

# Investigación

## Estandarización de la citología vaginal exfoliativa correlacionando los niveles séricos de progesterona en perras durante la peri-ovulación.

Víctor H. Arcila Q.\* Mvz

César A. Serrano-Novoa\* Mv, MSc.

Milena E. Hernández R.\*\* Mvz

Luz P. Meza B. Mvz.

**Resumen.** Según la literatura, la exactitud de la citología como prueba definitiva para determinar el periodo de ovulación en hembras caninas es controversial; por tanto, se crea la necesidad de correlacionar una característica típica de la ovulación, como son los niveles plasmáticos de progesterona, con los cambios celulares detectados en la citología vaginal exfoliativa. La medición de progesterona en plasma se realizó por ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA), para verificar si el porcentaje de células superficiales encontradas en la citología vaginal se relaciona con los niveles hormonales en la ovulación. El trabajo se realizó en la Clínica Veterinaria Pequeños Animales, Dr. Santiago Reyes, de la ciudad de Bucaramanga. Se colectaron muestras citológicas y serológicas de 30 perras de diferentes razas y edades, y en buen estado de salud. Se les realizó la prueba citológica cada 48 horas para identificar los cambios morfológicos celulares, hasta considerar el inicio del diestro; luego, se realizó la medición de los valores séricos de progesterona en las perras en estro (por encima del 75% de células superficiales), cada 48 horas hasta

**Abstract.** Because accuracy of cytology as definitive test to determine the period of ovulation in canine females (dogs) it is controversial, it makes necessary to correlate typical characteristics of ovulation, as plasmatic levels of progesterone and cytological changes to ensure optimum time of ovulation. Progesterone levels measures were carried out by ELISA test, to conclude if superficial cells percent found in vaginal cytology, is related with the hormonal levels during ovulation.

Cytologic and serum samples of 30 healthy female dogs were collected every 48 hours. The datas were analysed by correlation test.

When progesterone levels were below 10 ng/ml, the percentage of superficial cells was 72 +/- 1,72%, while the percentage of in flake, queratinizadas, intermediate cellular types were 13 +/- 3,12%, 84 +/- 1,14% and 16 +/- 2,62% respectively. When progesterone levels were between 10 to 20 ng/ml, the percentages of superficial cells was 68 +/- 2,08%, while in flake, queratinizadas, and intermediate cellular types were

---

\* Centro de Investigaciones en Ciencias Animales (CICA). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colombia. A.A. 2019 Bucaramanga, Colombia. Correo electrónico: dec\_mvz\_bga@correoucc.edu.co

\*\* Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

el primer día del diestro. Los resultados encontrados fueron: en niveles inferiores a 10 ng/ml de progesterona sérica el porcentaje de células superficiales es del 72 +/- 1,72%; células en escama: 13 +/- 3,12%; el total de células queratinizadas: 84 +/- 1,14%; células intermedias: 16 +/- 2,62%. En niveles de 10 a 20 ng/ml de progesterona, los porcentajes de células encontradas en la citología vaginal exfoliativa fueron: células superficiales: 68 +/- 2,08%; células en escama: 11 +/- 3,19%; total de células queratinizadas: 80 +/- 1,9%; células intermedias: 21 +/- 3,63%. Finalmente, en niveles superiores a 20 ng/ml de progesterona sérica, los porcentajes de células encontradas en la citología vaginal exfoliativa: células superficiales: 57 +/- 3,52%; células en escama: 10 +/- 1,35%; total de células queratinizadas: 64 +/- 2,75%; y células intermedias: 35 +/- 3,31%.

**Palabras clave:** células escamosas, células intermedias, células queratinizadas, estrógenos, LH.

11 +/- 3,19%, 80 +/- 1,9% and 21 +/- 3,63% respectively. Finally, within highest ranges (>20 ng/ml), the percentages of superficial cells was 57 +/- 3,52%, while in flake, queratinized and intermediate cells were 10 +/- 1,35%, 64 +/- 2,75% and 35 +/- 3,31% respectively.

**Key words:** cells in flake, estrogens, intermediate cells, LH, ovulation, superficial cells.

## Introducción

Uno de los principales problemas en reproducción de pequeños animales es la determinación de los días exactos de ovulación, cuando ocurre un descenso de la concentración sérica de estrógenos y un aumento en la concentración sérica de progesterona ideal para realizar la monta (1).

El ciclo estral de las perras consta de cuatro etapas: proestro, estro o celo, diestro y anestro. En proestro, la concentración de los estrógenos séricos está elevada, lo que causa cambios físicos evidentes, característicos de celo en las perras, incluyendo edema vulvar y exudación de una descarga serosanguinolenta a través de la vagina, y una cronificación aumentada del epitelio vaginal. La concentración sérica de estrógenos cae abruptamente en el proestro tardío, estimulando un pico en la concentración de hormona luteinizante (LH) sérica y la subsecuente ovulación. La concentración del pico de LH en suero (7 a 50 ng/ml) dura 24 a 40 horas antes de retornar a niveles basales, ocurriendo la ovulación 2,0 +/- 0,1 días después del pico de LH. La concentración sérica de progesterona comienza a aumentar, coincidiendo con el descenso de la concentración de los estrógenos séricos y el pico de LH, debido a luteinización preovulatoria de las células foliculares. La concentración sérica de pro-

gesterona en el día del pico de LH (2 días antes de la ovulación) es de 2,0 a 2,9 ng/ml. La concentración sérica de progesterona en el día de la ovulación es de 4 a 10 ng/ml. El descenso de la concentración sérica de estrógenos y el aumento en la concentración sérica de progesterona marca el comienzo del comportamiento de estro en las perras. En promedio, una perra puede ovular en cualquier momento entre el 2° y el 6° día después del comienzo del comportamiento de estro. El estro se caracteriza citológicamente por una cornificación completa de las células epiteliales vaginales, donde más del 50% de éstas aparentemente son anucleadas. Seis días después de la ovulación (8,0 +/- 0,3 días después del pico de LH), la perra entra en diestro citológico, caracterizado por un comportamiento de cesación del celo y, citológicamente, por un retorno abrupto al epitelio no cornificado.

Los métodos para determinar el momento de ovulación en las perras incluyen la evaluación del comportamiento o cambios físicos en la perra, cambios en el fluido vaginal, la evaluación citológica o vaginoscópica de los cambios en el epitelio vaginal y ensayos hormonales. La hormona luteinizante (LH) es la que induce la ovulación, y en la perra su máxima concentración sérica precede por 2 días a dicho evento.

Debido a que la medición de la LH sérica no es muy utilizada (requiere un muestreo diario de sangre), la medición de la concentración de progesterona puede utilizarse como un indicador indirecto del pico de LH y de la subsecuente ovulación.

La cornificación vaginal aumenta gradualmente en el proestro. La cornificación completa generalmente ocurre antes del pico de LH. El estro o celo se define citológicamente como la cornificación completa con más del 75% de las células anucleadas, aunque T.W. Concanon lo define desde el 50%, afirmando, además, que existe una pobre correlación entre el comienzo del estro citológico y la ovulación. El comienzo del diestro citológico, caracterizado por un abrupto retorno a la completa no-cornificación, ocurre 6 días después de la ovulación, permitiendo una evaluación retrospectiva del día de la ovulación.

El principio de la citología vaginal exfoliativa se basa en identificar el tipo y el porcentaje de células de las diferentes etapas del ciclo estral, ya que los cambios hormonales de la vagina durante el ciclo se reflejan en la morfología de sus células epiteliales. Al inicio del ciclo, la célula epitelial recibe mayor irrigación sanguínea (nutrición celular). Conforme los niveles de estrógenos se incrementan el epitelio vaginal se va engrosando, lo que ocasiona que la célula epitelial se vaya separando del aporte sanguíneo y dé como resultado una transformación celular que va de la célula parabasal a la célula anucleada o escama, (2), con células epiteliales de las diferentes capas del epitelio estratificado plano no queratinizado, a veces células endocervicales, de reserva y, en ocasiones, células endometriales, y células no epiteliales (eritrocitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y espermatozoides, entre otros). Las células que forman el epitelio vaginal estratificado plano sin queratina de la membrana basal hacia la superficie son: basales o germinales, intermedias, superficiales y escamas (3).

Las alteraciones que ocurren en la mucosa y la bóveda vaginal como resultado de una concentración sérica de estrógenos durante el proestro y el estro se reflejan en el aspecto de las células epiteliales vaginales exfoliadas. Se cree que esos cambios se deben únicamente a incrementos en las cifras de estrógenos circulantes. Por lo tanto, todas las perras bajo la influencia

de folículos funcionales y en maduración están bajo el efecto de concentraciones cada vez más altas de estrógenos. Estos causan engrosamiento de la cubierta vaginal, lo que aleja más a las células de la luz vaginal de su aporte sanguíneo. De este modo, la citología vaginal puede servir como una valoración indirecta, primaria pero confiable, de los estrógenos (3). Es por esto que las técnicas específicas, como la citología vaginal exfoliativa permiten establecer los días de la ovulación para realizar la monta o la inseminación con buena probabilidad de éxito (4).

Los métodos para la determinación adecuada de la ovulación han sido motivo de controversia por diferentes autores. Los métodos más confiables han sido la determinación sérica de los niveles hormonales de LH y progesterona (5,6,7). Se han citado métodos como la ultrasonografía para el seguimiento del desarrollo folicular (8,9). Y recientemente se han usado las excretas para determinar la presencia de hormonas (progestinas) como un índice indicativo del momento de la ovulación (10). El seguimiento citológico vaginal y los cambios hormonales han sido considerados como métodos paralelos fiables aunque con grandes variaciones, como lo afirman diversos autores (11,12,13) y hay quienes los consideran de poca confiabilidad, generando argumentos para valorar de nuevo esta metodología (14).

La carencia de métodos diagnósticos confiables que permitan tener certeza en la determinación del momento adecuado de la monta crea incertidumbre, conllevando a pérdidas económicas. Debido a estos problemas nace la necesidad de implementar técnicas diagnósticas que permitan determinar los cambios fisiológicos durante el estro, a un bajo costo pero con un alto grado de confiabilidad en su sensibilidad.

Este trabajo se propuso la tarea de fomentar la utilización de la citología vaginal exfoliativa como método seguro y confiable para la determinación de la ovulación, estandarizando el porcentaje de células superficiales que indican los días óptimos para la monta o la inseminación artificial en perras de la ciudad de Bucaramanga, teniendo en cuenta aspectos importantes como el clima, la altitud y las condiciones ambientales de la ciudad. En la literatura se reportan rangos diferentes de este porcentaje: Feldman (2000) cita que el celo se presenta con

más del 80 al 90% de células superficiales, (1); Root Kustritz reporta que con más del 50% (15); Bonagura Kirt afirma que el primer día del estro se presenta con el 90% o más de células epiteliales cornificadas o superficiales (12); y P. Van Arrle, en el Compendium de reproducción animal, cita la citología vaginal sólo como una técnica de análisis retrospectivo, afirmando que al empezar el diestro la perra ya había ovulado 6 días atrás (16). De esta manera se podrá brindar, tanto a propietarios comunes como a grandes criadores de la ciudad, la solución fácil, rápida y económica al problema de la detección de los días específicos en que se debe realizar la monta o inseminación artificial.

Además, se realizó el estudio de estandarización de la técnica de la citología vaginal como un método diagnóstico para la detección de los días de la ovulación, utilizando como prueba de correlación confirmativa la medición de los valores séricos de progesterona en perras de la ciudad de Bucaramanga (Santander-Colombia).

## Materiales y métodos

El trabajo se realizó en la Clínica Veterinaria Pequeños Animales Dr. Santiago Reyes, de la ciudad de Bucaramanga. Allí se colectaron muestras citológicas y serológicas de 30 perras a las que se les realizó un seguimiento observacional para determinar el momento más cercano al celo. Las unidades de estudio se seleccionaron, previa autorización de los propietarios, mediante un sondeo de los clientes que con frecuencia asisten a la clínica.

Se ubicaron las hembras que, según los informes de los propietarios, presentaran las manifestaciones físicas de celo; a partir de esto se les realizó la prueba citológica cada 48 horas para identificar los cambios morfológicos celulares, hasta considerar el inicio del diestro. Según los resultados obtenidos en las pruebas realizadas, se clasificaron las perras de la siguiente manera:

- Perras que se encuentran en proestro, es decir que citológicamente se encuentre más del 65% de células queratinizadas y, adicionalmente, no haya presencia de neutrófilos y eritrocitos esporádicos.
- Perras que se encuentran en estro, es decir que citológicamente se encuentren 75% ó más de células queratinizadas y no haya presencia de eritrocitos.

- Perras en primer día del diestro: caracterizado por un abrupto retorno de las células parabasales y presencia de leucocitos.

Según la clasificación anteriormente citada, se procedió a realizar la medición de los valores séricos de progesterona en las perras en estro (por encima del 75% de células superficiales), cada 48 horas hasta el primer día del diestro (presencia abrupta de células parabasales, 10% o más), para lo cual se tomaron muestras seriadas de sangre en tubos de ensayo localizados en un ángulo de 45 grados a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo, momento en el que se recuperó el suero con una pipeta pasteur, depositándolo en tubos ependorf de 1,5 ml y congelando a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la determinación de niveles de progesterona.

Según los resultados obtenidos en esta prueba se estableció el porcentaje ideal de células superficiales o queratinizadas en la citología vaginal, para determinar los días óptimos de la ovulación.

La citología vaginal exfoliativa se realizó de acuerdo con lo descrito por Feldman (1), brevemente: se separan los labios vulvares, se introduce el espéculo y se cubre para visualizar el meato urinario y la vagina, se puede realizar sin espéculo o sólo con ayuda de los dedos. Se introduce el aplicador (hisopo de 12,5 a 17,5 cm) a través de la comisura dorsal de la vulva. En principio, se dirige el aplicador en forma caudodorsal para evitar la fosa del clítoris, y luego se avanza siguiendo la columna vertebral hasta que pase el arco isquiático, después se gira en ambas direcciones y se retira; la punta del algodón se gira suavemente de un extremo a otro sobre una laminilla haciendo tres impresiones separadas y dejándolas secar al aire libre para proceder a la tinción.

La tinción de las muestras se realizó por el método de hemacolor: se lavó el exceso del fijador con agua corriente, se aplicó hematoxilina de Harris por 30 segundos, enjuagando luego con agua corriente por 5 segundos y, posteriormente, se aplicó el colorante de Shorr por 1 minuto; se lavó nuevamente con agua corriente. Hecho lo anterior, se trató la muestra con alcohol al 70% por 30 segundos, alcohol al 95% por otros 30 segundos, alcohol absoluto por el mismo lapso de tiempo, y por último se aplicó xilol por 1 minuto.

Todas las muestras las analizó un mismo observador en un microscopio en objetivo 40X.

La progesterona sérica fue analizada por ELISA semi-cuantitativo (kit K9 Proges-Check). El suero debe estar a temperatura ambiente cuando se realiza la prueba y se puede refrigerar o congelar, en caso de necesidad, pero antes de ejecutar la prueba. Los tres controles dan colores de azul marino, indicativo de 0 ng/ml de progesterona; azul claro, indicativo de 2 ng/ml de progesterona; y azul más claro, indicativo de más de 10 ng/ml de progesterona. El color de las muestras probadas se compara con el del control y se lee como 2 ng/ml o menos de progesterona si la intensidad está cerca o igual al color azul marino del control; entre 2 y 10 ng/ml de progesterona, si la intensidad es menor o igual al control azul claro; y más de 10 ng/ml de progesterona, si la intensidad de la muestra es como el control azul más claro. Según la concentración de progesterona, se establecieron 3 grupos:

1. <10 ng/ml.
2. 10-20 ng/ml.
3. >20 ng/ml.

Para cada grupo se realizó la tabulación de los datos, de acuerdo con la concentración de progesterona y el porcentaje de células en las citologías, con el fin de realizar análisis de regresión y correlación.

## Resultados

### Grupo 1. Niveles de progesterona menores a 10 ng/ml

El 76,92% de los sueros analizados en el rango de <10, ng de progesterona se encontraron entre 3,5 y 7,1 ng/ml.

**Tabla 1.** Distribuciones acumuladas de células queratinizadas en pacientes con un rango de progesterona < 10 ng/ml.

Clase	Límites		Frecuencia acumulada	Frecuencia relativa acumulada%	Porcentaje acumulado%%
1	74,5	79,5	3	11,54	11,54
2	79,5	84,5	14	53,85	65,38
3	84,5	89,5	5	19,23	84,62
4	89,5	94,5	3	11,54	96,15
5	94,5	99,5	1	3,85	100,00

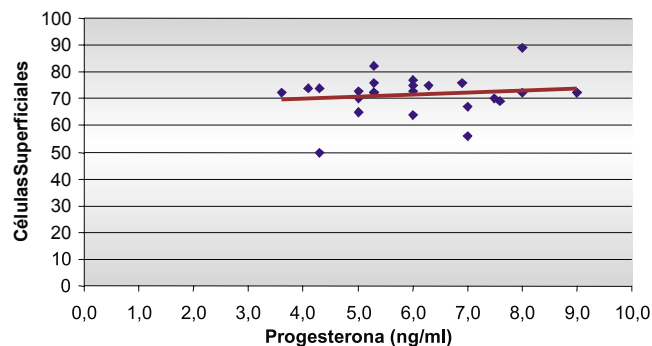
En la tabla 1 se observa que el 84,62% de las citologías de pacientes con niveles séricos de progesterona <10 ng/ml presentaron valores entre 74,5% y 89,5% de células queratinizadas.

**Tabla 2.** Distribuciones acumuladas de células intermedias en pacientes con un rango de progesterona < 10 ng/ml.

Clase	Límites		Frecuencia acumulada	Frecuencia relativa acumulada%	Porcentaje acumulado%%
1	0,5	5,5	1	3,85	3,85
2	5,5	10,5	3	11,54	15,38
3	10,5	15,5	5	19,23	34,62
4	15,5	20,5	14	53,85	88,46
5	20,5	25,5	3	11,54	100,00

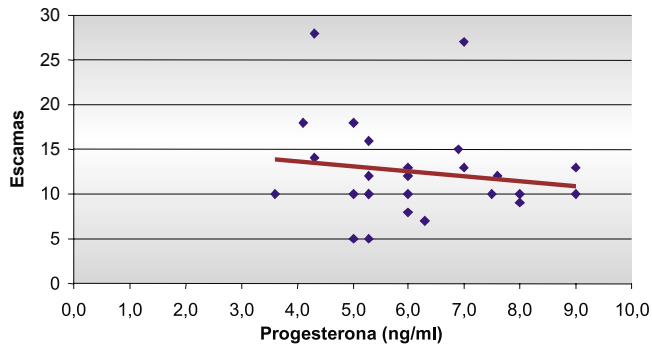
Como se aprecia en la tabla 2, con respecto a las células intermedias en los pacientes con el mismo rango de progesterona sérica, encontramos que el 88,46% de las citologías presentaron 20,5% o menos de células intermedias, y en el 100 hasta 25,5% o menos, lo que indica que las células intermedias tienen bajo porcentaje en niveles de progesterona <10 ng/ml y que las células predominantes son las queratinizadas.

En las figuras 1, 2 y 3 se aprecia que la nube de puntos de células superficiales, escamas y células intermedias frente a la progesterona (<10 ng/ml) muestra una tendencia lineal (recta) de regresión y curva ideal para predecir la progesterona con base en el porcentaje celular. A medida que aumenta la progesterona, aumenta el porcentaje de células superficiales y disminuyen las escamas y células intermedias. Aunque la nube de puntos detalla la dispersión de los datos, hay cierta tendencia hacia el aumento o disminución del porcentaje de células.

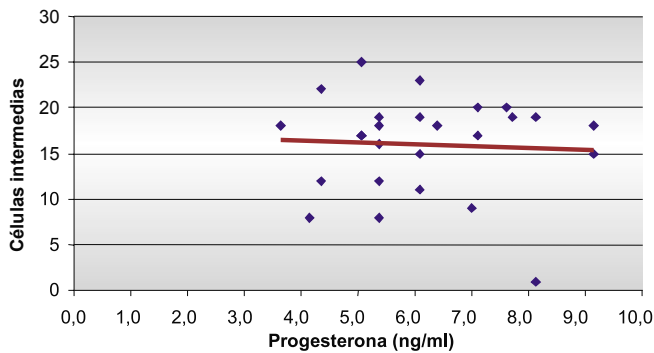


**Figura 1.** Curva de regresión de células superficiales sobre la progesterona.

Estandarización de la citología vaginal exfoliativa correlacionando los niveles séricos de progesterona en perras durante la peri-ovulación.



**Figura 2.** Curva de regresión de células en escama sobre la progesterona.



**Figura 3.** Curva de regresión de células intermedias sobre la progesterona.

El análisis de correlación entre los niveles de progesterona (cuando presenta niveles séricos de <10 ng/ml) y las células superficiales arroja un coeficiente de correlación 0,1441, muy cercano a 0, lo que indica que existe una relación lineal débil entre ambas variables. Lo mismo sucede con las células en escama (0,1441) y el total de células superficiales (-0,1438), indicando que al aumentar la progesterona aumentan las células superficiales y en escama. Con las células intermedias sucede lo mismo (0,0509), aunque se observa menor correlación.

### Grupo 2. Niveles de progesterona de 10-20 ng/ml

El 63,16% de los sueros analizados estaban en el rango de 10-20 ng/ml, con valores entre 10,15 y 14,15 ng/ml; el 73,68% entre 10,15 y 16,15 ng/ml; y el 84,21% entre 10,15 y 18,15 ng/ml.

En la tabla 3 se aprecia que el 89,47% de las citologías en perras con niveles séricos de progesterona entre 10 y 20 ng/ml presentaron un rango de 70 a 89,5% de células queratinizadas, y el 100% de estos pacientes mostraron un rango entre 70 a 96% de cé-

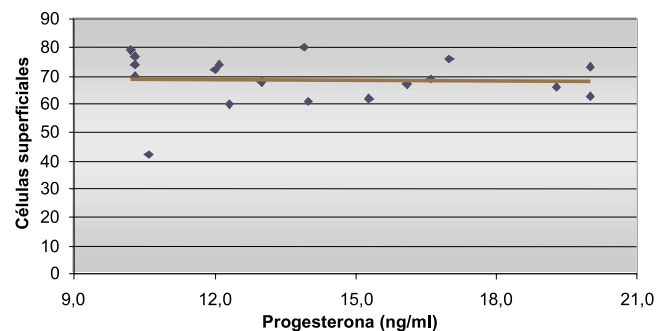
lulas queratinizadas. Es decir, en el diestro temprano las células superficiales están aún elevadas. En la tabla 4 se observa que el 84,21% de las citologías en perras con niveles séricos de progesterona entre 10 y 20 ng/ml presentaron un rango entre 5,5 y 31,5% de células intermedias, y el 100% en un rango de hasta 38% de este tipo celular, lo que podría indicar que el porcentaje de células intermedias se incrementa cuando los niveles de progesterona se encuentran en un rango entre 10 y 20 ng/ml durante el diestro temprano.

**Tabla 3.** Distribuciones acumuladas de células queratinizadas en pacientes con un rango de progesterona entre 10 y 20 ng/ml.

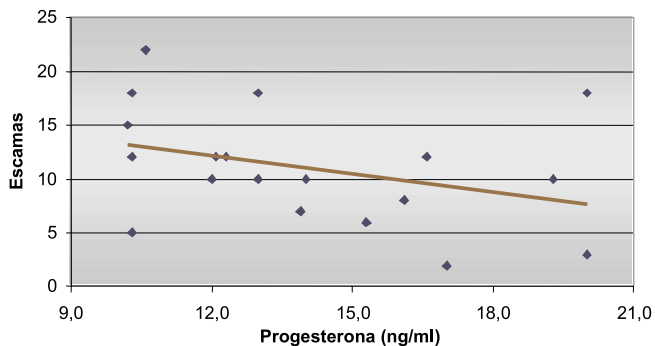
Clase	Límites		Frecuencia acumulada	Frecuencia relativa acumulada%	Porcentaje acumulado%%
1	63,5	70,0	3	15,79	15,79
2	70,0	76,5	4	21,05	36,84
3	76,5	83,0	5	26,32	63,16
4	83,0	89,5	5	26,32	89,47
5	89,5	96,0	2	10,53	100,00

**Tabla 4.** Distribuciones acumuladas de células intermedias en pacientes con un rango de progesterona entre 10 y 20 ng/ml.

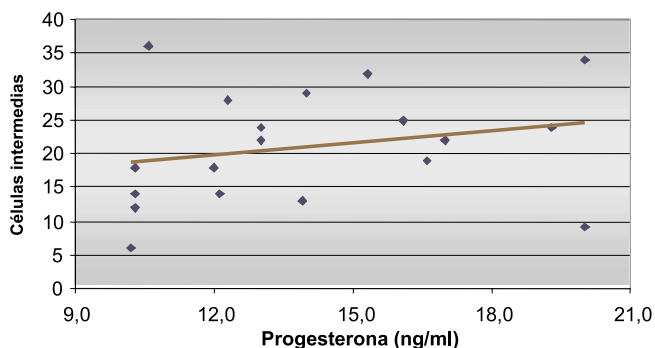
Clase	Límites		Frecuencia acumulada	Frecuencia relativa acumulada%	Porcentaje acumulado%%
1	5,5	12,0	3	15,79	15,79
2	12,0	18,5	5	21,05	36,84
3	18,5	25,0	6	26,32	63,16
4	25,0	31,5	2	26,32	89,47
5	31,5	38,0	3	10,53	100,00



**Figura 4.** Curva de regresión de células superficiales sobre la progesterona.



**Figura 5.** Curva de regresión de células en escama sobre la progesterona.



**Figura 6.** Curva de regresión de células intermedias sobre la progesterona.

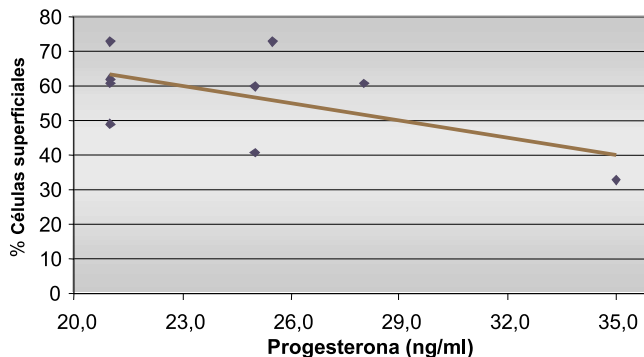
En las figuras 4, 5 y 6 podemos observar que la nube de puntos de células superficiales, escamas y células intermedias frente a la progesterona muestra una tendencia lineal (recta) de regresión para predecir la progesterona con base en el porcentaje celular. A medida que aumenta la progesterona, empieza a bajar el porcentaje de células superficiales, disminuyen las escamas, y aumentan las células intermedias en la citología vaginal exfoliativa; sin embargo, se observa que los datos se encuentran muy dispersos sobre la línea de regresión.

El análisis de correlación entre los niveles séricos de progesterona, cuando esta se encuentra en un rango 10 a 20 ng/ml, y las células superficiales muestra un coeficiente de correlación de  $-0,0329$ , indicando que no hay una correlación lineal entre ambas variables. Con las células en escama la correlación es negativa moderada de  $-0,3565$ , similar al total de células queratinizadas ( $-0,2567$ ); es decir, a medida que aumenta la progesterona tienden a disminuir estas células. La correlación con las

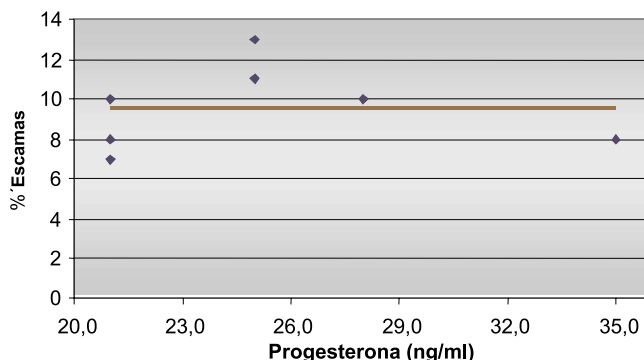
células intermedias es de  $0,2403$ , es decir, positiva moderada: tienden a aumentar las células intermedias.

### Grupo 3. niveles de progesterona mayores de 20 ng/ml

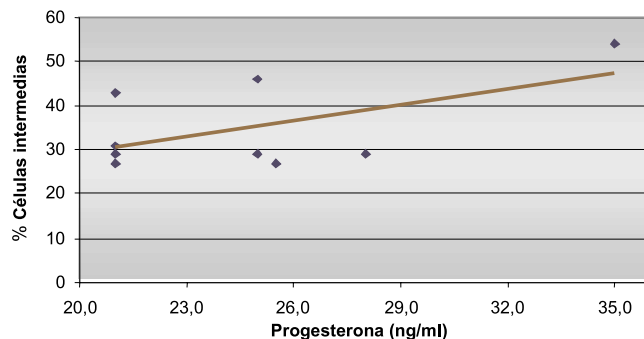
No se analizó la distribución de frecuencias para niveles de progesterona  $>20$  ng/ml dado el tamaño de la muestra obtenida.



**Figura 7.** Curva de regresión de células superficiales sobre la progesterona.



**Figura 8.** Curva de regresión de células en escama sobre la progesterona.



**Figura 9.** Curva de regresión de células intermedias sobre la progesterona.

En las figuras 7, 8 y 9 se aprecia que la nube de puntos de células superficiales, escamas y células intermedias frente a la progesterona muestra una tendencia lineal (recta) de regresión y curva ideal para predecir la progesterona con base al porcentaje celular. A medida que aumenta la progesterona, disminuye drásticamente el porcentaje de células superficiales, las escamas permanecen en un bajo porcentaje y aumentan ostensiblemente las células intermedias en la citología vaginal exfoliativa. Sin embargo, los datos se encuentran muy dispersos sobre la línea de regresión.

El análisis de correlación entre los niveles séricos de progesterona (con rangos superiores a 20 ng/ml) y las células superficiales arroja un coeficiente de correlación de  $-0,5711$ , indicando que hay una correlación moderada negativa, es decir, al aumentar los niveles de progesterona las células superficiales disminuyen. Con las células en escama no hay correlación lineal. Con el total de células queratinizadas la correlación es de  $-0,6213$ , es decir, cuando los niveles de progesterona son mayores de 20 ng/ml estas células disminuyen. La correlación positiva con las células intermedias de  $0,5605$  indica que al aumentar la progesterona aumentan también estas células.

### Análisis conjunto

La recopilación de los resultados anteriores se resume en la tabla 5.

De acuerdo con los datos de la tabla 5, en niveles inferiores a 10 ng/ml de progesterona sérica, es decir, cuando tiene lugar la ovulación, el porcentaje de células superficiales es del  $72 \pm 1,72\%$ ; el de células en escama:  $13 \pm 3,12\%$ ; el total de células queratinizadas:  $84 \pm 1,14\%$ ; el porcentaje de células intermedias:  $16 \pm 2,62\%$ . En niveles de 10 a 20 ng/ml de progesterona (diestro), los porcentajes de células encontradas en la citología vaginal exfoliativa son: células superficiales:  $68 \pm 2,08\%$ ; células en escama:  $11 \pm 3,19\%$ ; total de células queratinizadas:  $80 \pm 1,9\%$ ; células intermedias:  $21 \pm 3,63\%$ . Finalmente, en niveles superiores a 20 ng/ml de progesterona sérica, los porcentajes de células encontradas en la citología vaginal exfoliativa son: células superficiales:  $57 \pm 3,52\%$ ; células en escama:  $10 \pm 1,35\%$ ; total de células queratinizadas:  $64 \pm 2,75\%$ ; células intermedias:  $35 \pm 3,31\%$ .

El porcentaje de células superficiales en niveles de progesterona inferiores a 10 ng/ml llega hasta 74%; en niveles de 10 a 20 ng/ml alcanza 70% y en niveles superiores a 20 ng/ml es sólo del 61%. Es decir, a medida que los niveles séricos de progesterona aumentan, las células superficiales disminuyen.

**Tabla 5.** Porcentaje de células citológicas según los niveles de progesterona

	Estadísticos	Progesterona	Células (%)			Células intermedias
			Superficiales	Escamas	Total	
< 10 ng/ml	Nivel de confianza (95%)	0,05	0,05	0,05	5,0	0,05
	Desviación estándar	1,5	7,0	6,0	5,0	5,0
	Promedio muestral	6,1	72,0	13,0	84,0	16,0
	Intervalo de confianza	1,18	1,72	3,12	1,14	2,62
	Promedio + inter.conf	7,3	74,0	16,0	85,0	19,0
	Promedio - inter.conf	4,9	70,0	9,0	83,0	13,0
	10 a 20 ng/ml	Nivel de confianza (95%)	0,05	0,05	0,05	0,05
Desviación estándar		3,3	9,0	5,0	9,0	8,0
Promedio muestral		14,0	6,08	11,0	80,0	21,08
Intervalo de confianza		1,75	2,08	3,19	1,90	3,63
Promedio + inter.conf		15,8	70,0	14,0	81,0	25,0
Promedio - inter.conf		12,3	66,0	8,0	78,0	17,0
> 20 ng/ml		Nivel de confianza (95%)	0,05	0,05	0,05	0,05
	Desviación estándar	4,6	14,0	2,0	11,0	10,0
	Promedio muestral	24,7	57,0	10,0	64,0	35,0
	Intervalo de confianza	1,86	3,52	1,35	2,75	3,31
	Promedio + inter.conf	26,6	61,0	11,0	67,0	38,0
	Promedio - inter.conf	22,9	53,0	8,0	62,0	32,0



En cuanto a las células en escama, se encontró el mismo patrón de tendencia, sólo que estas no alcanzan niveles tan altos como las células superficiales, sólo llegan hasta un 16% cuando la progesterona se encuentra cerca de los 10 ng/ml. Finalmente, las células intermedias tienen una tendencia de aumentar cuando lo hace también la progesterona: iniciando en 19% cuando hay niveles inferiores 10 ng/ml de progesterona, hasta 38% cuando la progesterona supera los 20 ng/ml. La tendencia del total de células queratinizadas (85%) e intermedias frente al aumento de la progesterona es inversamente proporcional, mientras aumenta la progesterona, las células superficiales halladas disminuyen y las células intermedias tienden al aumento. Este comportamiento está determinado por los niveles hormonales de estrógenos y progesterona, es cuando transcurre la ovulación y resulta de vital importancia el conocimiento de estos eventos para cualquier diagnóstico reproductivo.

## Discusión

Se determinó el porcentaje del total de células superficiales en hembras caninas con niveles de progesterona menor de 10 ng/ml, en el cual ocurre la ovulación; de esta manera se pudo establecer que cuando se encontraba un 85% de células queratinizadas y células en escama en la citología vaginal, la ovulación había transcurrido. Este porcentaje es similar al reportado en dos trabajos, uno en México y otro en Guatemala; en el primero, se determinó que la perra se encontraba en estro cuando se observara al menos un 90% de células superficiales y descamadas en la citología vaginal exfoliativa (17). En el segundo trabajo realizado en Guatemala (18) se encontró que la ovulación se manifestaba cuando en la citología vaginal exfoliativa se hallaron 83% de células superficiales y en escama. Así mismo, se pudo determinar la presencia o no de algunas células características de ciertas etapas del ciclo; por ejemplo, el estro se da cuando el 85% de células se queratinizan con un fondo limpio y libre de bacterias; en la mayoría de perras ocurrió de tal forma, salvo algunas excepciones a la regla, se presentaron cantidad de hematíes, bacterias y neutrófilos en esta etapa del ciclo. Igualmente, las células espumosas típicas del metaestro sólo se reportaron en pocas perras, indicando que su presencia no es herramienta diagnóstica para establecer esta etapa del ciclo.

Feldman (1) reporta que la citología vaginal podría servir como una valoración primaria de los estrógenos; en una de las valoraciones citológicas de este trabajo, una hembra pastor alemán presentó un celo prolongado de más de 25 días, se realizaron citologías cada 48 horas y en ninguna de ellas se reportó una queratinización completa (50 y 60% de queratinización); esto lleva a sospechar que el efecto incompleto de los estrógenos en este animal no permitió la queratinización completa de sus células superficiales, por lo tanto, a pesar de la monta realizada no hubo preñez. Igualmente, sucedería en un celo silencioso, donde la concentración plasmática de estradiol no alcanza los rangos más altos para producir los eventos claves del celo. Por esto, en estas perras no se presenta (o es muy poca) hemorragia vaginal, edema vulvar y atracción de machos.

Es importante tener en cuenta que los autores que reportan ovulación con más de 50% de células superficiales no están considerando la queratinización completa de estas células, simplemente deducen que al encontrar 50% o más de células queratinizadas ya hay estro, olvidando que el efecto completo de los estrógenos se refleja en el engrosamiento de la cubierta vaginal, dando como resultado un mayor número de células superficiales en la citología exfoliativa vaginal.

Bonagura Kirt afirma que el primer día del estro se presenta con el 90% o más de células epiteliales cornificadas o superficiales; según este reporte, con este porcentaje la ovulación ya había transcurrido uno o dos días atrás, perdiendo así la fecha óptima para realizar las montas adecuadas (12).

A diferencia a lo que afirma P. Van Arrle en el *compedium* de reproducción animal, donde considera a la citología vaginal sólo como una técnica retrospectiva, afirmando que al empezar el diestro, la perra ya había ovulado 6 días atrás (16). Esta investigación puede asegurar que la citología es una técnica prospectiva que determina con exactitud cada una de las etapas del ciclo en el momento que ocurre; por lo tanto, los resultados de esta investigación permiten ratificar una herramienta diagnóstica que, sin duda, ha sido subutilizada por muchos profesionales dedicados a la clínica de pequeños animales, y que representa un mejor método al servicio de la sociedad en general.

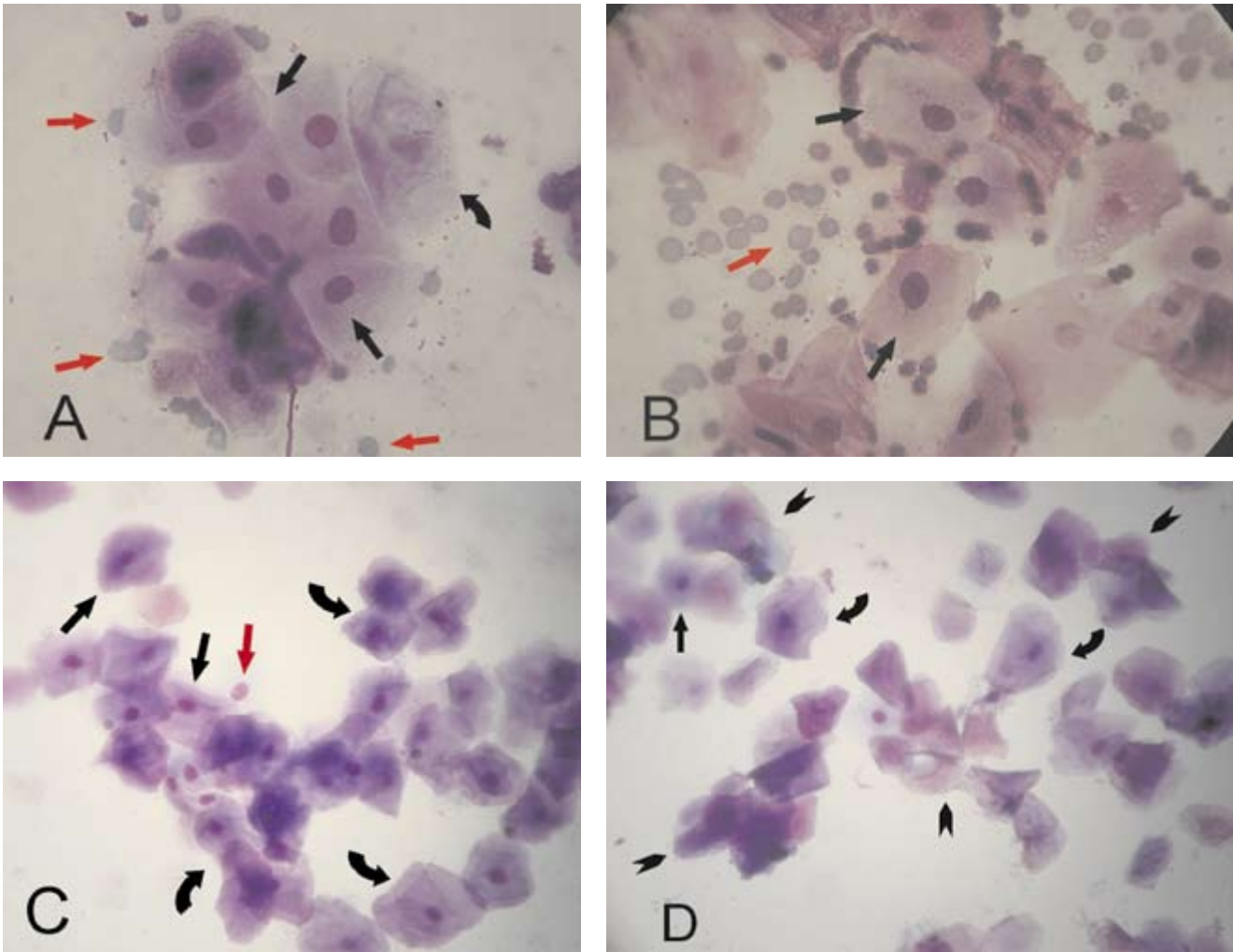
## Referencias

- (1) Feldman N. Endocrinología y reproducción en perros y gatos. 2ª ed., México: McGraw-Hill, 2000. pp. 572-592.
- (2) Esquibel Lacroix C. en Primer seminario de endocrinología con énfasis en reproducción. Abril 29-30, mayo 1°. 2000.
- (3) Bren de Arguello Nuri. Citología diagnóstica vaginal. Editorial Manual Médico: México, 2001. pp. 19-30.
- (4) Linde C., Karlsson IJ. Small animal pract. 1984, 2577.
- (5) Concannon PW, Hansel W, Visek W. Biol Reprod 1975; 13, 112.
- (6) Bouchar GF, Malugani N, Younquist RS, Krause GF, Concannon PW, et al. Determination of ovulation in the bitch with a qualitative progesterone enzyme immunoassay in serum, plasma and whole blood. J Reprod Fertil suppl 1993; 47:517-8.
- (7) Goodman M. Ovulation timing. Concepts and controversies. Vet Clin North Am Small Animal Pract 2001; (2): 219-235.
- (8) Hayer P, Gunzel-Apel AR, Luerssen D, Hoppen HO. Ultrasonographic monitorin of follicular development, ovulation and the early luteal phasej in the bitch. J Reprod Fertile 1993; 47:93-100.
- (9) Renton JP, Boyd JS, Harvey MJ, Ferguson JM, Nickson DA, Eckersall PD. Comparison of endocrine changes and ultrasound as means of identifying ovulation in the bitch. Res Vet Sci Jul 1992; 53 (1):74-9.
- (10) Hay MA, King WA, Gartley CJ, Goodrowe KL. Correlation of periovulation serum and fecal progestins in the domestic dog. Can J Vet Res Jan 2000; 64(1):59-63.
- (11) Kaneco J., Harvey JW and Bruss ML. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Fifth Edition. Academic Press; 1997.
- (12) Bonagura K. Terapéutica veterinaria de pequeños animales. XII. McGraw Hill Interamericana. pp. 1170-1171.
- (13) Simpson JMG, England GCW, Jarvey MJ. Manual de reproducción y neonatología en pequeños animales. Madrid: Editorial Harcourt S.A.; 2000, pp. 2-5.
- (14) Hiemstra M, Schaefers-Okkens AC, Teske E, Kooistra HS. The reability of vaginal cytology in determining the optimal mating time in the bitch. Tijdschr Diergeneeskd. Nov 2001; 126(21):685-9.
- (15) Root K. Uso de kits comerciales para ensayos de hormona luteinizante y de progesterona en el manejo reproductivo canino. Ithaca, New York. USA. 2001. URL: [www.ivis.org](http://www.ivis.org).
- (16) Van Arrle P, Aguer D, Baars J y otros. Compendium de reproducción animal. 3ª. Edición. Laboratorios Intervet. S. A. 1999. pp. 125-143.
- (17) Ortega Pacheco A, Ramírez Buenfil JC, Leal Ortega JA. Actividad estral de perras callejeras en la ciudad de Mérida, Yucatán y su relación con edad, tamaño y condición corporal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. Revista Biomédica. Vol. 11/No. 2/Abril-Junio, 2000. URL: [www.uady.mx/~biomedic/rb001124.pdf](http://www.uady.mx/~biomedic/rb001124.pdf)
- (18) Citología vaginal exfoliativa en perras con fines de diagnóstico de la fase estrual (celo principalmente). Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de San Carlos de Guatemala; 2000; 15(1):10-14..

**Anexo A.**

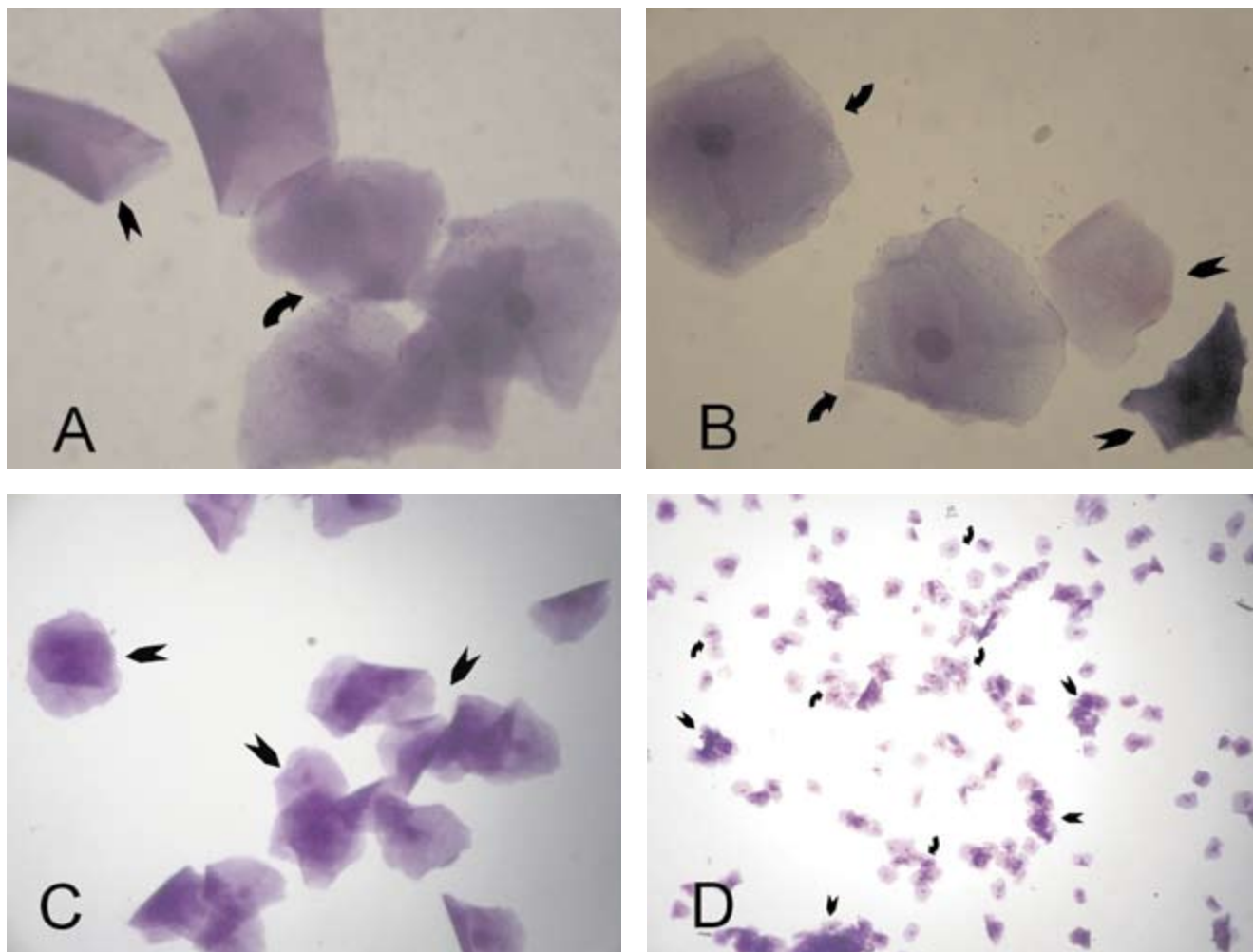
Estandarización de la citología vaginal exfoliativa correlacionando los niveles séricos de progesterona en perras durante la peri-ovulación.

**Anexo B.** Citología vaginal en proestro.



Hernández y Meza, 2003. Hematíes (*flecha roja*), células intermedias (*flecha recta*), células superficiales (*flecha curva*), escamas (*punta de flecha*). A y B = proestro temprano. C y D = proestro tardío.

**Anexo C.** Citología vaginal en estro.



Hernández y Meza, 2003. Células superficiales (*flecha curva*), escamas (*punta de flecha*).