles de progesterona en 2 ng/ml obtuvieron una precisión menor de ± 1 día, ± 2 días y ± 3 días en 67%, 90% y 100% respectivamente (Cramer et al., 2017). Para nuestro caso, el 100% de las gestaciones tuvieron cachorros viables por cesárea con una precisión de $56,6 \pm 0,5$ días. Otro estudio, estableció el día de inicio del diestro con citología vaginal y evaluó la función luteal y los cambios hemodinámicos del ovario durante el diestro. Se encontró que la duración de esta etapa era significativamente más corta en hembras preñadas (57 ± 1 día) que en hembras no preñadas (63 ± 1 día) (Polisca et al., 2013). Los resultados de nuestro estudio demuestran que la determinación del inicio del diestro citológico es un buen predictor del parto, sirve para programar las cesáreas electivas (57 días después del inicio del diestro) y es útil para estimar retrospectivamente el día del pico de la LH; por esta razón se utilizó como punto de referencia para comparar las diferentes pruebas utilizadas durante el seguimiento reproductivo.

Aunque se presentaron diferentes hallazgos anormales durante este estudio como prolapso vaginal, secreción vaginal abundante y piómetra; la patología que afectó en mayor medida la fertilidad de las hembras fue el piómetra, ya que en los dos casos donde se presentó, las hembras no lograron tener una gestación y adicionalmente fueron sometidas a ovariectomía. De tal manera que quedaron excluidas por completo de los planes reproductivos. Mientras que las hembras que presentaron secreción vaginal

abundante, durante el estro, se manejaron únicamente con el drenaje de dicha secreción y obtuvieron gestaciones exitosas; las hembras que presentaron prolapso vaginal no requirieron de ningún tratamiento, no presentaron dificultades durante la inseminación artificial y dicho prolapso disminuyó gradualmente cuando los niveles de estrógenos y el edema de la mucosa vaginal disminuyeron. Si se hubiera realizado monta natural en lugar de la inseminación artificial, es probable que las hembras con prolapso vaginal hubieran presentado dificultades en el momento de realizar la monta.

Cuando la medición de progesterona (CLIA) fue utilizada como prueba de oro, las pruebas que obtuvieron una mayor sensibilidad fueron la medición de progesterona (ELISA), el edema de la mucosa por endoscopio, la turgencia vulvar, la citología vaginal y la medición del ancho de la vulva con valores de 82,4%, 76,5%, 70,6%, 70,6% y 58,8% respectivamente. Adicionalmente estas pruebas también obtuvieron valores predictivos positivos altos (93,3%, 81,3%, 85,7%, 80% y 76,9% respectivamente). Los resultados de este estudio sugieren que la medición de progesterona es un buen parámetro para estimar el pico de LH, por el contrario se encontró que las otras pruebas clínicas perdieron más de un 10% de sensibilidad que podrían ocasionar fallas para detectar el momento óptimo para una sola inseminación. Pruebas como el edema de la mucosa por endoscopio, la turgencia vulvar y la citología vaginal son procedimientos poco invasivos que se pueden realizar rutinariamente en la práctica clínica y que proporcionan información de manera inmediata. Esta información puede ser utilizada para determinar cuándo tomar muestra de sangre para medir P4 ya que estas mediciones se realizan en pocas ciudades del país. La ventaja que presenta la medición de progesterona para estimar el pico de LH es que no requiere mediciones tan frecuentes como la medición de la LH y los resultados se pueden obtener en un lapso de 24-48 horas, suficientes para tomar las decisiones sobre inseminación. En general, los valores predictivos positivos de las pruebas *in situ* no son lo suficientemente altos para poder afirmar con precisión que un resultado positivo en cualquier muestra dada es un indicador confiable para estimar el pico de LH (Gordis, 2000). Por lo tanto, no sería recomendable utilizar una sola prueba durante la evaluación reproductiva; sino recurrir al uso conjunto de varias pruebas que permitan aumentar la sensibilidad.

En este estudio se observó que tanto con la prueba de CLIA como con la prueba de ELISA se presentó un aumento gradual en la concentración de progesterona a través del

tiempo. Por ejemplo, en el caso de la medición de progesterona con ELISA se encontraron diferencias significativas entre el día del pico de LH y el día de la ovulación ($p = 0,004$) y entre el día de la ovulación y el día de la maduración de los oocitos ($p = 0,00014$); este comportamiento también se ha establecido en otros estudios; en el caso de la investigación de Gloria et al., (2018) la concentración de progesterona incrementó desde el proestro al periodo preovulatorio ($p < 0,05$), desde el periodo preovulatorio al periodo ovulatorio ($p < 0,05$) y desde el periodo ovulatorio al periodo de maduración de los oocitos ($p < 0,05$), lo cual demuestra que las concentraciones de progesterona durante el ciclo estral siguen un patrón específico por lo tanto es un parámetro ampliamente usado para establecer el periodo fértil (Hahn et al., 2017).

El aumento preovulatorio de la progesterona sérica debido a la luteinización preovulatoria es una característica única de los caninos. En la investigación de Hase et al., (2000) se encontró que durante el pico de LH la progesterona aumentó a valores entre 2 a 4ng/ml, durante la ovulación se presentaron valores entre 4 a 10 ng/ml y después de la ovulación se presentaron valores mayores a 10ng/ml. En la presente investigación también fue evidente este aumento de la concentración sérica de progesterona con valores promedio de $2,7 \pm 0,85$ ng/ml durante el pico de LH, $3,7 \pm 3,05$ ng/ml durante la ovulación y $13,2 \pm 13,4$ ng/ml durante la maduración de los oocitos con la prueba de quimioluminiscencia. Con la prueba de ELISA también se presentó un aumento durante el pico de LH de $2,8 \pm 1,06$ ng/ml, durante la ovulación de $5,8 \pm 4,95$ ng/ml y durante la maduración de $11,8 \pm 8,52$ ng/ml. Estos resultados permiten confirmar que se presentó un aumento preovulatorio de la progesterona, que efectivamente se presentó la ovulación y que la medición de progesterona es una herramienta útil para estimar el pico de LH y establecer el momento óptimo para realizar las inseminaciones artificiales.

En el presente estudio se presentaron variaciones en los niveles de progesterona usando la prueba de ELISA o CLIA, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas en el día 0 ($p = 0,685$), día 2 ($p = 0,157$) ni día 4 ($p = 0,719$). Estos resultados se relacionan con otro estudio donde se comparó la concentración de progesterona durante la fase periovulatoria en 23 hembras caninas utilizando RIA, ELISA y CLIA y aunque se presentó un aumento significativo de la progesterona sérica durante el estro con todos los métodos; si se presentaron diferencias significativas en los valores de la hormona

dependiendo del tipo de prueba que había sido utilizada. Siendo los valores de progesterona más bajos para RIA, intermedios para CLIA y más altos para ELISA; por lo tanto, se encontró que dependiendo del método usado se afectan significativamente los valores de la progesterona. Estas diferencias en los resultados pueden darse por el uso de técnicas diferentes para cuantificar la concentración de progesterona, pero también se pueden presentar por variaciones individuales en la producción de progesterona y por el número de folículos de cada individuo (England et al., 1989, Gloria et al., 2018). Por lo tanto, se puede concluir que es mejor utilizar siempre la misma prueba cuando se va a medir la progesterona durante el seguimiento reproductivo de un mismo individuo.

El VPP de la P4 medida por ELISA fue de 93,3%, que representa la probabilidad de estimar el pico de LH en un paciente dado que el resultado de la progesterona está entre los valores de referencia para estimar el pico de LH. Por su parte, el VPN fue de 57%, la cual es la probabilidad de que un paciente no tenga el pico de LH dado que el resultado de la progesterona no está dentro de los valores de referencia para estimar el pico de LH. En nuestro estudio, es importante que las pruebas utilizadas tengan un VPP elevado, ya que esto permite estimar el pico de LH y la ovulación en cada uno de los casos y de esta forma poder tomar la decisión de inseminar o realizar la monta natural.

La evaluación del edema de la mucosa por endoscopio y la turgencia vulvar presentaron una sensibilidad de 76,5% y 70,6% respectivamente. Estas pruebas evalúan la misma condición fisiológica que es el grado de edematización de la mucosa que está influenciado por el aumento de los estrógenos durante el proestro y la disminución de los mismos durante el estro; así mismo como el inicio del aumento preovulatorio de los niveles de progesterona. Cabe resaltar que el VPP de la turgencia vulvar (85,7%) fue más alto que el VPP del edema de la mucosa por endoscopio (81,3%) a pesar de tener una menor sensibilidad; este resultado puede deberse a que la especificidad de la turgencia vulvar es mayor que la del edema de la mucosa por endoscopio. De tal forma que un incremento en la especificidad resulta en un mayor incremento del valor predictivo positivo que el mismo incremento de la sensibilidad (Gordis, 2000). Este hallazgo sugiere que en los casos en los cuales no se cuenta con el endoscopio para realizar la evaluación se podría recurrir a la observación de la mucosa interna de la vulva; ya que es un parámetro que suministra información importante al momento de estimar el pico de LH.

Con la citología vaginal se pudo estimar el pico de LH en 15 de las 22 pacientes con una sensibilidad del 70,6% y VPP del 80%. Estos resultados se relacionan con la investigación realizada por Moxon et al., 2012 donde se estableció que el pico de cornificación se presentó entre el día -2 y el día 3 (Día 0= ovulación); y luego, este porcentaje permanece alto por unos días y empieza a disminuir gradualmente, de tal forma que hay diferencias significativas ($P= 0,003$) entre el día 2 después de la ovulación (día óptimo para la monta) y el día 5 después de la ovulación (fin del periodo fértil y de fertilización) y difieren en que en nuestro estudio todas las perras alcanzaron porcentajes de cornificación mayores al 80%, mientras que en dicha investigación no todas las perras alcanzaron el pico del 80% y se reportó un pico promedio de $73,7 \pm 8,1\%$. La citología vaginal ha sido una prueba diagnóstica que se ha utilizado desde hace mucho tiempo y en nuestro estudio también se demuestra que es una prueba útil durante el seguimiento reproductivo ya que presenta una sensibilidad (70,6%) y un VPP (80%) aceptables. Sin embargo, su interpretación puede depender de varios factores como los parámetros utilizados para clasificar las células, la experiencia del técnico que realiza la lectura, el tipo de tinción utilizado, la subjetividad propia de la prueba y los días de seguimiento del celo de la perra.

Las otras pruebas realizadas (conducta de aceptación, secreción vaginal, color del hisopo, color de la mucosa por endoscopio y tamaño de la vulva) mostraron una baja sensibilidad para estimar el pico de LH. Esto se debe a que son pruebas muy subjetivas que pueden presentar variaciones debidas a factores externos. Por ejemplo, las hembras de temperamento tímido o nervioso generalmente no muestran claramente una conducta de aceptación al tener estímulos en la región perivulvar. Por otra parte, la cantidad de secreción vaginal es variable de una hembra a otra e incluso hay casos donde aún en el estro se observa aún sangrado. Tal como ocurrió en algunas de las hembras bulldog de este estudio, donde fue necesario realizar el drenaje de la secreción vaginal cada 24 horas.

Los resultados obtenidos al observar el color de la mucosa vaginal con el endoscopio mostraron una baja sensibilidad (23%) para estimar el pico de LH. Este resultado se relaciona con un estudio previo donde se evaluó el color de la mucosa vaginal (subjetiva)

y la saturación del color de la mucosa (objetiva) a través del programa Colorpix con la finalidad de establecer si una prueba era más efectiva que la otra (Moxon, et al., 2012). Sin embargo, se encontró que ninguna de las dos pruebas eran indicadores confiables para establecer la ovulación, el momento óptimo de la monta ni el final del periodo fértil. Aunque si hay cambios en la coloración de la mucosa durante el proestro y el estro producidos por el aumento de los estrógenos que generan edema y cambios en la vascularización; pero tanto la observación del color de la mucosa como la medición de la saturación del color no tuvieron correlación con los niveles de progesterona ni tampoco con el día de la ovulación.

Las medidas del largo y ancho de la vulva han sido parámetros que se han medido para estimar el día de la ovulación o para identificar el momento óptimo de la monta; sin embargo, en la presente investigación se encontró que las medidas del largo A y B y ancho de la vulva tuvieron una baja sensibilidad (35%, 29% y 58% respectivamente) para estimar el día del pico de LH. En otro estudio donde también midieron el tamaño de la vulva se encontró que la altura era variable desde el día -6 hasta el día 7 (Día 0= Ovulación) y que se presentó la medida del ancho de la vulva más alta el día de la ovulación en 4 de 9 perras. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas ni en el ancho ni en el alto entre el día -5 y el día 2, ni entre el día 2 y el día 5 y tampoco encontraron una correlación entre estas medidas y los niveles de progesterona, nivel de saturación del color de la mucosa o la medida de los pliegues vaginales (Moxon et al., 2012). Los resultados del presente estudio al igual que los de Moxon et al., (2012) sugieren que las medidas de la vulva tienen una capacidad limitada para estimar el pico de LH, identificar el momento óptimo de la monta o el día de la ovulación, ya que cuando el diagnóstico se basa únicamente en estas medidas se puede llegar a identificar de forma inadecuada el pico de LH. Una de las causas de la baja sensibilidad de la medición del tamaño de la vulva es que en todas las pacientes el aumento y disminución del tamaño de la vulva no se presenta de la misma manera, por ejemplo hay hembras en las cuales se inflama toda la zona perivulvar, mientras que en otras solamente se presenta un aumento de tamaño de los labios vulvares. Otra característica que puede influir en la evaluación del tamaño de la vulva es que los cambios en el tamaño no se presentan de una manera tan evidente en la misma perra a través del tiempo.

El diagnóstico ultrasonográfico de la ovulación en caninos constituye un reto teniendo en cuenta que la fisiología del funcionamiento ovárico es diferente al de otras especies. La luteinización de los folículos ocurre antes de la ovulación y la similitud entre la estructura y la ecogenicidad de los folículos y los cuerpos lúteos dificulta su diferenciación; entonces puede ser difícil encontrar cambios en el tamaño de los ovarios, número, diámetro, forma y/o ecogenicidad de los folículos que permita establecer con precisión el momento en que se da la ovulación, lo cual podría explicar la baja sensibilidad (23,5%) y bajo VPP (57,1%) en el presente estudio. A diferencia de lo que ocurre en otras especies como equinos, bovinos y humanos donde el crecimiento folicular y la ovulación son rutinariamente monitoreadas por ultrasonografía (Malandain et al., 2011).

En el estudio realizado por Hase et al., (2000) se encontró que el tamaño de los folículos 3 -8 días ($5,1 \pm 0,5$ días) después del inicio del sangrado vaginal fue de 0,3 – 0,5 cm ($0,4 \pm 0,02$ cm), luego los folículos crecieron hasta lograr su mayor tamaño entre los días 6 a 12 ($9,1 \pm 0,6$ días) con un diámetro de 0,5 – 0,8 cm ($0,58 \pm 0,03$ cm). Como en este estudio se pudo establecer que el pico de LH se había presentado $8,2 \pm 0,4$ días después del inicio del sangrado vaginal; concluyeron que los folículos ováricos alcanzaron su tamaño más alto uno o dos días después del pico de LH. En nuestro estudio el tamaño más alto de los folículos se presentó 1 día antes del pico de LH ($3,99 \pm 2,43$ mm), sin embargo, al no presentar diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) entre los días -2, -1, 0, 1, 2 y 3 con respecto al diámetro folicular no podemos establecer que exista un patrón específico que permita estimar el pico de LH.

En el estudio de Groppetti et al., (2015) se evaluaron los ovarios de 40 animales por medio de histomorfometría y se determinó el número y tamaño de los folículos, cuerpos hemorrágicos y cuerpos lúteos durante el periodo periovulatorio, diestro y anestro. Durante el proestro se registró un promedio de $12 \pm 5,3$ folículos terciarios por animal con un predominio de folículos mayores a 2 mm de diámetro. En el estro se registró un promedio de $14,7 \pm 7,6$ folículos por hembra y en el momento de la ovulación más de la mitad de los folículos tenían un diámetro mayor a 4 mm ($4,1 \pm 0,7$ mm). El número de folículos observados en el estro difirió significativamente comparado con otras fases del ciclo reproductivo ($P = 0,008$). El diestro estuvo caracterizado por la aparición de cuerpos lúteos ($7 \pm 3,2$ por perra; $P = 0,001$). En nuestro estudio, el número de folículos

observados durante el periodo periovulatorio fue mucho más bajo; esto se puede explicar por el método diagnóstico utilizado, ya que en el estudio de Groppetti et al, (2015) la caracterización se realizó por medio de histología de los ovarios y en nuestro estudio se utilizó US. En nuestro caso no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,005$) en el número de folículos durante los días -2, -1, 0, 1, 2 y 3. De tal manera que no se pudo establecer la ovulación por medio del conteo de los folículos durante el periodo periovulatorio.

En nuestra investigación fue posible observar por medio del ultrasonido en modo B los dos ovarios y los folículos durante el periodo periovulatorio, pero no se logró establecer un evento específico que permitiera estimar el pico de LH, la ovulación o diferenciar estructuras entre folículos y cuerpos lúteos. Aunque se logró observar una disminución en el número de estructuras en un 27,2% de los casos en el día 1 y en un 18,1% de los casos en el día 2 (Ovulación), este hallazgo no es concluyente, debido a que la desaparición de estructuras compatibles con folículos también se presentó en días diferentes al periodo periovulatorio. En otro estudio también encontraron que hubo una disminución en el número de folículos/cuerpos lúteos entre el día -1 donde el promedio de folículos fue de 4,6 por ovario y el día 4 donde el promedio de folículos fue de 3,2 por ovario; sin embargo, este hallazgo tampoco permitió establecer el momento en que se presentó la ovulación (Bergeron et al., 2013). En el estudio de Hase et al., (2000) se pudo detectar la ovulación en 6 de 11 animales (54,5%) al observar una disminución en el tamaño de los folículos; sin embargo, también encontraron que la forma de las estructuras observadas en los ovarios antes y después de la ovulación tenían la misma forma y características ultrasonográficas es decir que eran anecogénicas. Esto se debe a que no hay establecido un patrón claro con respecto al cambio ecográfico (modo B) en el número y forma de folículos durante el periodo periovulatorio y por último, es difícil diferenciar ecográficamente los folículos de los cuerpos lúteos.

Aunque se ha reportado que existen cambios en la ecogenicidad de los folículos preovulatorios (anecoico), folículos ovulados (hipoecoico) y cuerpos lúteos (anecoico) (Malandain et al., 2011), en nuestro estudio no observamos cambios en la ecogenicidad de los folículos durante el día 1, 2 (ovulación) o 3. Estos resultados son similares a los encontrados en otro estudio, donde no encontraron cambios significativos en la ecotextura de los folículos/cuerpos lúteos durante el periodo periovulatorio al ser

evaluados de forma más objetiva por medio del programa de procesamiento de imagen digital Image J, donde no se presentaron cambios significativos en el promedio de la escala de grises medido en pixeles entre los días -3 y 4 del periodo periovulatorio (Bergeron et al., 2013).

En este estudio se realizó el seguimiento ultrasonográfico cada 24 horas desde el inicio del proestro hasta el inicio del diestro con un transductor de 5MHz. En otro estudio se realizó este seguimiento cada 12 horas y utilizaron un transductor de 8 MHz y concluyeron que el ultrasonido era una prueba diagnóstica útil y confiable para estimar la ovulación y que adicionalmente, la resolución para la evaluación de los ovarios era buena usando un transductor de 8MHz (Eker et al., 2006). Sin embargo, este fue un seguimiento que se realizó en 1 sola perra y no en una población representativa. En otro estudio, fue posible detectar cambios en la forma de los folículos en 6 de 11 animales (54,5%) al realizar la ecografía 3 veces al día desde el momento en que se empezaron a observar folículos en los ovarios (Hase et al., 2000). Sería recomendable realizar los seguimientos ultrasonográficos con una mayor frecuencia (cada 8 a 12 horas) para aumentar la posibilidad de observar cambios en los ovarios que permitan estimar la ovulación y también utilizar un equipo de ultrasonografía de alta resolución. Sin embargo la practicidad clínica de esta recomendación sería cuestionable.

Debido a la dificultad de establecer la ovulación con la ultrasonografía tradicional (modo B), en investigaciones recientes han evaluado la eficacia de la ultrasonografía con Doppler color para medir el flujo de sangre ovárico y de esta forma detectar los eventos periovulatorios en la perra. En una investigación se logró establecer que en 10 de 12 perras hubo un incremento de 1,8 veces en el promedio del flujo sanguíneo ovárico en al menos uno de los dos ovarios desde el día del pico de LH preovulatorio hasta 1 día después del pico de LH, lo cual permitió la detección del pico de LH y la determinación prospectiva de la ovulación (Bergeron et al., 2013). Sin embargo, en nuestro país no es tan fácil poder disponer de este tipo de equipos que puedan medir el flujo sanguíneo debido a su costo. Por lo tanto, su uso a nivel clínico se puede ver bastante limitado.

En nuestro estudio, la única prueba que presentó un buen nivel de acuerdo con respecto a la prueba de oro fue la medición de progesterona (ELISA), la cual adicionalmente

también obtuvo una sensibilidad y valor predictivo positivo altos; sin embargo la eficiencia en la estimación del pico de LH se puede mejorar con la inclusión de otras pruebas *in situ* que son fáciles de realizar y que se pueden realizar de forma rutinaria durante la evaluación reproductiva. Por esta razón, en este estudio se determinó la sensibilidad y especificidad de las pruebas al ser evaluadas en paralelo.

Pruebas en paralelo

Cuando se utilizaron dos pruebas diagnósticas en paralelo para estimar el pico de LH, se observó un incremento en la sensibilidad comparado con la sensibilidad de cada prueba por separado. En el caso de hacer la estimación del pico de LH por medio del edema de la mucosa por endoscopio y la progesterona (ELISA) se obtuvo un 96% de sensibilidad, frente a 76,5% (edema de la mucosa por endoscopio) y 82,4% (progesterona por ELISA) de sensibilidad al realizar las pruebas de forma aislada. De forma similar ocurrió cuando se utilizaron en paralelo la citología vaginal y la progesterona (ELISA); donde se obtuvo un 95% de sensibilidad, frente a 70,6% (citología vaginal) y 82,4% (Progesterona por ELISA) de sensibilidad al realizar las pruebas de forma individual. Este aumento en la sensibilidad se debe a que la tasa de falsos positivos se disminuye, incrementando la posibilidad de estimar el pico de LH en el momento en el cual realmente se está presentando.

La combinación de la citología vaginal y la medición de progesterona es uno de los protocolos más populares a nivel clínico para establecer el periodo fértil. Por ejemplo en el estudio de Hahn et al. (2017) utilizaron los resultados de la citología vaginal para determinar el momento en que se tomaban las pruebas de progesterona, de tal forma que ellos encontraron que el coeficiente de correlación era positivo entre el índice de cornificación (proporción de células picnóticas y anucleadas sobre el total de células) y la proporción de células cornificadas (proporción de la suma de células intermedias y superficiales sobre el total de células) con la concentración de progesterona sérica. Los autores recomiendan iniciar la medición de progesterona sérica cuando la citología vaginal tenga una proporción de células cornificadas del 50% y un índice de cornificación del 80%. Lo cual implica que la citología vaginal y la progesterona pueden ser medidas en paralelo para aumentar la sensibilidad o de forma secuencial para disminuir los

costos; ya que en la práctica la citología vaginal es más económica y más rápida de realizar

También se encontró que se puede utilizar la combinación de pruebas *in situ* como turgencia vulvar y edema de la mucosa por endoscopio logrando una sensibilidad del 93%, frente a una sensibilidad individual de 70,6% y 76,5% respectivamente; así como, la combinación de citología vaginal y edema de la mucosa vaginal por endoscopio con una sensibilidad del 93%, frente a una sensibilidad individual de 70,6% y 76,5%. Estos resultados representan una gran ventaja a nivel clínico, debido a que en la práctica es posible combinar estas pruebas de forma muy sencilla y adicionalmente no aumentan los costos del seguimiento reproductivo. Es decir, que en circunstancias en las cuales no es posible medir la progesterona, se puede recurrir al uso de estas pruebas que proporcionan una buena sensibilidad para estimar el pico de LH y de esta forma realizar las inseminaciones artificiales en un momento óptimo.

No existen estudios previos donde se haya determinado la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de estas pruebas en forma individual, ni tampoco se hace mención a la realización o interpretación de estas pruebas en paralelo, como se hizo en la presente investigación. Por esta razón, este estudio aporta un conocimiento muy valioso a nivel clínico, ya que establece las pruebas que ofrecen una mayor confiabilidad para estimar el pico de LH.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

La duración del seguimiento reproductivo puede ser variable de un paciente a otro debido a que el proestro es una etapa de duración variable en los caninos y a las fallas que se pueden presentar en la detección adecuada del inicio del celo.

Para determinar con una mayor precisión el pico de LH y/o el momento ideal para realizar la inseminación artificial en hembras caninas es indispensable un seguimiento reproductivo completo, el cual no solamente incluye la medición de progesterona sino también la observación de los cambios clínicos como la turgencia vulvar, conducta de receptividad y tamaño de la vulva. Así como, la toma de citología vaginal y visualización de la mucosa vaginal por vaginoscopia. No es recomendable evaluar un solo parámetro para estimar el pico de LH, ya que el uso de pruebas en paralelo aumenta la sensibilidad y el valor predictivo positivo comparado a sus respectivos valores de forma independiente.

La citología vaginal de diestro es una prueba diagnóstica muy útil para establecer con precisión la fecha estimada de parto o cesárea y también para estimar de manera retrospectiva el momento en que se presentó el pico de LH y tiene la ventaja de ser una prueba económica, fácil de realizar y rápida en la práctica clínica.

La medición de la concentración de progesterona durante el periodo periovulatorio es importante debido a que la prueba presenta una alta sensibilidad para estimar el pico de LH, no requiere mediciones tan frecuentes como otras pruebas y sigue un patrón específico durante este periodo. Sin embargo, se debe tener en cuenta que se presentan variaciones en el resultado dependiendo de la prueba utilizada, por esta razón siempre se debe usar la misma técnica durante el seguimiento reproductivo y verificar que se

presente un aumento en las concentraciones de progesterona más que un valor específico de la hormona.

La evaluación periódica de la mucosa vaginal ya sea por medio del endoscopio o por observación directa de la parte interna de los labios de la vulva durante el periodo periovulatorio permitió establecer una buena estimación del pico de LH. Por lo tanto, se debería dar una mayor importancia al uso de estas pruebas durante la evaluación clínica y además tiene la ventaja de proporcionar un resultado inmediato; a diferencia de la medición de progesterona o la toma de citología vaginal que implican un proceso de laboratorio que en la mayoría de los casos implica un mayor tiempo y necesidad de equipos para obtener un resultado.

Algunas pruebas como el color de la mucosa vaginal, color del hisopo, conducta de aceptación, cantidad de secreción vaginal y tamaño de la vulva presentan una baja sensibilidad para estimar el pico de LH, pero cuando se usan de forma paralela con otras pruebas se aumenta la sensibilidad. Es por esta razón, que es mejor realizar una evaluación reproductiva donde se evalúan varios parámetros tanto clínicos como paraclínicos para estimar el pico de LH; que realizar pruebas de forma independiente.

Es posible observar los ovarios y los folículos por medio del ultrasonido en modo B en caninos, pero no es fácil diferenciar los folículos de los cuerpos lúteos, o el momento en que ocurre la ovulación ya que no hay un patrón ecográfico específico que nos permita establecer con precisión cualquiera de los eventos periovulatorios.

5.2 Recomendaciones

Para estimar el pico de LH, la ovulación y determinar el momento óptimo para realizar la inseminación artificial, es mejor realizar un seguimiento reproductivo donde se puedan evaluar varios parámetros de forma simultánea. Adicionalmente, la evaluación requiere una evaluación periódica desde el momento en que se detecta el inicio del sangrado (proestro) hasta el inicio del diestro para detectar los diferentes cambios que se

presentan debidos al aumento y disminución de los estrógenos y el aumento de los niveles de progesterona.

Siempre que se realice un seguimiento reproductivo se deben realizar las citologías vaginales hasta determinar la fecha de inicio del diestro. De esta manera se puede calcular una fecha aproximada de parto o cesárea y de tal manera dar las recomendaciones de manera anticipada a los criadores o propietarios de hembras en gestación para disminuir factores de riesgo al momento del parto.

Cuando se realizan mediciones seriadas de progesterona para monitorear el aumento de la hormona se debe realizar utilizando la misma prueba (CLIA o ELISA) y el mismo laboratorio para evitar variaciones en el resultado debidas a estos dos aspectos.

En los casos en los cuales no se cuenta con un endoscopio para realizar la evaluación de la mucosa vaginal; este parámetro puede ser evaluado por medio de la observación de la mucosa interna de la vulva; ya que ambas pruebas presentan una sensibilidad y VPP altos.

A. Anexo: Resultados de la sensibilidad y la especificidad al realizar las pruebas en paralelo

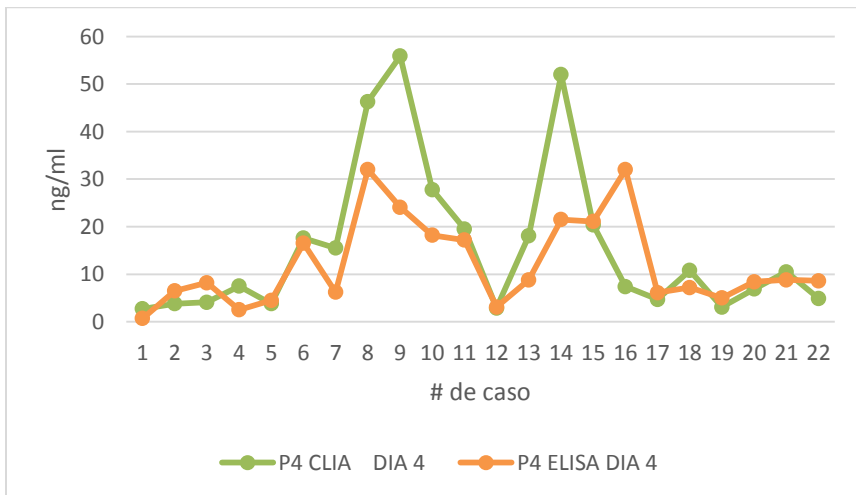
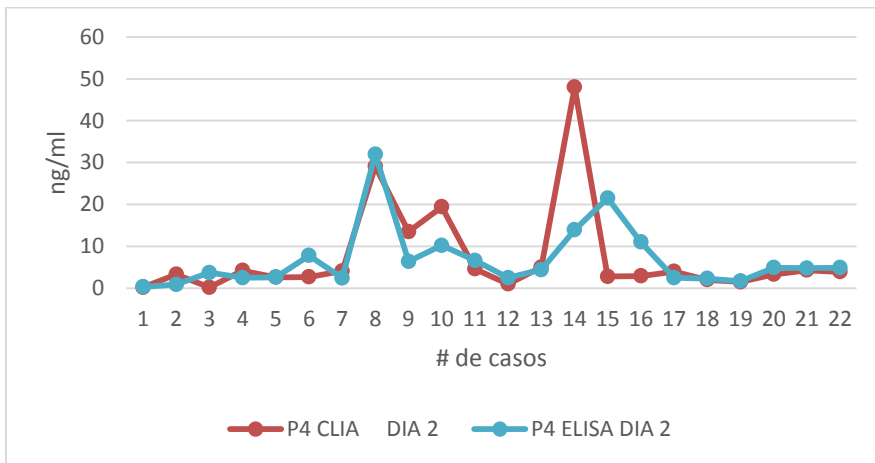
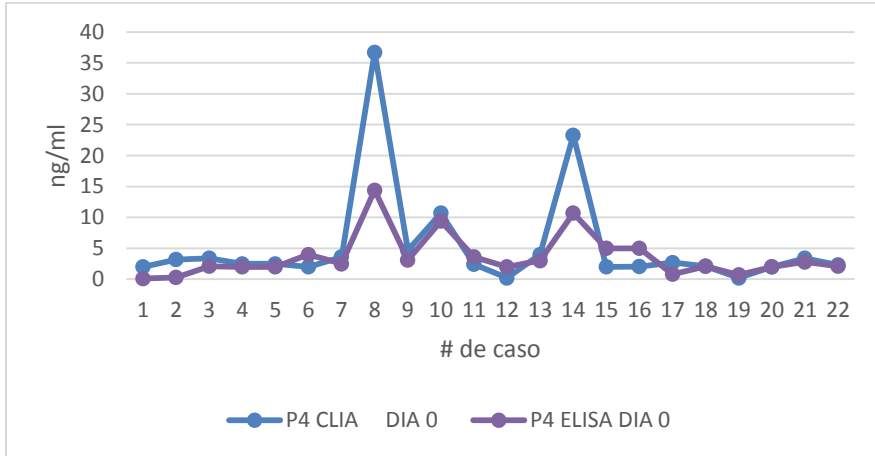
PRUEBAS	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
Conducta aceptación + Secreción vaginal	0,70	0,12
Conducta aceptación + Turgencia vulvar	0,86	0,12
Conducta aceptación + Citología vaginal	0,86	0,08
Conducta aceptación + color del hisopo	0,67	0,04
Conducta aceptación + color mucosa endoscopio	0,64	0,08
Conducta aceptación + Edema mucosa endoscopio	0,89	0,08
Conducta aceptación + Tamaño Vulvar: largo A	0,70	0,12
Conducta aceptación + Tamaño Vulvar: largo B	0,67	0,16
Conducta aceptación + Tamaño Vulvar: Ancho	0,81	0,08
Conducta aceptación + Progesterona (ELISA)	0,92	0,16
Secreción vaginal + Turgencia vulvar	0,81	0,36
Secreción vaginal + citología vaginal	0,81	0,24
Secreción vaginal + Color del hisopo	0,54	0,12
Secreción vagina + Color mucosa x endoscopio	0,51	0,24
Secreción vaginal + Edema mucosa x endoscopio	0,85	0,24
Secreción vaginal + TV: Largo A	0,58	0,36
Secreción vaginal + TV: Largo B	0,54	0,48
Secreción vaginal + TV: Ancho	0,73	0,24
Secreción vaginal + Progesterona (ELISA)	0,89	0,48
Turgencia vulvar + Citología vaginal	0,91	0,24
Turgencia vulvar + Color del hisopo	0,79	0,12
Turgencia vulvar + Color mucosa x endoscopio	0,78	0,24
Turgencia vulvar + Edema mucosa x endoscopio	0,93	0,24
Turgencia vulvar + Tamaño Vulvar: Largo A	0,81	0,36
Turgencia vulvar + Tamaño Vulvar: Largo B	0,79	0,48
Turgencia vulvar + Tamaño Vulvar: Ancho	0,88	0,24
Turgencia vulvar + Progesterona (ELISA)	0,95	0,48
Citología vaginal + Color del hisopo	0,79	0,08
Citología vaginal + Color mucosa x endoscopio	0,78	0,16
Citología vaginal + Edema mucosa x endoscopio	0,93	0,16
Citología vaginal + Tamaño Vulvar: Largo A	0,81	0,24
Citología vaginal + Tamaño Vulvar: Largo B	0,79	0,32

Citología vaginal + Tamaño Vulvar: Ancho	0,88	0,16
Citología vaginal + Progesterona (ELISA)	0,95	0,32
Color del hisopo + Color mucosa x endoscopio	0,46	0,08
Color del hisopo + Edema mucosa x endoscopio	0,83	0,08
Color del hisopo + Tamaño Vulvar: Largo A	0,54	0,12
Color del hisopo + Tamaño Vulvar: Largo B	0,50	0,16
Color del hisopo + Tamaño Vulvar: Ancho	0,71	0,08
Color del hisopo + Progesterona (ELISA)	0,88	0,16
Color mucosa x endoscopio + Edema mucosa x endoscopio	0,82	0,16
Color mucosa x endoscopio + Tamaño Vulvar: Largo A	0,51	0,24
Color mucosa x endoscopio + Tamaño Vulvar: Largo B	0,46	0,32
Color mucosa x endoscopio + Tamaño Vulvar: Ancho	0,68	0,16
Color mucosa x endoscopio + Progesterona (elisa)	0,87	0,32
Edema mucosa x endoscopio+ TV: Largo A	0,85	0,24
Edema mucosa x endoscopio + TV: Largo B	0,83	0,32
Edema mucosa x endoscopio + TV: Ancho	0,90	0,16
Edema mucosa x endoscopio + Progesterona (elisa)	0,96	0,32
Tamaño Vulvar: Largo A + Tamaño Vulvar: Largo B	0,54	0,48
Tamaño Vulvar: Largo A + Tamaño Vulvar: Ancho	0,73	0,24
Tamaño Vulvar: Largo A+ Progesterona (ELISA)	0,89	0,48
Tamaño Vulvar: Largo B + Tamaño Vulvar: Ancho	0,71	0,32
Tamaño Vulvar Largo B + Progesterona (ELISA)	0,88	0,64
Tamaño Vulvar: Ancho + Progesterona (ELISA)	0,93	0,32

B. Anexo: Resultados de la progesterona medida por CLIA y ELISA en los días 0, 2 y 4

# CASO	P4 CLIA DIA 0	P4 CLIA DIA 2	P4 CLIA DIA 4	P4 ELISA DIA 0	P4 ELISA DIA 2	P4 ELISA DIA 4
1	2	0,2	2,7	0,1	0,3	0,7
2	3,2	3,3	3,8	0,3	0,9	6,5
3	3,4	0,2	4,1	2,1	3,7	8,2
4	2,5	4,2	7,5	2	2,5	2,5
5	2,5	2,6	3,8	2	2,6	4,5
6	2	2,7	17,6	4	7,8	16,5
7	3,6	4,1	15,5	2,5	2,4	6,2
8	36,7	29,1	46,3	14,4	32	32
9	4,7	13,5	55,9	3,1	6,4	24,1
10	10,7	19,4	27,8	9,4	10,2	18,2
11	2,4	4,6	19,5	3,6	6,6	17,2
12	0,2	1	2,9	2	2,5	3,1
13	4	5	18,1	3	4,4	8,8
14	23,3	48	52	10,7	13,9	21,5
15	2	2,8	20,4	5	21,5	21,1
16	2,05	2,9	7,4	5	11	32
17	2,7	4	4,7	0,8	2,5	6,1
18	2,1	2	10,8	2,1	2,3	7,2
19	0,2	1,5	3,1	0,7	1,7	5
20	2	3,3	6,9	2	4,9	8,4
21	3,4	4,3	10,5	2,8	4,8	8,8
22	2,3	3,9	4,9	2,1	4,9	8,6
Promedio	5,36	7,39	15,74	3,62	6,81	12,15
Desviación	8,48	11,33	16,15	3,54	7,48	9,23

C. Anexo: Gráfica comparativa de los valores de progesterona medidos por CLIA y ELISA en los días 0, 2 y 4



D. Resultado de la prueba t de student para comparar la concentración de progesterona en los días 0, 2 y 4

Prueba t para medias de la concentración de progesterona medida por CLIA y ELISA en el día 0

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	5,36136364	3,62272727
Varianza	71,9923647	12,552316
Observaciones	22	22
Coefficiente de correlación de Pearson	0,89862844	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	21	
Estadístico t	1,47621046	
P(T<=t) una cola	0,077363	
Valor crítico de t (una cola)	1,7207429	
P(T<=t) dos colas	0,154726	
Valor crítico de t (dos colas)	2,07961384	

Prueba t para medias de la concentración de progesterona medida por CLIA y ELISA en el día 2

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	7,39090909	6,80909091
Varianza	128,44658	55,9199134
Observaciones	22	22
Coefficiente de correlación de Pearson	0,58854907	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	21	
Estadístico t	0,29668612	
P(T<=t) una cola	0,38481033	
Valor crítico de t (una cola)	1,7207429	
P(T<=t) dos colas	0,76962067	
Valor crítico de t (dos colas)	2,07961384	

Prueba t para medias de la concentración de progesterona medida por CLIA y ELISA en el día 4

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	15,7363636	12,1454545
Varianza	260,669091	85,1578355
Observaciones	22	22

Coefficiente de correlación de Pearson	0,7082271
Diferencia hipotética de las medias	0
Grados de libertad	21
Estadístico t	1,4507341
P(T<=t) una cola	0,08081402
Valor crítico de t (una cola)	1,7207429
P(T<=t) dos colas	0,16162803
Valor crítico de t (dos colas)	2,07961384

Bibliografía

- Barstow, C., Wilborn, R., Johnson, A., 2018, Breeding Soundness Examination of the bitch: *Vet Clin Small Anim*, v.48, p. 547-566.
- Bergeron, L. H., S. G. Nykamp, B. A. Brisson, P. Madan, and C. J. Gartley, 2013, An evaluation of B-mode and color Doppler ultrasonography for detecting periovulatory events in the bitch: *Theriogenology*, v. 79, p. 274-283.
- Concannon, P.W., 2011, Reproductive cycles of the domestic bitch: *Animal Reproduction Science*, v.124, p. 200-210.
- Chapwanya, A., T. Clegg, P. Stanley, and L. Vaughan, 2008, Comparison of the Immulite and RIA assay methods for measuring peripheral blood progesterone levels in Greyhound bitches: *Theriogenology*, v. 70, p. 795-799.
- Cramer, K., J. Nöthling, 2017, The precision of peri-oestrous predictors of the date of onset of parturition in the bitch: *Theriogenology*, v. 96, p. 153-157.
- Eker, K., M. Salmanoglu, 2006, Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and corpora lutea formation in a bitch: *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, v. 30, p. 589-592.
- England, G. C. W., C. M. Burgess, S. L. Freeman, S. C. Smith, and A. A. Pacey, 2006, Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch: *Theriogenology*, v. 66, p. 1410-1418.
- Fay, J., T. Mezo, L. Solti, A. Wölfling, Z. Abonyi-Tóth, 2003, Comparison of different methods used for oestrus examination in the bitch: *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 51, p. 385-394.
- Gloria, A., A. Contri, A. Carluccio, D. Robbe, 2018, Blood periovulatory progesterone quantification using different techniques in the dog: *Animal Reproduction Science*, v. 192, p. 179-184.
- Gier, J., H. S. Kooistra, S. C. Djajadiningrat-Laanen, S. J. Dieleman, and A. C. Okkens, 2006, Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17 β , progesterone, prolactin, and α -melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch: *Theriogenology*, v. 65, p. 1346-1359.
- Gier, J., H. S. Kooistra, S. C. Djajadiningrat-Laanen, S. J. Dieleman, and A. C. Okkens, 2006, Differential regulation of the secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone around the time of ovulation in the bitch: *Theriogenology*, v. 66, p. 1419-1422.
- Gordis, L., 2000, *Epidemiology*. Second Edition. W.B. Saunders Company.
- Groppetti, D., A. Pecile, S. Arrighi, A. Di Giancamillo, F. Cremonesi, 2010, Endometrial cytology and computerized morphometric analysis of epithelial nuclei: A useful tool for reproductive diagnosis in the bitch: *Theriogenology*, v. 73, p. 927-941.
- Groppetti, D., M. Aralla, V. Bronzo, G. Bosi, A. Pecile, S. Arrighi, 2015, Periovulatory time in the bitch: What's new to know? Comparison between ovarian histology and clinical features: *Animal Reproduction Science*, v. 152, p. 108-116.

- Hahn, S., Y. Jo, Y. Jin, G. Jang, 2017, Timing of fertile period for successful pregnancy in American Bully dogs: *Theriogenology*, v. 104, p. 49-54.
- Hase, M., T. Hori, E. Kawakami, and T. Tsutsui, 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*, v. 62, p. 243-248.
- Hayashi, K., R. Morita, T. Aso, M. Ono, T. Ohtaki, K. Tanemura, T. Watari, and S. Tsumagari, 2013, Evaluation of transcervical insemination using frozen semen by flexible endoscope in dogs: *J Vet Med Sci*, v. 75, p. 315-8.
- Hoffmann, B., A. Riesenbeck, R. Klein, 1996, Reproductive endocrinology of bitches: *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 275-288.
- Hoffmann, B., F. Büsges, E. Engel, M. P. Kowalewski, and P. Papa, 2004, Regulation of corpus luteum-function in the bitch: *Reproduction In Domestic Animals = Zuchthygiene*, v. 39, p. 232-240.
- Hollinshead, F. K., Hanlon, D.W, 2019, Factors affecting the reproductive performance of bitches: A prospective cohort study involving 1203 inseminations with fresh and frozen semen. *Theriogenology*, v 101, p. 62-72.
- Hollinshead, F. K., Hanlon, D.W, 2019, Normal progesterone profiles during estrus in the bitch: A prospective analysis of 1420 estrous cycles. *Theriogenology*, v 125, p. 37-42.
- Hori, T., M. Ichikawa, E. Kawakami, and T. Tsutsui, 2004, Artificial Insemination of Frozen Epididymal Sperm in Beagle Dogs: *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 66, p. 37-41.
- Hori, T., R. Yoshikuni, M. Kobayashi, and E. Kawakami, 2014, Effects of Storage Temperature and Semen Extender on Stored Canine Semen: *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 76, p. 259-263.
- Kutzler, M. A., 2005a, Induction and synchronization of estrus in dogs: *Theriogenology*, v. 64, p. 766-775.
- Kutzler, M. A., 2005b, Semen collection in the dog: *Theriogenology*, v. 64, p. 747-754.
- Linde-Forsberg, C., B. Ström Holst, and G. Govette, 1999, Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: A retrospective study: *Theriogenology*, v. 52, p. 11-23.
- Lulich, J. P., 2006, Endoscopic vaginoscopy in the dog: *Theriogenology*, v. 66, p. 588-591.
- Macedo, S. P., C. Malm, M. R. J. M. Henry, L. F. Telles, M. S. Figueiredo, F. B. Fukushima, M. M. Neves, G. A. de Oliveira Cavalcanti, M. S. Chaves, R. M. Mascarenhas, M. de Albuquerque Lagares, and V. A. Gheller, 2012, Endoscopic transcervical intrauterine artificial insemination in Labrador Retriever bitches: *Research in Veterinary Science*, v. 92, p. 494-500.
- Malandain, E., D. Rault, E. Froment, S. Baudon, L. Desquilbet, D. Begon, S. Chastant-Maillard, 2011, Follicular growth monitoring in the female cat during estrus: *Theriogenology*, v. 76, p. 1337-1346.
- Martínez BR, Martínez RN y Martínez MM., 2011, Diseño de experimentos en ciencias agropecuarias y biológicas con SAS, SPSS, R y STATISTIX. Fondo Nacional Universitario. Bogodtá, Colombia, p. 1-45.
- Moxon, R., D. Copley, G. England, 2010, Quality assurance of canine vaginal cytology: A preliminary study: *Theriogenology*, v. 74, p. 479-485.
- Moxon, R., H. Batty, G. Irons, G. England, 2012, Perioovulatory changes in the endoscopic appearance of the reproductive tract and teasing behavior in the bitch: *Theriogenology*, v. 78, p. 1907-1916.

- Nishiyama, T., K. Narita, S. Tsumagari, M. Takeishi, 2000, Shrinkage in the horizontal dimensions of the vulva (vulvar shrinkage) as an indicator of standing heat in the beagle: *Journal of the American Animal Hospital Association*, v 36, p. 556-560.
- Niżański, W., 2006, Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid: Use of an infusion pipette and the Osiris catheter: *Theriogenology*, v. 66, p. 470-483.
- Nöthling J.O., K.G.M. Cramer, D. Gerber, V.R. Kammer, 2006, Luteal and follicular count in bitches: Assessment by means of magnetic resonance imaging: *Theriogenology*, v. 66, p. 1343-1354.
- Polisca A., R. Zelli, A. Orlandi, G. Brecchia, C. Boiti, 2013, Power and pulsed Doppler evaluation of ovarian hemodynamic changes during diestrus in pregnant and nonpregnant bitches: *Theriogenology*, v. 79, p. 219-224.
- Pretzer, S. D., R. K. Lillich, and G. C. Althouse, 2006, Single, transcervical insemination using frozen-thawed semen in the Greyhound: A case series study: *Theriogenology*, v. 65, p. 1029-1036.
- Reynaud, K., A. Fontbonne, N. Marseloo, C. de Leseugno, M. Saint-Dizier, S. Chastant-Maillard, 2006, In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: A review: *Theriogenology*, v. 66, p. 1685-1693.
- Reynaud, K., A. Fontbonne, M. Saint-Dizier, S. Thoumire, C. Marnier, M. Tahir, T. Meylheuc, S. Chastant-Maillard, 2012, Folliculogenesis, ovulation and endocrine control of oocytes and embryos in the dog: *Reprod Dom Anim*, v. 47, p. 66-69.
- Rota, A., C. Milani, S. Romagnoli, P. Zucchini, A. Mollo, 2009, Pregnancy and conception rate after two intravaginal inseminations with dog semen frozen either with 5% glycerol or 5% ethylene glycol. *Animal Reproduction Science*.
- Steckler, D., J. O. Nöthling, and C. Harper, 2013, Prediction of the optimal time for insemination using frozen-thawed semen in a multi-sire insemination trial in bitches: *Animal Reproduction Science*, v. 142, p. 191-197.
- Suwa, Y., Y. Abe, L. Dong Soo, Y. Y. Ueta, and H. Suzuki, 2009, Individual fertility differences in the frozen-thawed spermatozoa among semen donors in the Labrador Retriever: *Reproductive Medicine & Biology*, v. 8, p. 125-129.
- Tahir, M., K. Reynaud, G. Mawa, S. Thoumire, S. Chastant-Maillard, M. Saint-Dizier, 2012, Immunolocalization of progesterone receptors in the canine oviduct around ovulation: *Reprod Dom Anim*, v. 47, p. 35-39.
- Tahir, M., S. Thoumire, M. Raffaelli, B. Grimard, K. Reynaud, S. Chastant-Maillard, 2013, Effect of blood handling conditions on progesterone assay results obtained by chemiluminescence in the bitch: *Domestic Animal Endocrinology*, v. 45, p. 141-144.
- Thomassen, R., and W. Farstad, 2009, Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation: *Theriogenology*, v. 71, p. 190-199.
- Thomassen, R., G. Sanson, A. Krogenæs, J. A. Fougner, K. A. Berg, and W. Farstad, 2006, Artificial insemination with frozen semen in dogs: A retrospective study of 10 years using a non-surgical approach: *Theriogenology*, v. 66, p. 1645-1650.
- Tsumagari, S., Y. Ichikawa, H. Toriumi, K. Ishihama, M. Morita, M. Kanamaki, and M. Takeishi, 2003, Optimal Timing for Canine Artificial Insemination with Frozen Semen and Parentage Testing by Microsatellite Markers in Superfecundity: *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 65, p. 1003-1005.

- Tsutsui, T., T. Hori, N. Kirihara, E. Kawakami, P. Concannon, 2006, Relation between mating or ovulation and the duration of gestation in dogs: *Theriogenology*, v. 66, p. 1706-1708.
- Uchoa, D. C., T. F. P. da Silva, J. d. F. S. Cardoso, A. C. M. Filho, R. P. Jucá, A. R. Silva, and L. D. Machado da Silva, 2012, Favoring the birth of female puppies after artificial insemination using chilled semen diluted with powdered coconut water (ACP-106c): *Theriogenology*, v. 77, p. 1959-1963.