

CITOLOGÍA VAGINAL EN CANINOS: METODOLOGÍA Y APLICACIONES CLÍNICAS

VAGINAL CYTOLOGY IN THE BITCH: TECHNIQUE AND CLINICAL APPLICATION

**María Alejandra Stornelli^{1,4}, César A. Savignone^{2,4}, M. Claudia Tittarelli³,
María Cecilia Stornelli^{1,4}**

¹Instituto de Teriogenología, ²Cátedra de Histología y Embriología, ³Cátedra de Fisiología, ⁴Laboratorio Central, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. B1900AVW. La Plata. Argentina. Tel: +54-221-4236663/4, ext. 457. Fax: +54-4257980.

¹E-mail: astornel@fcv.unlp.edu.ar

Resumen *En este trabajo se analizan diferentes aspectos del ciclo estrol de la perra. Se discuten las aplicaciones clínicas del estudio citológico vaginal y su relación con procesos fisiológicos y patológicos.*

Abstract *This article deals with various aspects of basic physiology of the estrous cycle in the female dog. The clinical use of vaginal cytology and the relationship with physiology and pathology process are reviewed.*

Palabras clave Citología vaginal-perra-ciclo estrol

Key Words Vaginal cytology- bitch- estrous cycle

Introducción

El estudio de la citología vaginal es un método complementario sencillo, poco costoso, no invasivo y que puede ser de gran utilidad en la clínica reproductiva diaria. El conocimiento de la estructura histológica de la pared vaginal y de la fisiología del ciclo estral canino nos permitirá realizar una adecuada interpretación de los resultados obtenidos y relacionarlos con los procesos fisiológicos y patológicos del paciente

Descripción histológica de la pared vaginal

La vagina es una estructura tubular que comunica el útero con el vestíbulo de la vulva. Las dimensiones en la hembra canina son variables dependiendo de la talla del animal (7). Su pared presenta cuatro capas que desde adentro hacia fuera se denominan:

- **Mucosa**
- **Submucosa**
- **Muscular**
- **Adventicia**

La **mucosa vaginal** esta recubierta por un epitelio escamoso estratificado, el cual varía su grosor en las distintas fases del ciclo estral de la perra (18). Este epitelio esta sostenido y nutrido por una lámina propia de tejido conectivo (7). En el epitelio vaginal se describen tres zonas:

La *zona profunda*, corresponde a la capa basal, que presenta células cúbicas de 15 a 20 μm de diámetro, con grandes núcleos y citoplasma basófilo (células basales). Estas células apoyan todas sobre la membrana basal que las separa del tejido conectivo de la lámina propia. Por encima de estas, se encuentran las células parabasales (generalmente 2 capas), que son similares aunque más cilíndricas, midiendo aproximadamente 30 μm (1, 6).

La *zona intermedia* se compone de células poligonales llamadas células intermedias, con núcleos redondos y a menudo retraídos, de aspecto vesicular con cromatina finamente granular. El citoplasma de estas células, que suelen medir entre 35 y 40 a 60 μm , muestra basofilia moderada. A menudo se observan también células naviculares, que se consideran una variante de las anteriores, de forma oval y con su citoplasma rico en inclusiones de glucógeno (1, 6).

La *zona externa*, presenta varias capas de células muy aplanadas (llegan a tener hasta 90 μm de diámetro), de borde definidos, con pequeños núcleos picnóticos y citoplasma eosinófilo. Son las células descamativas (1, 6).

La **submucosa** es una capa de espesor variable, también de tejido conectivo, en donde se localizan abundantes arteriolas y senos venosos (1, 6).

La **túnica muscular** (músculo liso) presenta

tres capas, de acuerdo a su distribución y la dirección de las fibras, separadas entre si por delgadas hojas de tejido conectivo. La más interna de las capas es muy delgada (3 a 4 fibras de grosor) y se dispone longitudinalmente respecto al eje mayor de la vagina. La capa media es de disposición circular y es mucho más gruesa, mientras que la más externa presenta una disposición plexiforme y es nuevamente fina (1, 6).

La **adventicia** está formada por tejido conjuntivo y es rica en nervios y ganglios nerviosos (1, 6).

Relación de la citología vaginal con los cambios endocrinológicos

Los cambios que ocurren en la mucosa vaginal y su epitelio, a través del ciclo estral, son el resultado del aumento de las concentraciones séricas de estrógenos producto de la actividad ovárica durante el proestro (8). Estos cambios celulares pueden observarse en las células vaginales exfoliadas. Los estrógenos causan el engrosamiento del epitelio vaginal a través del aumento de las capas celulares del mismo. Las células epiteliales en este proceso se alejan de la membrana basal hacia el lumen vaginal, distanciándose del soporte vascular nutricio y progresando hacia la muerte celular. De esta manera los cambios citológicos vaginales son reflejo de las variaciones de las concentraciones séricas de estrógeno. Es así que los diferentes tipos celulares representan distintos estadios de muerte celular. Tan pronto como las células vaginales esféricas mueren comienzan a agrandarse y su forma se vuelve más irregular. Los núcleos celulares también sufren cambios que reflejan el proceso de muerte, estos comienzan a disminuir su tamaño, se vuelven picnóticos para luego desintegrarse dando como resultado una célula enucleada (2).

Fisiología del ciclo estral canino

La hembra canina cicla durante todo el año. El ciclo estral canino presenta cuatro fases: proestro, estro, diestro y anestro (21).

Proestro: en este período existe actividad folicular, su comienzo se caracteriza por sangrado vaginal, agrandamiento vulvar y atracción de los machos. Su duración es variable, oscila desde 24 h hasta 25 días con un promedio de 9 días. Usualmente la hembra rechaza los intentos de cópula del macho con gruñidos, alejamiento o mordiscos. A medida que transcurre este período la hembra se vuelve menos agresiva. Esta fase generalmente se asocia, pero no siempre, con cantidades variables de secreción vaginal sanguinolenta, producto de la diapédesis de glóbulos rojos y ruptura capilar subepitelial en el endometrio (10).

Los folículos comienzan a crecer en el anestro, pero solo bajo la influencia hormonal pituitaria logran madurar

y obtener la capacidad de sintetizar y secretar estrógenos, responsables de los eventos ocurridos en el proestro (4).

En respuesta a la producción estrogénica folicular proliferan las capas celulares del epitelio vaginal y el endometrio aumenta su espesor preparándose para el coito y la gestación.

Las capas del epitelio vaginal aumentan rápidamente alejándose del soporte vascular lo que resulta en la muerte celular y es fácilmente reconocido en la citología vaginal. Estos cambios disminuyen la probabilidad de lesiones vaginales durante el servicio (5).

El endometrio se prepara para la implantación mediante el aumento de su espesor y de su actividad glandular (10).

Estro: en esta fase la hembra permite ser montada volviendo a rechazar al macho cuando finaliza este período.

Uno o dos días antes del comienzo del estro, la estrogenemia alcanza su nivel máximo para comenzar a declinar cuando empieza el estro. Conjuntamente las células foliculares ováricas comienzan a luteinizarse y a secretar progesterona. El descenso de la estrogenemia y el ascenso de la progesteronemia coinciden con el comienzo de la aceptación y la posibilidad de cópula (24). Simultáneamente ocurre una retroalimentación positiva hacia el hipotálamo e hipófisis que origina una onda secretoria de hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) que coincide con el inicio de la aceptación. La progesterona alcanza niveles superiores al basal antes de que ocurra la onda de LH (3, 4).

Es así que durante el estro ocurre un descenso progresivo del estradiol, un aumento paulatino de la progesterona y una onda breve de liberación de LH (12-24 h). Aproximadamente dos días después de la onda de LH ocurrirá la ovulación de ovocitos primarios que estarán maduros y capaces de ser fecundados unos dos días luego de la ovulación (3, 11).

El útero continúa su preparación para la implantación, la vulva se vuelve blanda y flácida para permitir la penetración. La citología vaginal refleja la hiperestrogenemia previa y no hay modificaciones que indiquen el día del pico de LH (5).

Diestro: comienza aproximadamente ocho días después de ocurrido el pico de LH. En éste período el cuerpo lúteo secreta progesterona, la cual continúa por encima de los niveles basales, alcanzando niveles máximos 20 -30 días post ovulación. La concentración de progesterona sérica mantiene estos valores elevados una a dos semanas para luego declinar lentamente durante un lapso de 10-20 días (10).

El útero mantiene la hipertrofia de su estructura glandular y la hipervascularización en respuesta de la progesteronemia elevada alcanzando su mayor tamaño, en la perra

vacía, el día 20 o 30 del diestro (momento de concentración más alta de progesterona en sangre) (4).

La vulva retorna al tamaño normal y pierde la flacidez (5).

Anestro: es el período en que ocurre la involución uterina. Posee una duración variable con un promedio de 4,5 meses (5).

Obtención, acondicionamiento, procesado de las muestras e identificación de los diferentes tipos celulares

Obtención y acondicionamiento de las muestras

La obtención de muestras de extendidos vaginales puede realizarse por diversos métodos. Las técnicas utilizadas para la toma de muestra deben ser sencillas, aplicables al paciente independientemente de su tamaño, causar mínimas molestias al animal y ser de bajo costo.

El método del hisopado reúne todos los requisitos mencionados por lo tanto puede considerarse como método de elección.

Para realizar la técnica mencionada se utiliza un hisopo de algodón estéril con un palillo de 12 a 17 cm de largo, el cual es ligeramente humedecido con solución fisiológica estéril. Seguidamente se separan los labios vulvares con suavidad y se introduce el hisopo por la comisura dorsal de la vulva hacia dorso- craneal evitando la fosa del clítoris. El hisopo se introduce la distancia necesaria para alcanzar el canal pélvico, luego es rotado sobre las paredes vaginales. Todo el procedimiento se realiza en pocos segundos y no causa molestias al animal (8, 23).

La fosa del clítoris debe ser evitada para que el extendido sea representativo de la mucosa vaginal y no de las células de la fosa del clítoris que no se modifican durante el ciclo estral y pueden confundirse con las células superficiales (12).

Una vez realizada la toma de muestra, el hisopo es retirado y el mismo se hace rodar suavemente (para no distorsionar la imagen celular) sobre un portaobjetos seco, desengrasado y rotulado (se colocará fecha y número de muestra). Deben realizarse dos o tres extendidos para asegurar material suficiente para una buena observación. Los extendidos vaginales deben secarse al aire y fijarse en alcohol metílico 95-100 % para su conservación (20).

Luego se procederá a la tinción inmediata o se realizará la misma en los días subsiguientes.

Tinciones utilizadas. Desarrollo y metodología de los procesos tintoriales

Existen diferentes tinciones que pueden ser utilizadas para colorear los extendidos vaginales. Las técnicas más sencillas y rápidas serán las elegidas para realizar en el

consultorio mientras que las técnicas más complejas se reservarán para su uso en el laboratorio. Cualquier tinción utilizada debe al menos permitir reconocer las diferencias morfológicas de cada tipo celular.

Nuevo Azul de Metileno:

Preparación del colorante: Es un colorante de fácil utilización, de moderado costo y fácil conservación. La solución de nuevo azul de metileno se prepara al 5 % en una solución formolada al 1 % (16).

Azul de Metileno:

Preparación del colorante: La solución de azul de metileno se prepara al 1 % en agua destilada formolada al 1 %. (16).

Técnica: La metodología utilizada es la misma que la empleada con el Nuevo Azul de metileno (16)

Giemsa:

Observaciones: Esta tinción si bien es de moderada complejidad puede utilizarse en el consultorio (9).

May -Grunwald-Giemsa:

Observaciones: Al utilizar esta coloración los núcleos celulares se observan violeta- rojizo y el citoplasma rosavíoláceo .Se recomienda utilizar esta coloración en el laboratorio (9).

Particularidades morfológicas y tintoriales de cada tipo celular

Células basales:

Estas células dan origen a todos los tipos celulares epiteliales observables en los extendidos vaginales. Son pequeñas, poseen poco citoplasma y raramente son vistas en los extendidos (10, 12).

Células parabasales:

Estas son las células vaginales más pequeñas observadas en el extendido vaginal. Son redondas o ligeramente ovaladas, poseen núcleo grande y escasa cantidad de citoplasma en relación al tamaño nuclear. Se tiñen bien con cualquiera de las tinciones utilizadas de rutina. Estas células se exfolian de la capa contigua a la capa de células germinales (basales) y se encuentran cerca del los vasos (10, 12).

Células intermedias:

Su tamaño oscila desde ligeramente más grande que las parabasales hasta dos veces su tamaño. Son ovals o redondas, su núcleo es generalmente más pequeño que el de las células parabasales y poseen mayor cantidad de citoplasma. Estos cambios morfológicos representan el primer paso en la muerte celular. Se las clasifica en células intermedias pequeñas y células intermedias grandes (10, 12).

Células superficiales:

Reflejan los cambios característicos de muerte celular y están situadas en la capa celular adyacente al lumen vaginal. Son las células más grandes observadas en la citología vaginal, poseen bordes angulares, núcleo pequeño y picnótico, o carecen de él (10, 12).

Células metaestrales:

Son células grandes y poseen uno o más neutrófilos dentro de su citoplasma, pueden ser vistas en el diestro temprano (10, 12).

Células de la fosa del clítoris:

Son células fusiformes y carecen de núcleo (10, 12).

Evaluación e interpretación de los resultados obtenidos en el estudio de la citología vaginal

Variaciones de la citología vaginal durante el ciclo estral

Proestro: la imagen citológica del proestro refleja la presencia de folículos funcionales y en maduración con activa producción estrogénica, lo cual determina un incremento de estrógenos circulantes (8, 10, 12).

Proestro temprano: los extendidos vaginales de una perra en proestro temprano, presentan variable cantidad de glóbulos rojos (provenientes del rápido desarrollo endometrial), numerosas células parabasales e intermedias pequeñas y grandes. Frecuentemente se observan neutrófilos y bacterias en número variable. El fondo del extendido aparece sucio debido a la presencia de secreciones vaginales viscosas que se tiñen ligeramente (8, 10, 12).

Proestro medio: las células intermedias grandes y superficiales proliferan y reemplazan a las células parabasales e intermedias pequeñas. Los eritrocitos pueden o no estar presentes (provenientes del útero), los neutrófilos desaparecen (por incapacidad de atravesar las numerosas capas epiteliales vaginales inducidas por los estrógenos) y el fondo del extendido puede ser sucio o claro (8, 10, 12).

Proestro tardío: la imagen citológica está representada por un predominio de células superficiales (> 80 %), con núcleo picnótico o si núcleo. No se observan neutrófilos y aparecen eritrocitos en número variable, siendo el fondo del extendido claro (8, 10, 12).

Estro: la imagen citológica está representada por células superficiales nucleadas y anucleadas las cuales alcanzan más del 80% y en algunos casos llegan el 100%. No se observan neutrófilos y los eritrocitos pueden estar o no presentes. El fondo permanece claro, por ausencia del material granuloso observado en el proestro (8, 10, 12).

Diestro: el porcentaje de células superficiales disminuye abruptamente hasta aproximadamente el 20 %. La mayor parte de las células está representada por células intermedias y parabasales. Los neutrófilos pueden en-

contrarse en escasa o moderada cantidad, o pueden estar ausentes. Ocasionalmente se observan células metaestrals. El fondo se observa sucio con grandes cantidades de detritus (8, 10, 12).

Anestro: en el extendido vaginal se observan células parabasales e intermedias pequeñas. Los neutrófilos pueden o no estar presentes, y los eritrocitos suelen faltar. Si se observan bacterias generalmente son parte de la flora normal. El fondo aparece claro o granular (8, 10, 12).

Relación de los resultados obtenidos con diferentes procesos fisiológicos y patológicos

El estudio de la citología vaginal brinda información de gran utilidad en la clínica reproductiva diaria. Puede ser utilizada tanto para el control de procesos fisiológicos (aproximación del momento adecuado para realizar el servicio, estimación del momento del ciclo estral canino, estimación de la fecha probable de parto, etc) así como para la aproximación diagnóstica y seguimiento de procesos patológicos (vaginitis, quistes foliculares ováricos, endometritis, etc).

Si bien este método es sumamente útil, sencillo y poco costoso no deben olvidarse las limitaciones del mismo para evitar incurrir en errores. Este principio debe respetarse para cualquier método complementario.

Estimación del momento del ciclo estral canino

Como se mencionó en «variaciones de la citología vaginal durante el ciclo estral» la citología vaginal permite estimar el momento del ciclo estral en que se encuentra la hembra.

Aproximación del momento de servicio

La observación de la conducta de la hembra, muchas veces, permite determinar el momento en que la misma entra en celo y cuando está lista para el servicio. Sin embargo en muchas ocasiones esto no es así e identificar el inicio del celo como la elección del momento de servicio basándose en los signos externos de celo y en la receptividad de la hembra solo llevan a grandes frustraciones (8, 10).

Si analizamos lo comentado anteriormente, podremos observar que la citología vaginal es de gran ayuda en la estimación del proestro, estro, diestro y anestro.

De esta manera en relación a la acción estrogénica sobre el epitelio vaginal, podremos estimar el comienzo del proestro y el inicio del estro aproximando así el momento del servicio y considerando que la hembra debe unirse al macho cuando el porcentaje de células superficiales alcance o supere el 80%. Si la hembra no acepta al macho deberán realizarse nuevos intentos en los días sucesivos. Sin embargo debemos conocer que este método no permite

determinar en forma exacta el momento en que los óvulos están maduros y capaces de ser fecundables. Por lo tanto si estamos trabajando con una hembra que no acepta la cópula, si solo contamos con un servicio por parte del macho o si trabajamos con inseminación artificial debemos utilizar además de la citología vaginal otros métodos complementarios como vaginoscopia y determinaciones hormonales (Progesterona y LH) (13, 14).

Estimación de la fecha probable de parto

Diversos investigadores han comprobado que el parto, en la perra, ocurrirá 56 a 58 días luego del primer día del diestro identificado por citología vaginal. Es así que la realización y observación de una serie de extendidos vaginales a partir de la detección del celo permitirá reconocer el primer día del diestro y estimar la fecha probable de parto. Esto posibilita un manejo racional del mismo y mayor probabilidad de sobrevida materna y neonatal (10, 12, 15).

Estimación de la edad gestacional, controles gestacionales y elección del momento para una cesárea programada

Si reconocemos el primer día del diestro por citología vaginal podremos estimar la edad gestacional para seleccionar adecuadamente los estudios complementarios indicados en cada etapa de la gestación a fin de controlar la salud materna, viabilidad fetal y número de fetos gestados. Esto aumenta las posibilidades de llevar a cabo una gestación sin problemas o detectar los mismos precozmente.

Por otro lado en diversas situaciones (suplementación gestacional con progesterona por hipoluteidismo, alta probabilidad de distocia, etc) nos permite realizar una cesárea programada en el momento preciso, evitando el nacimiento de cachorros prematuros que tendrán menor viabilidad neonatal o la muerte de los mismos dentro del útero, por no ocurrir el nacimiento en el momento adecuado (10, 12, 15).

Reconocimiento de la acción estrógenica

Administración de estrógenos

La administración de estrógenos exógenos es utilizada ocasionalmente con el fin de inhibir la implantación embrionaria. Esto puede causar alteraciones funcionales que ponen en riesgo la vida del animal.

Mediante el estudio citológico vaginal puede arribarse al diagnóstico presuntivo de administración exógena de estrógenos ya que la mucosa vaginal sufre los mismos cambios que por la acción estrogénica endógena (17, 18).

Reconocimiento de estro fragmentado

Las hembras jóvenes pueden presentar ciclos monofásicos, que se repiten cada 3 a 6 semanas, en los cuales ocurre solo la fase folicular (estro fragmentado). Esto

puede confundirse con intervalos interestrales acortados. Un seguimiento mediante citología vaginal permite aproximar el diagnóstico, arribándose al diagnóstico definitivo mediante la aplicación de otros métodos complementarios (determinación de la progesteronemia) (17, 25).

Identificación de acción estrogénica persistente

Los quistes foliculares ováricos son una de las causas de estro persistente. La citología vaginal permitirá identificar la acción estrogénica persistente, y será el primer paso en su aproximación diagnóstica. Otros métodos complementarios permitirán arribar al diagnóstico presuntivo. En el caso de quistes foliculares ováricos una ecografía será de gran ayuda. (18)

Detección de celos silentes

La imagen citológica vaginal característica de la acción estrogénica permite identificar la ocurrencia de celos con escasas manifestaciones externas permitiendo evidenciar la ausencia de anestro (17).

Aproximación diagnóstica en el síndrome de ovario remanente

En perras ovariectomizadas la aparición cíclica de descarga vulvar sanguinolenta, atracción de machos, con citología vaginal representativa de proestro es un indicador de presencia de tejido ovárico (17).

Aproximación diagnóstica del edema vaginal del proestro (Hiperplasia vaginal)

La hiperplasia vaginal es una consecuencia del agrandamiento edematoso de la pared de esta y es causa problemas en el servicio natural. Esta entidad se manifiesta frecuentemente en perras jóvenes, debido a una respuesta exagerada a la secreción de estrógenos. Se puede arribar a un diagnóstico por medio de la citología vaginal, en la cual se observará una imagen de proestro o estro (12).

Aproximación diagnóstica de vaginitis y endometritis infecciosa

Si bien mediante la utilización de la citología vaginal se puede identificar la presencia de un proceso inflamatorio en vagina o útero no es posible conocer la localización del mismo. En los extendidos se observará la presencia de un gran número de células inflamatorias con predominio de neutrófilos muchos de los cuales se encontrarán en vías de degeneración y poseerán bacterias en su citoplasma. Si estas observaciones persisten en el tiempo el cuadro es compatible con un proceso infeccioso (12, 19, 22).

Es importante recordar que en el diestro temprano pueden observarse neutrófilos y bacterias pero en número menor y la imagen citológica no persiste en el tiempo (12).

Aproximación diagnóstica de tumores

Mediante la utilización de la citología vaginal se puede arribar al diagnóstico de tumores con asiento en la cavidad vaginal o uterina de origen genital o producto de la invasión de neoplasias del aparato urinario, que exfolien células observables en los extendidos.

Los tumores que más frecuentemente son diagnosticados por citología vaginal son: tumor venéreo transmisible, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transicionales que invaden la vagina (10, 12, 17)

Aproximación diagnóstica de sub-involución de sitios placentarios

La observación de células trofoblásticas permite arribar a diagnóstico de esta entidad (8).

Conclusiones

Finalmente es preciso remarcar que si bien la citología vaginal es un método complementario sencillo, poco costoso y muy útil en la aproximación diagnóstica de variados procesos de enfermedad y en el seguimiento de diferentes procesos fisiológicos, deben recordarse sus limitaciones como método complementario. Esto evitará incurrir en errores al sobre dimensionar su valor como método complementario de diagnóstico.

Por otra parte debe recordarse que la observación aislada de una sola muestra puede llevar a errores, ya que diferentes situaciones pueden compartir la misma imagen citológica. Es así que se hace imprescindible el estudio seriado de varias muestras a lo largo de un período de tiempo y la utilización de otros métodos complementarios de diagnóstico a fin de arribar a resultados representativos del estado fisiológico o patológico del paciente.

Bibliografía

1. Banks J. Histología Veterinaria Aplicada. (Ed. 2nd) El Manual Moderno. (México DF). (1996); 639-671.
2. Concannon P W. A review for breeding management and artificial insemination with chilled or frozen semen. Proceedings of canine reproduction Symposium. American college of theriogenologist. 1997; p.1-17.
3. Concannon P W, Hansen W, McEntee K. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. Biol. Reprod. 1977; (17): 604-613.
4. Concannon P W, Hansen W, Visek W J. The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. Biol. Reprod. 1975; (13): 112-121.
5. Concannon PW, Mc Cann J P, Temple M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. Reprod. Ferti. 1989; 39: 3- 25.
6. Dieter Dellman (1994) Histología Veterinaria (Ed. 2nd) Acribia, Buenos Aires. 267-290.
7. Dieter Dellman Citología e Histología Inter-Médica, Buenos

Aires (Argentina), 1999; 301-319.

8. Dumon JF. Frottis vaginaux chez la chienne. En: Dumon C, Fontbonne A (ed). *Reproduction du chien et du chat*. PMCAC. (Paris), 1992 ; 47-52

9. Dumond C, Fontbonne A. Les indispensables de l'animal de compagnie. Ed P.M.C.A.C. Paris (Francia), 1993; p.153-159.

10. Duncan J R. *Veterinary Laboratory Medicine*. (3rd Ed) Iowa State University Press Ames, Iowa. (United States), 1995; 213-216.

11. Ettinger S J, Feldman E R. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Ed. Saunders Philadelphia (United States), 1995; p.1664-1662

12. Fastard W. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*. 2000; (53): 175-186.

13. Feldman E C, Nelson R W. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction* (2nd Ed). W.B. Saunders, Philadelphia (United States), 1996.

14. Fosberg C L. Accurate monitory of the estrus cycle of the bitch for artificial insemination. *Proceedings 19th World Congress of the WASAVA*. 1994; p.601-605.

15. Harrop A E. Mating natural service and artificial insemination in reproduction in the dog. Ed. Tindall & Cox. London (England), 1960; p.87-99.

16. Helmut Kraft. Métodos de laboratorio para el diagnóstico del ciclo estral y la preñez. En: *Métodos de laboratorio clínico en medicina veterinaria de mamíferos domésticos*. (3^{er} ed). Acribia S.A Zaragoza (España), 1998; 229-237.

17. Iovine S. *El laboratorio en la clínica*. (3^{er} Ed) Panamericana. Buenos Aires (Argentina), 1985; 787-847.

18. Jhonston D J, Kuztritz M V R, Olson P. *Canine and feline theriogenology*. Ed. Saunders. Philadelphia (United States), 2001; 16:287-306.

19. Olson P, Thomas T, Husted P, Nett T. Evaluación clínica de infertilidad en la perra. En: Ford, R. *Signos clínicos y diagnóstico en pequeños animales*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, (Argentina), 1992; 549-569.

20. Sokolowski J H. Reproductive patterns in the bitch. *Vet. Clin. North. Am*. 1977; 7: 653-666.

21. Stornelli M A, Cerdá R, Arauz M S, Gobello M C, Stanchi N O. Estudio de Mycoplasmas y Bacterias Aeróbicas en la vagina craneal de hembras caninas clínicamente sanas. *Analecta Veterinaria*. 2000; (20); 1: 40-42.

22. Thrall M A, Olson P N. La vagina. En Cowel, R. L.(ed) *Cilología y hematología diagnóstica en el perro y el gato*. (2nd Ed) Gráfica IN S.A. Barcelona (España), 1999; 240-248

23. Wildt D T, Chacabarty P K, Panko W B. Relationship of reproductive behavioral, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch. *Biol. Reprod* 1978; 18: 561-570.