

**IDENTIFICACIÓN DE HEMBRAS CANINAS DOMÉSTICAS EN ESTRO
MEDIANTE LA OBSERVACIÓN DE CRISTALIZACIÓN DE LA SALIVA
COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO COMPLEMENTARIO COMPARADO
CON CITOLOGIA VAGINAL**

FRANCISCO ESTEBAN NARVÁEZ ORTIZ



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN ESTRUCTURADO DE MANERA
INDEPENDIENTE COMO PRERREQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO
DE MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

AMBATO – ECUADOR

2015

RESUMEN EJECUTIVO

El trabajo de investigación denominado, “Identificación del estro en hembras caninas domésticas, mediante la observación de la cristalización de la saliva como método diagnóstico complementario comparado con citología vaginal”, se realizó con el propósito de dar una solución alternativa al problema de determinación del estro en hembras caninas, el método puesto a prueba fue el de cristalización de saliva comparado con citología vaginal, el estudio se realizó en las instalaciones del Hospital Clínico Veterinario Chile y la Clínica Veterinaria Vida Animal ubicadas en el sector centro norte de la ciudad de Ambato, en los cuales se obtuvieron muestras de mucosa vaginal y saliva para su análisis mediante frotis y observación directa al microscopio respectivamente, las dos muestras fueron analizadas el mismo momento y se realizó 2 tomas adicionales con un intervalo de 1 día entre cada obtención, esto fue obtenido de 30 pacientes hembras caninas que presentaron signos de proestro y se encontraban dentro de los parámetros fisiológicos normales.

Para evaluar la muestra de mucosa vaginal obtenida mediante un hisopado vaginal se realizó un frotis en portaobjetos, utilizando Tinción de Wright como colorante, mientras que para la muestra de saliva, que fue obtenida directamente de la cavidad bucal del paciente, se fija la muestra a temperatura ambiente durante 60 segundos, y se precede a su observación en el microscopio.

Se utilizó el análisis estadístico de t mediante el cual se pudo comparar si existe diferencia entre los dos métodos utilizados, la prueba estadística de t realizada para la primera muestra, determina que no existe diferencia significativa entre los dos métodos por lo tanto el método de cristalización de saliva es factible en esta etapa, para la muestra número 2 realizada el 3er día se obtiene un resultado similar con un valor estadístico de t de 1,43 que se encuentra dentro del rango, demostrando que el método evaluado sigue siendo confiable, mientras que para la muestra número 3 realizada al 5to día se obtuvo un valor estadístico de t -2.79 que queda por fuera del rango, dando como resultado una diferencia entre ambos métodos, con los resultados obtenidos en las 3 muestras se obtienen 2 resultados similares entre ambos métodos y 1 resultado desigual por lo que se asignaría un 66.6% de fiabilidad al método de determinación de estro mediante la observación de la cristalización de la saliva.

En conclusión, se determinó que el método de cristalización de saliva se considera factible para la aproximación hacia la determinación del estro en hembras caninas domésticas teniendo en cuenta que el método estudiado muestra una ligera diferencia en la última muestra obtenida.

INDICE DE CONTENIDO

CAPITULO I

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.2. ANÁLISIS CRÍTICO Y SUBJETIVO DEL PROBLEMA	2
1.3. JUSTIFICACIÓN	2
1.4 OBJETIVOS	3

CAPITULO II

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	4
2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES	5
2.2.1. Ciclo estral en hembras caninas domésticas	5
2.2.2. Características y composición de la saliva	9
2.2.3. Cristalización de saliva	10
2.2.3.1 <i>Tipos de Cristalización</i>	11
2.2.3. Citología vaginal	13
2.2.3.1. <i>Fundamento de la citología vaginal</i>	13
2.2.3.2. <i>Toma de muestras</i>	13
2.2.3.4. <i>Observación e interpretación de los resultados</i>	15
2.3 HIPÓTESIS	19
2.4 VARIABLES DE LA HIPÓTESIS.	19
2.5 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	20

CAPITULO III

3.1. ENFOQUE.	23
3.2. MODALIDAD	23
3.3. TIPO DE INVESTIGACIÓN	23
3.4. UBICACIÓN DEL ENSAYO	23

3.5. CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR	24
3.5.1 Clima	24
3.5.2. Descripción de recurso animal	24
3.6. FACTORES DE ESTUDIO	24
3.6.1. Cristalización de Saliva	24
3.6.2. Citología exfoliativa vaginal	25
3.6.2.1 <i>Túnica muscular</i>	25
3.7. POBLACION Y MUESTRA	26
3.7.1. Características del universo	26
3.7.2. Población	26
3.7.3. Muestra	26
3.8. MATERIAL EXPERIMENTAL	27
3.9. MATERIALES DE CAMPO	27
3.10. MATERIALES DE ESCRITORIO	27
3.11. DATOS A RECOLECTAR	27
3.11.1 Peso del animal	27
3.11.2 Revisión de Signos Vitales	27
3.11.3 Toma de la muestra de saliva	27
3.10.4 Toma de Muestra para realización de citología vaginal	29

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION	31
4.1 ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS	31
4.2 VERIFICACION DE LA HIPOTESIS	42

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
5.1 CONCLUSIONES	43
5.2 RECOMENDACIONES	44

CAPITULO IV

PROPUESTA	45
6.1 TEMA	45
6.2 OBJETIVOS	45
6.2.1 Objetivo General	45
6.2.2 Objetivos Específicos	45
6.3 JUSTIFICACIÓN	45
6.4 MANEJO TECNICO	46
Toma de Muestras	46
Extracción de la muestra de la saliva	46
Manejo de la Muestra	46
Colocación de la muestra en el portaobjetos	46
Interpretación	47
Observación de la muestra en el Microscopio	47
ANEXOS	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	
Representación de los cambios físicos producidos durante el proestro y el estro.	7
Figura 2.	
Ilustración de los cambios hormonales producidos durante el estro y el proestro.	8
Figura 3.	
Cristal tipo A	11
Figura 4.	
Cristal tipo B.	11
Figura 5.	
Cristal tipo C.	12
Figura 6.	
Secuencia del correcto hisopado de la vagina en las perras.	14
Figura 7.	
Tipos celulares epiteliales a reconocer durante un hisopado vaginal.	15
Figura 8.	
Imagen citológica de proestro. Células epiteliales parabasales e intermedias en presencia de eritrocitos y algunos neutrófilos. Las células epiteliales comienzan a formar ángulos a medida que comienza la queratinización.	16
Figura 9.	
Imagen característica de estro. Las células epiteliales superficiales no presentan núcleo, hay presencia de bacterias y algunas células con núcleo picnótico.	17
Figura 10.	
Diestro. Células epiteliales parabasales e intermedias. Las células presentan bordes más redondeados, núcleo visible, presencia de eritrocitos y células epiteliales con neutrófilos en su interior (células metestrasales).	18
Figura 11.	
Ubicación del ensayo	23
Figura 12.	
Proceso realizado para la Visualización de la Cristalización de saliva.	28
Figura 13.	
Procedimiento para la recolección de la muestra para la realización de la citología vaginal.	30
Figura 14.	
Representación gráfica Prueba de <i>t</i> Muestra 1	35
Figura 15.	
Representación muestra 1.	35

Figura 16.	
Representación gráfica Prueba de t Muestra 2	38
Figura 17.	
Representación de muestra 2	38
Figura 18.	
Representación gráfica Prueba de t Muestra 3	41
Figura 19.	
Representación muestra 3.	41

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	
Parámetros fisiológicos de las pacientes caninas.	31
Tabla 2.	
Resultados de las pruebas diagnósticas de cristalización de saliva y citología vaginal, en la primera toma.	33
Tabla 3.	
Prueba de t realizada en la Muestra 1.	34
Tabla 4.	
Resultados de las pruebas diagnósticas de cristalización de saliva y citología vaginal, en la segunda toma.	36
Tabla 5.	
Prueba de t realizada en la Muestra 2.	37
Tabla 6.	
Resultados de las pruebas diagnósticas de cristalización de saliva y citología vaginal, en la tercera toma.	39
Tabla 7.	
Prueba de t realizada en la Muestra 3.	39

CAPÍTULO I

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

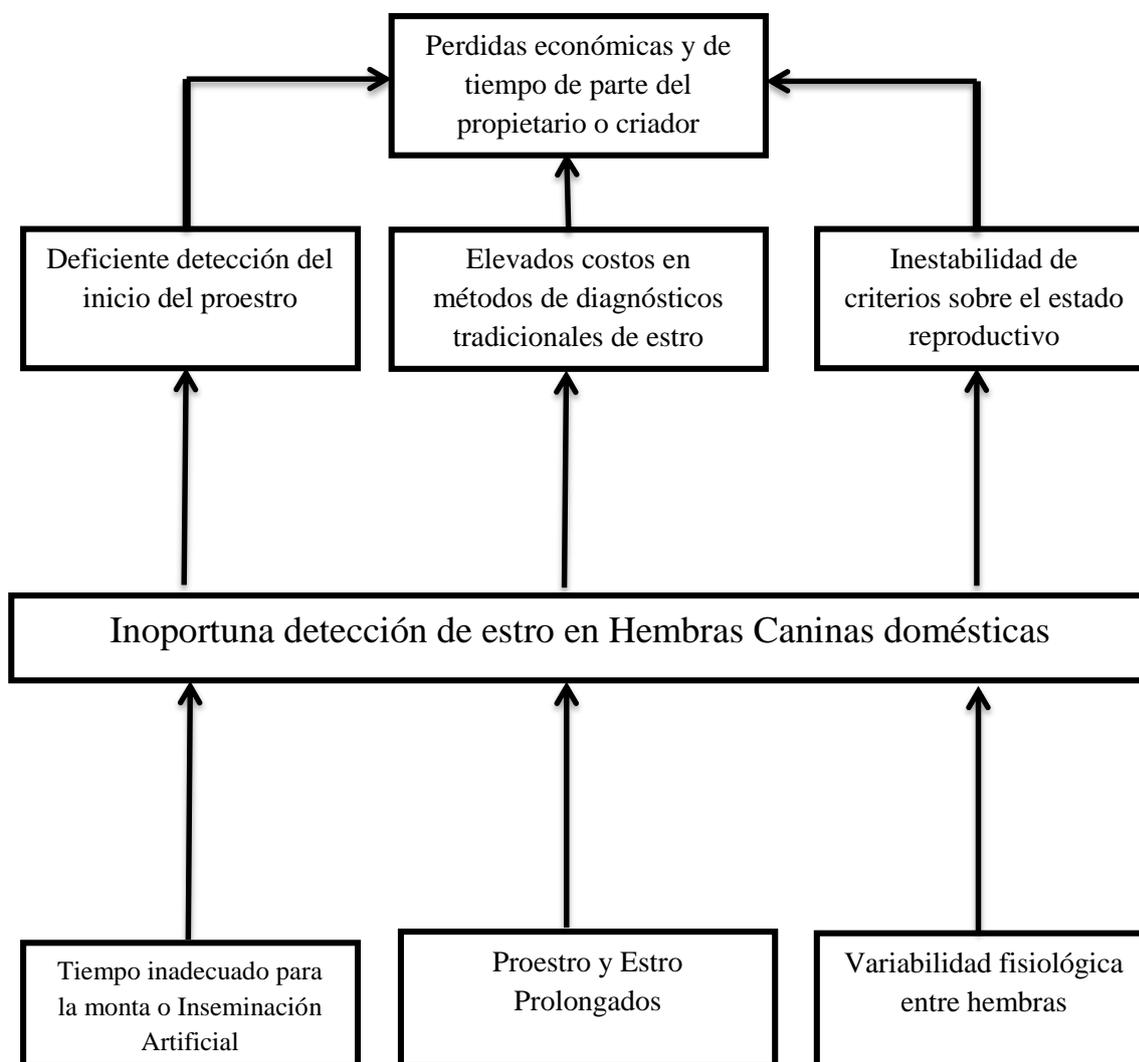
Lo que busca el estudio es comprobar la eficacia de la técnica de cristalización de saliva en comparación con el estado real de la ovulación. En la reproducción canina, uno de los problemas más comunes con el que nos encontramos, es el poder determinar el momento preciso para realizar la monta o bien para llevar a cabo la inseminación artificial debido a la gran variación que se presenta en la duración del proestro y el estro lográndose la elaboración de técnicas como la de citología vaginal exfoliativa para detectar la etapa de estro en la cual ocurre la ovulación, niveles de progesterona sérica, prueba con relaxina.

La arborización está íntimamente ligada con el nivel estrogénico que en el caso de la hembra canina alcanza su pico aproximadamente 2 días antes de la ovulación lo que hace suponer que el máximo de cristalización estará presente en el periodo ovulatorio.

Con el fin de dar una pronta solución al problema de la determinación del ciclo estral se plantea la posibilidad de realizar la técnica de la arborización de la saliva en las pacientes caninas. Se encuentra utilidad en tal estudio debido a la relación estrecha de la arborización con el nivel de estrógenos circulante, y su difusión a los líquidos celulares.

Rydberg en 1948 encuentra arborización del moco cervical humano detectando la presencia de sustancias como el cloro, sodio y la mucina lo cual resultó importante ya que cuando estas sustancias son agregadas a otros fluidos como la saliva se presenta una cristalización igual a la del moco cervical del humano, bovino y suino.

1.2. ANÁLISIS CRÍTICO Y SUBJETIVO DEL PROBLEMA



1.3. JUSTIFICACIÓN

El trabajo a desarrollarse se basa en la aplicación de una técnica rápida, eficaz y económica de diagnosticar el estro, lo que aproximará al momento de la ovulación, que indica el momento adecuado para la reproducción, se evaluará los resultados de la detección del celo mediante pruebas de cristalización de la saliva, que pueden ser observadas mediante microscopio.

De esta manera se podrá aplicar una técnica alternativa para determinar su fiabilidad y comprobar si el animal se encuentra o no listo para realizar la monta o inseminación artificial según lo amerite el caso.

El tiempo empleado en la realización de la prueba de cristalización de saliva se estima en un máximo de 5 minutos que se distribuyen entre, la toma de muestra desde la cavidad bucal de la hembra canina doméstica su colocación en un portaobjetos , posteriormente se procede a fijar la muestra mediante calor, y la observación de la muestra en el microscopio, que comparado con el método para la realización de citología vaginal que se estima en 15 minutos divididos en la toma, colocación de la muestra en el portaobjetos y tinción, observación en el microscopio; se evidencia la rapidez de la cristalización de saliva en comparación con citología vaginal.

El costo de las pruebas diagnósticas realizadas también varía ya que la cristalización de la saliva no requiere tinción y solo la utilización de un portaobjetos y su visualización en el microscopio.

Las ventajas presentadas por la cristalización de saliva, son la rapidez que posee para determinar un resultado y la mínima manipulación del paciente al momento de tomar la muestra lo que abarca el bienestar animal.

1.4 OBJETIVOS

– Objetivo General

Identificar el estro en Hembras Caninas Domésticas mediante la observación de cristalización de saliva.

– Objetivos Específicos

Identificar el grado de cristalización presente en la saliva de las hembras caninas en ciclo estral.

Determinar el tiempo óptimo de la ovulación para realizar Inseminación Artificial o monta natural.

Verificar los resultados obtenidos en las pruebas de cristalización de saliva comparada con los obtenidos en las pruebas de citología vaginal.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO E HIPÓTESIS

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Brito Cubillos en el 2009 realizó un estudio en la Universidad del Tolima acerca de la “arborización de la saliva de la perra como técnica auxiliar para el diagnóstico del ciclo estral” en el cual sus conclusiones son, que el procedimiento diagnóstico es válido por cuanto los resultados de la citología vaginal exfoliativa así lo demuestran. El protocolo se establece con una toma directa de la boca, una lectura de la placa a los 118 segundos y observación clara hasta 15 minutos después de la primera lectura.

Al realizar esta investigación es posible adentrar más en la correlación con niveles de estrógenos en sangre medidos en laboratorio. El hecho de conocer el ciclo estral de la perra hace que el diagnóstico sea más certero.(Brito Cubillos, 2009)

En otro estudio realizado en el 2010 por Pardo-Carmona B, Moyano MR, Fernández-Palacios R, Pérez-Marín CC. del Department of Animal Medicine and Surgery, University of Cordoba, Campus de Rabanales, describe el método utilizado: Se utilizaron seis perras beagle con actividad reproductiva normal . Se establecieron patrones de saliva hehecho durante pro-estro y diestro. Se utilizó Citología vaginal para determinar el tiempo de apareamiento óptimo, los niveles de progesterona (P4) y los signos de comportamiento.

Resultados: Los diferentes patrones de cristalización puntuaban de 0 a 2. A pesar de las variaciones en la cristalización de la saliva se observaron durante la fase folicular del ciclo estral en las perras, la prueba no resultó exacta; la sensibilidad de la prueba fue del 40,6%, es decir, demasiado baja para discriminar de manera fiable el período fértil, mientras que la especificidad fue del 86,1%.

Significado Clínico: Esta prueba podría ser utilizada para complementar otros métodos para determinar el período fértil en las hembras, pero su capacidad potencial aún no se ha demostrado.

2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES

2.2.1. Ciclo estral en hembras caninas domésticas

La perra, desde el punto de vista reproductivo, se define como una especie con ciclo sexual monoestríco de ovulación espontánea. El intervalo interestro, definido como el tiempo desde el comienzo de un ciclo estral hasta el inicio del próximo, posee una duración variable de entre 5-11 meses.

En este sentido, las perras presentan un intervalo interestro mínimo 120 días que se corresponde con la fase luteal.

Nuestras perras domésticas suelen presentar 2 ciclos estrales al año, variando entre 1 y 3 ciclos al año según la raza, la edad y el individuo, por lo que pasa gran parte del año en reposo sexual.

Así, las hembras de raza Rottweiler parecen estar predispuestas a manifestar intervalos interestro cortos, mientras que las de raza Basenji y Galgos y otros cánidos silvestres normalmente tienden a mostrar intervalos interestro largos (de 10 a 12 meses). (Gobello C, De la Sota RL, Goya. 2001)

El ciclo estral de la perra, con una duración media de 18 días, está constituido por 4 fases (proestro, estro, diestro y anestro). Generalmente el inicio de la fase proestral se corresponde con el inicio del ciclo reproductivo.

El proestro, fase de incremento de la actividad folicular ovárica que precede al estro, muestra una duración media de 6-11 días (rango de 2-3 hasta 25 días según Bell and Christie en 1971). Durante esta fase, bajo estimulación estrogénica se producen una serie de cambios físicos evidentes tales como la aparición de una secreción vulvar serosanguinolenta procedente del útero, una tumefacción vulvar y atracción del macho como consecuencia de la liberación de feromonas a través de la secreción vaginal, rectal y urinaria (Goodwin et al., 1979).

En cambio, durante esta fase de proestro, la hembra mantiene una ausencia de receptividad sexual, reaccionando al cortejo con manifestaciones vocales o reacciones agresivas o violentas.

Durante el proestro los estrógenos producidos por el folículo ovárico, representan la hormona predominante, responsable de las modificaciones peculiares de esta fase. El pico de estrógenos se produce 24-48 horas antes del inicio del estro, niveles que durante esta fase sufrirán una disminución progresiva hasta caer abruptamente en el proestro tardío (Concannon et al., 1975; Olson et al., 1982), estimulando un pico en la concentración de hormona luteinizante (LH) y la posterior ovulación (Wildt et al., 1979). La concentración de progesterona, mínima durante toda la fase proestral (<0.5-1ng/ml), tiende a superar los niveles basales coincidiendo con el descenso de los niveles de estrógenos y el pico de LH ovulatoria, consecuencia de la luteinización preovulatoria de las células foliculares (Handley, 1975; Wildt et al., 1979).

Las concentraciones de las gonadotropinas (FSH y LH) son reducidas durante el proestro para incrementar hasta niveles máximos al inicio del estro (Olson et al., 1982), induciendo la ovulación.

El estro muestra una duración media de 5-10 días (rango de 2-20 días según Bell and Christie en 1971). Se estima como la fase de receptividad sexual positiva, de tal manera que se considera como inicio del estro el primer día en el que la hembra acepta el coito con el macho. Las manifestaciones clínicas se caracterizan por la aceptación pasiva o activa del macho, desviando la cola y adoptando una postura de lordosis.

Además, se registra una disminución del edema y de la secreción vulvar.

Los estrógenos alcanzan concentraciones máximas 24-48 horas antes del inicio del estro, niveles que ejercen una acción "feed-back" positiva sobre el hipotálamo e hipófisis, induciendo la secreción en pico LH (de 7 a 50ng/ml), típico del inicio de la fase estral. La presencia de una onda de LH alargada, con una duración de 48-96 horas, induce la ovocitación en aproximadamente 2 o 3 días tras este pico preovulatorio de LH (Phemister et al., 1973; Wildt et al., 1978).

Los oocitos son liberados a trompas uterinas en estado inmaduro, como oocitos primarios, por lo que deben madurar para poder ser fertilizados por el espermatozoide. Este proceso de maduración, consistente en la extrusión del primer cuerpo polar y la culminación completa de la primera división meiótica, culminará en 2-3 días tras la ovulación, convirtiéndose así en oocito secundario. Por otra parte, esta fase se caracteriza por una elevación de los niveles plasmáticos de progesterona (hiperprogesteronemia), iniciada desde finales del proestro y mantenida durante todo el periodo estral. La concentración sérica de progesterona aproximadamente 2 días antes de la ovulación, coincidiendo con el pico de LH, es de 2 a 2.9ng/ml, mientras que esta concentración en el día de la ovulación es de 4 a 10ng/ml (Wildt et al., 1979; Johnston and Root, 1995).

El diestro, periodo de secreción de progesterona a partir de los cuerpos lúteos formados, se inicia en el momento en el que la hembra muestra un rechazo patente a la cópula. Tiene una duración variable en torno a 60-80 días (Holst and Phemister, 1974). Se caracteriza por la disminución del tamaño y el tono de la vulva y la disminución del interés mostrada por el macho.

Tras la ovulación, la formación del cuerpo lúteo induce la producción continua de progesterona, con o sin gestación, con un pico máximo a los 20-30 días del pico de LH y una posterior disminución gradual durante los siguientes 40-60 días. En perras gestantes, la progesteronemia cae de forma llamativa para iniciar el parto, el cual no sucede hasta que la progesterona sea inferior a 2ng/ml.

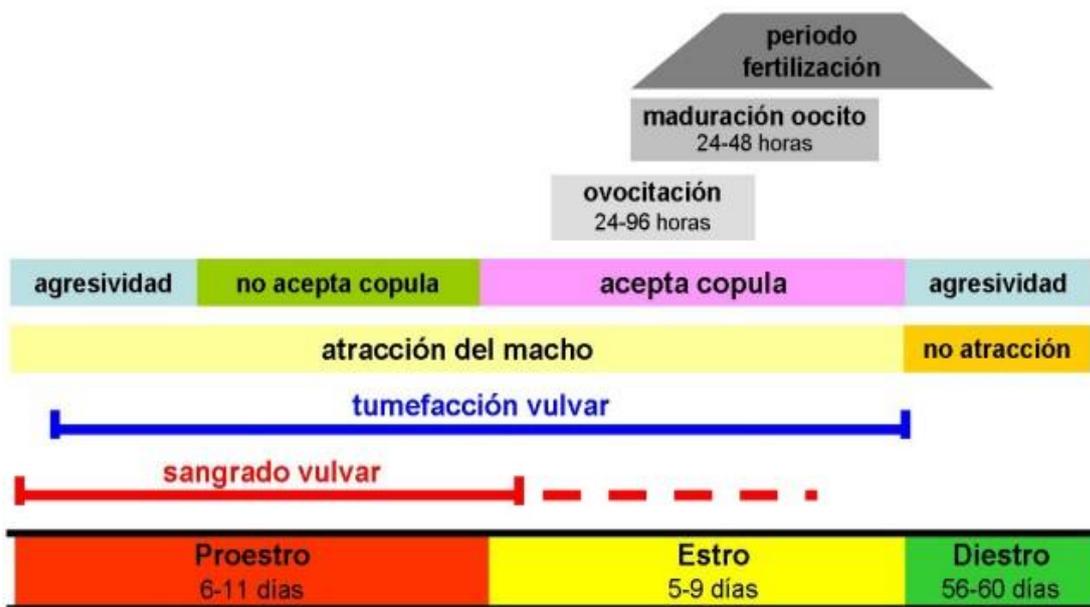
La prolactina está presente y es necesaria durante la fase luteal, incrementándose mucho más en respuesta a la caída de la progesterona al final del diestro y promoviendo el comienzo y mantenimiento de la lactación.

El anestro, periodo quiescente del ciclo reproductivo de la perra, muestra una duración mínima de 7 semanas y máxima 1 año (Andersen and Wooten, 1959). Clínicamente es un periodo de inactividad que se caracteriza por la no atracción del macho y el rechazo a la cópula, junto a la presencia de una vulva pequeña y con ausencia de secreción. Desde el punto de vista endocrino, la actividad hormonal continúa.

Como en otras especies, la secreción pulsátil de LH ocurre esporádicamente a lo largo del anestro, apreciándose un pico de LH precediendo al proestro y un segundo precediendo a la ovulación. La FSH tiende a aumentar durante el anestro, mientras que la progesterona disminuye hasta niveles basales (Jeffcoate, 1992).

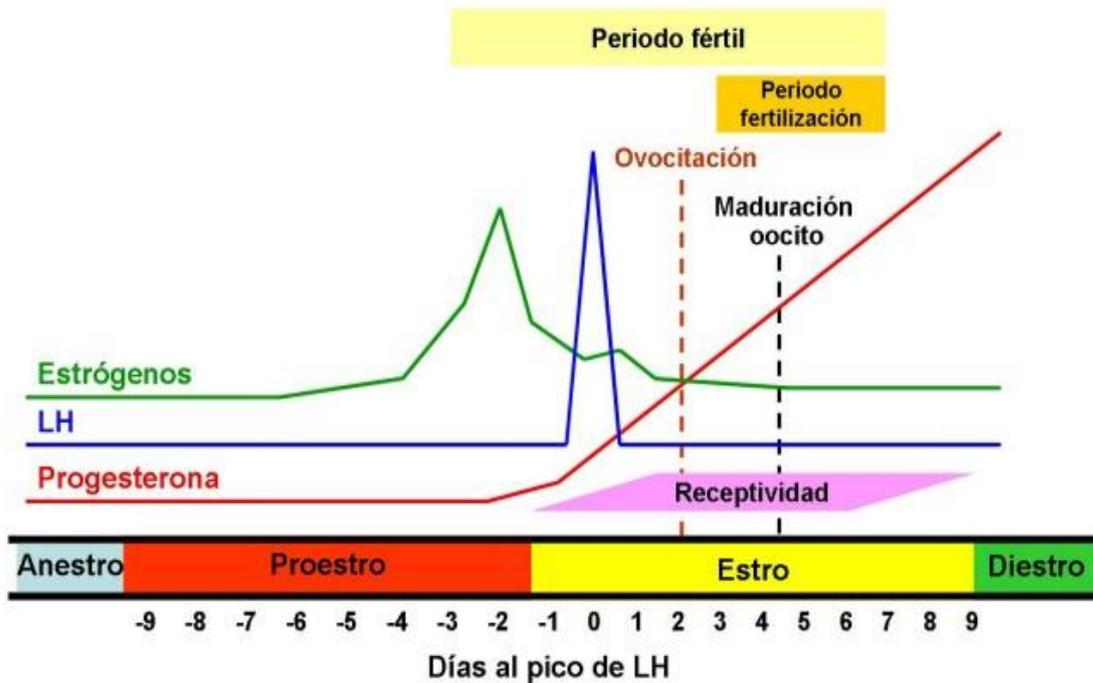
La concentración de estrógeno fluctúa durante todo el anestro como consecuencia de la existencia de oleadas de desarrollo folicular.

Figura 1. Representación de los cambios físicos producidos durante el proestro y el estro.



Fuente: M. Root, Kustritz Reproducción Clínica de Caninos y Felinos.

Figura 2. Ilustración de los cambios hormonales producidos durante el estro y el proestro.



Fuente: M. Root, Kustritz Reproducción Clínica de Caninos y Felinos.

Muchos criadores confían en el recuento de los días desde el inicio del proestro, y creen que las perras ovulan siempre en un número determinado de días desde este evento (aproximadamente 12 días desde el inicio del proestro).

Sin embargo, esto no es cierto y el rango de ovulación puede variar tanto como que una perra ovule el día 5 de proestro y otra lo haga el 30. Por lo tanto, el apareamiento en los días 12 y 14 del ciclo, lo que es común en la práctica reproductiva, no siempre culmina en gestación. A lo expuesto, debemos sumar que en la perra a menudo existe una pobre correlación entre los eventos endocrinos y los comportamentales, hecho que impide usar los signos conductuales para determinar el momento óptimo de cubrición.

Visto el reducido número de ciclos estrales manifestados por la perra a lo largo del año, se hace necesario el uso de varias evaluaciones clínicas en el manejo reproductivo de la perra, y poder, a través de ellas, determinar el momento de ovulación y el momento ideal de cubrición. (Root Kustritz MV, 2007)

2.2.2. Características y composición de la saliva

La saliva es un líquido transparente y de viscosidad variable, lo cual se atribuye al ácido siálico. Es inodora como el agua.

La composición y pH de la saliva varían en función de los estímulos (como el olor o la visión de la comida). El pH salival normal oscila entre 6,5 y 7.

La composición de la saliva es similar a la del plasma y se caracteriza por los siguientes componentes:

- **Agua:** Representa un 99,5 %. Permite que los alimentos se disuelvan y se pueda percibir su sabor a través del sentido del gusto.
- **Iones cloruro:** Activan la amilasa salival o ptilina.
- **Bicarbonato y fosfato:** Neutralizan el pH de los alimentos ácidos y de la corrosión bacteriana.
- **Moco:** El contenido de mucina, glicoproteína fundamental de la saliva, produce la viscosidad necesaria para funciones lubricantes y de formación del bolo alimenticio que facilita la deglución a lo largo del tubo digestivo, sin dañarlo.
- **Lisozima:** Es una sustancia antimicrobiana que destruye las bacterias contenidas en los alimentos, protegiendo en parte los dientes de la caries y de las infecciones.
- **Enzimas:** Como la ptilina, que es una amilasa que hidroliza el almidón parcialmente en la boca, comenzando la digestión de los hidratos de carbono. La lipasa lingual inicia también la digestión de grasas.
- **Estaterina:** Con un extremo amino terminal muy ácido, que inhibe la precipitación de fosfato cálcico al unirse a los cristales de hidroxiapatita. Además, también tiene función antibacteriana y antifúngica.
- **Otras sustancias:** La saliva contiene también inmunoglobulinas específicas, transferrina y lactoferrina. En el 2006 investigadores franceses del Instituto Pasteur identificaron una sustancia en la saliva humana que llamaron Oporfina, similar a la encontrada en ratas y vacas, que es hasta seis veces más potente que la morfina para calmar el dolor.
- **Calcio:** La saliva está saturada de Ca^{++} , con lo que se evita que los dientes lo pierdan y ayuda a digerir el alimento.

(Segarra E, Edgar, 2012)

2.2.3. Cristalización de saliva

El fenómeno conocido como arborización del moco cervical de la mujer fue descubierto por Papanicolaou en 1946 sirviendo como base importante para el estudio de este evento en otras especies tales como los bovinos y cerdos.

Esta cristalización se presenta después de que una muestra del moco cervical sin teñir se deja secar en un portaobjetos presentándose un patrón microscópico en forma de helecho.

Muchos investigadores han relacionado estos hallazgos con los diversos estadios del ciclo estral encontrando que existe mayor arborización durante la fase folicular del ciclo en comparación con la fase lútea del mismo alcanzando la máxima cristalización en el principio de la etapa de estro.

Las investigaciones realizadas por grupos internacionales como el Natural Family Planning (NFP) han sido encaminadas para lograr obtener un método eficaz para detectar el periodo de fertilidad de las mujeres encontrándose que el nivel de arborización del moco cervical está altamente correlacionado con los niveles séricos de estrógenos, que como se sabe, son los responsables de la manifestación de los signos clínicos de estro en las especies domésticas.

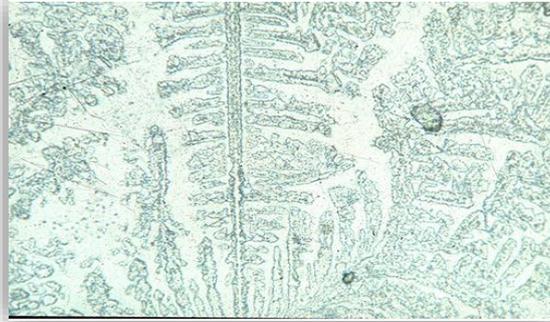
En la reproducción canina uno de los problemas más comunes con el que se encuentra el médico veterinario así como los propietarios de perras es el poder determinar el momento preciso para realizar la monta o bien para llevar a cabo la inseminación artificial debido a la gran variación que se presenta en la duración de las etapas del ciclo estral lográndose la elaboración de técnicas como la de citología vaginal exfoliativa para detectar la etapa de estro en la cual ocurre la ovulación.

(Lezama,H.J, 1985)

2.2.3.1 Tipos de Cristalización

La arborización se ha clasificado en tres tipos de acuerdo al momento de su presentación:

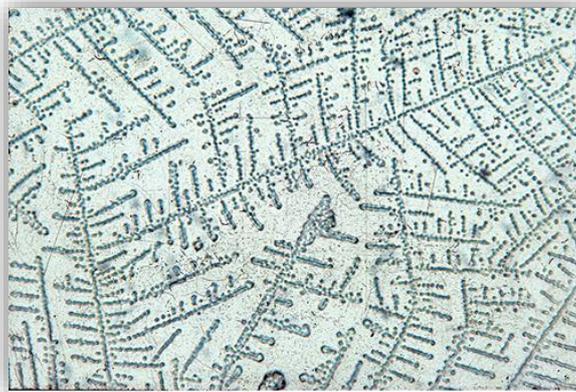
Figura 3. Cristal tipo A



(MVZ MPA Carlos Esquivel Lacroix)

a.- TIPO A: Son helechos abundantes anchos y grandes, se presentan en el máximo nivel estrogénico (principio del estro).

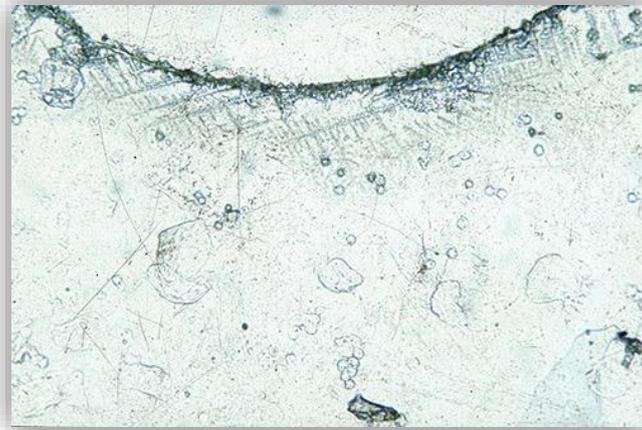
Figura 4. Cristal tipo B.



(MVZ MPA Carlos Esquivel Lacroix)

b.- TIPO B: Son helechos más delgados que el tipo A que se acomodan de manera longitudinal se presentan cuando hay descenso de Estrogenos. (mitad del estro).

Figura 5. Cristal tipo C.



(MVZ MPA Carlos Esquivel Lacroix)

c.- TIPO C: Son helechos muy pequeños casi fragmentos y se presentan cuando hay dominancia de progesterona.(final del estro).

Como ya se mencionó la arborización está íntimamente ligada con el nivel estrogénico que en el caso de la hembra canina alcanza su pico aproximadamente 2 días antes de la ovulación lo que hace suponer que el máximo de cristalización estará presente en el periodo ovulatorio.

Estudios realizados para la detección de hormonas esteroides han postulado que más del 95 % de los estrógenos (E2) circulantes se encuentran unidos a proteínas y que estas moléculas son eficientemente secuestradas para su destrucción en el hígado sin embargo los estrógenos fisiológicamente libres difunden con facilidad a todos los líquidos secretados intercelularmente como es el caso de la saliva (lo cual es aplicable a la mayoría de las hormonas esteroides) donde se han encontrado niveles de 2 – 11pg/ml durante la fase folicular del ciclo menstrual y niveles de .8 – 8 pg/ml durante la fase lútea recordando que una de la funciones de los E2 es regular la retención del fósforo y sodio además de provocar la acumulación de líquido en los tejidos y la excreción del potasio lo que resulta en la hipótesis de que la arborización de la saliva y del moco cervical son cristales de sodio, cloro ó potasio.

(MVZ MPA Carlos Esquivel Lacroix 2006)

2.2.3. Citología vaginal

La citología vaginal es un método de simple realización, orientativa para determinar en que etapa del ciclo estral se encuentra la perra.

Otras utilidades incluyen la predicción de la fecha probable de parto, ayuda en la determinación de problemas de infertilidad, diagnóstico de vaginitis, tumores vaginales, piómetra y metritis aguda, y orientación para la utilización de anticonceptivos en el momento adecuado del ciclo. (Hiemstra M, Shaefers-Okkens AC, Teske E, et al, 2001.).

2.2.3.1. Fundamento de la citología vaginal

El principio de la citología vaginal exfoliativa se basa en determinar el tipo y cantidad de células de las diferentes etapas del ciclo estral, ya que los cambios hormonales que sufre la mucosa vaginal durante el ciclo estral se reflejan en la morfología de sus células epiteliales. Al inicio del ciclo, la célula epitelial está en contacto con la irrigación sanguínea.

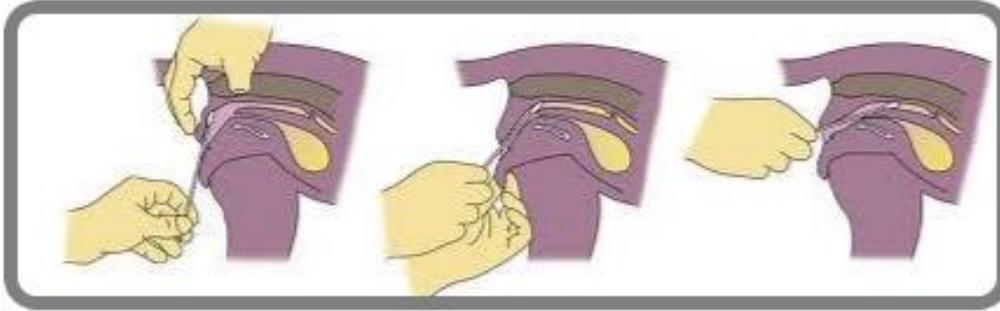
Conforme los niveles de estrógenos se incrementan, el epitelio vaginal se va engrosando ocasionando que la célula epitelial se vaya separando del aporte sanguíneo dando como resultado una transformación celular que va de célula parabasal a célula anucleada o escama. (Wolf, A.M.1994)

2.2.3.2. Toma de muestras

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

Existen técnicas de tinción como la de Papanicolau, Diff-Quick, Giemsa, Wright y Shorr que pueden ser utilizadas para teñir muestras de citología vaginal. (Goodman M 2001)

Figura 6.Secuencia del correcto hisopado de la vagina en las perras.



Fuente: Feldman, E.C.; Nelson, R. (1991) Ciclo Ovárico y Citología Vaginal. En endocrinología y reproducción canina y felina

2.2.3.3. Clasificación de las células vaginales

En cuanto al tipo de células vaginales estas se clasifican en:

Célula parabasal:

Es una célula de forma oval o redonda con núcleo aparente y pequeña cantidad de citoplasma. Esta célula se desprende de la capa de células germinales cercana a los vasos sanguíneos y predomina en el anestro y principios del proestro.

Célula intermedia:

Es una célula grande de bordes irregulares con núcleo más pequeño o más grande que la parabasal pero con mayor cantidad de citoplasma. La presencia de esta célula indica la etapa anterior a su transformación a superficial, predomina a la mitad del proestro.

Célula superficial:

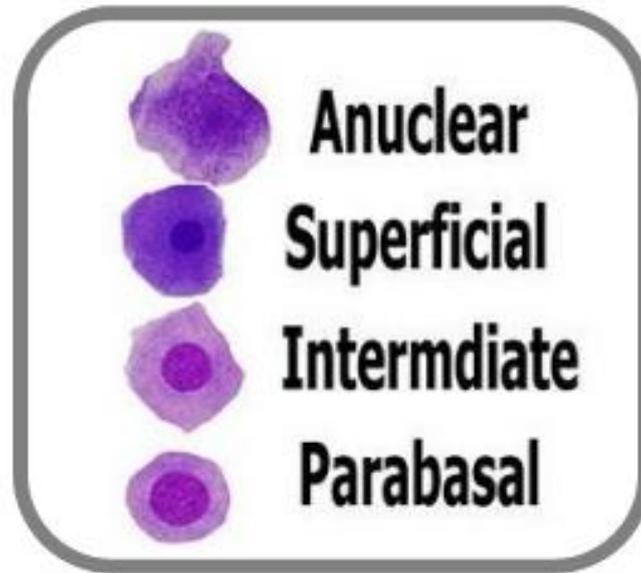
Es una célula de bordes angulosos, con núcleo de menor tamaño que las anteriores. Es característica del final del proestro y todo el estro, que es cuando la vagina se encuentra bajo la influencia del pico estrogénico.

Célula anucleada:

También se le conoce como escama, es una célula, sin núcleo, de bordes angulosos e irregulares que predomina en el estro y marca el final del proceso de descamación de la célula parabasal.

(Goodman M 2001)

Figura 7. Tipos celulares epiteliales a reconocer durante un hisopado vaginal.



Fuente: Laboratorio Patológico San Isidro 2009, Citología Vaginal.

2.2.3.4. Observación e interpretación de los resultados

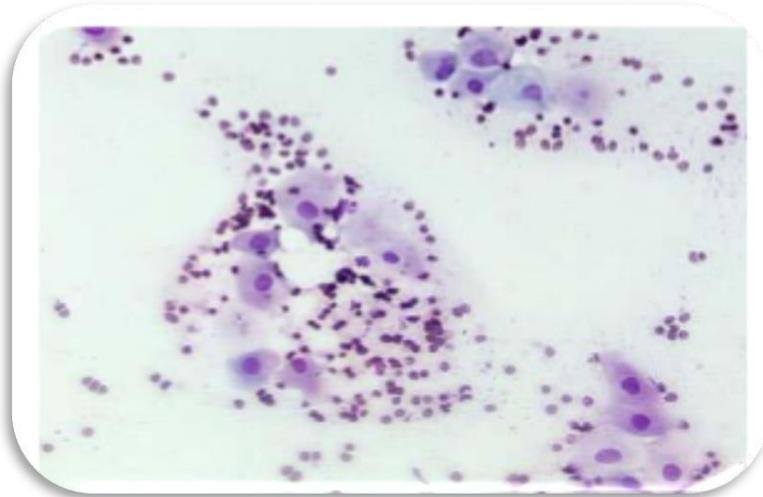
La interpretación de los extendidos se realiza de acuerdo al predominio de los distintos tipos celulares presentes, los cuales pueden ser orientativos de los diferentes momentos del ciclo estral canino. No obstante, es imprescindible hacer un seguimiento de la evolución del cuadro celular a través del ciclo estral, ya que un preparado aislado podría resultar compatible con distintos momentos del ciclo estral de la perra.

Proestro:

Duración: 9 días en promedio. Se observará un número variable de eritrocitos junto con escasas células parabasales, numerosas células intermedias y escasas células intermedias superficiales. Se puede encontrar neutrófilos en bajo número y bacterias en pequeñas o grandes cantidades. El fondo a menudo tiene aspecto sucio debido a la presencia de secreciones cervicales y vaginales viscosas. En el proestro medio desaparecen los neutrófilos (estas células entran a la luz vaginal a través del epitelio vaginal pero luego ya no pueden atravesar la pared vaginal de múltiples capas inducida por los estrógenos). Los neutrófilos no deberían ser observados nuevamente hasta el diestro. El número de células parabasales e intermedias pequeñas disminuye y son reemplazadas por células intermedias grandes e intermedias superficiales. Los eritrocitos pueden o no estar presentes y el fondo es sucio o claro.

En el proestro tardío, más del 80% de las células vaginales son superficiales con núcleos picnóticos o son superficiales anucleadas. (Goodman M 2001)

Figura 8. Imagen citológica de proestro. Células epiteliales parabasales e intermedias en presencia de eritrocitos y algunos neutrófilos. Las células epiteliales comienzan a formar ángulos a medida que comienza la queratinización.



Fuente: Universidad Nacional del Litoral Facultad de Ciencias Veterinarias, Citología Vaginal, 2003.

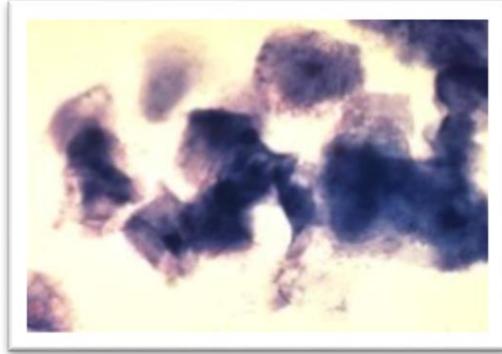
Estro:

No existen modificaciones que sugieran el pico de LH o de ovulación o el momento de la fertilización. Las células superficiales nucleadas y anucleadas (queratinizadas) o con núcleo picnótico representan más del 80% y a menudo alcanzan el 100% de las células observadas en el frotis.

No se observan neutrófilos, los eritrocitos pueden o no estar presentes y el fondo es limpio y libre de detritus celulares.

Cuando se realizan frotis seriados durante el estro, un cambio abrupto en el número relativo del tipo de células epiteliales marca el comienzo del diestro. (Goodman M 2001)

Figura 9. Imagen característica de estro. Las células epiteliales superficiales no presentan núcleo, hay presencia de bacterias y algunas células con núcleo picnótico.



Fuente: Universidad Nacional del Litoral Facultad de Ciencias Veterinarias, Citología Vaginal, 2003.

Diestro:

Duración: 56 a 58 días. Durante dicho período el número de células superficiales disminuye mientras que las células parabasales e intermedias se incrementan marcadamente. Asimismo, en los 7 -10 días iniciales del diestro reaparecen los neutrófilos en número variable.

Es importante reconocer como normal esta aparición de neutrófilos en los extendidos de diestro temprano a fin de diferenciarlo de posibles cuadros infecciosos. En algunas perras pueden no observarse los neutrófilos en frotis del diestro.

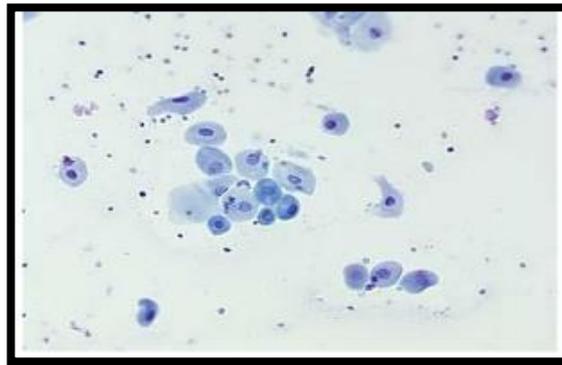
A veces pueden encontrarse células Metaestrales, que son células epiteliales vaginales con uno o dos neutrófilos en su interior. Puesto que los glóbulos rojos pueden presentarse en extendidos vaginales obtenidos durante principios del diestro, es imposible diferenciar el proestro del diestro basándose exclusivamente en la citología vaginal.

Además, luego de los primeros días del diestro, la citología vaginal es similar a la del anestro con leucocitos y eritrocitos en cantidades escasas y las células epiteliales corresponden a intermedias y parabasales. (Lezama,H.J.)

El conocimiento de las características del ciclo reproductivo canino es de suma utilidad para:

- Determinar el día de mayor fertilidad ya sea para implementar servicio natural o inseminación artificial.
- Determinar el primer día del diestro y así aproximar la fecha probable de parto.
- Aproximar el diagnóstico y evaluar las posibilidades terapéuticas de las diversas enfermedades reproductivas.
- Realizar un adecuado manejo del ciclo estral, ya sea para prevenir como para inducir ciclos fértiles.

Figura 10. Diestro. Células epiteliales parabasales e intermedias. Las células presentan bordes más redondeados, núcleo visible, presencia de eritrocitos y células epiteliales con neutrófilos en su interior (células metestrales).



Fuente: Universidad Nacional del Litoral Facultad de Ciencias Veterinarias, Citología Vaginal, 2003.

Anestro:

Se caracteriza por un predominio de células parabasales y de células intermedias pequeñas.

Si bien pueden hallarse algunos neutrófilos, su número es muy inferior al observado durante el principio del diestro.

Pueden o no verse bacterias y la apariencia del fondo puede ser clara o sucia

2.3 HIPÓTESIS

Ho. La cristalización de la saliva no es un método factible y confiable para determinar el momento óptimo para realizar la monta o inseminación artificial en hembras caninas.

Ha. La cristalización de la saliva es un método factible y confiable para determinar el momento óptimo para realizar la monta o inseminación artificial en hembras caninas.

2.4 VARIABLES DE LA HIPÓTESIS.

Variable dependiente

- Determinación del grado de la cristalización de saliva como método para determinar el estro en hembras caninas

Variable independiente

- Presentación del ciclo estral en la hembra canina.
- Definición del tipo de células observadas en la muestra de citología vaginal exfoliativa.

2.5 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable dependiente

Tipo de Variable	Conceptualización	Indicadores	Ítems Básicos	Técnicas
<p>Dependiente</p> <p>Cristalización de la saliva</p>	<p>Cristalización de saliva</p> <p>Este fenómeno se produce debido a que los estrógenos (β-estradiol) presentes durante el proestro se ligan a fluidos corporales como la saliva produciendo una cristalización.</p> <p>Esta cristalización se presenta después de que una muestra sin teñir se deja secar en un portaobjetos presentándose un patrón microscópico en forma de helechito.</p>	<p>Grado de cristalización en saliva que es determinado por etapa del ciclo estral</p>	<p>TIPO A: Son helechitos abundantes anchos y grandes, se presentan en el máximo nivel estrogénico (principio del estro).</p> <p>TIPO B: Son helechitos más delgados que el tipo A que se acomodan de manera longitudinal se presentan cuando hay descenso de Estrógenos. (mitad del estro).</p> <p>TIPO C: Son helechitos muy pequeños casi fragmentos y se presentan cuando hay dominancia de progesterona. (final del estro). Ausencia de cristalización se presenta cuando el animal se encuentra en anestro.</p>	<p>Hisopado bucal</p>

Variable independiente

Tipo de variable	Conceptualización	Indicadores	Ítems Básicos	Técnicas
Independiente Estro en hembras caninas domésticas	Estro Se estima como la fase de receptividad sexual positiva, de tal manera que se considera como inicio del estro el primer día en el que la hembra acepta el coito con el macho. Las manifestaciones clínicas se caracterizan por la aceptación pasiva o activa del macho, desviando la cola y adoptando una postura de lordosis.	Hembras Caninas Domésticas en ciclo estral Positivas a estro Negativas a estro	Número de Positivos Número de Negativos	Observación de frotis por de medio de microscopia
Independiente Citología vaginal	La citología vaginal exfoliativa se basa en determinar el tipo y cantidad de células de las diferentes etapas del ciclo estral, ya que los cambios hormonales que sufre la mucosa vaginal durante el ciclo estral se reflejan en la morfología de sus células epiteliales. Al inicio del ciclo, la célula epitelial está en contacto con la irrigación sanguínea.	Valoración de la cantidad y morfología de células presentes en la mucosa vaginal	CÉLULAS PARABASALES Las células parabasales son las células más pequeñas que se encuentran de manera rutinaria en un hisopado vaginal. Son de forma redondeada con un núcleo grande y una relación núcleo: citoplasma alta. Son células de tamaño uniforme que se observan en los periodos de proestro temprano, diestro y anestro.	Hisopado de la mucosa vaginal

		<p>CÉLULAS INTERMEDIAS</p> <p>Son células parabasales intermedias con un tamaño mayor (muchas veces el doble) al de las células parabasales. Presentan un aumento en el tamaño del citoplasma más no del núcleo por lo que la relación núcleo: citoplasma baja. El citoplasma puede tornarse de un azul grisáceo pálido con ligeras irregularidades por la keratinización temprana. Éste proceso se hace más evidente a medida que pasa el tiempo y se acerca el periodo estral.</p> <p>CÉLULAS SUPERFICIALES</p> <p>Estas células se observaran en el estro, son células grandes con un núcleo pequeño que se ha reducido de tamaño y a medida que siguen madurando lo pierden por completo. El citoplasma es amplio con muchas irregularidades y dobleces. En su estado más maduro presentan ausencia total de núcleo y es el estadio más tardío de las células epiteliales vaginales.</p>	
--	--	--	--

CAPITULO III

METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION

3.1. ENFOQUE.

El enfoque de la investigación es predominantemente cualitativa explicativa.

3.2. MODALIDAD

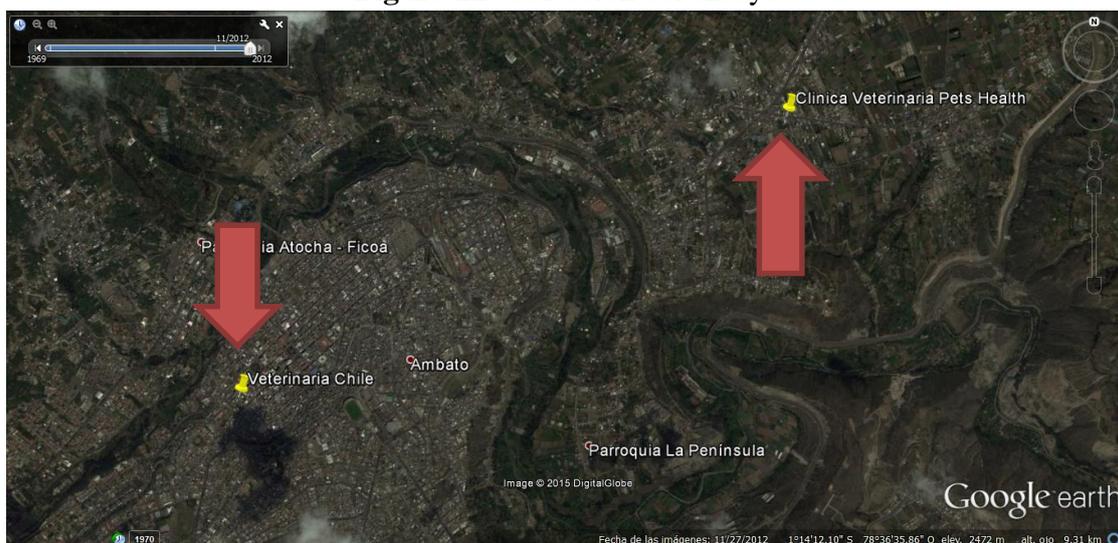
Modalidad de investigación utilizada será la investigación de campo y laboratorio.

3.3. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Investigación de tipo comparativa.

3.4. UBICACIÓN DEL ENSAYO

Figura 11. Ubicación del ensayo



Fuente: Google Earth 2012

El estudio se realizará en dos lugares los cuales comprenden el sector centro norte de la ciudad, se lo realizará en las instalaciones de la Clínica Veterinaria “Vida Animal” del Dr. Cesar Álvarez ubicada en el sector de Izamba, cantón Ambato, provincia de Tungurahua. Con una Latitud de $1^{\circ}13'35.13''S$ y Longitud de $78^{\circ}35'48.77''O$ y a una altitud de 2610 msnm.

También se realizará en el sector centro de la ciudad en el Hospital Clínico Veterinario “Chile” ubicado en las calles Sucre y Guayaquil, propiedad del Dr. Diego Gavilanes; la clínica se encuentra ubicada a una latitud $1^{\circ}14'38.56''S$ y longitud $78^{\circ}37'49.38''O$ a 2571 msnm.

3.5. CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR

3.5.1 Clima

Clima: templado

Temperatura: 10 a 25 °C

Humedad relativa: 78%

3.5.2. Descripción de recurso animal

Se utilizarán hembras caninas domésticas que acudan a la clínica con motivos relacionados con la presentación o diagnóstico del estro en el cual se evaluará las constantes fisiológicas y estado general, temperatura, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, tiempo de llenado capilar, edad, también se determinará su condición corporal y se realizará una anamnesis al propietario acerca del padecimiento de patologías anteriores relacionadas con la reproducción.

Se considerará a las hembras en buen estado fisiológico, que no hayan presentado enfermedades relacionadas con la reproducción.

3.6. FACTORES DE ESTUDIO

3.6.1. Cristalización de Saliva

La saliva es un fluido orgánico complejo producido por las glándulas salivales en la cavidad bucal, y directamente involucrada en la primera fase de la digestión.

La producción de saliva está relacionada con el ciclo circadiano, de tal manera que por la noche se segrega una mínima cantidad de saliva.

La saliva es segregada por las glándulas salivares mayores parótida y submaxilar (80%- 90%) en condiciones estimuladas, mientras que las glándulas sublinguales producen solo el 5% del total. Las glándulas menores son responsables básicamente de la secreción en reposo y contribuyen al 5% al 10% del total de saliva secretada

(Segarra E., Edgar.2012)

3.6.2. Citología exfoliativa vaginal

La túnica mucosa forma bastantes pliegues (arrugas vaginales, dependiendo la orientación de las mismas según la especie) y en ocasiones llega a cerrar por completo la luz vaginal.

Posee dos capas:

- **Epitelio:** Su diámetro oscila mucho, promedio 3 cm. En el epitelio, no mucoso, plano estratificado, existe gran cantidad de glucógeno durante la fase proliferativa o luteica, producido por células eosinófilas, cuya fermentación, producida por la flora bacteriana (bacilos de Döderlein), que lo transforma en ácido láctico, confiere el carácter ácido a la superficie del epitelio vaginal. Durante la fase secretora, el grosor de esta capa disminuye considerablemente, y su citología también cambia, dominando la situación las células basófilas, junto con leucocitos y diversas bacterias.

Es en esta fase (y no en la anterior) cuando la eyaculación masculina (a través del pene) puede producir con mucho mayores probabilidades el embarazo (concepción), pues en la fase anterior la luz vaginal se encuentra cerrada. Es, de hecho, en la fase secretora cuando se generan más infecciones (debido a la ausencia de ácido láctico).

Es posible que esta etapa «inofensiva» ayude a la supervivencia de los espermatozoides. Además, los leucocitos de la lámina propia pueden ayudar a evitar alguna infección (es posible que algún microorganismo atraviese el epitelio vaginal).

- **Lámina propia:** Es el tejido laxo conjuntivo que une el epitelio a las capas musculares. En su zona profunda existen fibras más gruesas y vasos de mayor calibre, dándose así tejido eréctil, formando esos vasos las llamadas cavernas vasculares.

(Feldman, E.C.; Nelson, R. 1991.)

3.6.2.1 *Túnica muscular*

- El músculo liso posee, a su vez, dos estratos diferenciados: uno interno, compuesto de fibras circulares, y uno externo, más grueso, compuesto de fibras longitudinales musculares también lisas.
- En cuanto al músculo esquelético, en la parte inferior existe una especie de esfínter, que cierra la vagina. Se trata de células musculares esqueléticas del músculo bulboesponjoso.

(S. Sisson y J. D. Grossman. Robert Getty. 2003)

3.7. POBLACION Y MUESTRA

3.7.1. Características del universo

El universo de esta investigación lo constituyen las hembras caninas domésticas que acuden a la consulta en las Clínicas Veterinarias “Pets Health” y “Chile” ubicadas en el sector centro norte de la ciudad respectivamente, hacia ellas acuden hembras caninas domésticas de diferentes, edades, desde neonatos hasta pacientes geriátricos.

3.7.2. Población

De acuerdo con esta investigación la población está constituida por las hembras caninas domésticas que acudan a la consulta, por motivos relacionados a la presentación de celo, las cuales se presentan una por semana en cada clínica esto por multiplicado por las cuatro semanas que contiene un mes obtenemos 4 pacientes al mes ya que la investigación está planteada para 4 meses se obtiene 16 hembras caninas en cada clínica dándonos una población de 32 pacientes.

3.7.3. Muestra

Para calcular la muestra se utilizara la siguiente formula:

$$n = \frac{N\sigma^2Z^2}{(N-1)e^2 + \sigma^2Z^2}$$

Donde:

n = el tamaño de la muestra.

N = tamaño de la población.

σ = Desviación estándar de la población, que suele utilizarse un valor constante de 0,5.

Z = Valor obtenido mediante niveles de confianza. Es un valor constante que, se lo toma en relación al 95% de confianza equivale a 1,96

e = Límite aceptable de error muestral.

$$n = \frac{32 * 0.5^2 * 1.96^2}{(32 - 1) * 0.05^2 + 0.5^2 * 1.96^2}$$

$$n = 29.61$$

$$n = 30 \text{ animales}$$

Por lo que se aproxima a 30 animales que serán tomados en cuenta para la muestra.

3.8. MATERIAL EXPERIMENTAL

- Saliva
- Microscopio
- Tinción Wright
- Agua Destilada
- Portaobjetos

3.9. MATERIALES DE CAMPO

- Hembras caninas
- Hisopos
- Guantes
- Estetoscopio
- Balanza
- Termómetro

3.10. MATERIALES DE ESCRITORIO

- Computador
- Vehículo
- Hojas de papel
- Cámara fotográfica

3.11. DATOS RECOLECTADOS

3.11.1 Peso del animal

Se tomaron los pesos de las hembras que llegan a la consulta y se determinara si su condición corporal es adecuada (C.C 3)

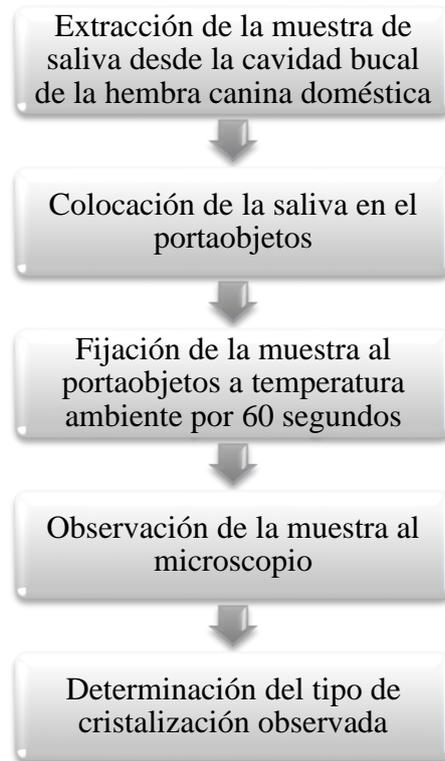
3.11.2 Revisión de Signos Vitales

Se evaluó si el estado fisiológico de la perra es adecuado y si presenta alguna sintomatología patológica, para esto se determinó la temperatura (38.5 °C), frecuencia respiratoria (10-30 respiraciones por minuto), frecuencia cardíaca (80-120 latidos por minuto), tiempo de llenado capilar (1-2 segundos), condición corporal escala de 1 a 5, coloración de mucosas siendo el normal el color rosa brillante.

3.11.3 Toma de la muestra de saliva

La muestra se tomó directamente de la cavidad bucal, en el portaobjetos para luego realizar la fijación de la muestra mediante calor y posteriormente será analizada en el microscopio.

Figura 12. Proceso realizado para la Visualización de la Cristalización de saliva.



La arborización se ha clasificado en tres tipos de acuerdo al momento de su presentación:

- a.- TIPO A: Son helechos abundantes anchos y grandes, se presentan en el máximo nivel estrogénico (principio del estro).
- b.- TIPO B: Son helechos más delgados que el tipo A que se acomodan de manera longitudinal se presentan cuando hay descenso de E2. (mitad del estro).
- c.- TIPO C: Son helechos muy pequeños casi fragmentos y se presentan cuando hay dominancia de progesterona (final del estro).

(MVZ MPA Carlos Esquivel Lacroix)

3.10.4 Toma de Muestra para realización de citología vaginal

Anatomía

Los labios vulvares cubren la fosa ventral del clítoris y el vestíbulo dorsal. El vestíbulo se orienta dorsalmente y se extiende desde la vulva hasta el orificio uretral. La vagina se encuentra craneal al orificio uretral.

Consideraciones previas al procedimiento

La vagina no es estéril. Se utiliza un aplicador con punta de algodón, no estéril humedecido con solución salina o agua corriente.

Procedimiento

Introducimos el hisopo humedecido en el punto más dorsal de la hendidura vulvar y lo orientamos hacia arriba en un Angulo de 45° , haciéndolo girar entre los dedos de ser necesario para avanzar más allá de la papila uretral, hacemos rodar el hisopo contra la superficie vaginal y lo retiramos en un movimiento.

Luego lo hacemos rodar varias veces sobre un porta objetos de vidrio limpio. Aplicamos sobre esta una tinción triple o azul de metileno nuevo.

Cuidados posteriores y complicaciones

En ocasiones, el algodón se sale de la vara del aplicador, pero se lo puede retirar fácilmente en forma digital. Ni el sitio exacto de la vagina de donde se retire la muestra ni el método de tinción alteran los resultados.

(MVZ MPA Carlos Esquivel Lacroix)

Figura 13. Procedimiento para la recolección de la muestra para la realización de la citología vaginal.



CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

A continuación se describirá todos los datos tomados de las pacientes caninas, en ellas se podrá observar que su estado fisiológico cabe dentro de los parámetros normales, como son los de temperatura, condición corporal, peso, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, tiempo de llenado capilar, coloración de mucosas así como también su raza y edad.

Además se presenta los resultados obtenidos de las pruebas diagnósticas de cristalización de saliva y citología vaginal realizadas a cada una de ellas, agrupadas de acuerdo al día en que se realizó la toma de muestra, estas estarán agrupadas en: 1ro, 2do y 3er día de toma de muestra, estas muestras se toman intercalando un día entre cada una de ellas.

La puntuación en la cristalización de saliva va de, 0 a 2 siendo el 0 igual a la cristalización tipo C que se presenta como helecchos fragmentados o ausencia de cristalización, el 1 igual al tipo B que se presenta como helecchos delgados que se acomodan de manera longitudinal y el 2 que es similar al tipo A que se presentan como helecchos abundantes grandes y anchos.

En los resultados de la citología vaginal el valor de 0 corresponde a presencia predominante de células parabasales, el valor de 1 indica que se presentan células intermedias y el valor de 2 señala presencia de células superficiales en la muestra.

Tabla 1. Parámetros fisiológicos de las pacientes caninas.

NOMBRE PACIENTE	EDAD	RAZA	W. kg	T. °C	F.C	F.R	T.LL. C (seg)	SCORE CORP.	COLORACION MUCOSAS
Sheila	6 años	Golden retriever	35	38,5	93	32	2	4	Normal
Perlita	2 años	Schnauzer	4	38,3	86	36	2	3	Normal
Cakina	2 años	Bobtail	20	38,4	78	28	2	3	Normal
Chimbi	10 años	Mestizo	7	39,2	110	44	2	4	Normal

Ratona	1 año	French Poodle	8	38,5	115	48	2	3	Normal
Rebeca	1 año 3 meses	Bulldog ingles	25	38,5	110	45	2	4	Normal
Albergue 1	3 años	Mestizo	8	39	112	40	2	3	Normal
Darla	4 años	Bulldog ingles	14	38,7	128	42	2	3	Normal
Peggi	1 año 6 meses	Mestiza	15	38,6	142	48	2	3	Normal
Cloe	1 año 3 mese	Bulldog Frances	10	38,5	125	36	2	3	Normal
Morita	1 año 2 meses	Golden retriever	18	38,8	147	46	2	4	Normal
Minnie	3 años	Shih tzu	7	38,4	138	36	2	3	Normal
Tisha	2 años 10 meses	Pastor aleman	28	38,8	142	48	2	3	Normal
Perla	2 años	French poodle	7,8	38,3	148	28	2	3	Normal
Kuky	3 años	Bulldog ingles	26	38,9	142	43	2	4	Normal
Tonka	3 años 4 meses	Pitbull	22	38,3	133	38	2	3	Normal
Lucky	2 años 9 meses	Beagle	18	38,8	122	30	2	3	Normal
Monky	3 años	Yorkshire terrier	5	38,8	139	46	2	3	Normal
Albergue 2	3 años	Mestizo	18	38,4	118	32	2	2	Normal
Loba	2 años	Akita	32	38,6	122	28	2	3	Normal
Mona	2 años 3 mese	Yorkshire terrier	4	38,3	140	42	2	3	Normal
Peggy	1 año 10 meses	Bulldog ingles	22	38,9	168	90	2	4	Normal

Lua	3 años	San Bernardo	35	38,3	110	40	2	3	Normal
Candy	3 años	Pomerania n	4	38,8	152	73	2	3	Normal
Albergue 3	2 años	Mestizo	11	38,2	170	96	2	2	Normal
Princesa	2 años	Pekines	8	39,1	166	82	2	3	Normal
Kiara	1 año 4 meses	Husky	19	38,8	150	73	2	3	Normal
Chiki	2 años	Tekel	9	38,2	138	47	2	3	Normal
Laica	3 años	Husky	22	38,8	154	96	2	3	Normal
Lazie	1 año	Husky	17	38,8	178	88	2	3	Normal

Los valores promedio obtenidos de las 30 hembras caninas utilizadas son: edad 2 años con 6 meses, peso 16kg, temperatura 38,6 °C, frecuencia cardiaca 132.5 lpm, frecuencia respiratoria 50 rpm, tiempo de llenado capilar 2 segundos, condición corporal 3.1 y coloración de las mucosas normal.

Tabla 2. Resultados de las pruebas diagnósticas de cristalización de saliva y citología vaginal, en la primera toma.

Muestra/Día 1					
Paciente	Cristalización Saliva	Citología Vaginal	Paciente	Cristalización Saliva	Citología Vaginal
1	2	2	16	0	1
2	1	1	17	2	0
3	0	0	18	1	1
4	1	1	19	1	1
5	0	0	20	2	2
6	1	1	21	0	0
7	0	0	22	0	0
8	1	1	23	0	0
9	1	2	24	0	0
10	1	1	25	0	0
11	0	0	26	0	0
12	1	1	27	2	1
13	1	1	28	2	0
14	1	0	29	0	0
15	1	1	30	2	1

Cristalización Saliva: 0= No existe cristalización

1= Cristalización leve

2= Abundante cristalización

Citología Vaginal: 0= Presencia de células parabasales

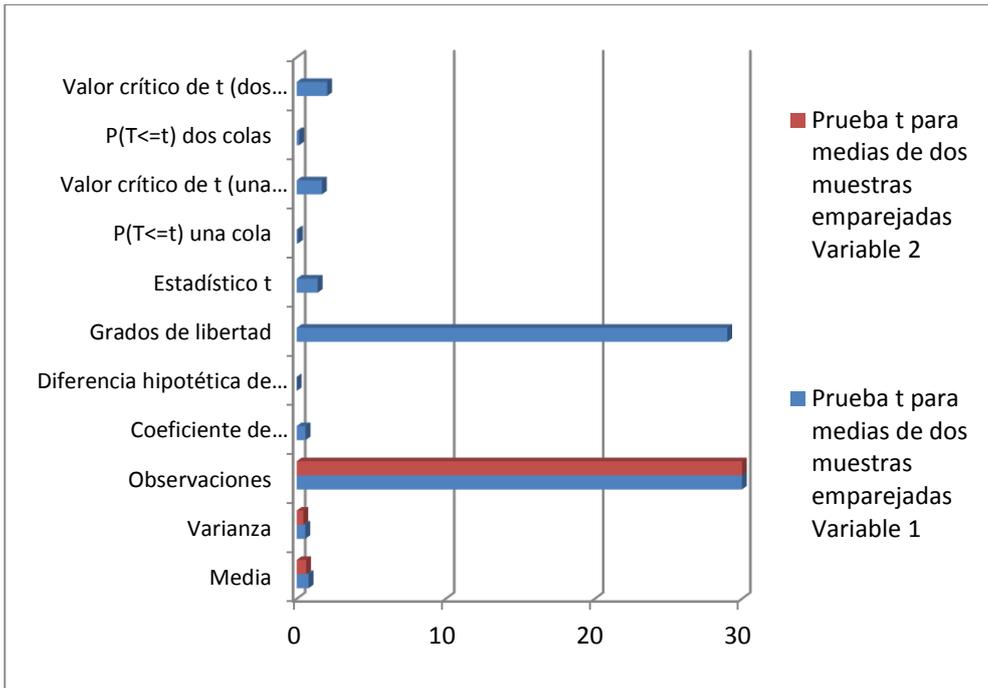
1=Presencia de células intermedias

2=Presencia de células epiteliales superficiales

Tabla 3. Prueba de t realizada en la Muestra 1.

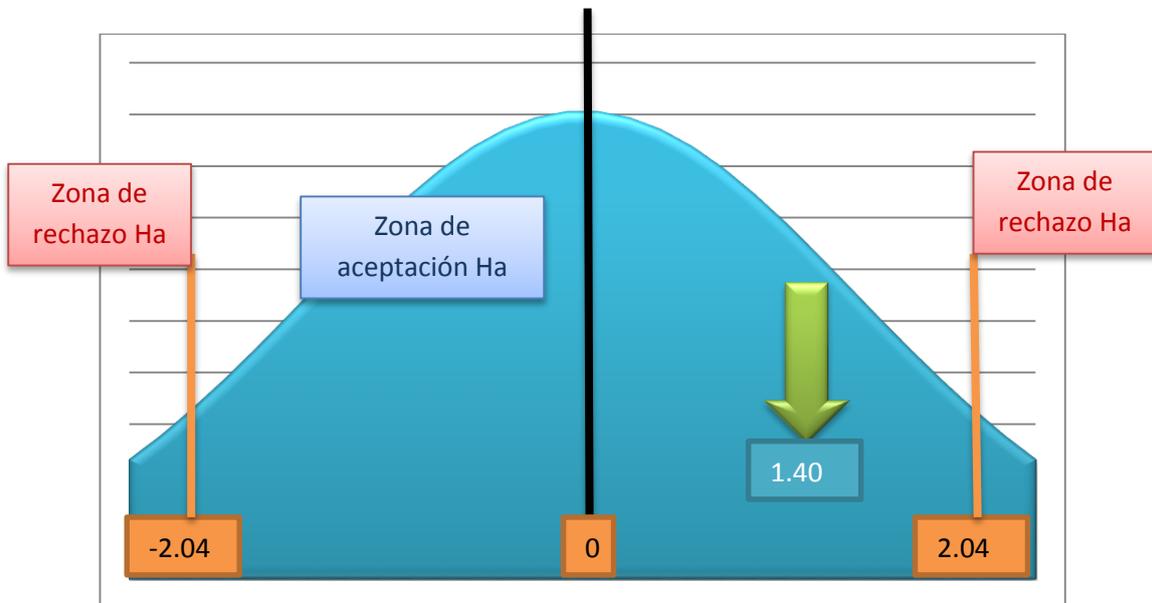
	Variable 1	Variable 2
Media	0,8	0,63333333
Varianza	0,57931034	0,44712644
Observaciones	30	30
Coefficiente de correlación de Pearson	0,59623005	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	29	
Estadístico t	1,40936204	
P(T<=t) una cola	0,08468105	
Valor crítico de t (una cola)	1,69912703	
P(T<=t) dos colas	0,1693621	
Valor crítico de t (dos colas)	2,04522964	

Figura 14. Representación gráfica Prueba de t Muestra 1



En la prueba realizada demuestra que la diferencia entre los dos métodos diagnósticos no es significativa, ya que el valor Estadístico de t 1,4093 se encuentra dentro del rango de aceptación que está dado por el Valor Crítico de t que es 2,0452.

Figura 15. Representación muestra 1.



En el gráfico se puede observar que el valor de 1.40 correspondiente al valor Estadístico de t se encuentra dentro de la zona de aceptación que está delimitada por los valores Críticos de t que son -2.04 y 2.04.

Por lo tanto según el método estadístico utilizado en este caso se aceptaría la H_a que dice:

La cristalización de la saliva es un método factible y confiable para determinar el momento óptimo para realizar la monta o inseminación artificial en hembras caninas.

Este resultado será tomado en cuenta solo para las muestras tomadas en el primer día que por lo general corresponde a inicios del proestro en el que se presenta cristalizaciones de saliva tipo C y B en menor proporción y en citología vaginal podemos observar células parabasales caracterizadas por su forma redondeada, núcleo de gran tamaño y citoplasma pequeño, acompañadas de gran cantidad eritrocitos presentes debido al sangrado.

Tabla 4. Resultados de las pruebas diagnósticas de cristalización de saliva y citología vaginal, en la segunda toma.

Muestra 2/ Día 3					
Paciente	Cristalización Saliva	Citología Vaginal	Paciente	Cristalización Saliva	Citología Vaginal
1	0	2	16	2	2
2	1	2	17	1	1
3	1	1	18	2	1
4	0	1	19	0	0
5	2	1	20	2	2
6	2	2	21	1	1
7	2	2	22	1	2
8	1	1	23	1	0
9	0	1	24	1	1
10	1	2	25	0	0
11	1	1	26	0	1
12	1	1	27	1	1
13	0	2	28	1	1
14	1	1	29	1	1
15	2	1	30	1	1

Cristalización Saliva: 0= No existe cristalización

1= Cristalización leve

2= Abundante cristalización

Citología Vaginal: 0= Presencia de células parabasales

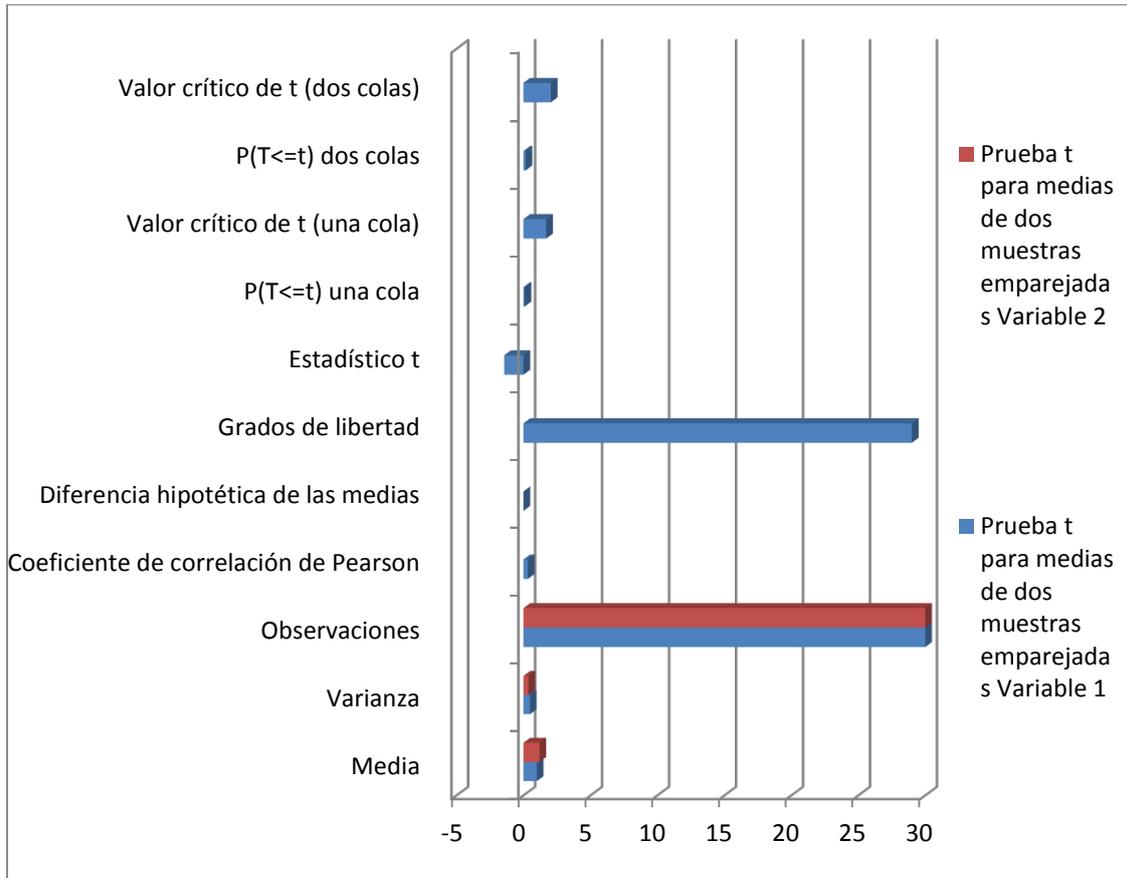
1=Presencia de células intermedias

2=Presencia de células epiteliales superficiales

Tabla 5. Prueba de t realizada en la Muestra 2.

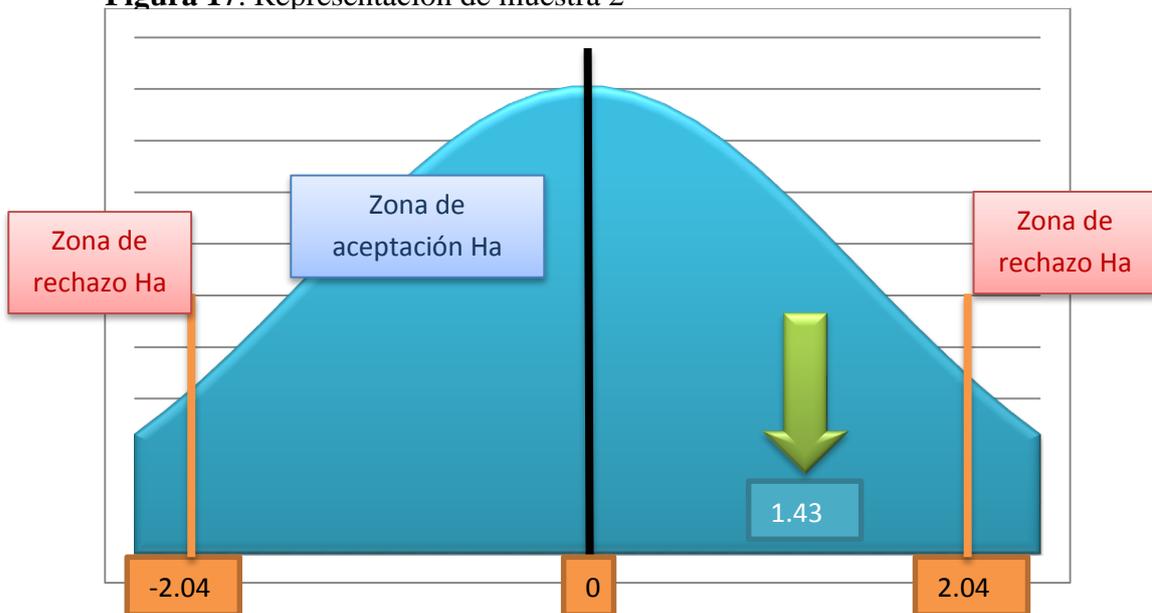
Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	1	1,2
Varianza	0,48275862	0,37241379
Observaciones	30	30
Coefficiente de correlación de Pearson	0,32530002	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	29	
Estadístico t	-1,43925	
P(T<=t) una cola	0,0803941	
Valor crítico de t (una cola)	1,69912703	
P(T<=t) dos colas	0,16078821	
Valor crítico de t (dos colas)	2,04522964	

Figura 16. Representación gráfica Prueba de t Muestra 2



En la prueba realizada demuestra que la diferencia entre los dos métodos diagnósticos no es significativa, ya que el valor Estadístico de t 1,43925 se encuentra dentro del rango de aceptación que está dado por el Valor Crítico de t que es 2,0452.

Figura 17. Representación de muestra 2



En el gráfico se puede observar que el valor de 1.43 correspondiente al valor Estadístico de t se encuentra dentro de la zona de aceptación que está delimitada por los valores Críticos de t que son -2.04 y 2.04, por lo tanto se acepta H_0 que dice: La cristalización de la saliva es un método factible y confiable para determinar el momento óptimo para realizar la monta o inseminación artificial en hembras caninas.

Tabla 6. Resultados de las pruebas diagnósticas de cristalización de saliva y citología vaginal, en la tercera toma.

Muestra 3/ Día 5					
Paciente	Cristalización Saliva	Citología Vaginal	Paciente	Cristalización de saliva	Citología vaginal
1	0	1	16	2	2
2	1	2	17	2	2
3	1	2	18	1	2
4	2	2	19	2	2
5	1	2	20	2	1
6	2	2	21	2	2
7	1	0	22	1	2
8	1	2	23	2	1
9	1	1	24	1	2
10	1	2	25	2	2
11	2	2	26	2	2
12	2	2	27	1	2
13	2	2	28	1	2
14	2	2	29	1	2
15	0	2	30	2	2

Cristalización Saliva: 0= No existe cristalización

1= Cristalización leve

2= Abundante cristalización

Citología Vaginal: 0= Presencia de células parabasales

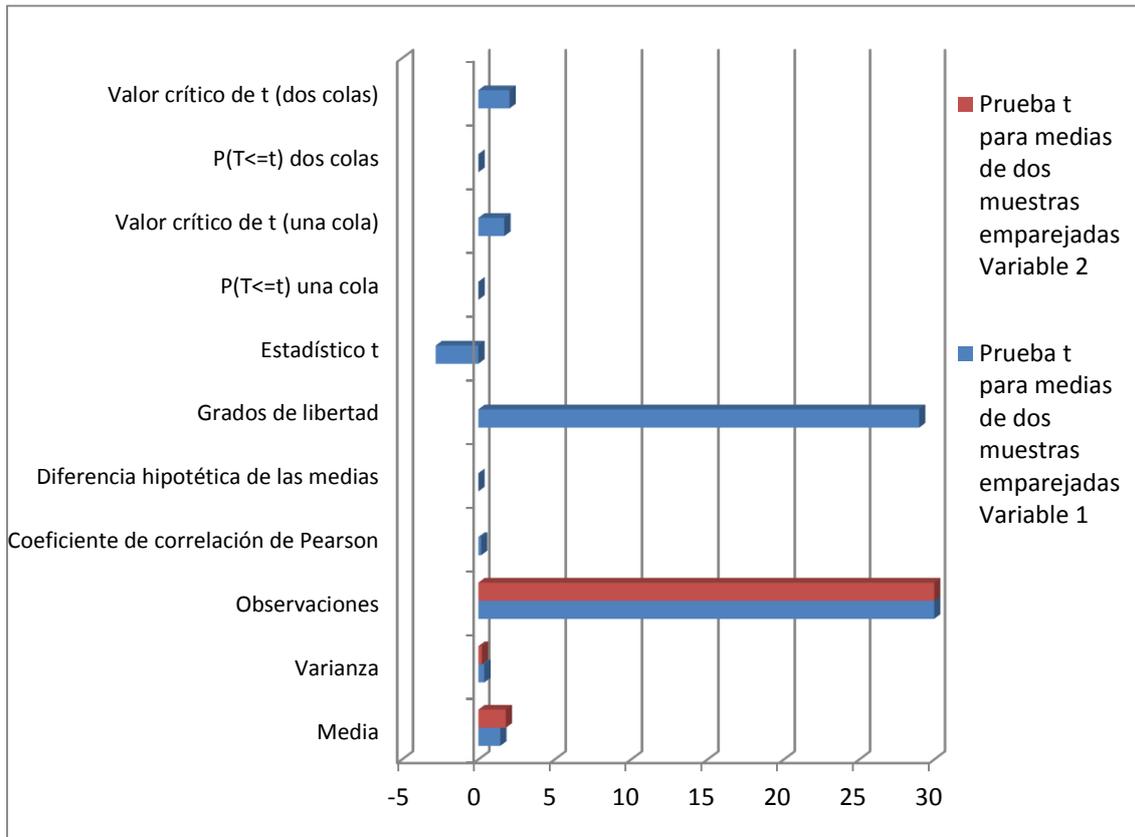
1=Presencia de células intermedias

2=Presencia de células epiteliales superficiales

Tabla 7. Prueba de t realizada en la Muestra 3.

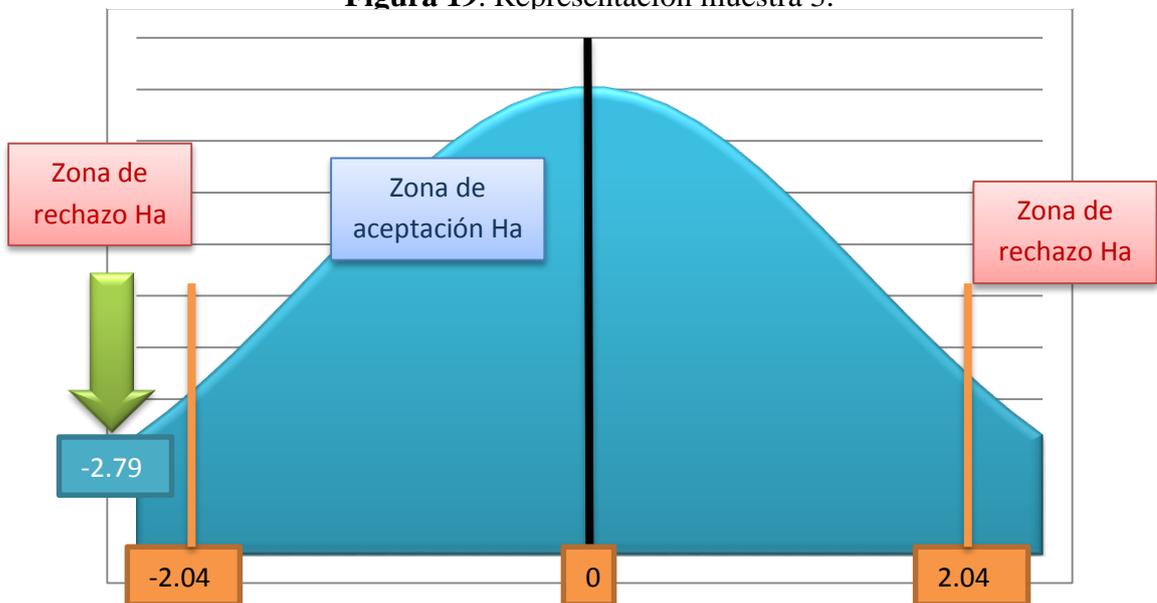
Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	1,43333333	1,8
Varianza	0,39195402	0,23448276
Observaciones	30	30
Coefficiente de correlación de Pearson	0,1819906	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	29	
Estadístico t	-2,7955580	
P(T<=t) una cola	0,00454795	
Valor crítico de t (una cola)	1,69912703	
P(T<=t) dos colas	0,0090959	
Valor crítico de t (dos colas)	2,04522964	

Figura 18. Representación gráfica Prueba de t Muestra 3



En la prueba realizada se demuestra que la diferencia entre los dos métodos diagnósticos es significativa, ya que el valor Estadístico de t $-2,795580$ no se encuentra dentro del rango de aceptación que está dado por el Valor Crítico de t que es $2,0452$.

Figura 19. Representación muestra 3.



En el gráfico se puede observar que el valor de -2.79 correspondiente al valor Estadístico de t se encuentra dentro fuera de la zona de aceptación que está delimitada por los valores Críticos de t que son -2.04 y 2.04 .

Por lo tanto se rechazaría H_a y se acepta H_o que dice, la cristalización de la saliva no es un método factible y confiable para determinar el momento óptimo para realizar la monta o inseminación artificial en hembras caninas.

4.2 VERIFICACION DE LA HIPOTESIS

Mediante la observación de resultados obtenidos en las pruebas de t de Student realizadas en los tres días de toma de muestras se determina que la Cristalización de la Saliva resulta confiable para en 1er y 2do día, aceptando la **H_a** que dice:

La cristalización de la saliva es un método factible y confiable para determinar el momento óptimo para realizar la monta o inseminación artificial en hembras caninas.

El 3er día de toma de muestras se rechaza **H_a** y se acepta **H_o** que manifiesta la cristalización de la saliva no es un método factible y confiable para determinar el momento óptimo para realizar la monta o inseminación artificial en hembras caninas.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- Las constantes fisiológicas obtenidas de las 30 pacientes se encuentran dentro de lo normal presentando en promedio los siguientes valores:

Edad promedio 2 años 6 meses esto quiere decir que en general las pacientes que acuden a consulta ya han presentado ciclos estrales con anterioridad, peso 16 kg lo que varía de acuerdo al tamaño de cada paciente, temperatura 38,6 °C demostrando estar dentro del rango normal, frecuencia cardíaca 132.5 lpm, esta se presenta levemente elevada debido al estrés provocado por la manipulación, frecuencia respiratoria 50 rpm también elevada ya que las pacientes no se encuentran completamente en reposo, el tiempo de llenado capilar es de 2 segundos descartándose hipovolemia, deshidratación, y otros problemas de diverso índole, condición corporal de 3.1 esta fue evaluada en una escala de 1 a 5, y coloración normal de las mucosas presentando todas las pacientes una coloración rosa brillante considerada normal.

- Según los resultados obtenidos de las pruebas diagnósticas de cristalización de saliva, se concluye que este método se aproxima en fiabilidad a la citología vaginal exfoliativa en la Muestra realizada el 1er día, la Prueba de t demuestra que no se observa una diferencia significativa entre los dos métodos diagnósticos ya que el Valor Estadístico de t 1.4093 se encuentra dentro del rango de aceptación que está dado por el Valor Crítico de t que es 2,0452.

En la Muestra realizada el 2do día se obtiene como resultado de la Prueba de t que no existe diferencia entre las dos variables en estudio, presentando un Valor Estadístico de t 1.43925 y un Valor Crítico de t 2.0452 lo que significa que la cristalización de saliva se asemeja a la prueba de citología vaginal.

El 3er día de toma de Muestras, realizando la Prueba de t se obtiene que existe diferencia entre las dos variables en estudio obteniendo un Valor Estadístico de t 2,7955 y el Valor Critico de t 2.0452 por lo que se demuestra que existe diferencia entre el método de cristalización de saliva y la prueba de citología vaginal día de muestra se observa.

- Se identificó el grado de cristalización presente en la saliva de las hembras caninas durante el inicio del proestro caracterizado por cristalizaciones en forma de helechos similares al Tipo C que son fragmentados y pequeños, en la fase intermedia se pudo observar cristales Tipo B caracterizados por su tamaño y por no ser tan abundantes y ramificados, mientras que en la fase final del

proestro e inicios del estro se pudo observar cristales Tipo A que se presentan en forma de helechos anchos, grandes y abundantes.

- Se determinó que los resultados obtenidos en las muestras 1 y 2 de cristalización de saliva poseen similitud con las muestras realizadas con el método de citología vaginal, mientras que la muestra 3 no guarda una considerable relación con la prueba de citología vaginal, por lo cual la prueba de cristalización de saliva posee una efectividad comprobada de 2/3 (66,6%) por lo que se la puede considerar como una alternativa confiable para la determinación del estro.

5.2 RECOMENDACIONES

- Utilizar el método de cristalización de saliva como un método auxiliar y complementario con el que se puede obtener un gran porcentaje de aproximación al estro y también determinar la fase reproductiva en que se encuentra nuestro paciente.
- Motivar a profesionales en el área a utilizar este método en su práctica diaria ya que no conlleva gran inversión de tiempo y dinero por lo que se puede realizar rápidamente y obtener un resultado diagnóstico aceptable en instantes.
- Realizar un registro en el que se pueda documentar fechas importantes en el control reproductivo, como la fecha de inicio de sangrado, fecha que se realiza la monta o inseminación, fecha control de gestación, fecha probable de parto, y parámetros fisiológicos durante la gestación en hembras caninas y de esta manera poder llevar un control más preciso.
- Elaborar una guía para uso de los profesionales en la que se describa el proceso de toma de muestras y la interpretación de los resultados obtenidos con el método de Cristalización de Saliva ya que este método puede ser realizado de una manera rápida y económica.

CAPITULO VI

PROPUESTA

6.1 TEMA

GUIA PARA LA OBTENCION E INTERPRETACION DE MUESTRAS MEDIANTE LA OBSERVACION DE LA CRISTALIZACION DE SALIVA COMO METODO DIAGNOSTICO DE ESTRO.

6.2 OBJETIVOS

6.2.1 Objetivo General

- Utilizar la guía para la obtención e interpretación de muestras mediante la observación de la cristalización de saliva en la práctica diaria como método auxiliar y confiable para determinar el momento óptimo para realizar la monta o inseminación artificial.

6.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar mediante la guía la etapa del ciclo estral en que se encuentran las pacientes, que pueden ser, anestro, proestro, estro y diestro.
- Establecer el grado de cristalización de la saliva presente utilizando la guía en el momento en que se evalúa las muestras en el microscopio y establecer la etapa del ciclo estral.

6.3 JUSTIFICACIÓN

La utilización del método de cristalización de saliva es muy importante ya que con este método se puede tener una idea de en qué etapa de ciclo estral se encuentra el paciente y por lo tanto podríamos acercarnos a determinar el momento óptimo para realizar la inseminación artificial.

Otras pruebas utilizadas en la clínica diaria como pueden ser análisis sanguíneos y la citología vaginal exfoliativa son más fiables pero requieren también de un cierto grado de tiempo y dinero por parte del propietario, pero no por eso deben dejar de ser utilizadas, mientras que la cristalización no requiere de mucho tiempo y materiales especiales para su ejecución por lo que se recomienda su utilización como método rápido y orientativo al momento de determinar el estro.

6.4 MANEJO TECNICO

Toma de Muestras

Extracción de la muestra de la saliva

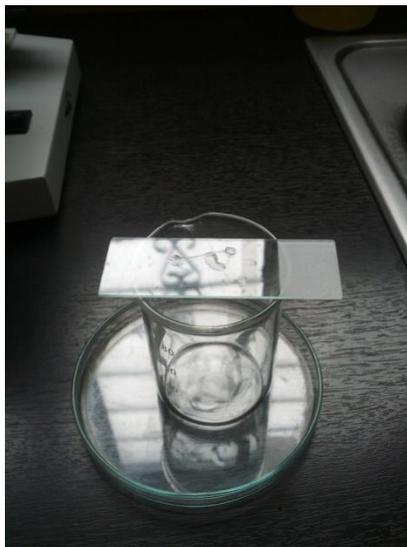
Utilizando un guante de examinación se procede a recolectar saliva de la cavidad bucal utilizando en dedo índice tratar de extraer la mayor cantidad posible de saliva que se encuentra bajo la lengua y a nivel de las encías de los molares 2 y 3, se debe tener cuidado de obtener una muestra limpia sin residuos de alimento.



Manejo de la Muestra

Colocación de la muestra en el portaobjetos

Ya recolectada la muestra de saliva colocarla sobre un portaobjetos, tratando de ubicarla en varios sitios, ya realizado esto se procede a dejarla a temperatura ambiente durante dos minutos, luego se procede a observarla en el microscopio con el lente de 4x. La muestra podrá ser observada hasta 20 minutos luego de su extracción pasado este tiempo se volverá difusa y se necesitara una nueva muestra.

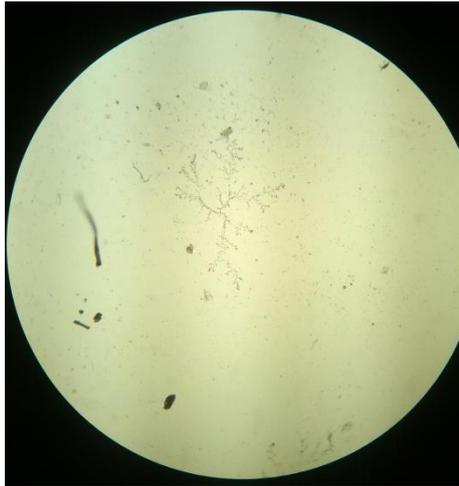


Interpretación

Observación de la muestra en el Microscopio

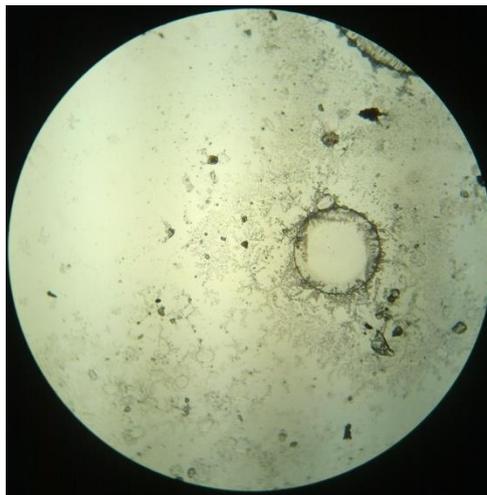
Se procede a observar todas las improntas realizadas en el portaobjetos y se tomara en cuenta la que mayor visibilidad presente, a continuación se observan muestras obtenidas en el estudio.

Paciente: Peggy, Raza; Bulldog Ingles, Edad: 1 año 10 meses
Cristalización de saliva Muestra 1



Se puede observar presencia de cristalización de tipo A caracterizada por cristales con forma de helechos pequeños y poco ramificados presentes a inicio del proestro.

Paciente: Cloe, Raza: Bulldog francés, Edad: 1 año 3 meses
Cristalización de saliva Muestra 2



Se observa cristalización de tipo B caracterizada por helechos más abundantes que el tipo A presentes en la mitad del proestro

Paciente: Minnie, Raza: Shih tzu, Edad: 3 años
Cristalización de saliva Muestra 3



En esta muestra se observa cristalizaciones de tipo C con forma de helechos grandes, anchos y con varias ramificaciones, estos se presentan durante el estro.

En las muestras que son tomadas en etapas de diestro y anestro no se observa cristalización al observarla al microscopio se pueden presentar cristalizaciones muy fragmentadas y delgadas.

ANEXOS

Instalaciones de las Clínicas que formaron parte del estudio



Materiales utilizados en la investigación:



Guantes de examinación



Microscopio



Portaobjetos



Tinción de Wright y Agua Destilada



Hisopos

Toma de Constantes Fisiológicas:



Frecuencia Cardíaca



Temperatura



Tiempo de llenado capilar



Peso

Proceso para la Toma de Muestra para Citología Vaginal



Limpieza de la vulva



Introducción de hisopo en ángulo de 45°



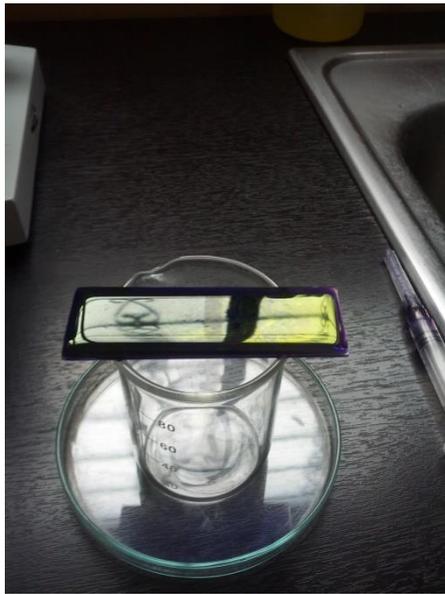
Colocación de la Muestra en el portaobjetos rodando el hisopo en la placa.



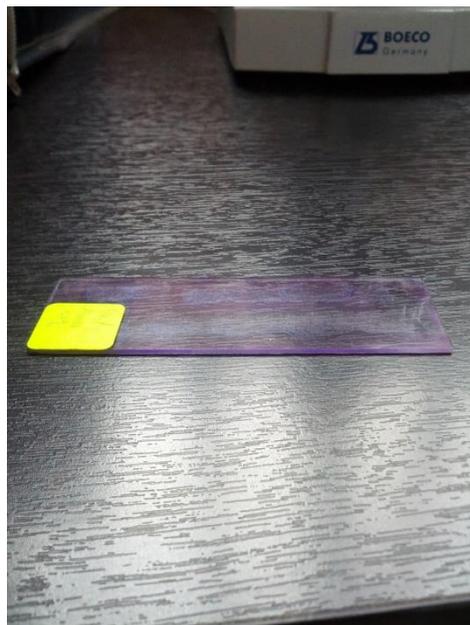
Colocación de 2ml de Tinción de Wright



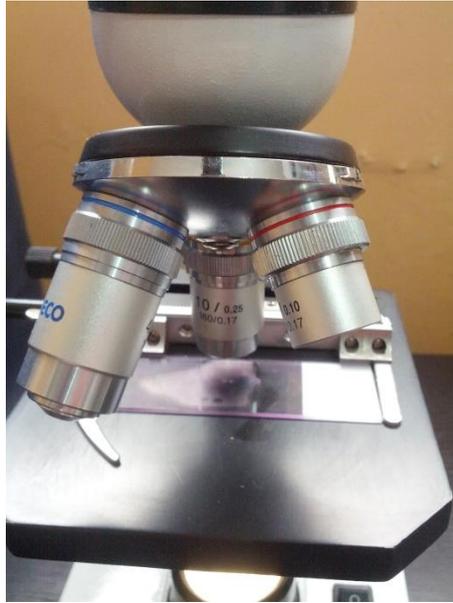
Agregamos 2ml de agua destilada



Observación de brillo metálico sobre la muestra



Secado de la Muestra



Observación de la muestra en el microscopio

Toma de Muestra para la observación de la Cristalización de Saliva



Toma de la muestra de saliva directamente de la cavidad bucal del paciente

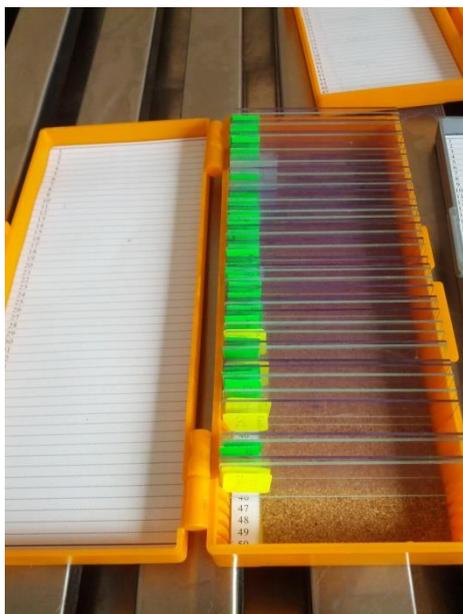


Colocación de la muestra en el portaobjetos



Observación en el microscopio

Placas obtenidas de las 30 pacientes que formaron parte de la investigación



BIBLIOGRAFIA

- Brito Cubillos, Arborización de la saliva de la perra como técnica auxiliar para el diagnóstico del ciclo estral. Ibagué Tolima 2009.
- Gobello C, De la Sota RL, Goya. A review of canine pseudocyesis. La Plata, Argentina 2001.
- Goodwin et al., Sex pheromone in the dog: Vol. 203 no. 4380 pp. 559-561I:0.1126/science. 569903 , February 1979.
- Concannon et al., Reproduction in Domestic Animal, 1975.
- FELDMAN, E.C.; NELSON, R. (1991) Ciclo Ovárico y Citología Vaginal. En endocrinología y reproducción canina y felina
- Laboratorio Patológico San Isidro 2009, Citología Vaginal.
- Universidad Nacional del Litoral Facultad de Ciencias Veterinarias, Citología Vaginal, 2003
- Segarra E, Edgar, Fisiología de los aparatos y sistemas. Universidad de Cuenca.2012.
- S. Sisson y J. D. Grossman. Robert Getty. Anatomía de los Animales Domésticos.2003
- Alanis Calderón, L.J.: Fundamentos sobre urología clínica en perros y gatos. UNAM, México, 1988.
- Gourley, I.M.: Tratamiento de la piometra de la perra sin ovariectomía. En: Bojrab, M.J.: Medicina y Cirugía en especies pequeñas. P.267-270.CECSA. México, D.F. 1980.
- Grooters, A.M.: Enfermedades de ovarios y útero. En: Birchard, S.J. y Sherding, R.G.: Manual Clínico de Pequeñas Especies. p1061-1075. Mc. Graw-Hill Interamericana.México, D.F.1996.
- Pardo-Carmona B, Moyano MR, Fernández-Palacios R, Pérez-Marín CC. del Department of Animal Medicine and Surgery, University of Cordoba, Campus de Rabanales
- Olson et al. Adaptability and Cohesion Evaluation Scales. Minnesota Science, University of Minnesota., 1982

- Wild et al., Antibodies in patients with various types of cancer: assay, identification and characterization. 1979
- Handley, The Pathogenesis of Urinary Tract Infections. 1975.
- Bell and Christie Endocrinology of the oestrous cycle in the bitch, 1971.
- Phemister et al., The Ovarian Cycle of the Bitch - Biology of Reproduction 1973
- Jhonson and Root, Normalization of raised sodium absorption and raised calcium-mediated chloride secretion by adenovirus-mediated expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in primary human cystic fibrosis airway epithelial cells. 1995.
- Holst and Phemister, Onset of diestrus in the beagle bitch: Definition and significance. 1974.
- Andresen and Wooten, Genetic and reproducción of animals 1959.
- Jeffcoate, Concentrations of luteinizing hormone and oestradiol in plasma and response to injection of gonadotrophin-releasing hormone analogue at selected stages of anoestrus in domestic bitches. 1992
- Dr Augusto Simões Lopes, Cuidados Reproductivos, 2012
- Universidad de Córdoba, Reproducción animal 2006.
- Hiemstra M, Shaefers-Okkens AC, Teske E, et al. 2001.
- Feldman, E.C.; Nelson, R. 1991. Ciclo ovárico y citología vaginal. En: Endocrinología y Reproducción canina y felina. Editorial Inter-Médica. Buenos Aires. Argentina.
- Lezama, H.J.: Estacionalidad reproductiva de la perra en la Ciudad de México. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1985.
- Wolf, A.M.: Infertilidad en la gata. En: Kirk, R.W.: Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales. Mc. Graw-Hill Interamericana. Madrid, España, 1994
- Goodman M: Ovulation timing concepts and controversies. Vet. Clin. North. Am. 219. 2001