



**UNIVERSIDAD
VIÑA DEL MAR**

Escuela de Ciencias Veterinarias

**ESTANDARIZACIÓN DE LA MEDICIÓN DE
PROGESTERONA SÉRICA EN LA PERRA MEDIANTE
ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA
(ELISA)**

Memoria Para Optar al Título de Médico Veterinario

NICOLE ANDREA ROBLES MERCADO

Profesor Guía: Dra. Mónica De Los Reyes Solovera

VIÑA DEL MAR – CHILE

2012

ÍNDICE

ÍNDICE DE MATERIAS

1.	RESUMEN	1
	ABSTRACT	3
2.	INTRODUCCIÓN	5
3.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
	3.1.Fisiología reproductiva de la perra	8
	3.1.1.Caracterización endocrina del Ciclo estral	9
	3.1.1.1.Anestro.....	10
	3.1.1.2.Proestro	10
	3.1.1.3.Estro.....	12
	3.1.1.4.Diestro.....	13
	3.1.2.Biosíntesis de las hormonas esteroidales en el ovario.....	15
	3.1.2.1.Progesterona.....	16
	3.1.3.Determinación de la ovulación	17
	3.2.Ensayos hormonales y su utilidad diagnóstica.....	21
	3.2.1.Uso de ensayos hormonales en el manejo reproductivo de la perra..	22
	3.3.ELISA.....	24
	3.3.1.Tipos	26
	3.3.2.Reactivos	28
	3.3.2.1.Soporte sólido	28
	3.3.2.2.Anticuerpo.....	28
	3.3.2.3.Buffer de lavado	29
	3.3.2.4.Buffer de bloqueo.....	29
	3.3.2.5.Antígeno.....	30
	3.3.2.6.Enzima	30
	3.3.2.7.Sustrato.....	30
	3.3.2.8.Solución de detención (“Stop solution”)	31
	3.3.4.Parámetros de validación de un ELISA cuantitativo.....	32

3.3.4.1. Validación analítica	32
3.3.4.1.1. Exactitud	32
3.3.4.1.2. Precisión	33
3.3.4.1.3. Linealidad e intervalo	34
3.3.4.1.4. Sensibilidad.....	34
3.3.4.1.5. Límite de detección	34
3.3.4.1.6. Límite de cuantificación.....	35
3.3.4.1.7. Especificidad	35
3.3.5. ELISA como técnica de diagnóstico hormonal.....	35
3.3.5.1. Antecedentes de ELISA cuantitativo para la medición de progesterona canina.....	36
4. OBJETIVOS	39
4.1. Objetivo general.....	39
4.2. Objetivos específicos	39
5. MATERIALES Y MÉTODO.....	40
5.1. Materiales del ensayo	40
5.1.1. Animales	40
5.1.2. Reactivos para la medición hormonal con ELISA	40
5.1.3. Buffers utilizados en ELISA.....	41
5.1.4. Instrumentos y equipamiento requerido para ELISA.....	41
5.1.5. Reactivos para la medición hormonal con RIA	42
5.1.6. Instrumentos y equipamiento requerido para RIA.....	43
5.2. Método	43
5.2.1. Obtención y procesamiento de las muestras	43
5.2.2. Clasificación.....	43
5.2.3. Medición hormonal.....	44
5.2.3.1. ELISA cuantitativo.....	44
5.2.3.1.1. Preparación de los reactivos.....	44
5.2.3.1.2. Preparación de estándares de progesterona	46
5.2.3.1.3. Procedimiento del ensayo.....	47
5.2.3.2. ELISA semicuantitativo	50

5.2.3.3.RIA	50
5.2.4.Diseño experimental	51
5.2.5.Análisis de datos	52
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
6.1.Optimización del ensayo	53
6.2.Curva de calibración	54
6.3.Sensibilidad.....	55
6.4.Precisión	56
6.5.Correlación entre ELISA y RIA.....	57
6.6.Concentraciones de P ₄ en relación al ciclo estral	60
7. CONCLUSIONES.....	65
8. BIBLIOGRAFÍA	66
9. ANEXOS	85

ÍNDICE DE FIGURAS EN EL TEXTO

1.	Hormonas reproductivas en el ciclo estral de la perra.....	9
2.	Biosíntesis de hormonas esteroidales.....	15
3.	Células epiteliales vaginales.....	18
4.	Citología vaginal	19
5.	Vaginoscopía en diferentes estados del ciclo estral	20
6.	Diagrama de formatos más comunes de ELISA.....	27
7.	ELISA de competencia.....	28
8.	Preparación de concentraciones estándar de progesterona	47
9.	Distribución de muestras en microplaca	48
10.	ELISA de competencia con doble anticuerpo	49
11.	Curva de calibración con concentraciones estándar de P_4 para la medición de P_4 en muestras de suero canino	54
12.	Regresión lineal de concentraciones de P_4 (ng/ml) de 75 muestras de suero canino determinadas por ELISA y RIA.....	59
13.	Determinación de las concentraciones de P_4 mediante ELISA en 9 perras durante proestro y estro.....	60
14.	Concentraciones de P_4 (ng/ml) detectadas en muestras provenientes de 52 perras presentadas a ovariectomía (OH) en diferentes estados del ciclo estral	64

ÍNDICE DE TABLAS EN EL TEXTO

1. Cálculo de la sensibilidad del ensayo.....	55
2. Coeficientes de variación intra e interensayo para la determinación de P ₄	56
3. Concentraciones de P ₄ (ng/ml) determinadas por ELISA y RIA en 78 muestras de suero.....	58
4. Concentraciones de P ₄ (ng/ml) detectadas en muestras provenientes de 52 perras presentadas a ovariectomía (OH) en diferentes estados del ciclo estral	63

ÍNDICE DE ANEXOS

1. Concentraciones de P ₄ determinadas por RIA y ELISA en 9 pacientes durante proestro y estro.....	85
2. Evaluación de concentraciones de P ₄ determinadas por RIA y ELISA semicuantitativo y cuantitativo, citología vaginal de 9 pacientes durante proestro y estro.....	88

1. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y estandarizar un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) cuantitativo para determinar concentraciones de P₄ canina con el fin de evaluar su ciclo reproductivo. Este fue realizado en el Laboratorio de Reproducción del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile,

Se evaluaron 101 muestras de suero obtenidas de perras de diferentes razas y mestizas, de 1 a 6 años de edad, clínicamente sanas en diferentes estados del ciclo estral. Un primer grupo de muestras provino de hembras presentadas a ovariectomía en la Unidad de Salud e Higiene Ambiental de la Municipalidad de La Pintana y en el Centro de Atención Primaria de Mascotas Santo Tomás, del sector de Santo Tomás, en la comuna de La Pintana. Un segundo grupo de perras, se presentaron en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, para seguimiento de su ciclo durante proestro y estro.

ELISA fue capaz de detectar los cambios fisiológicos en la P₄ a través del ciclo estral. Durante el proestro la concentración se encontró en niveles basales hasta llegar al peak de LH. En el estro las concentraciones de P₄ siguieron en aumento debido a la luteinización pre y post ovulatoria. Durante el diestro temprano la concentración fue más alta, se detectó un máximo de 62,67 ng/ml, con una disminución progresiva en el diestro tardío. En anestro los niveles de P₄ fueron bajo 1 ng/ml.

La sensibilidad del ensayo fue de 0,19 ng/ml. Para evaluar su exactitud, se seleccionaron 75 muestras con un rango de 0,33 a 38,41 ng/ml para comparar su concentración con un radioinmunoensayo (RIA) previamente validado. Se obtuvo una

correlación significativamente alta ($r=0,9$; $p=0,0001$) entre ambos métodos. La precisión intraensayo e interensayo de ELISA fue de 8,1% y 13%, respectivamente.

Las características del ensayo fueron consideradas satisfactorias tanto analítica como clínicamente, pudiendo ser aplicado con certeza aceptable para la determinación de concentración de P_4 sérica durante los diferentes estados del ciclo estral de la perra.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop and standardize a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the Reproduction Laboratory of the Department of Animal Production Development at the Faculty of Veterinary and Animal Sciences of the Universidad de Chile university, to determine concentrations of canine P₄ to assess the reproductive cycle.

101 serum samples were evaluated obtained from dogs of different breeds and crossbred from 1 to 6 years old, clinically healthy at different stages of the estrous cycle. A first set of samples came from bitches submitted to ovariohysterectomy in the Health and Environmental Hygiene unit of the Municipality of La Pintana and in the Pet's primary Care Center Santo Tomas in the Santo Tomas area, in the district of La Pintana. A second group of bitches were presented at the Reproduction Laboratory of the Faculty of Veterinary and Animal Sciences of the Universidad de Chile university, to monitor their cycle during proestrus and estrus.

ELISA was able to detect the physiological changes in the P₄ through the estrous cycle. During proestrus the concentration was found in basal levels up to the peak of LH. In estrus P₄ concentrations continued to increase due to the pre-and post-ovulatory luteinization. During the early diestrus the concentration was higher, a maximum of 62.67 ng / ml, was detected with a progressive decrease in the late diestrus. In anoestrus P₄ levels were below 1 ng / ml.

The sensitivity of the assay was 0.19 ng / ml. To evaluate its accuracy, 75 samples were selected with a range of 0.33 to 38.41 ng / ml for comparing its concentration in a radioimmunoassay (RIA) previously validated. A highly significant correlation ($r = 0.9$, $p = 0.0001$) between the two methods was obtained. The intra- and interassay precision of ELISA was 8.1% and 13%, respectively.

Trial characteristics were considered both analytically and clinically satisfactory and can be applied with acceptable accuracy for determination of P₄ serum concentration during the different stages of the estrous cycle of the bitch.

2. INTRODUCCIÓN

La maduración ovocitaria es uno de los muchos aspectos en los que la fisiología reproductiva canina difiere de la mayoría de los animales domésticos. Los ovocitos se ovulan en el proceso de profase de la primera división meiótica, en estado de vesícula germinal (GV) y completan su maduración nuclear y citoplasmática en el oviducto, dentro de 2 a 5 días (De Los Reyes *et al.*, 2011).

La determinación del día de ovulación en la perra con la mayor precisión posible, es considerada como uno de los factores más importantes para establecer el momento de cruce o inseminación (Buff, 2005; Fontbonne y Lévy, 2007). Además, es el primer prerrequisito para utilizar biotecnologías reproductivas, tanto en investigación como en la práctica clínica (Reynaud *et al.*, 2006; De Los Reyes *et al.*, 2012).

Existen técnicas que ayudan en la determinación de la ovulación. Junto con el examen clínico reproductivo, que incluye la observación del genital externo, citología vaginal y vaginoscopía (Fontbonne y Lévy, 2007) asociado al comportamiento estral, el incremento de los niveles de progesterona (P_4) sérica es un indicador confiable de ovulación (Fontbonne y Lévy, 2007; Chapwanya *et al.*, 2008; Brugger *et al.*, 2011). También la medición seriada de la hormona luteinizante (LH), se utiliza para estimar el momento de ovulación, ya que la ovulación ocurre en la mayoría de las perras alrededor de 36-50 h luego del alza de LH (Concannon, 2009). Sin embargo, para determinar este incremento de LH, se requiere de al menos 2 muestras diarias de sangre, por lo que lo hace poco factible en la práctica clínica y se limita principalmente a protocolos de investigación (Fontbonne y Lévy, 2007).

El nivel plasmático de P_4 periférica comienza a incrementar de 0,2-0,4 ng/ml a 0,6-0,8 ng/ml, 1 o 2 días previos al peak de LH (Concannon, 2011), alcanzando niveles de 5 a 8 ng/ml cuando ocurre la ovulación (Ververidis *et al.*, 2002; Brugger *et al.*, 2011; Concannon, 2011). Por lo tanto, la evaluación de P_4 cobra importancia, ya

que en la actualidad es el método que permite la estimación más certera de la ovulación y por tanto, la detección del período de mayor fertilidad (Buff, 2005; Fontbonne y Lévy, 2007; Brugger *et al.*, 2011).

En la actualidad, la progesterona se mide por métodos cuantitativos o semicuantitativos. Existen kits comerciales de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) semicuantitativos como: Target canine ovulation test®, Premate test®, K9 Proges-check® y Status-Pro® (Root Kustriz, 2001; Buff, 2005) que pueden ser utilizados en la consulta veterinaria, siendo de aplicación fácil y rápida. El inconveniente está en la confiabilidad de sus resultados, ya que se basa en la interpretación subjetiva de cambios de color y entregan rangos de concentración sérica muy amplios. Adicionalmente, las técnicas cuantitativas en la medición de la P₄ como: radioinmunoensayo (RIA), quimioluminiscencia (CLIA) o ELISA cuantitativo, entregan un valor específico y objetivo (Buff, 2005), sin embargo, deben realizarse en laboratorios especializados.

El RIA es utilizado como método de rutina para el análisis hormonal, sin embargo, presenta ciertos inconvenientes relacionados con el uso y la inestabilidad de materiales radiactivos (Forsberg *et al.*, 1993; Chapwanya *et al.*, 2008). Los ensayos inmunoenzimáticos (EIA) son la actual alternativa al RIA, pero su uso para la estimación de la P₄ canina es aún limitado (Ververidis *et al.*, 2002; Chapwanya *et al.*, 2008). Esto podría explicarse por la ausencia de laboratorios, suficientemente equipados, dispuestos a poner a punto estas técnicas en animales pequeños. Esta situación obliga a los médicos veterinarios a recurrir a laboratorios de medicina humana, los que no siempre proveen resultados aceptables, debido a las diferencias moleculares y de rangos hormonales entre las distintas especies (Gobello, 1999). Por estas razones se hace necesario, tanto para la evaluación clínica como para la investigación científica, estandarizar adecuadamente la medición de esta hormona en la perra.

® Bio-Veto Test, France; Biovet, Canada; Endocrine Technology, Newarck, CA; Synbiotics, San Diego, CA.

El objetivo del presente estudio fue estandarizar una técnica de ELISA cuantitativa para la medición de progesterona sérica en la perra asociada al ciclo estral y ovulación.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Fisiología reproductiva de la perra

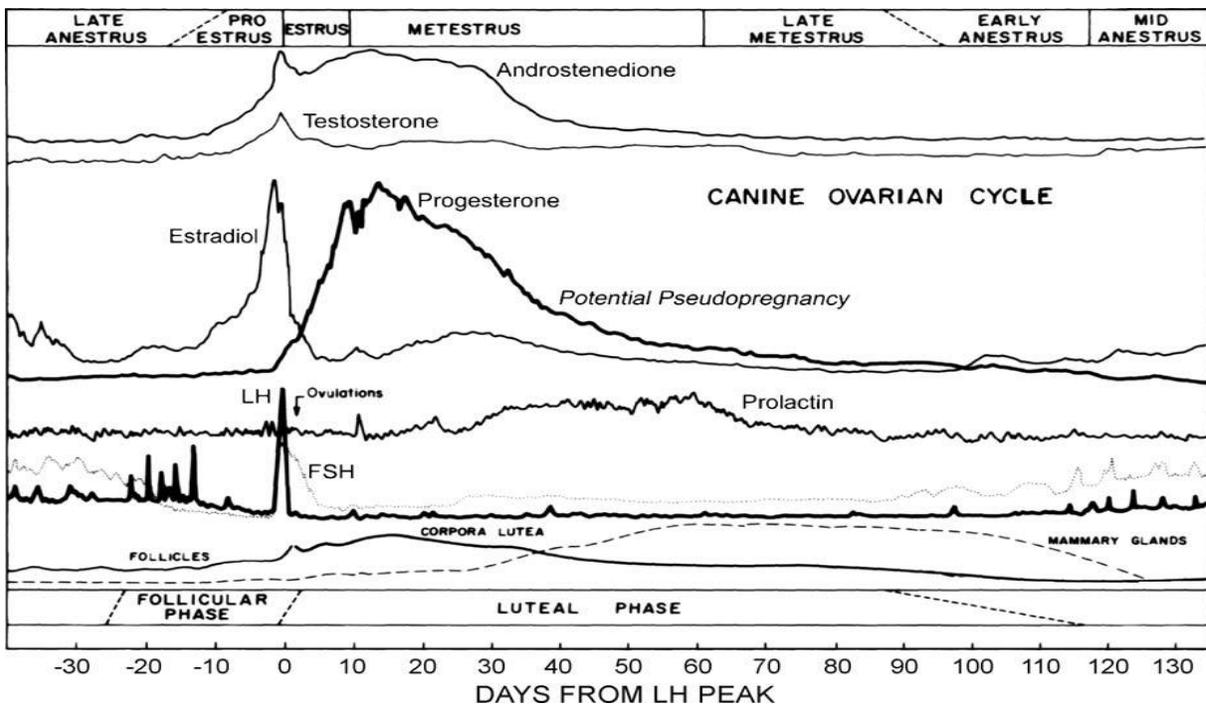
La fisiología reproductiva canina tiene características únicas. La perra es monoéstrica, poliovulatoria, no estacional, es decir, ovula espontáneamente una o dos veces por año y la ovulación puede ocurrir en cualquier época del año (Vermeulen, 2009). Posee el ciclo sexual más prolongado entre todas las especies, con un intervalo interestro de 5 a 12 meses, en promedio 7 meses (Jeffcoate, 2004; Auke y Schaefers-Okkens, 2010; Concannon, 2011). Después de los 8 años de edad, la duración y frecuencia de los ciclos son menos regulares y el intervalo interestro se incrementa (Auke y Schaefers-Okkens, 2010). El ciclo se divide en 4 fases: proestro, estro, diestro y anestro (England y Concannon 2002; Vermeulen, 2009).

En perras, zorras y otros cánidos, ocurre una luteinización folicular preovulatoria (Holst y Phemister, 1971; Concannon *et al.*, 1975; Farstad *et al.*, 1989), que significa que, por lo tanto, los ovocitos son expuestos a altas concentraciones de progesterona, lo que es opuesto a lo que sucede en los demás mamíferos, donde los estrógenos dominan el entorno folicular periovulatorio. La ovulación ocurre 24 a 72 horas luego del peak de LH (Holst y Phemister, 1971; Farstad *et al.*, 1989). Durante el estro, los ovocitos son ovulados en un estadio de vesícula germinal, como ovocito primario (Phemister *et al.*, 1973; De Los Reyes *et al.*, 2005; De Los Reyes *et al.*, 2009). A diferencia de los otros mamíferos que ovulan un gameto maduro, en etapa de segunda metafase. En la perra, la finalización de la maduración meiótica hasta la segunda metafase se produce en el oviducto y requiere un período prolongado de 2 a 5 días (Holst y Phemister, 1971; Renton *et al.*, 1991; Yamada *et al.*, 1993; Reynaud *et al.*, 2005; De Los Reyes *et al.*, 2005).

3.1.1. Caracterización endocrina del Ciclo estral

El inicio de la pubertad en la hembra sana sucede entre los 6 a 18 meses de edad, dependiendo del tamaño de la raza (Jeffcoate, 2004; Concannon, 2011). El ciclo estral canino es clásicamente dividido en 4 fases: proestro, estro, diestro y anestro (England y Concannon 2002; Vermeulen, 2009; Concannon, 2011). Estas fases se correlacionan, respectivamente, con la fase folicular con incremento de la concentración de estrógeno, una fase luteal inicial con incremento de progesterona y declinación de los niveles de estrógeno, el resto de la fase luteal, y el intervalo entre la pérdida de la función lútea y el inicio del próximo ciclo (Fig. N°1) (Concannon, 1975; Jeffcoate, 2004).

Fig. N° 1: Hormonas reproductivas en el ciclo estral de la perra



(Concannon, 2011)

Fig. N°1: Esquema de los cambios en las concentraciones hormonales durante el ciclo estral de la perra doméstica, donde se indican valores basales y peaks.

3.1.1.1. Anestro

El anestro se caracteriza por una inactividad ovárica, involución uterina y regeneración endometrial (Okkens y Koistra, 2006). La reparación completa del endometrio a su estado basal parece ocurrir típicamente alrededor de 120-140 días, sobre la base de los estudios histológicos (Okkens y Koistra, 2006; Concannon y Verstegen, 2005). Durante este período la perra no es atractiva ni receptiva al macho (Concannon, 2011).

Endocrinológicamente, hay una lenta declinación de las concentraciones plasmáticas de progesterona a niveles basales (Okkens y Koistra, 2006). La secreción de gonadotrofinas durante la transición del anestro temprano a tardío es controversial. El término del anestro está marcado por un incremento en la secreción pulsátil de gonadotrofinas, inducidas por la secreción intermitente de GnRH (Tani *et al.*, 1996; Blendinger, 2007). Los niveles de estrógeno son basales (2-10 pg/mL) y los de progesterona son <1 ng/mL en el anestro tardío, con valores cercanos a 0,4 ng/ml a 30-40 días antes del proestro (Concannon, 1993; Jeffcoate, 1992; Blendinger, 2007). Asimismo, las concentraciones de prolactina disminuyen lentamente a lo largo del anestro para llegar a alcanzar valores basales en torno al inicio de un nuevo ciclo estral (Okkens y Koistra, 2006).

3.1.1.2. Proestro

El proestro se define como la primera evidencia externa de la fertilidad en la perra. Se extiende desde 3 a 21 días, con un promedio de 9 días (Concannon, 1989; Concannon, 2011). La perra comienza a ser atractiva para el macho, pero ella no es receptiva a la monta. La atracción está dada por la secreción de feromonas en el fluido vaginal. Se presenta una descarga vulvar serosanguinolenta de origen uterino y la vulva es más turgente (Jeffcoate, 2004; Blendinger 2007).

La fase folicular del ciclo ovárico coincide con el proestro y estro temprano (Blendinger 2007; Concannon, 2009). Las gonadotropinas juegan un rol esencial en la inducción de la fase folicular. La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), liberada desde el hipotálamo, estimula la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) desde la adenohipofisis, que es responsable del crecimiento folicular en el ovario (Kooistra y Okkens, 2001) y el incremento de la liberación de LH induce el comienzo de la fase folicular (Concannon, 1993; De Gier *et al.*, 2006). Los niveles de FSH y hormona luteinizante (LH) son bajos durante la mayoría del proestro, aumentando al acercarse al “peak” preovulatorio (Fig. N°1) (De Gier *et al.*, 2006).

En la perra, existen 2 tipos de luteinización preovulatoria. En primer lugar, hay una luteinización menor, pero morfológica y endocrinológicamente detectable, que ocurre en pequeños parches en la pared interior de los folículos, hacia el proestro tardío, 2 a 3 días previos al “peak” preovulatorio de LH (Concannon, 1993; Concannon y Verstegen, 2005). Esto resulta en mínimos incrementos en la concentración sérica de progesterona, que van de 0.6 a 0.8 ng/ml (Concannon, 1977; Concannon y Verstegen, 2005). En segundo lugar, existe una marcada luteinización preovulatoria posterior al “peak” de LH, en donde se produce un aumento en la concentración de progesterona sérica, alcanzando niveles de 1 a 3 ng/ml (Concannon *et al.*, 1975; Wildt *et al.*, 1979; Concannon y Verstegen, 2005).

Las concentraciones estrogénicas se incrementan desde niveles basales durante el anestro (5-10 pg/mL) hasta alcanzar un peak de 40-120 pg/mL (media 70 ng/ml) en el proestro tardío (Fig. N°1) (Concannon *et al.*, 1975; Wild *et al.*, 1979; Concannon, 2009).

El proestro finaliza cuando la hembra se vuelve receptiva a la monta, lo que típicamente ocurre 0,5 a 3 días después del peak de estradiol (Concannon, 2009). Endocrinológicamente, el proestro fisiológico termina con el peak de LH (Concannon, 1975; Wild *et al.*, 1979; Concannon, 2009).

3.1.1.3. Estro

Este período puede extenderse desde 3 a 21 días, con un promedio de 9 días (Wild *et al.*, 1979; Concannon, 1989; Blendinger, 2007). El estro fisiológico se extiende desde el peak de LH al inicio del diestro citológico, 6-11 días (promedio 7,5 días) desde el peak de LH (Concannon, 2009). En esta etapa disminuye el edema vulvar y la descarga pasa de ser serosanguinolenta a sólo serosa (Concannon, 1989; Jeffcoate, 2004; Root Kustritz, 2012). Es aquí donde la hembra es receptiva al macho, por lo que se puede producir el apareamiento (Concannon *et al.*, 1975; Root Kustritz, 2012). El comportamiento sexual de aceptación del macho puede preceder o seguir al peak de LH y su duración es variable (Concannon *et al.*, 1977; Wild *et al.*, 1978; Blendinger, 2007).

La ovulación durante el estro se produce en respuesta a un brusco aumento de las gonadotropinas al final del proestro, estimuladas por el GnRH (Vermeulen, 2009) (Fig. N°1). Ésta ocurre cerca de las 36 a 50 h después del alza de LH (Phemister *et al.*, 1973; Wild *et al.*, 1977; Concannon, 1989). El intervalo entre el peak de LH y la ovulación se caracteriza por un rápido incremento en la luteinización de células murales del folículo, en el crecimiento de teca y vasos sanguíneos, y abrupto incremento de progesterona y 17-hydroxyprogesterona séricas (Fig.N°1) (Concannon, 2009). La progesterona incrementa sobre 1 a 3 ng/ml durante el alza preovulatorio de LH para aumentar posteriormente a niveles de 10 a 30 ng/ml, siendo este incremento variable entre individuos dependiendo del desarrollo folicular y la respuesta a LH (Concannon *et al.*, 1975; Wild *et al.*, 1979; De Gier *et al.*, 2006). Al momento de la ovulación la concentración de progesterona se encuentra generalmente entre 5 y 10 ng/ml (Concannon *et al.*, 1977; Post *et al.*, 1990; Brugger *et al.*, 2011). Mientras que el estradiol disminuye desde los valores máximos del proestro de 40-120 pg/mL (media 70 ng/ml) a valores intermedios de 10 a 20 pg/mL (Concannon *et al.*, 1979). La conducta del estro es justamente gatillada por el sinergismo entre la declinación del estradiol y el rápido incremento de progesterona luego del peak de LH (Concannon *et al.*, 1979; Concannon, 1989).

3.1.1.4. Diestro

Esta etapa comprende la fase luteal, que en promedio dura 60 días, y en las perras no preñadas es algo más larga que en las gestantes (Concannon y Vergensten, 2005; Concannon, 2011). Durante el diestro, la perra se vuelve reacia a la monta, y ya no hay atracción del macho hacia ella. El edema vulvar se resuelve lentamente (Jeffcoate, 2004; Blendinger, 2007).

La longitud aparente de la gestación en la perra puede variar entre 58 a 72 días (intervalo de ovulación al parto). El promedio de duración de la gestación es 63 ± 1 días desde el día de la ovulación (Luvoni y Beccaglia, 2006; Fayrer-Hosken, 2007) y 65 ± 1 días desde el alza de LH (Fayrer-Hosken, 2007).

El cuerpo lúteo (CL) es la principal fuente de progesterona circulante durante el diestro y la preñez (Concannon, 1989; Hoffman *et al.*, 2004). Por lo tanto, la medición de progesterona no es utilizada como diagnóstico de preñez, como sucede en otras especies (Concannon y Vergensten, 2005). En la mayoría de los estudios, el promedio de progesterona en las perras preñadas vs las no preñadas no difiere significativamente (Concannon *et al.*, 1977, Verstegen-Onclin y Verstegen, 2008; Marinelli *et al.*, 2009; Concannon, 2011).

Hasta los 20-30 días, el CL recién formado es independiente del soporte gonadotrópico. La PGE2 de origen luteal actuaría como factor autocrino/paracrino responsable de mantener la función del CL durante el primer tercio (Kowalewski *et al.*, 2006^a; Kowalewski *et al.*, 2008). Mientras que en la segunda mitad del diestro depende de la secreción de prolactina y LH (Hoffman *et al.*, 2004).

Los niveles de progesterona aumentan constantemente durante el diestro, llegando a un máximo de 15-80 ng/mL, entre el día 20 y 30 (Concannon, 2011; Hoffman y Papa, 2011), luego hay una disminución progresiva hasta llegar a concentraciones cercanas a 1 ng/ml en el diestro tardío (Concannon, 2011).

Los niveles de estrógeno son variablemente bajos, entre 15 y 30 pg/ml (Concannon, 2011) y al igual que la P₄ su concentración baja a niveles basales antes del parto o término del diestro (Hoffman y Papa, 2011). Mientras que la prolactina sérica se incrementa al término del diestro o gestación (Verstegen-Onclin y Verstegen, 2008), llegando a niveles mucho más altos en preñez (Onclin y Verstegen, 1997; Kooistra y Okkens, 2002).

El fin de la fase luteal ocurre con el parto en la hembra gestante, donde el nivel de progesterona cae abruptamente bajo 5 ng/ml pocos días antes de éste (Concannon *et al.*, 1978; England y Verstegen, 1996; Brugger *et al.*, 2011). En la perra no gestante, este término es generalmente definido por un decrecimiento constante de la concentración de progesterona hasta llegar a niveles basales menores a 1 ng/ml (Hoffman *et al.*, 2004; Concannon y Verstegen, 2005; Concannon, 2011).

A diferencia de otras especies domésticas, en la perra no gestante la regresión del cuerpo lúteo es independiente de luteolisinas uterinas secretadas en forma natural (Hoffman *et al.*, 2004; Hoffman y Papa, 2011; Concannon, 2011) y ocurre a pesar del soporte de la LH y prolactina (Hoffman y Papa, 2011).

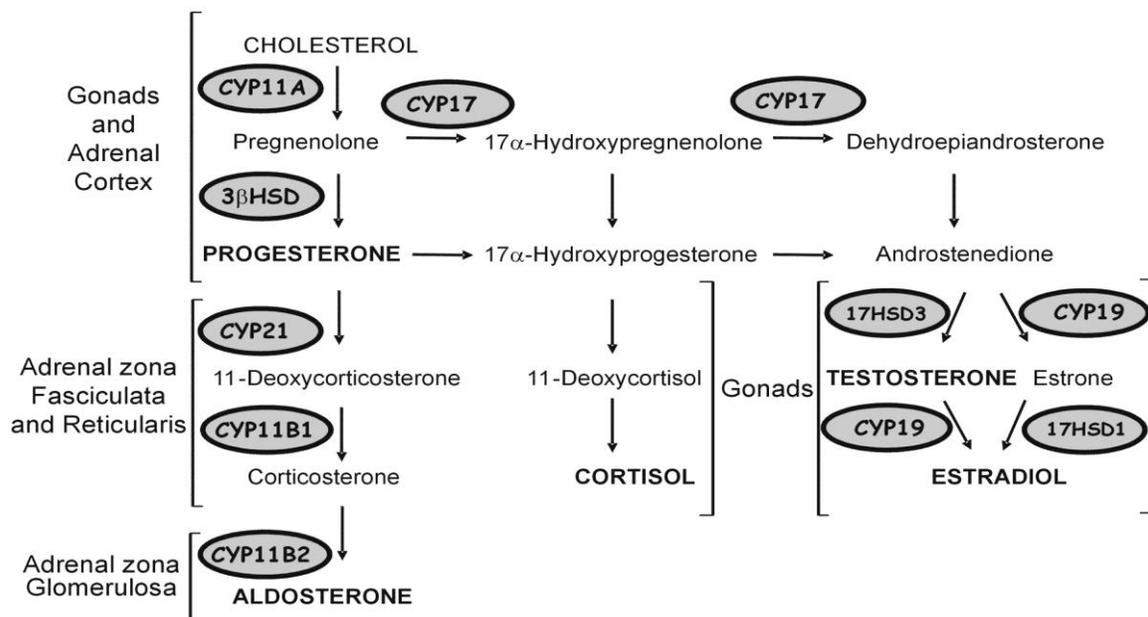
Los principales factores implicados en el control de la función lútea son mecanismos paracrinós y/o autocrinós de progesterona y estradiol (Hoffman y Papa, 2011). La concentración de P₄ comienza a disminuir después del día 20-30 (Concannon, 2011; Hoffman y Papa, 2011), en consecuencia, los primeros signos morfológicos de regresión luteal ocurren a partir del día 45 y los primeros signos de apoptosis aparecen el día 65 (Sonnack, 2009). La expresión de StaR, proteína implicada en el transporte de colesterol hacia la mitocondria para la síntesis de esteroides, disminuye a partir del día 65 (Kowalewski y Hoffman, 2008). Además la expresión de la enzima esteroideogénica 3 β HSD, clave para la síntesis de progesterona también disminuye al final de la fase luteal (Kowalewski *et al.*, 2006^b; Hoffman y Papa, 2011).

3.1.2. Biosíntesis de las hormonas esteroidales en el ovario

La capacidad de las células esteroidogénicas está determinada por la presencia y actividad de complejos enzimáticos codificados en genes de expresión tejido-específico (Omura y Morohashi, 1995). En los mamíferos existen 3 órganos especializados en la producción de hormonas esteroidales: corteza adrenal, ovario y testículos. Durante la preñez la placenta es una fuente adicional de esteroides (Hanukoglu, 1992). Sin embargo, en la placenta de la perra no existen enzimas esteroidogénicas (Nishiyama *et al.*, 1999).

A partir del colesterol (C-27) se sintetiza la pregnenolona, la primera sustancia esteroide y precursora de todas las moléculas esteroides endógenas (Miller, 1988). Este proceso es catalizado por la enzima Citocromo P450_{scc} (side chain cleavage), que se localiza en la membrana interna de la mitocondria de las células esteroidogénicas (Payne y Hales, 2004). Una vez iniciada la síntesis de hormonas esteroides, los productos finales dependen de las diferentes enzimas que se expresen en el tejido específico (Fig.Nº2) (Payne y Hales, 2004).

Fig. Nº2: Síntesis de hormonas esteroidales



(Payne y Hales, 2004)

Fig. N°2: Enzimas que intervienen en la síntesis de las hormonas esteroidales en la corteza suprarrenal y células gonadales. Enzimas citocromo P450: CYP11A (P450 scc), CYP11B1 (11 β hidroxilasa), CYP11B2 (aldosterona sintetasa), CYP17 (17 α hidroxilasa), CYP19 (aromatasa) y CYP21 (21 α hidroxilasa). Enzimas Hidroxiesteroide deshidrogenasas: 3 β HSD (3 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa), 17HSD1 (estradiol 17 β Hidroxiesteroide deshidrogenasa) 17HSD3 (17 β Hidroxiesteroide deshidrogenasa testicular).

3.1.2.1. Progesterona

La progesterona natural, también conocida como P₄ (pregn-4-ene-3,20-dione), es sintetizada y secretada en cantidades relativamente altas por los cuerpos lúteos durante la fase lútea del ciclo estral (Kowalewski *et al.*, 2006^b). También es sintetizada como un precursor de esteroides en varios tejidos, incluyendo los folículos ováricos como precursor para la producción de andrógenos y posteriormente de estrógenos, en los testículos como precursor de la testosterona y otros andrógenos, y en la corteza adrenal como precursor de corticoesteroides (Romagnoli y Concannon 2005).

La síntesis de P₄ implica una serie de vías esteroidogénicas. En células luteales, el colesterol almacenado en vacuolas citoplasmáticas es movilizado hacia las mitocondrias por acción de la proteína aguda de esteroidogénesis (StAR, steroidogenic acute protein), allí el citocromo P450 scc cataliza el corte de la cadena lateral de la molécula de colesterol, mediante hidroxilación, y de esta manera se sintetiza pregnenolona (Miller, 1988; Kowalewski *et al.*, 2006^b; Miller, 2007). Luego, 3 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa/isomerasa (3 β HSD) cataliza la conversión de pregnenolona, 17 α -hidroxipregnenolona y dehidroepiandrosterona (DHEA) a progesterona, 17 α -hidroxiprogesterona y androstenediona, respectivamente (Payne y Hales, 2004; Kowalewski *et al.*, 2006^b; Feeser y Loria, 2011). La progesterona es a su vez el precursor de la aldosterona, y después de su conversión a 17-

hidroxiprogesterona, es precursora del cortisol y la androstenediona (Fig.Nº2) (Payne y Hales, 2004; Feeser y Loria, 2011).

La progesterona es la hormona de la gestación y sus funciones en el aparato genital de la hembra se dirigen al mantenimiento de las condiciones óptimas para el buen término de la misma. Tiene efecto inmunosupresor en el aparato genital para evitar el rechazo del feto, estimula la secreción glandular en el endometrio para la nutrición del embrión antes de la implantación, favorece el desarrollo lóbulo-alveolar en la glándula mamaria y provoca descamación del epitelio vaginal (Verstegen-Onclin y Verstegen, 2008). Aumenta también la temperatura basal (Luvoni y Becaglia, 2006).

La progesterona es un esteroide singularmente potente en las perras. Puede, sin un pretratamiento de estrógenos, causar proliferación endometrial e hiperplasia mamaria durante el anestro. Aparentemente, en el tejido mamario ocurre un nivel significativo de expresión constitutiva de receptores de progesterona (Concannon, 2011).

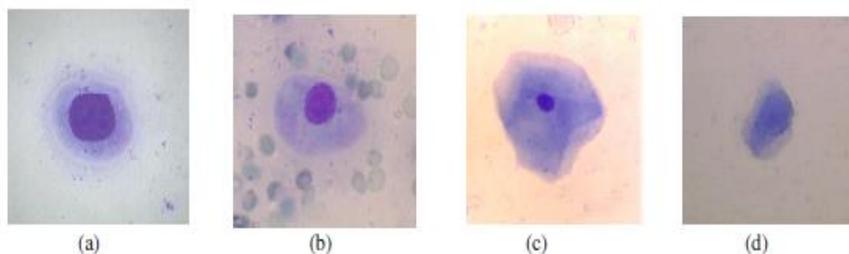
En la perra, la progesterona se requiere para iniciar y mantener la preñez. La concentración plasmática de progesterona debe ser mayor a 2 ng/ml para mantener la preñez (Hoffman y Papa, 2004; Verstegen-Onclin y Verstegen, 2008).

3.1.3. Determinación de la ovulación

La determinación del día de la ovulación, es considerada por la mayoría de los autores como uno de los factores más importantes para determinar el momento de apareamiento o inseminación. Con respecto a esta última, esta determinación toma especial importancia cuando se usa semen congelado, debido a la supervivencia relativamente corta de éste en el tracto genital femenino luego del procedimiento (Fontbonne y Lévy, 2007).

Las evaluaciones clínicas, como el edema vulvar, la cantidad y aspecto de la descarga vulvar (más o menos hemorrágica), el signo de Amantea o la aceptación de la monta, no son lo suficientemente precisas para detectar la ocurrencia y el día de la ovulación (England y Concannon, 2002). Frente a esta situación, es indispensable el uso de exámenes clínicos complementarios para determinar con la mayor precisión posible el momento de la ovulación. Entre estos, la citología vaginal es el examen más común en la práctica veterinaria (Jeffcoate, 2004; Vermeulen, 2009), obteniéndose células epiteliales de la porción craneal de la vagina, las que según el tipo y cantidad permiten clasificar los distintos estados del ciclo estral, ya que los cambios hormonales que sufre la mucosa vaginal durante este período, se reflejan en la morfología de sus células epiteliales (England y Concannon, 2002; Vermeulen, 2009). Al inicio del ciclo, la célula epitelial está en contacto con la irrigación sanguínea. A medida que aumentan los niveles de estrógenos, el epitelio vaginal se va engrosando, con lo cual la célula epitelial se separa del aporte sanguíneo, dando como resultado una transformación celular que va de célula parabasal a célula anucleada o escama (Fig. N°3) (Jeffcoate, 2004; Vermeulen, 2009; Root Kustritz, 2012).

Fig. N°3: Células epiteliales vaginales

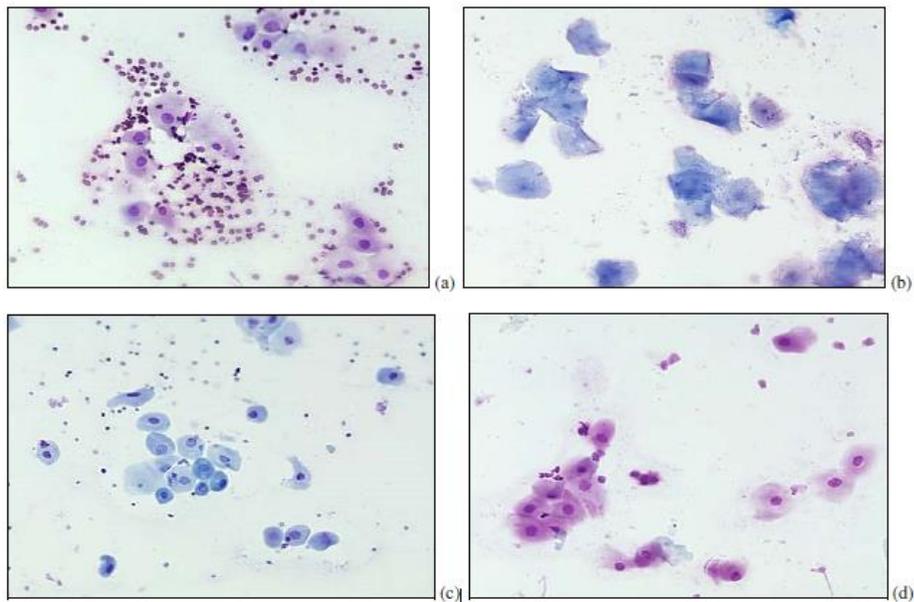


(Vermeulen, 2009)

Fig. N°3: Diferentes tipos de células epiteliales vaginales: parabasal (a) es una célula de forma oval o redonda con núcleo aparente y pequeña cantidad de citoplasma. Intermedia (b) es una célula grande, con bordes irregulares y con mayor cantidad de citoplasma. Superficial(c) es una célula de bordes rectos o angulosos, con núcleo de menor tamaño que las anteriores. Anucleada (d) también se le conoce como escama, es una célula sin núcleo, de bordes angulosos e irregulares.

El estro se define citológicamente como la presencia de un 100% de células superficiales con al menos un 50% de anucleadas (Vermeulen, 2009; Root Kustritz, 2012). Un abrupto cambio en la población celular ocurre en el diestro, disminuye el número de células superficiales, mientras que las células parabasales e intermedias se incrementan marcadamente, junto a la presencia de neutrófilos (Blendinger 2007; Vermeulen, 2009; Concannon, 2011). El aspecto citológico de proestro temprano y diestro y de anestro y diestro tardío, pueden ser muy similares, por lo que un frotis vaginal no es adecuado para la diferenciación entre estas etapas (Fig. N°4) (Vermeulen, 2009).

Fig. N°4: Citología vaginal



(Vermeulen, 2009)

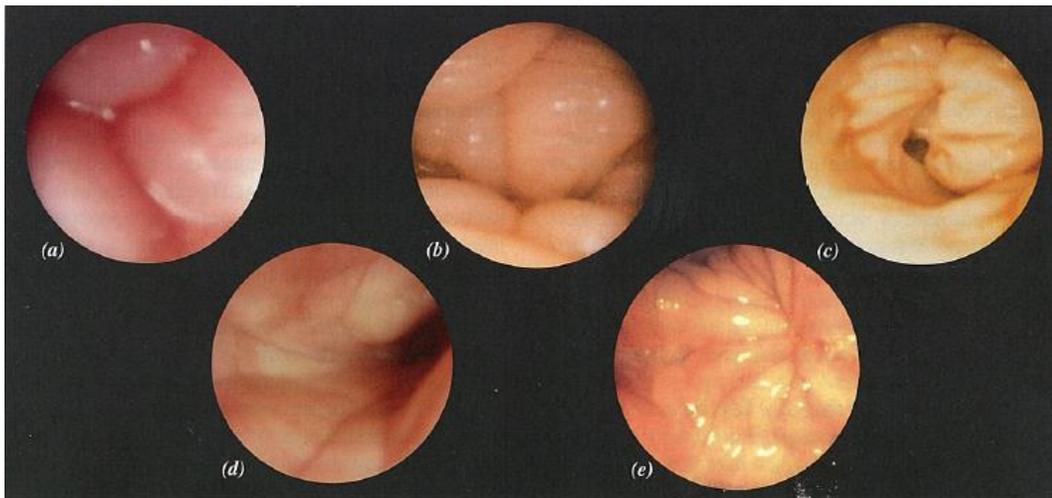
Fig. N°4: Citología vaginal mostrando proestro (a), estro (b), diestro (c) y anestro (d).

Las proporciones relativas de los diversos tipos de células epiteliales identificadas en citología vaginal durante el proestro se pueden utilizar como marcadores de los cambios en el ambiente endocrino, básicamente de los niveles de estrógenos (Jeffcoate, 2004). El porcentaje de células superficiales puede alcanzar el

100% tan temprano como 9 días antes de la ovulación o tan tarde como 2 días después (England y Concannon, 2002).

La vaginoscopía también es descrita como una técnica de diagnóstico útil para la detección del “período fértil”. Una vez más con este método, es imposible determinar el día exacto de la ovulación (Fontbonne y Lévy, 2007).

Fig. N°5: Vaginoscopía en diferentes estados del ciclo estral



(Jeffcoate, 2004)

Fig. N°5: (a) Proestro: Mucosa vaginal con aspecto edematoso, redondeado y de color rosado; (b) Estro inicial: Mucosa de color pálido, pérdida del aspecto edematoso y aparecen arrugas; (c) Estro medio: Mucosa de color crema pálido, con arrugas marcadas y angulosas; (d) y (e) Diestro: Los pliegues de la mucosa son redondeados con manchas pálidas (d), a veces, se cierran para formar un patrón de roseta (e).

Más recientemente, el examen de ultrasonido en los ovarios de la perra ha sido probado por algunos autores como una herramienta para diagnosticar la ovulación en las hembras (Fontbonne y Lévy, 2007; Reynaud *et al.*, 2007). Aunque la observación del desarrollo folicular se puede hacer fácilmente mediante ecografía, la determinación de la ovulación es difícil, ya que, a diferencia de las vacas y yeguas

donde se puede ver un colapso de la pared folicular, el cuerpo lúteo es difícil de reconocer (Hase *et al.*, 2000; Marseloo *et al.*, 2004; Vermeulen, 2009). Estudios previos han demostrado que los folículos ováricos justo antes y después de la ovulación son muy similares (England *et al.*, 2003), algunos folículos no colapsan en el momento de la ovulación (Hayer y Günzel-Apel, 1993) y folículos no ovulados a menudo permanecen después de la ovulación (Wallace *et al.*, 1992; England y Concannon, 2002). Con sistema doppler, la ovulación podría ser detectada en un alto porcentaje (Fontbonne y Lévy (2007).

3.2. Ensayos hormonales y su utilidad diagnóstica

La introducción del radioinmunoensayo y técnicas relacionadas como los ensayos enzimáticos en base a la colorimetría, quimioluminiscencia y electroquimioluminiscencia, han permitido medir hormonas en suero, plasma, leche y otros fluidos corporales con una alta sensibilidad y especificidad. Los inmunoensayos (IE) han ayudado a aumentar el conocimiento de eventos endocrinos y metabólicos que ocurren durante el estrés, enfermedades, ciclos reproductivos, crecimiento y desarrollo (Matamoros *et al.*, 2002).

Las principales ventajas de los IE consisten en que son altamente selectivos, por lo que pueden ser utilizados en muestras complejas como orina o sangre, poseen bajos límites de detección y pueden ser adaptados para la determinación de muchos compuestos de interés clínico (Voller *et al.*, 1978; Gobello *et al.*, 1999). Además son relativamente económicos y fáciles de realizar (Gobello *et al.*, 1999; Buff, 2005; Chapwanya *et al.*, 2008) en comparación al RIA. Por estas razones, los IE constituyen los métodos de elección para múltiples aplicaciones endocrinológicas, tanto en medicina humana como veterinaria (Gobello *et al.*, 1999; Cultek, 2006; Thermo Scientific Pierce, 2010). Una de las principales limitantes de estas técnicas es el tiempo necesario para obtener resultados, generalmente un ensayo toma entre 8 a 12 horas (al menos 2 horas, a veces hasta 24) (Buff, 2005).

En nuestro medio, no hay una aplicación rutinaria de los IE en la endocrinología clínica canina. Esto podría explicarse por la ausencia de laboratorios, adecuadamente equipados, dispuestos a poner a punto estas técnicas para pequeños animales. Esta situación obliga a los médicos veterinarios a recurrir a laboratorios de medicina humana, los que no siempre proveen resultados aceptables, debido a las diferencias moleculares y de rangos hormonales entre las distintas especies (Gobello *et al.*, 1999). Rangos de referencia y composición del suero de las diferentes especies, hacen necesario que un ensayo que fue originalmente desarrollado para su uso en humanos deba ser validado (precisión, exactitud, sensibilidad y especificidad) para su uso en animales e idealmente para la especie a analizar (Matamoros *et al.*, 2002).

En animales de compañía, la principal utilidad de la medición hormonal está dada en aspectos reproductivos (Concannon, 1993; Buff, 2005) y alteraciones metabólicas (Gobello *et al.*, 1999; Hegstad-Davies, 2006).

3.2.1. Uso de ensayos hormonales en el manejo reproductivo de la perra

La medición seriada del nivel de la hormona luteinizante (LH), es útil para detectar su incremento preovulatorio, dado que la ovulación ocurre en la mayoría de las perras alrededor de 36-50 h luego del alza de LH (Phemister *et al.*, 1973; Wild *et al.*, 1977; Concannon, 1989). Existen comercialmente diferentes kit de ensayo ELISA para la medición de LH en suero canino ayudando a la determinación de la ovulación (Buff, 2005). Sin embargo, para determinar este incremento de LH, se requiere de al menos 2 muestras diarias de sangre, para la detección del momento del alza (Concannon, 1989; Hase *et al.*, 2000), por lo que lo hace poco factible en la práctica clínica y se limita principalmente a protocolos de investigación (Fontbonne y Lévy, 2007).

La determinación de la concentración de progesterona (P₄) en sangre periférica es de ayuda en la evaluación reproductiva en la perra (Fontbonne y Lévy, 2007;

Chapwanya *et al.*, 2008; Brugger *et al.*, 2011). Es esencial para la detección de la ovulación, y así también en casos de disfunción ovárica, manipulación del ciclo estral y verificación de la luteolisis previa al parto (Luvoni y Becaglia, 2006; Michel *et al.*, 2011; Brugger *et al.*, 2011).

El nivel plasmático de progesterona periférica comienza a incrementar de 0,2-0,4 ng/ml a 0,6-0,8 ng/ml, 1 o 2 días previos al peak de LH (Concannon, 1977; Concannon y Verstegen, 2005), alcanzando niveles de 5 a 10 ng/ml cuando ocurre la ovulación (Ververidis *et al.*, 2002; Brugger *et al.*, 2011). Las muestras seriadas de sangre cada 2 días pueden identificar el aumento inicial de la progesterona que luego varía de 1 a 3, ng/ml, cuando ocurre el peak de LH (Buff, 2005; Blendinger, 2007). Por lo tanto, junto con los exámenes clínicos, tales como citología, vaginoscopía, observación genital externa y del comportamiento de estro, el nivel creciente de progesterona sérica es un indicador confiable de la ovulación (Chapwanya *et al.*, 2008; Vermeulen, 2009; Brugger *et al.*, 2011).

El ensayo de progesterona se realiza también en ausencia de ciclicidad, a fin de determinar la existencia de una secreción residual de progesterona que evita la continuación del ciclo, que es de origen patológico (tumor de células de la granulosa o un quiste ovárico secretor de hormona) (Blendinger, 2007; Fontaine *et al.*, 2010) o unido a la existencia de un ciclo pasado desapercibido por el dueño (Matamoros *et al.*, 2002; Blendinger, 2007).

El monitoreo del periodo gestacional y la predicción del parto mediante medición de los niveles de progesterona en la perra es de ayuda para prevenir y minimizar pérdidas de crías y para la programación de cesáreas (Luvoni y Becaglia, 2006). La concentración de P₄ disminuye drásticamente entre 12 y 40 h previas a la expulsión del primer cachorro, 5 días antes del parto la concentración de P₄ es de 5 ng/ml (Concannon, 1978) y a las 24-16 h preparto la concentración es menor a 2 ng/ml (Concannon, 1978; England y Verstegen, 1996; Brugger *et al.*, 2011).

En la actualidad, la progesterona se evalúa por métodos cuantitativos o semicuantitativos (Buff, 2005; Blendinger, 2007; Brugger *et al.*, 2011). Existen kits de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) semicuantitativos como Target canine ovulation test®, Premate test®, K9 Proges-check® y Status-Pro® (Root Kustriz, 2001; Buff, 2005; Moxon *et al.*, 2010) para ser utilizados en la consulta veterinaria, de aplicación fácil y rápida. El inconveniente está en la confiabilidad de sus resultados, ya que se basa en la interpretación subjetiva de cambios de color y entregan rangos de concentración sérica muy amplios. Además, es útil para la programación de una monta natural e inseminación con semen fresco, sin embargo en una inseminación con semen congelado se necesita una mayor precisión, debido a la supervivencia relativamente corta de éste en el tracto genital femenino luego del procedimiento (Fontbonne y Lévy, 2007; Fontaine *et al.*, 2010). En cambio, las mediciones cuantitativas realizadas por las técnicas de radioinmunoensayo (RIA), quimioluminiscencia (CLIA) o ELISA, ejecutados en laboratorios especializados, entregan un valor específico y objetivo (Ververidis *et al.*, 2002, Chapwanya *et al.*, 2008; Brugger *et al.*, 2011).

3.3. ELISA

ELISA (de sus siglas en inglés Enzyme Linked Immunosorbent Assay) es un tipo de inmunoensayo (Lequin, 2005). Los inmunoensayos (IE) se definen como un conjunto de técnicas analíticas que usan anticuerpos para la determinación selectiva de ciertos componentes de interés presentes en muestras biológicas (Gobello *et al.*, 1999).

ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática, lo que le da el nombre de inmunoensayo enzimático (Voller *et al.*, 1978; Gobello *et al.*, 1999; Thermo Scientific Pierce, 2010). Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por

tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico, que al actuar la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (Cultek, 2006). Esta característica de separación entre el inmunocomplejo formado sobre la fase sólida y las biomoléculas no fijadas es la que clasifica a ELISA como un inmunoensayo enzimático de tipo heterogéneo (Ochoa, 2001).

La técnica de ELISA fue conceptualizada y desarrollada por Peter Perlmann, principal investigador, y Eva Engvall de la Universidad de Estocolmo, Suecia, entre 1971 y 1972 (Lequin, 2005; Cultek, 2006). Voller (1974) puso a punto el método en microplaca de poliestireno y sugirió su uso para titular anticuerpos inducidos por enfermedades infecciosas. En 1975 aparece el primer trabajo empleando el ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Trichinella spiralis* (Cultek, 2006).

Inicialmente, durante la década de los 60', el inmunoensayo utilizado masivamente fue el radioinmunoensayo (RIA). Si bien, el ensayo en sí es altamente sensible, al utilizar como marcador isotopos radioactivos, genera complicaciones en el tratamiento de sus residuos y posterior eliminación, además se requiere de laboratorios más complejos para el manejo de desechos radioactivos, personal entrenado y equipos costosos para su interpretación, lo que lo hace poco práctico (Lequin, 2005).

Es por esto, que la invención de ELISA como variante de inmunoensayo no radiactivo, fue tan espectacular. A principios de los 70', se desarrollaron sistemas de ensayos enzimáticos en el campo de la endocrinología, para la medición de hCG, estrógenos totales y lactógeno placentario en plasma (Lequin, 2005).

Los ensayos inmunoenzimáticos (EIE) tienen la ventaja de poder ser realizados en forma inmediata en un laboratorio no complejo. No obstante, la sensibilidad de los EIE puede no ser suficiente para medir concentraciones extremadamente bajas en las cuales algunas hormonas polipeptídicas circulan; además la medición de la

actividad enzimática está sujeta a factores medioambientales (pH, temperatura, etc) y a interferencias de estos en la reacción Ag-Ac (Gobello *et al.*, 1999).

Actualmente existen muchas variaciones en los sustratos y, por lo tanto, en el método de detección de los complejos antígeno-anticuerpo, por lo que hay sistemas de detección colorimétricos, fluorescentes y luminiscentes (Cultek, 2006; Thermo Scientific Pierce, 2010).

3.3.1. Tipos

ELISA puede detectar tanto el antígeno como el anticuerpo. Para ello son necesarios 3 reactivos: (1) anticuerpo o antígeno unido a fase sólida; (2) antígeno o anticuerpo marcado con una enzima, el cual es llamado conjugado; (3) Sustrato. De acuerdo al reactivo utilizado y la constitución de la detección, existen diferentes tipos de ELISA. Los ELISA pueden ser competitivos o no competitivos. Los ensayos heterogéneos no competitivos se subdividen, de acuerdo a la detección de anticuerpos o de antígenos, en directo, indirecto y sándwich (Ochoa, 2001).

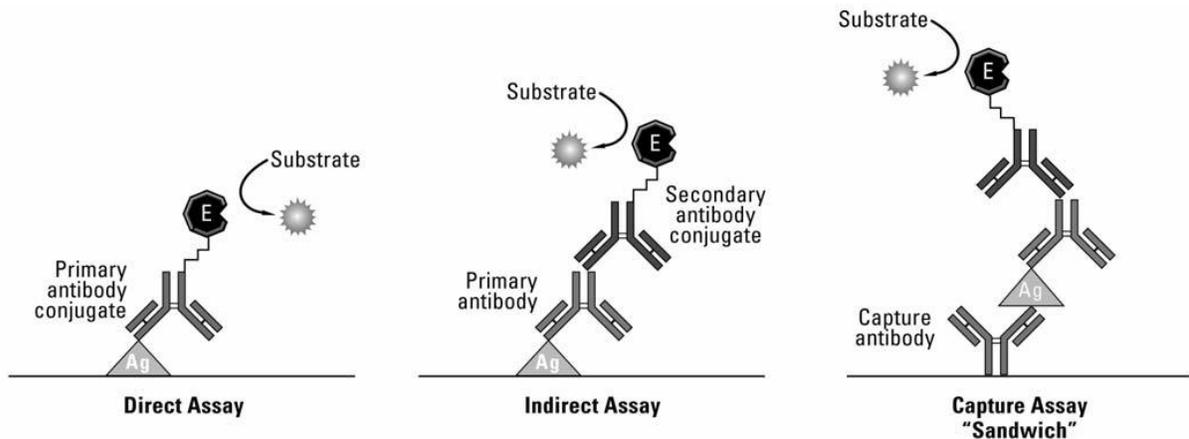
Un ELISA directo se basa en la detección de antígeno (Voller *et al.*, 1978; KPL, 2005; Thermo Scientific Pierce, 2010). Consiste en enfrentar la muestra con el antígeno a detectar contra un anticuerpo unido en la fase sólida (Fig. N°6). Se usa cuando el antígeno es relativamente abundante (Thermo Scientific Pierce, 2010).

El ELISA indirecto se basa en la detección de anticuerpo (Fig. N°6) (Voller *et al.*, KPL, 2005; Thermo Scientific Pierce, 2010). La detección indirecta es más sensible que el método directo, debido a que permite una amplificación de la señal por medio del uso de un anticuerpo secundario (Thermo Scientific Pierce, 2010).

En un ensayo de tipo “sandwich” el antígeno a medir está atrapado entre anticuerpos, el anticuerpo de captura y el de detección (Fig. N°6). Este formato es

utilizado comúnmente porque permite una mayor sensibilidad (KPL, 2005; Thermo Scientific Pierce, 2010).

Fig. N°6: Diagrama de los formatos más comunes de ELISA

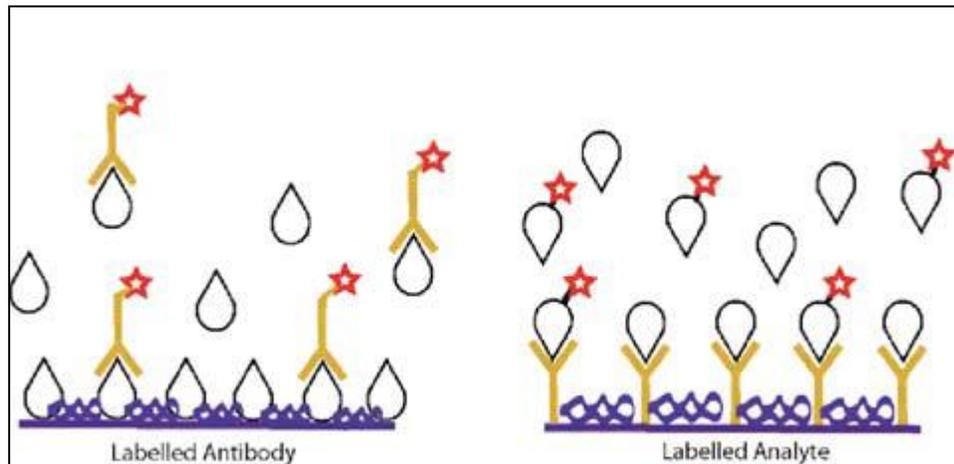


(Thermo Scientific Pierce, 2010)

Fig. N°6: Ensayo Directo: detección directa del antígeno, la que incluye un anticuerpo de detección conjugado con una enzima. Ensayo Indirecto: detección indirecta de anticuerpo, implica un paso adicional al utilizar un anticuerpo secundario que es conjugado a una enzima. ELISA "Sandwich": Dos diferentes anticuerpos se unen específicamente al antígeno. El primer anticuerpo es llamado de captura y el segundo de detección.

Por otro lado, los ensayos de tipo competitivos, se basan en la competencia entre el antígeno presente en una muestra y un conjugado enzimático del mismo antígeno, ambos en el mismo pocillo, por la unión a una cantidad limitada de anticuerpo unido al fondo de una microplaca. El ensayo puede realizarse ya sea con el antígeno o el anticuerpo adsorbido a la fase sólida (Fig. N°7). A medida que la concentración de antígeno presente en la muestra aumenta, la cantidad de antígeno marcado capturado por el anticuerpo que recubre el pocillo disminuye. Por lo tanto, existe una relación inversamente proporcional entre la densidad óptica (DO) y la cantidad de antígeno en la muestra (KPL, 2005; Thermo Scientific Pierce, 2010).

Fig. N°7: ELISA de competencia



(KPL, 2005)

Fig. N°7: En la imagen a la izquierda, se encuentra el antígeno () unido a fase sólida y el anticuerpo marcado con enzima (). A la derecha, el anticuerpo () está unido a fase sólida y el antígeno marcado con enzima.  proteína bloqueando sitios de unión no específica.

3.3.2. Reactivos

3.3.2.1. Soporte sólido

El soporte de elección para un ELISA es la microplaca, que permite procesar un elevado número de muestras. Aunque existe un gran número de materiales, el poliestireno es el más usado por su excelente calidad óptica y por facilitar enlaces estables (Ochoa, 2001). El formato más común de la microplaca es de 96 pocillos organizados en 8 filas y 12 columnas (Ochoa, 2001; KPL, 2005).

3.3.2.2. Anticuerpo

Se pueden utilizar tanto anticuerpos monoclonales como policlonales. En un ELISA sándwich, estos pueden ser utilizados como anticuerpos de captura y de

detección. Los anticuerpos monoclonales tienen una mayor especificidad al dirigirse hacia un epítipo único, que permite la detección y cuantificación fina de pequeñas diferencias en el antígeno. Un anticuerpo policlonal se utiliza a menudo como anticuerpo de captura para adsorber la mayor cantidad de antígeno como sea posible (Thermo Scientific Pierce, 2012). Éste es generalmente menos caro (~ 5 veces) de producir que un anticuerpo monoclonal (Thermo Scientific Pierce, 2012).

3.3.2.3. Buffer de lavado

Se utiliza para lavar las microplacas de ELISA entre los pasos de adición de reactivos. Elimina toda interferencia de reactivo no unido, sin comprometer la señal positiva. Reduce el ruido de fondo y la variabilidad entre los ensayos, aumentando la señal específica (ImmunoChemistry Technologies, 2011).

Los buffers de lavado comúnmente usados en ELISA son buffer Tris salino (TBS) y buffer fosfato salino (PBS) contenidos en 0,05% (v/v) Tween-20 (Thermo Scientific Pierce, 2010).

3.3.2.4. Buffer de bloqueo

Se utiliza para estabilizar proteínas recubiertas sobre la placa de ELISA, manteniendo un óptimo nivel de hidratación durante el proceso de recubrimiento. También se utilizan para bloquear sitios de unión inespecíficos de las proteínas adsorbidas y cualquier región de recubrimiento de la placa (ImmunoChemistry Technologies, 2011).

Las dos principales clases de agentes bloqueantes son proteínas y detergentes. Los detergentes tales como Tween-20 y Triton X-100, han sido utilizados con reactivos unidos covalentemente a superficie sólida, además son los más utilizados como agentes de lavado (KPL, 2005). Las proteínas por otro lado, como la albúmina sérica bovina (BSA) y caseína (Ochoa, 2001; KPL, 2005), además de bloquear los

sitios de unión inespecífica, pueden servir como agentes estabilizantes, evitando la desnaturalización de las proteínas que reaccionan en la superficie de la fase sólida (KPL, 2005).

3.3.2.5. Antígeno

El antígeno debe estar presente en un buffer o matriz que le permita interactuar con el anticuerpo de captura adherido a los pocillos de la microplaca (Thermo Scientific Pierce, 2010).

3.3.2.6. Enzima

Las enzimas más utilizadas en ELISA son fosfata alcalina (AP) y peroxidasa de rábano picante (HRP) (Thermo Scientific Pierce, 2010). La fosfatasa alcalina (AP) es una enzima de gran tamaño (140 KDa), lo que dificulta la conjugación de más allá de dos moléculas a cada molécula de un anticuerpo y limita la cantidad de señal que puede ser generada. Por esta razón, su uso en ensayos es minoritario (Thermo Scientific Pierce, 2010). La peroxidasa (HRP) es la enzima de elección para ELISA. Su tamaño pequeño (40 KDa) permite una mejor conjugación, ya que una mayor cantidad de moléculas se unen al anticuerpo y genera una mejor señal (Thermo Scientific Pierce, 2010).

3.3.2.7. Sustrato

Es usado para generar la señal de lectura del ensayo. Hoy en día existe una variedad de sustratos que permiten sistemas de detección colorimétricos, fluorescentes y luminiscentes. Tanto la peroxidasa (HRP) como la fosfatasa alcalina (AP) pueden reaccionar con sustratos de estos tipos, sin embargo sustratos para HRP poseen una mayor sensibilidad que para AP (ImmunoChemistry Technologies, 2011; Cultek, 2006; Thermo Scientific Pierce, 2010). La fosfatasa alcalina reúne otras

ventajas, es menos dependiente de factores interferentes, puede hacerse sin que se requiera detener la reacción (Ochoa, 2001).

Los ensayos colorimétricos dan un producto de reacción coloreado que absorbe luz en el espectro visible, siendo la densidad óptica (DO) del mismo proporcional a la cantidad de producto medido (Cultek, 2006).

En los inmunoensayos de fluorescencia (ELFIA), la enzima convierte el sustrato en un producto de reacción que emite fluorescencia cuando es excitado a una determinada longitud de onda, siendo las unidades relativas de fluorescencia (fotones de luz emitidos) proporcionales a la cantidad de producto analizado (Cultek, 2006). La señal es medida con un fluorómetro. Este sistema de detección es menos sensible que la colorimetría y quimioluminiscencia (Thermo Scientific Pierce, 2010).

La quimioluminiscencia es una reacción química que genera energía liberada en forma de luz. La emisión de luz se produce sólo durante la reacción enzima-sustrato, por lo tanto, cuando el sustrato se agota la señal cesa. La detección quimioluminiscente tiene una mayor sensibilidad que la colorimétrica (Thermo Scientific Pierce, 2010). Sin embargo, la colorimetría sigue siendo el método más empleado debido a la posibilidad de evaluación visual, un equipamiento más sencillo y la mayor estabilidad de los productos formados (Ochoa, 2001).

3.3.2.8. Solución de detención (“Stop solution”)

Previene el desarrollo adicional de color del sustrato en el ensayo (ImmunoChemistry Technologies, 2011). Las soluciones de detención estabilizan el desarrollo de color para permitir la medición exacta de su intensidad a una determinada longitud de onda, utilizando un espectrofotómetro (Thermo Scientific Pierce, 2010).

3.3.3. Parámetros de validación de un ELISA cuantitativo

Validación es la confirmación mediante examen y aporte de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico previsto (ISO 8402; ISO 17025). Es necesario validar cuando se está desarrollando una técnica nueva, antes de incorporar una nueva técnica a la rutina del laboratorio y cuando se desea comparar el desempeño de dos técnicas (Lumsden, 2000).

3.3.3.1. Validación analítica

La validación analítica estudia los parámetros de desempeño analítico del método.

3.3.3.1.1. Exactitud

Según la IFCC (International Federation of Clinical Chemists) se define como el grado de concordancia entre el valor medido y el valor verdadero. Indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximo posible al verdadero valor. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena (Ochoa, 2001).

Para evaluar la exactitud se pueden efectuar los estudios siguientes:

1. Comparación con métodos de referencia: Se analizan muestras de pacientes por el método en estudio y otro método de comparación. El método de comparación debe en lo posible ser el de referencia (“gold standard”), el cual es una técnica cuyos resultados se han comparado con métodos definitivos y/o traceables a materiales estándar de referencia (Ochoa, 2001). La mayoría de los autores recomienda comparar un mínimo de 40 muestras por ambos métodos. Deben elegirse de modo de cubrir todo el rango de trabajo del método y representar el espectro de valores esperados en la aplicación de rutina del método (Lumsden, 2000).

2. Ensayo de paralelismo o de dilución: Este ensayo es usado también para evaluar la linealidad. Evalúa concentraciones del analito estándar y las muestras, que deben tener un comportamiento similar a diferentes diluciones. Con este ensayo se evalúa el efecto matriz (Ochoa, 2001).

3. Ensayos de recuperación: Evalúa la capacidad del método de recobrar una concentración exógena de analito, añadida a una muestra con concentración endógena libre de éste o con baja concentración (Ochoa, 2001). La recuperación se define como el error (%) entre el valor observado u obtenido y el real o esperado (valor obtenido en el ensayo x 100 / valor esperado) (Lumsden, 2000).

3.3.3.1.2. Precisión

Expresa el grado de acuerdo entre valores cuando se analiza la misma muestra estable repetidamente (Ochoa, 2001). Estima el error causado por factores como el pipeteo, condiciones de reacción (T° , mezclado, etc.) (Ochoa, 2001). Puede dividirse en precisión intraensayo e interensayo. La precisión intraensayo (también llamada precisión intermedia) es la variación en las múltiples determinaciones de la misma corrida de muestras en un mismo ensayo (Chaloner-Larsson *et al.*, 1997; Gobello *et al.*, 1999), que equivale a repetibilidad (Chaloner-Larsson *et al.*, 1997; Ochoa, 2001). Mientras que la precisión interensayo es la variación de múltiples determinaciones de la misma muestra en distintos ensayos (Chaloner-Larsson *et al.*, 1997; Gobello *et al.*, 1999). Existe una precisión entre laboratorios, conocida como reproducibilidad, la que no es relevante para la validación de un ensayo a aplicar en un laboratorio (Chaloner-Larsson *et al.*, 1997).

La precisión se expresa como coeficiente de variación (CV%) (Chaloner-Larsson *et al.*, 1997; Gobello *et al.*, 1999), y no debe superar el 10 % en la prueba de precisión intraensayo (Gobello *et al.*, 1999; Ochoa, 2001) y el 20 % en la interensayo, siendo óptimos los inferiores al 5 % y al 10 % respectivamente (Ochoa, 2001). Sin

embargo, las normas vigentes de la Organización Mundial de la Salud admiten un rango entre el 5 % y el 20 % (Chaloner-Larsson *et al.*, 1997).

3.3.3.1.3. Linealidad e intervalo

Es la capacidad de producir resultados proporcionales a la concentración del analito en las muestras dentro de un rango determinado de concentración ya sea directamente o por medio de una transformación matemática (Ochoa, 2001).

El rango o intervalo, son los valores entre el mayor y el menor nivel de analito que pueden ser medidos con aceptable precisión y exactitud (Inezédy, 1997). Puede medirse utilizando un diseño similar al empleado en los estudios de exactitud y linealidad, lo que permite realizar el estudio del rango de forma simultánea (Ochoa, 2001).

3.3.3.1.4. Sensibilidad

Según la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) la sensibilidad se define como la menor cantidad de antígeno que puede ser detectada con certeza estadística (Inezédy, 1997). Es el cociente entre la señal medida y la concentración de analito. Cuando se trabaja con curvas de calibrado, la sensibilidad es la pendiente de la curva a una concentración dada (Inezédy, 1997). Cuanto mayor sea ésta mayor será la sensibilidad. Para aumentar la sensibilidad se puede aumentar la dilución del antisuero; la dilución aconsejable es aquella que fija un 50% del trazador en ausencia del antígeno no marcado (Gobello *et al.*, 1999).

3.3.3.1.5. Limite de detección

Corresponde a la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones experimentales establecidas (Chaloner-Larsson *et al.*, 1997; Ochoa, 2001).

3.3.3.1.6. Límite de cuantificación

Es la mínima concentración del analito que puede determinarse con una precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones experimentales establecidas (Chaloner-Larsson *et al.*, 1997). El límite de cuantificación es un término cuantitativo (menor cantidad medible), mientras que el de detección es cualitativo (menor cantidad detectable) (Chaloner-Larsson *et al.*, 1997; Ochoa, 2001)

3.3.3.1.7. Especificidad

Es la habilidad de determinar una sustancia o componente con exclusión de otras (Chaloner-Larsson *et al.*, 1997). El efecto de una sustancia presente en una muestra que causa que el resultado de un test sea erróneo se denomina interferencia, que puede ser inespecífica, conocida como efecto matriz (tonicidad, temperatura, sustancias extrañas), ó específica, dada por la heterogeneidad de los antígenos, del antisuero o al hecho de que distintos antígenos comparten grupos inmunológicos (Gobello *et al.*, 1998).

Los términos selectividad y especificidad se consideran equivalentes (Chaloner-Larsson *et al.*, 1997), aunque se ha definido la selectividad como la capacidad de detectar separadamente sustancias diferentes presentes en una misma muestra y especificidad la capacidad de detectar el analito sin interferencia de ningún otro compuesto (Ochoa, 2001).

3.3.4. ELISA como técnica de diagnóstico hormonal

La investigación pionera de ELISA se dio en el área de la endocrinología. Van Weemen y Schuurs (1971, 1972, 1974) establecieron ELISA para la medición de gonadotropina coriónica humana (hCG), más tarde estos ensayos fueron también desarrollados por Stimson y Sinclair (1974) y Yorde *et al.* (1976) quienes lograron una sensibilidad cercana a la de RIA. Van Weemen y Schuurs (1974, 1975),

realizaron evaluaciones detalladas de ensayos de hCG, estrógeno y hormona luteinizante. Estudios paralelos con ELISA en lactógeno placentario humano (Bosch *et al.*, 1975; van Hell *et al.*, 1976; Barbour, 1976) resultaron en ensayos mucho menos sensibles que RIA. La insulina y la hormona estimulante de la tiroides (TSH) son otras grandes hormonas que han sido medidas con éxito por ELISA (Voller *et al.*, 1978). Además, hormonas de bajo peso molecular, como progesterona, estriol y cortisol se midieron con una alta sensibilidad (Voller *et al.*, 1978).

3.3.4.1. Antecedentes de ELISA cuantitativo para la medición de progesterona canina

A pesar de que los ensayos inmunoenzimáticos (EIA) son la alternativa más conveniente al RIA, es limitado su uso en caninos para la estimación de progesterona.

Dray *et al.* (1978) fueron los primeros en desarrollar un inmunoensayo no radiactivo para medir progesterona, utilizaron tubos de poliestireno recubiertos con anticuerpo antiprogesterona, y b-galactosidasa como marcador enzimático (Khatun *et al.*, 2009). Posteriormente, Seeger *et al.* (1979) utilizaron este ensayo para medir progesterona en plasma equino. Luego, Munro y Stabenfeldt (1984) desarrollaron un inmunoensayo enzimático en placa de microtitulación de fase sólida usando 3-O-carboximetil oxima-progesterona (3-CMO- progesterona) conjugada a peroxidasa (HRP) como marcador y un anticuerpo antiprogesterona de conejo inmunizado con 11 α -hemisuccinil progesterona-BSA. Consecutivamente, Van de Wiel y Koops (1986) y Prakash *et al.* (1988) desarrollaron la técnica del segundo anticuerpo, en donde un segundo anticuerpo adherido al fondo de la microplaca se une al anticuerpo primario antiprogesterona, en este caso se utilizó un anticuerpo antiprogesterona de conejo inmunizado con progesterona-7-carboxyethylthioether-BSA y peroxidasa (HRP) como marcador enzimático.

Desde entonces, se desarrollaron un sinnúmero de métodos inmunoenzimáticos, no tan sólo colorimétricos, también quimioluminiscentes (Miller *et al.*, 1988) y fluorescentes (Kakabakos y Khosravi, 1992) para medir progesterona con la mayor eficiencia posible.

Existen bastantes ensayos inmunoabsorbentes ligado a enzima (ELISA) cuantitativos descritos en la literatura, desarrollados para la medición de progesterona en suero humano, en leche y plasma bovino (Arnstadt y Cleere, 1981; Marcus y Hackett, 1986; Hatzidakis *et al.*, 1993; Basu *et al.*, 2006; Bayemi *et al.*, 2007; Kathun *et al.*, 2009; Shrivastav *et al.*, 2010). Algunos de ellos han sido validados para su uso en equinos (Elmore *et al.*, 1988; Nagy *et al.*, 1998) y en cerdos (Moriyoshi *et al.*, 1997).

En tanto, en la perra, existe una escasa cantidad de ensayos enzimáticos cuantitativos (Eckersall y Harvey, 1987; England *et al.*, 1989; Günzel-Apel *et al.*, 1990; Post *et al.*, 1990; Arbeiter, 1993; Dietrich y Möller, 1993; Forsberg *et al.*, 1993; Ververidis *et al.*, 2002; Thuróczy *et al.*, 2003; Seki *et al.*, 2007; Chapwanya *et al.*, 2008; Brugger *et al.*, 2011) descritos en la literatura para la determinación de progesterona. De estos, la mayoría de los ELISA utilizados han sido diseñados originalmente para la medición de progesterona en suero o leche bovina (Eckersall y Harvey, 1987; England *et al.*, 1989; Günzel-Apel *et al.*, 1990; Post *et al.*, 1990; Dietrich y Möller, 1993), los que incorporan un estándar con un máximo de 10 ng/ml de progesterona, y por lo tanto, fueron empleados durante la fase de proestro y estro para estimar el momento de la ovulación y el subsecuente período de apareamiento o inseminación artificial. Por otro lado, en los otros seis ELISA restantes se ocuparon estándares sobre los 10 ng/ml (Arbeiter, 1993; Forsberg *et al.*, 1993; Ververidis *et al.*, 2002; Thuróczy *et al.*, 2003; Chapwanya *et al.*, 2008; Brugger *et al.*, 2011), permitiendo la detección de altas concentraciones de progesterona, observadas durante la fase luteal y fueron aplicados en los diferentes estados del ciclo estral y preñez. Sin embargo, los ELISA descritos por Arbeiter (1993), Forsberg *et al.* (1993), Chapwanya *et al.* (2008) y Brugger *et al.* (2011), al igual que un RIA, requieren un

personal capacitado y/o equipamiento especial más costoso para su aplicación. Arbeiter (1993), utilizó un análisis fotométrico cuantitativo con separación magnética en fase sólida, Forsberg *et al.* (1993) y Chapwanya *et al.* (2008) utilizaron la quimioluminiscencia, mientras que Brugger *et al.* (2011) usó la fluorescencia como marcador.

Con respecto a las consideraciones en el manejo de las muestras para la medición de P₄ canina en suero o plasma con ELISA, existen antecedentes poco claros en cuanto al efecto de anticoagulantes, intervalo de tiempo previo a la centrifugación, tiempo de almacenamiento, temperatura de almacenamiento y método de ensayo sobre la concentración de P₄ determinada en la muestra. Los resultados reportados difieren de acuerdo al método empleado y en algunos casos son contradictorios. Mientras que en otras especies, estos factores tienen un efecto evidente e indiscutible sobre las concentraciones de P₄, especialmente en la vaca donde hay una marcada disminución, algo similar ocurre en el ovino pero menos manifiesto (Volkman, 2006). La concentración de P₄ medida por ELISA en plasma canino es más baja que en suero, indistintamente del tipo de anticoagulante que se utilice (EDTA, Heparina o fluoruro de sodio oxalato potásico, NaFK) (Thuróczy *et al.*, 2003). Se ha demostrado que la hemólisis en muestras evaluadas con RIA no afecta la concentración final de P₄ (Reimers *et al.*, 1991). Sin embargo, en ELISA quizás este factor afecte, por lo que deben evitarse muestras muy hemolisadas.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, debido a la gran variabilidad en la metodología de los ensayos para la determinación de progesterona canina es que se hace necesario que cada laboratorio cuente con un protocolo propio estandarizado que evite las variaciones observadas comúnmente en diversos laboratorios externos, especialmente si no son veterinarios.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL:

- Estandarizar la medición de los niveles de progesterona sérica en la perra mediante Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), en relación a su ciclo reproductivo.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estandarizar la técnica de ELISA en la evaluación de progesterona sérica en la perra.
- Analizar la evaluación de la progesterona en la perra en el diagnóstico de ovulación.
- Evaluar las características propias de la perra en la evaluación de la progesterona sérica mediante ELISA.
- Comparar la evaluación de progesterona en la perra mediante ELISA y otros métodos hormonales cuantitativos (RIA) y semicuantitativos.

5. MATERIALES Y MÉTODO

5.1. Materiales del ensayo

5.1.1. Animales

Se trabajó con hembras caninas, desde Agosto del 2011 a Agosto del 2012, de diferentes razas y mestizas, de 1 a 6 años de edad, clínicamente sanas, en diferentes estados del ciclo estral. Todos los animales provenían de privados.

Un primer grupo de muestras provino de hembras presentadas a ovariectomía en la Unidad de Salud e Higiene Ambiental de la I. Municipalidad de La Pintana y en el Centro de Atención Primaria de Mascotas Santo Tomás, del sector de Santo Tomás, en la comuna de La Pintana.

Un segundo grupo de perras, se presentaron en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, para seguimiento del ciclo estral, desde el inicio del proestro, luego del comienzo del sangramiento vulvar.

5.1.2. Reactivos para la medición hormonal con ELISA

- Microplaca de poliestireno de 96 pocillos (#15134; Thermo Fisher Scientific; Rockford IL, USA): Cada set contiene 5 microplacas transparentes precubiertas con IgG de cabra anti-ratón.
- Anticuerpo monoclonal IgG anti-progesterona (#MA5-11246; Thermo Fisher Scientific; Rockford IL, USA): Obtenido de ratón inmunizado con 11 α -hemisuccinato-progesterona conjugada a BSA. Purificado a partir de fluido ascítico por cromatografía de Proteína G (200 μ g/ml). Es reactivo para progesterona de todas las especies domésticas. El vial contiene 0,5 ml.

- Progesterona estándar (#P0130-25G; Sigma; St. Louis, USA)
- 3-O-carboximetil oxima-progesterona (3-CMO-Progesterona) conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (#P9006-24A; USBiological; Massachusetts, USA): Concentración no determinada. El vial contiene 1 ml.
- Sustrato Ultra TMB® (#34022; Thermo Fisher Scientific; Rockford IL, USA): Tetra-metil bencidina (TMB)/peróxido de hidrógeno.
- Solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 95%) (#1007311000; Merck Chile S.A.): Solución de detención de la reacción (*Stop solution*).

Los reactivos del ELISA semicuantitativo Ovulation Test® (BioVeto Test®, Francia) utilizado en este estudio, incluyen pocillos tratados con anticuerpo monoclonal, un sustrato A, un sustrato B, dos soluciones de lavado y un conjugado enzimático. Este ensayo fue diseñado para determinar el nivel de progesterona en plasma o suero de caninos, felinos, bovinos y equinos.

5.1.3. Buffers utilizados en ELISA

- Buffer de lavado concentrado 20X PBS Tween-20 (#28352; Thermo Fisher Scientific, Inc.; Rockford, IL, USA): Compuesto por 10 mM de fosfato de sodio, 0,15 M de NaCl, contenidos en 0,05% de Tween-20, pH 7,2.
- Buffer de dilución: Se preparó en base a 25 mM de Tris (tris hidroximetil aminometano; (HOCH₂)₃CNH₂), 0,15 M de cloruro de sodio (NaCl), contenidos en 0,05% de Tween-20, 2% (p/v) de albúmina sérica bovina (BSA fraction V ≥96%; Sigma; St. Louis, USA), pH 7,2.

5.1.4. Instrumentos y equipamiento requerido para ELISA

- Centrífuga de sobremesa (Eppendorf Modelo 5415D, Hamburg, Alemania).

- Micropipeta de 1-10 μ l (Socorex Isba S.A., Suiza) y puntas de pipeta respectivas.
- Micropipeta de 10-100 μ l (Socorex Isba S.A., Suiza) y puntas de pipeta respectivas.
- Micropipeta de 100-1000 μ l (Socorex Isba S.A., Suiza) y puntas de pipeta respectivas.
- Micropipeta multicanal de 8 canales de 10-100 μ l (Ecopipette, CAPP, Dinamarca).
- Incubadora (Daihan LabTech Co. Ltd., India), capaz de proporcionar condiciones estables de incubación a 37° C, con agitación constante.
- Microplate Sealing Tape (#15036; Thermo Fisher Scientific, Rockford IL, USA): Paquete de 100 hojas pre-picadas, sensibles a la presión digital para el sellado de microplacas.
- Lector de microplaca Autobio PHOmo (Autobio Labtec Instruments Co. LTd., Zhengzhou, China).
- PC (Gear©, Chile) equipado con Software AUTOsoft (Autobio Labtec Instruments Co. LTd., Zhengzhou, China).
- Refrigerador capaz de refrigerar a 4-5 °C y congelar a -18° C (Bosch® Modelo 460 dynamic cooling; Bosch and Siemens Home Appliances Group; Alemania)

5.1.5. Reactivos para la medición hormonal con RIA

Se utilizó el kit Coat-A-Count® Progesterone (Siemens Healthcare Diagnostic Inc., California, USA), compuesto por tubos de polipropileno recubiertos con

anticuerpo anti-progesterona, progesterona marcada con I125 y estándares de progesterona con concentraciones de 0; 0,1; 0,5; 2; 10; 20 y 40 ng/ml.

5.1.6. Instrumentos y equipamiento requerido para RIA

Se requirió de una micropipeta de 10-100 μ l (Socorex Isba S.A., Suiza) y puntas de pipeta respectivas, para la adición de las muestras a los tubos. Para colocar la progesterona marcada con I125 se utilizó una pipeta repetidora Eppendorf® (Hamburg, Alemania).

La lectura de las muestras se realizó mediante un contador de rayos gamma (ISO Data Gamma Counter, GMI Inc.)

5.2. Método

5.2.1. Obtención y procesamiento de las muestras

Las muestras de sangre fueron obtenidas, previa desinfección de la zona con alcohol 96°, de las venas braquiocefálicas anteriores, y recolectadas en tubos libres de anticoagulante (BD Vacutainer®, USA). Se permitió la formación del coágulo por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente el suero se extrajo y se centrifugó a 1000 g por 15 minutos. Luego, se congeló a -18°C, hasta el momento de la medición hormonal.

5.2.2. Clasificación

Las muestras individuales de perras sometidas a OH se clasificaron en relación al estado de su ciclo reproductivo, en anestro (n=13), proestro (n=6), estro (n=8) y diestro (n=25). Lo que fue determinado por anamnesis reproductiva, examen clínico del genital externo (sangramiento vulvar, edematización de la vulva), citología vaginal

e inspección de ovarios y útero, en el caso de las hembras presentadas a ovariectomía.

Se examinaron 9 Hembras en proestro inicial hasta el día estimado de ovulación. Para estimar el estado del ciclo, a cada una se le realizó citología vaginal, de acuerdo a las técnicas estandarizadas en el Laboratorio de Reproducción Animal (De los Reyes *et al.*, 2011), seguimiento ecográfico con un equipo de ultrasonografía con Doppler color (Sonosite® serie M-Turbo®; Washington, EE.UU.) para visualizar el estado folicular y la vascularización en los ovarios (De Los Reyes *et al.*, 2012). Adicionalmente, se realizaron las determinaciones de P₄ con un test semicuantitativo (Ovulation Test®; BioVeto Test; Francia). De las perras que participaron de este estudio, 3 fueron sometidas a ovariectomía (OH), 1 a inseminación artificial (IA), cuatro a monta natural y 1 a ningún manejo.

5.2.3. Medición hormonal

5.2.3.1. ELISA cuantitativo

Las concentraciones séricas de progesterona de un total de 101 muestras se midieron mediante un ELISA cuantitativo de competencia basado en la técnica del doble anticuerpo descrita por Van de Wiel y Koops (1986) y Prakash *et al.* (1988), y posteriormente validada para progesterona canina por Dietrich y Moller (1993).

Este ensayo, el cual fue diseñado en base al protocolo de ELISA de Thermo Scientific Pierce (2010), se desarrolló en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

5.2.3.1.1. Preparación de los reactivos

Previo a la preparación de los reactivos, con las concentraciones indicadas a continuación, se realizó una matriz de ensayo con diferentes diluciones de anticuerpo

(1 µg/ml; 2 µg/ml; 5 µg/ml en buffer de dilución) y conjugado enzimático (1/10; 1/50; 1/100; 1/1000 en buffer de dilución) utilizando estándares de progesterona, para determinar las concentraciones óptimas del ensayo.

- Anticuerpo monoclonal anti-progesterona: Para completar una microplaca de 96 pocillos, se preparó una cantidad suficiente de 5 ml de anticuerpo monoclonal con una concentración de 1 µg/ml, concentración determinada como la mínima óptima. Para esto, del vial de 0,5 ml (200 µg/ml) (#MA5-11246; Thermo Fisher Scientific; Rockford IL, USA) se extrajeron 25 µl, que se adicionaron en 4,975 ml de buffer de dilución. Para determinar el volumen a extraer del vial que se diluyó en buffer de dilución y así obtener una concentración de 1 µg/ml, se utilizó la fórmula $V1 * C1 = V2 * C2$:

$V1 * 200 \mu\text{g/ml} = 5 \text{ ml} * 1 \mu\text{g/ml} \rightarrow V1 = 5/200 = 0,025 \text{ ml} = 25 \mu\text{l}$ de anticuerpo en 4975 µl de buffer.

- Progesterona-HRP: Para completar una microplaca de 96 pocillos se preparó una cantidad suficiente de 5 ml de progesterona conjugada, con una dilución de 1:50 determinada como la mínima óptima. Del vial de 1 ml (concentración desconocida) (#P9006-24A; USBiological; Massachusetts, USA) se extrajeron 100 µl, que se diluyeron en 4,9 ml de buffer de dilución. Para determinar el volumen a extraer del vial, que se diluyó en el buffer de dilución en una proporción de 1/50, se utilizó la siguiente fórmula:

$1 \mu\text{l} \rightarrow 50 \mu\text{l}$

$V1 \rightarrow 5000 \mu\text{l} \quad V1 = 5000 * 1/50 = 100 \mu\text{l}$ de conjugado en 4900 µl de buffer

- Solución Stock de progesterona: En primera instancia se preparó una solución Pre-stock con una concentración de 500.000 ng/ml. Se pesaron 50 mg de progesterona (#P0130-25G; Sigma; St. Louis, USA) que se reconstituyeron en 100 ml de etanol al 95% (LabSynth Ltda.; Brasil). A partir de esta solución se preparó una solución Stock (500 ng/ml) de 5 ml. Se extrajeron 5 µl de solución Pre-stock (500.000 ng/ml) para ser diluidos en 4,995 ml de buffer de dilución. La solución Stock fue

refrigerada hasta su posterior uso para la preparación de los correspondientes estándares de progesterona. La solución pre-stock (500.000 ng/ml) fue congelada a -18 °C.

- Buffer de lavado: Se prepararon 300 ml de buffer de lavado, cantidad suficiente para 5 microplacas de 96 pocillos. Se diluyeron 15 ml del buffer concentrado 20X PBS Tween-20 (#28352; Thermo Fisher Scientific, Inc.; Rockford, IL, USA) en 285 ml de agua destilada.

- Solución de detención: Se prepararon 100 ml de solución 2 M de ácido sulfúrico (H_2SO_4), cantidad suficiente para 20 microplacas de 96 pocillos. Para ello se diluyeron 21,05 ml de H_2SO_4 al 95% (#1007311000; Merck Chile S.A.) en 78,95 ml de agua destilada. El volumen necesario de H_2SO_4 a diluir en agua destilada para llegar a una concentración 2M se calculó de la siguiente manera:

M= moles/lit Peso molecular (PM) de H_2SO_4 = 98,2 g/mol

2M= 2 moles/1 lit 1 mol \rightarrow 98,2 g

2 mol \rightarrow X X= 196,4 g

196,4 g \rightarrow 1 lit

X \rightarrow 0,1 lit X=19,6 g en 100 ml \rightarrow 20% aprox.

$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \rightarrow 95\% \cdot V_1 = 20\% \cdot 100 \text{ ml} \rightarrow V_1 = 2000/95 = 21,05 \text{ ml}$ de H_2SO_4 en 78,95 ml de buffer

5.2.3.1.2. Preparación de estándares de progesterona

Para hacer la curva de calibración, considerando los valores descritos de progesterona en las perras (Forsberg et al., 1993; Ververidis et al., 2002; Chapwanya et al., 2008; Brugger et al., 2011), se prepararon seis estándares de P_4 de 0,5 ml cada uno, con concentraciones de 0,2 ng/ml, 0,5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml y 50 ng/ml a partir de la solución stock de progesterona (500 ng/ml). Se comenzó por preparar el estándar 6 (50 ng/ml), diluyendo 50 μ l de Solución Stock de P_4 en 450 μ l de buffer de dilución. A partir del estándar 6 se preparó el estándar 5, diluyendo 200

μl en 300 μl de buffer de dilución. Para preparar el estándar 4 se utilizó el estándar 5 y así sucesivamente hasta el estándar 1, como se indica en la Fig. N°8. El estándar 0 sólo contiene buffer de dilución.

Fig. N°8: Preparación de concentraciones estándar de progesterona.

	Estándar 0	Estándar 1	Estándar 2	Estándar 3	Estándar 4	Estándar 5	Estándar 6
Buffer de dilución (μl)	500	300	400	375	250	300	450
Volumen de adición (μl)	-	200	100	125	250	200	50
Concentración final (ng/ml)	0	0,2	0,5	2,5	10	20	50

5.2.3.1.3. Procedimiento del ensayo

Las muestras de suero se descongelaron a temperatura ambiente (T° 20°C) para luego ser centrifugadas a 3000 g por 10 minutos antes de su análisis (Ververidis *et al.*, 2002; Brugger *et al.*, 2011).

Todos los reactivos, refrigerados a 4°C, fueron expuestos a temperatura ambiente (T° 20°C) por lo menos 30 minutos antes de su uso para equilibrar su temperatura con el ambiente.

Con una micropipeta de 10-100 μl (Socorex Isba S.A.; Suiza) se colocaron 50 μl de cada muestra de suero a analizar y/o los correspondientes estándares de P₄ (0; 0,2; 0,5; 2,5; 20 y 50 ng/ml) por cada pocillo de la placa de microtitulación recubierta con IgG de cabra anti- ratón (Thermo Scientific Inc. Rockford, IL, USA). Cada muestra se ensayó en duplicado (Fig. N°9). Las puntas de pipeta se cambiaron entre cada pocillo.

Fig. N°9: Distribución de muestras en microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	BL	M1	M1	M9	M9	M17	M17	M25	M25	M33	M33
B	S0	S0	M2	M2	M10	M10	M18	M18	M26	M26	M34	M34
C	S1	S1	M3	M3	M11	M11	M19	M19	M27	M27	M35	M35
D	S2	S2	M4	M4	M12	M12	M20	M20	M28	M28	M36	M36
E	S3	S3	M5	M5	M13	M13	M21	M21	M29	M29	M37	M37
F	S4	S4	M6	M6	M14	M14	M22	M22	M30	M30	M38	M38
G	S5	S5	M7	M7	M15	M15	M23	M23	M31	M31	M39	M39
H	S6	S6	M8	M8	M16	M16	M24	M24	M32	M32	M40	M40

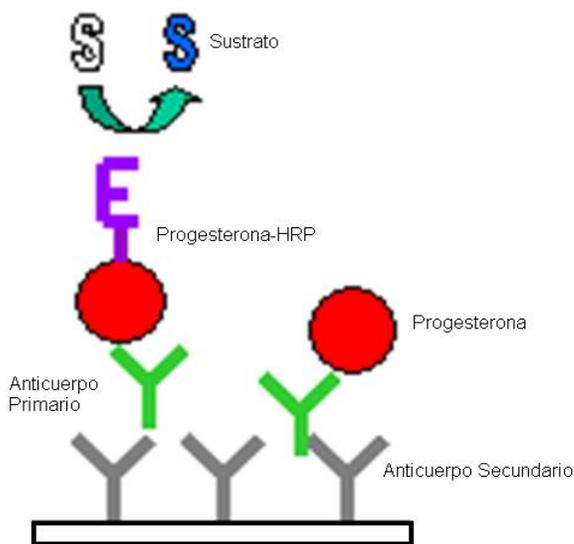
BL: Blanco S0: Estándar 0 S1: Estándar 1 S2: Estándar 2 S3: Estándar 3
S4: Estándar 4 S5: Estándar 5 S6: Estándar 6 M1-40: Muestras

Se añadieron 50 µl de conjugado enzimático 3-CMO-Progesterone-HRP (#P9006-24A; USBiological, Massachusetts, USA) preparado previamente en una dilución 1/50, a cada pocillo (menos al pocillo blanco).

Luego se añadieron 50 µl de anticuerpo monoclonal de ratón anti-progesterona (#MA5-11246; Sigma; St. Louis, USA), preparado previamente en una concentración de 1 µg/ml, a cada uno de los pocillos.

La mezcla se incubó a 37°C por dos horas en una incubadora (Daihan LabTech Co. Ltd.; India) con agitación constante y en oscuridad. Para evitar la evaporación y contaminación de los pocillos, se cubrió la microplaca con Microplate Sealing Tape (#15036; Thermo Fisher Scientific; Rockford IL, USA). Durante este período de tiempo la P₄ contenida en las muestras compite con la P₄ conjugada por la unión al anticuerpo primario anti-progesterona, el cual es reconocido por el anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón, que está adherido en el fondo de cada pocillo de la microplaca (Fig. N°10).

Fig. N°10: ELISA de competencia con doble anticuerpo



Posteriormente se vertió el excedente de reactivo de los pocillos de la microplaca y se procedió al lavado con una micropipeta multicanal de 8 canales (Ecopipette, CAPP; Dinamarca). Se realizaron 3 lavados sucesivos, llenando cada pocillo con 200 μ l del buffer de lavado preparado previamente. En cada lavado se dejó actuar el buffer durante 1 minuto, para luego ser removido por aspiración. En el último lavado, la microplaca se invirtió sobre una toalla de papel absorbente para eliminar cualquier remanente de buffer de lavado presente, por decantación.

La reacción antígeno-anticuerpo adsorbida en el fondo de la microplaca fue revelada por adición de 50 μ l de sustrato Ultra TMB® (#34022; Thermo Fisher Scientific; Rockford IL, USA) a cada pocillo. Esta reacción produce un color azul (absorbancias máximas a 370nm y 652nm) cuando se oxida como resultado de los radicales de oxígeno producidos por la hidrólisis de peróxido de hidrógeno por la enzima peroxidasa (HRP). Para permitir esta reacción, la microplaca se llevó a incubación a 37°C por 10 minutos en una incubadora (Daihan LabTech Co. Ltd.; India) con agitación constante y en oscuridad. Se selló la microplaca con Microplate Sealing Tape (Thermo Fisher Scientific; Rockford IL, USA).

Luego de los 10 minutos, la reacción se finalizó por adición de 50 µl de solución de detención en base a ácido sulfúrico 2 M (#1007311000; Merck), generándose un color amarillo de variada intensidad (Absorbancia máxima = 450nm).

La absorbancia de la reacción en cada pocillo, expresada en densidad óptica (DO), se midió a 450 nm con el lector de microplaca Autobio PHOmo (Autobio Labtec Instruments Co. LTd.; Zhengzhou, China).

Se promediaron los duplicados de las lecturas de cada estándar y muestra. La densidad óptica (DO) media del blanco se restó al promedio de cada estándar y muestra. Las absorbancias obtenidas de los estándares se utilizaron para construir una curva de calibración, semilogarítmica (lin/log) con ajuste de 4 parámetros, comúnmente utilizado para el análisis de ajuste de curvas en inmunoensayos, como ELISA (Ochoa, 2001), la que por interpolación permitió calcular las concentraciones de progesterona de las muestras analizadas. Todo esto fue realizado por el software AUTOsoft (Autobio Labtec Instruments Co. LTd.; Zhengzhou, China).

5.2.3.2. ELISA semicuantitativo

Las 47 muestras de suero, provenientes de las perras en seguimiento desde inicio de proestro se analizaron por el ELISA semicuantitativo Ovulation Test® (BioVeto Test, Francia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La intensidad de color producido en el ensayo de cada muestra, correspondiente con el nivel de progesterona presente en ésta, se comparó con la carta de color inserta en el manual, que indica cuatro rangos de concentración de P₄: <1, 1 - 2,5, 2,5 - 8 y >8 ng/ml.

5.2.3.3. RIA

75 muestras de suero se analizaron adicionalmente por radioinmunoensayo (RIA), ya estandarizado para la medición de progesterona canina (Coat-A-Count®

Progesterone, Siemens Healthcare Diagnostic Inc., California, USA). Este RIA se realizó en el Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

5.2.4. Diseño experimental

Los parámetros de validación del ensayo evaluados fueron: sensibilidad, exactitud y precisión.

La exactitud se estudió mediante la comparación con un método de referencia. Se seleccionaron 75 muestras diferentes de suero provenientes de perras en diferentes etapas del ciclo estral, por tanto las muestras de suero abarcaban un amplio rango analítico de concentración de progesterona, para su análisis tanto por ELISA y su comparación con RIA, usado como referencia (Lumsden, 2000; Ochoa, 2001).

La precisión intraensayo e interensayo se evaluó considerando muestras con concentraciones altas, medias y bajas de los diferentes segmentos de la curva de calibración. Para la precisión intraensayo se seleccionaron 4 muestras, que fueron testeadas 8 veces en un mismo ensayo (Ochoa, 2001). La precisión interensayo se determinó en 5 muestras cada una testada en duplicado, en 3 ensayos diferentes. Como criterio de precisión se usó un coeficiente de variación (CV) menor del 10% en la precisión intraensayo y del 15% en la interensayo (Chaloner-Larson, 1997; Gobello et al., 1998).

La sensibilidad del ensayo fue determinada a 3 desviaciones estándar del estándar 0 (S0), la cual se obtuvo por multiplicación de 3 desviaciones estándar del promedio de densidad óptica de S0 por la concentración de S1 y dividido en la diferencia entre la densidad óptica promedio de S0 y S1. Sensibilidad: $(3 DS \times S1) / \Delta DO (S0-S1)$ (Ochoa, 2001).

5.2.5. Análisis de datos

Los valores de las concentraciones de progesterona obtenidas mediante RIA y ELISA fueron traspasadas a una planilla de Microsoft Excel 2007 para su análisis estadístico. Se calcularon promedio, desviación estándar, coeficiente de variación.

Los resultados obtenidos mediante RIA fueron comparados con los de ELISA mediante un análisis de regresión lineal (Miller y Miller, 2002). Considerando los valores obtenidos por el RIA como referencia (variable independiente x), se calculó la ecuación de regresión con el software GraphPad Prism v.6 (San Diego, California, USA). Se utilizó un nivel de significancia de $p < 0,05$ (Miller y Miller, 2002).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Optimización del ensayo

La mayor reacción antígeno anticuerpo adsorbida en la microplaca se alcanzó con 2 horas de incubación a 37 °C, con diluciones del anticuerpo anti progesterona de 1 µg/ml, 2 µg/ml y 5 µg/ml y de la progesterona conjugada de 1:10 y 1:50. Se seleccionaron las condiciones que correspondieron al menor tiempo de ejecución del ensayo y las que propician la mayor optimización de reactivos, lo que resultó en 2 horas de incubación a 37 °C, con el conjugado en una dilución 1:50 y con una concentración de anticuerpo de 1µg/ml.

Para evitar una excesiva ni muy variada intensidad de color generada en los pocillos luego de agregar el sustrato, no debieron pasar más de 5 minutos al pipetear desde el primer al último pocillo de la microplaca y el tiempo de incubación correspondió a 10 minutos.

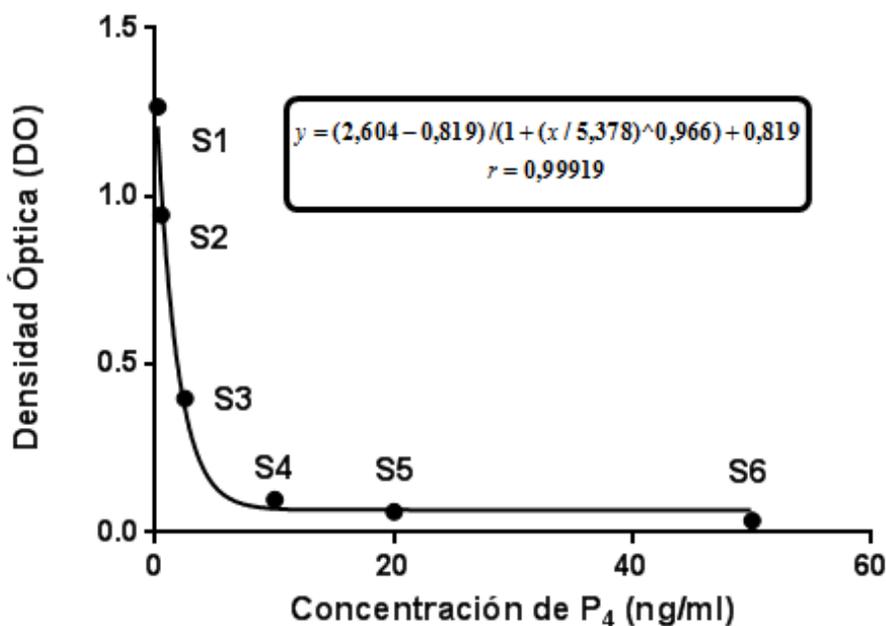
La lectura de la microplaca en el espectrofotómetro debió ser hasta 10 minutos después de haber agregado la solución de detención, luego de ese tiempo la densidad óptica determinada por el equipo comenzó a descender considerablemente.

6.2. Curva de calibración

Se construyó una curva estándar mediante una curva semilogarítmica (lin/log) con ajuste de 4 parámetros ($F(x) = (A-D)/(1+(x/C)^B) + D$, donde A: asíntota mínima; B: pendiente; C: punto de inflexión; y D: asíntota máxima) .

El eje x corresponde a las concentraciones estándar de P₄: 0,2 ng/ml (S1), 0,5 ng/ml (S2), 2,5 ng/ml (S3), 10 ng/ml (S4), 20 ng/ml (S5) y 50 ng/ml (S6), valores independientes. El eje y representa las respectivas densidades ópticas obtenidas por cada concentración, valores dependientes (Fig. N°11). El coeficiente de correlación (r) fue de 0,996, lo que refleja un alto grado de asociación entre densidad óptica y concentración de progesterona. Esto indica por tanto que puede ser utilizada de manera confiable para obtener por interpolación el valor de una muestra de concentración desconocida a partir de su densidad óptica.

Fig. N° 11: Curva de calibración con concentraciones estándar de P₄ para la medición de P₄ en muestras de suero canino.



Ensayos de ELISA descritos previamente en la literatura incorporan estándares con una concentración máxima de 10 ng/ml (Eckersall y Harvey, 1987; England *et al.*, 1989; Post *et al.*, 1990; Dietrich y Moller, 1993) por lo que son útiles sólo en etapas de proestro y estro, ya que en estas etapas del ciclo los niveles de P₄ no superan 1 ng/ml durante el proestro, llegando hasta 10 ng/ml al momento de la ovulación durante el estro (Concannon *et al.*, 1977; Brugger *et al.*, 2011). Ensayos posteriores incorporan estándares de hasta 40 ng/ml (Arbeiter, 1993; Forsberg *et al.*, 1993; Ververidis *et al.*, 2002; Chapwanya *et al.*, 2008; Brugger *et al.*, 2011), lo que implica que se pueden utilizar en etapa de diestro, donde las concentraciones pueden llegar a 15-80 ng/ml (Concannon, 2011; Hoffman y Papa, 2011).

El presente ensayo incorporó estándares de P₄ con concentraciones entre 0,2 ng/ml y 50 ng/ml, lo que permitió la detección de un amplio rango de concentraciones, incluyendo aquellas durante la fase luteal, abarcando así las diferentes etapas del ciclo estral de la perra.

6.3. Sensibilidad

La sensibilidad determinada fue de 0,19 ng/ml (Tabla N°1).

Tabla N°1: Cálculo de la sensibilidad de ELISA para progesterona

	Media (DO)	Desviación Estándar (DS)	3DS	Δ DO (S0-S1)
Estándar 0	1,301	0,016	0,048	0,05
Estándar 1	1,252	0,022		

Sensibilidad: $(3 \text{ DS} \times \text{S1}) / \Delta \text{DO (S0-S1)} = (0,048 \times 0,2 \text{ ng/ml}) / 0,05 = 0,192 \text{ ng/ml}$

La sensibilidad del ensayo fue adecuada y suficiente para detectar la concentración basal de P₄ (<1 ng/ml) presente en circulación antes del peak preovulatorio de LH, ya que los límites determinados previamente son valores

cercanos a 0,2-0,4 ng/ml en el anestro tardío y en el proestro tardío aumentan a 0,6-0,8 antes del peak LH (Concannon, 1993; Concannon y Vergesten, 2005; Blendinger, 2007; Concannon, 2011).

En relación a las sensibilidades obtenidas en ensayos cuantitativos previos, la concentración determinada en este ensayo es cercana a la sensibilidad obtenida en el ensayo de Eckersall y Harvey (1987) que fue de 0,1 ng/ml, Ververidis et al. (2002) de 0,28 ng/ml y Chapwanya et al. (2008) de 0,2 ng/ml.

6.4. Precisión

Los coeficientes de variación intraensayo para 4 muestras fueron de 7,35% a 9 % con un promedio de 8,1%. Los coeficientes de variación interensayo fueron de 8,2% a 16,3% con un promedio de 12,6% (Tabla N°2).

Tabla N°2: Coeficientes de variación intra e interensayo para la determinación de P₄

	<i>Intra-ensayo</i>				<i>Inter-ensayo</i>				
<i>Muestra</i>	<i>N11</i>	<i>N63</i>	<i>N67</i>	<i>N68</i>	<i>B1</i>	<i>N66</i>	<i>N43</i>	<i>N44</i>	<i>P5</i>
<i>Media (ng/ml)</i>	0,33	0,35	16,22	2,79	22,08	0,57	0,75	4,96	12,40
<i>Desviación Estándar (DS)</i>	0,03	0,03	1,19	0,22	2,45	0,09	0,12	0,61	1,02
<i>Coeficiente de variación (CV%)</i>	9,01	8,22	7,35	7,89	11,09	15,42	16,27	12,20	8,23
<i>Promedio CV%</i>	8,12				12,64				

La precisión intraensayo determinada en este ensayo, fue mayor al 5% que es el coeficiente de variación determinado como óptimo (Ochoa, 2001), sin embargo fue menor al 10% que es el máximo aceptable (Gobello *et al.*, 1999; Ochoa, 2001). Eckersall y Harvey (1978), obtuvieron un coeficiente de variación intraensayo de

15,5%. En el presente ensayo el uso de una micropipeta multicanal en la etapa de lavado y en la adición del sustrato disminuye el error, las diferencias están dadas en las variaciones que se pueden producir al pipetear desde el primer al último pocillo y en el tiempo que demora la adición de los reactivos. Con la experiencia estas diferencias deberían reducirse, disminuyendo el coeficiente de variación intraensayo.

El coeficiente de variación interensayo se encontró dentro del rango aceptable, menor a 15% (Chaloner-Larsson, 1997; Ochoa, 2001), indicando una buena reproducibilidad de los resultados, aunque esté sobre el máximo óptimo, menor o igual a 10% (Ochoa, 2001). Al igual que en la precisión intraensayo, el coeficiente de variación interensayo debería disminuir con la experiencia.

Los coeficientes de variación intra e interensayo determinados en las muestras con concentraciones bajas de P_4 fueron mayores que en las muestras con concentraciones altas de P_4 , similar a lo obtenido por Ververidis et al. (2002) y Brugger et al. (2011).

6.5. Correlación entre ELISA y RIA

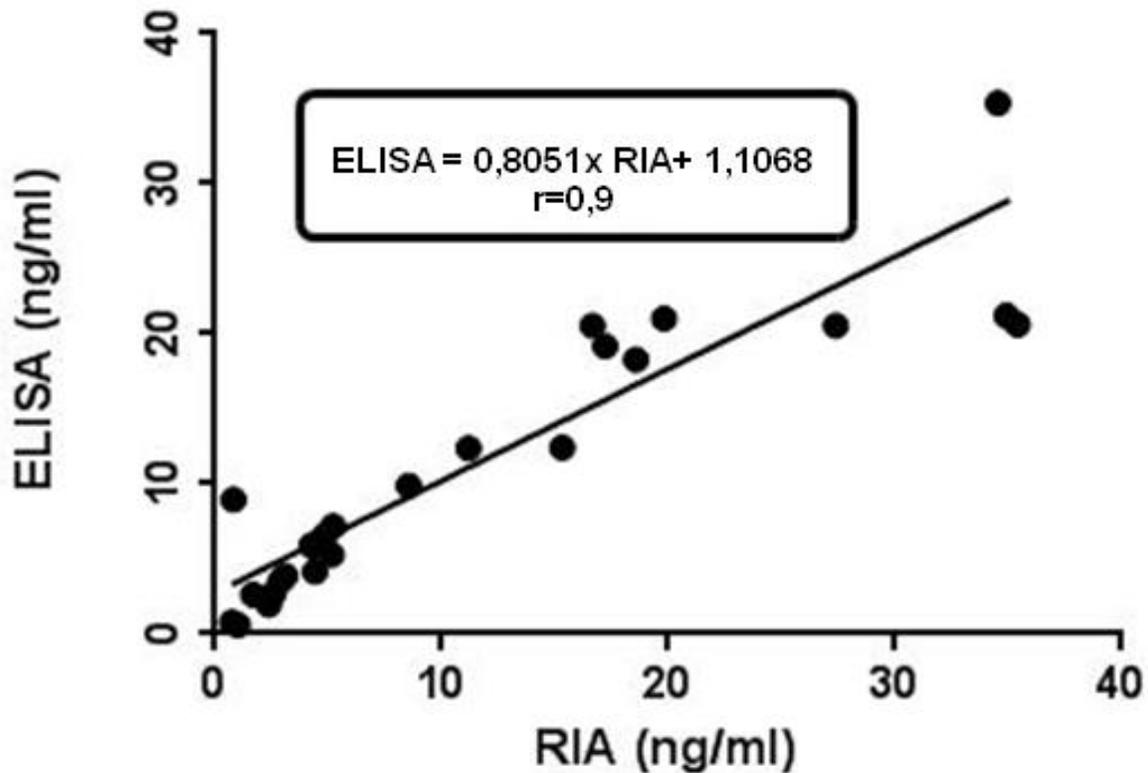
Los resultados obtenidos mediante RIA y ELISA de las 75 muestras de suero incluidas en este estudio se muestran en la tabla N°3.

Tabla N°3: Concentraciones de P₄ (ng/ml) determinadas por ELISA y RIA en 75 muestras de suero.

Concentración de Progesterona (ng/ml)								
Muestra	ELISA	RIA	Muestra	ELISA	RIA	Muestra	ELISA	RIA
B1	20,55	16,66	M4	3,46	3,46	N13	3,97	4,26
B3	20,60	35,40	M5	8,70	8,29	N14	1,35	2,03
B4	18,30	18,57	M6	17,80	32,02	N16	0,56	0,94
B5	21,20	34,93	PU1	0,42	0,65	N25	1,51	2,00
B6	21,00	19,81	PU2	0,72	0,72	N26	3,59	4,12
H2	0,90	0,6	PU3	0,97	1,72	N27	6,13	9,08
H3	9,89	8,55	PU4	2,15	1,01	N29	1,13	1,33
H5	10,45	19,37	PU5	15,05	17,66	N31	0,48	0,66
H6	12,85	28,81	PU6	35,11	25,97	N32	2,33	2,80
H7	35,39	34,54	MA1	1,8	2,57	N33	2,9	2,44
C1	0,75	0,82	MA2	4,95	5,6	N37	4,77	4,68
C3	6,52	4,8	MA3	7,2	6,19	N38	2,46	2,92
C4	30,00	24,99	PE1	1,02	3,95	N39	15,78	13,86
P2	5,90	4,25	PE2	5,9	8,01	N40	2,22	3,75
P3	5,29	5,14	PE3	16,12	34,32	N41	2,87	1,51
P4	5,80	4,33	PE4	23,6	12,94	N43	0,75	0,73
P5	12,40	11,19	PE5	38,41	38,71	N44	4,96	4,38
P6	20,55	27,38	N1	19,22	12,81	N47	28,20	21,75
A1	1,94	2,37	N6	0,68	0,98	N62	1,58	1,92
A2	2,61	1,67	N7	1,61	2,85	N63	0,35	0,33
A3	2,67	2,57	N8	9,20	7,20	N64	1,00	1,26
A4	7,20	5,21	N9	1,88	1,60	N65	0,75	0,52
A5	12,42	15,33	N10	0,69	0,66	N66	0,57	1,04
A6	19,18	17,22	N11	0,33	0,28	N67	16,22	14,87
M3	0,77	0,77	N12	0,91	0,57	N68	2,79	3,02

Para las 75 muestras de suero canino, el coeficiente de correlación fue de 0,9 ng/ml, con un nivel de significancia <0,0001, indicando una correlación significativamente alta entre las técnicas de ELISA y RIA (Fig. N°12). La ecuación de regresión lineal fue: $ELISA = 0,8051 \times RIA + 1,1068$.

Fig. N°12: Regresión lineal de concentraciones de P₄ (ng/ml) de 75 muestras de suero canino determinadas por ELISA y RIA.

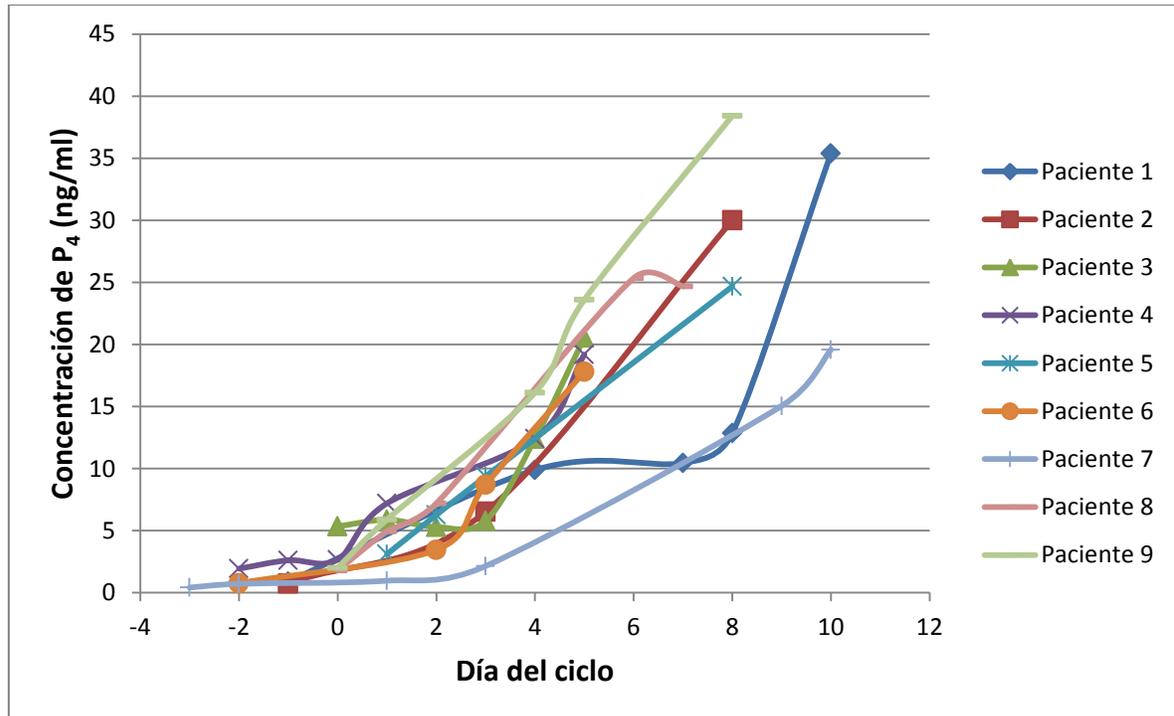


Esta alta correlación entre los resultados de ELISA y RIA demostró que ELISA puede reemplazar de forma eficiente el uso de RIA en la evaluación de progesterona sérica en las perras. Este nivel de correlación fue similar al obtenido por Eckersall y Harvey (1987) y England et al. (1989), con un $r = 0,90$ y Arbeiter (1993) con un $r = 0,92$, al estudiar las concentraciones de P₄ de perras durante proestro y estro mediante RIA y ELISA.

6.6. Concentraciones de P₄ en relación al ciclo estral

Para las 9 hembras en seguimiento estral, la concentración de progesterona fue incrementando lentamente desde el proestro hacia el inicio del estro y a partir de éste su aumento fue evidente (Fig. N° 13). Los resultados obtenidos tanto por ELISA como por RIA entregaron patrones semejantes en la concentración de progesterona (Anexo N°1), excepto en la paciente N5, donde las concentraciones determinadas por RIA fueron evidentemente mayores.

Fig. N°13: Determinación de las concentraciones de P₄ mediante ELISA en 9 perras durante proestro y estro.



Con ELISA se determinó una concentración promedio de 2,56 ng/ml al día 0 del ciclo, coincidente con el peak de LH. De acuerdo a lo estudiado, la concentración de progesterona sérica, alcanza niveles de 1 a 3 ng/ml al momento del peak de LH (Concannon *et al.*, 1975; Wildt *et al.*, 1979; Hase *et al.*, 2002; Concannon y Vergesten, 2005; Seki *et al.*, 2010), por lo tanto la concentración promedio determinada en este estudio se encontró dentro del rango descrito. Concannon *et al.*

(1975) indicaron que entre los días 6 y 10 del ciclo la concentración de P_4 es de $19,1 \pm 2,5$ ng/ml, Wild *et al.* (1979) determinaron concentraciones de P_4 entre 16 y 31 ng/ml. En el presente ensayo entre los días 6 y 10 del ciclo se obtuvo una concentración promedio de 23,24 ng/ml, con un máximo de 38,41 ng/ml.

Al comparar los valores obtenidos por ELISA cuantitativo con el semicuantitativo, un 80% de estos se encuentran dentro del rango de concentración de P_4 determinado por Test de ELISA semicuantitativo (Ovulation Test®) en las mismas muestras (Anexo N° 2). A pesar de que el método semicuantitativo es rápido y útil como una guía en la determinación del momento del ciclo estral en que se encuentra la perra, al sólo entregar rangos de concentración y no indicar valores mayores a 8 ng/ml no es posible precisar mejor un momento de monta apropiado, o diferenciar alguna patología como un quiste lúteo, ya una concentración indicada como >8 ng/ml puede ser tan cercana como 9 ng/ml o tan alta como 30 ng/ml.

La citología vaginal tuvo una apariencia similar entre las perras en una misma etapa del ciclo estral y obedeció a la tipología y cantidad celular previamente descritos en la literatura (England y Concanon, 2002; Jeffcoate, 2004; Vermeulen, 2009). La mayoría de las perras presentaron al frotis vaginal un alto porcentaje de células superficiales durante el proestro, cuando las concentraciones de P_4 se encontraban bajo 1 ng/ml. Esto se debe a la mayor concentración de estrógeno durante el proestro, que causó la proliferación de las capas de células. Durante el estro el porcentaje fue aún mayor, con más de un 80% de células superficiales. El porcentaje de células intermedias fue menor durante el estro (Anexo N°2).

En cuanto a la utilidad de la evaluación por ELISA para determinar el momento de ovulación y por tanto el de la monta o inseminación artificial. De las pacientes que se sometieron a monta y se preñaron, la paciente N1 se inseminó el día que alcanzó una concentración de P_4 de 12,9 ng/ml, coincidente con el día 8 de su ciclo, resultando en preñez de 6 cachorros. En la paciente N7 se determinó una

concentración de 2,15 ng/ml el día 3 de su ciclo y se sometió a monta los días 4 y 5, resultando en preñez de 5 cachorros.

Post *et al.* (1990) establecieron que el mejor momento para la monta era 24 h después de alcanzar niveles de P_4 de 5-10 ng/ml y el mismo día para concentraciones mayores a 10 ng/ml. Dietrich y Möller (1993) sometieron a monta a 13 perras 2 y 3 días después de determinar una concentración mayor a 5 ng/ml, de las cuales 11 se preñaron. Brugger *et al.* (2011) establecieron una concentración de 5-10 ng/ml como indicativo de ovulación, 4 perras se sometieron a monta dos días después de alcanzar esta concentración, 3 se preñaron. En el estudio realizado por Chapwanya *et al.* (2008), 17 de 19 perras inseminadas con semen congelado una sola vez con concentraciones de P_4 entre 14 y 19 ng/ml quedaron preñadas, estableciendo éste como el rango de concentración de óptima fertilidad.

En el presente estudio, no fue posible establecer el momento óptimo de monta o inseminación artificial para alcanzar una preñez exitosa en base a un rango de concentración de P_4 . Debido a que sólo 4 perras fueron sometidas a monta, de las cuales sólo 1 se concretó. Además sólo una perra se sometió a inseminación artificial.

En base a los valores de referencia que se presentan en cada etapa del ciclo estral (Concannon *et al.*, 1975; Concannon, 1977; Concannon *et al.*, 1978; Wildt *et al.*, 1979; Jeffcoate, 1992; Concannon, 1993; England y Verstegen, 1996; Concannon y Verstegen, 2005; De Gier *et al.*, 2006; Blendinger, 2007; Brugger *et al.*, 2011) las mediciones efectuadas en este estudio utilizando ELISA, entregaron resultados válidos para la determinación de P_4 sérica en la perra.

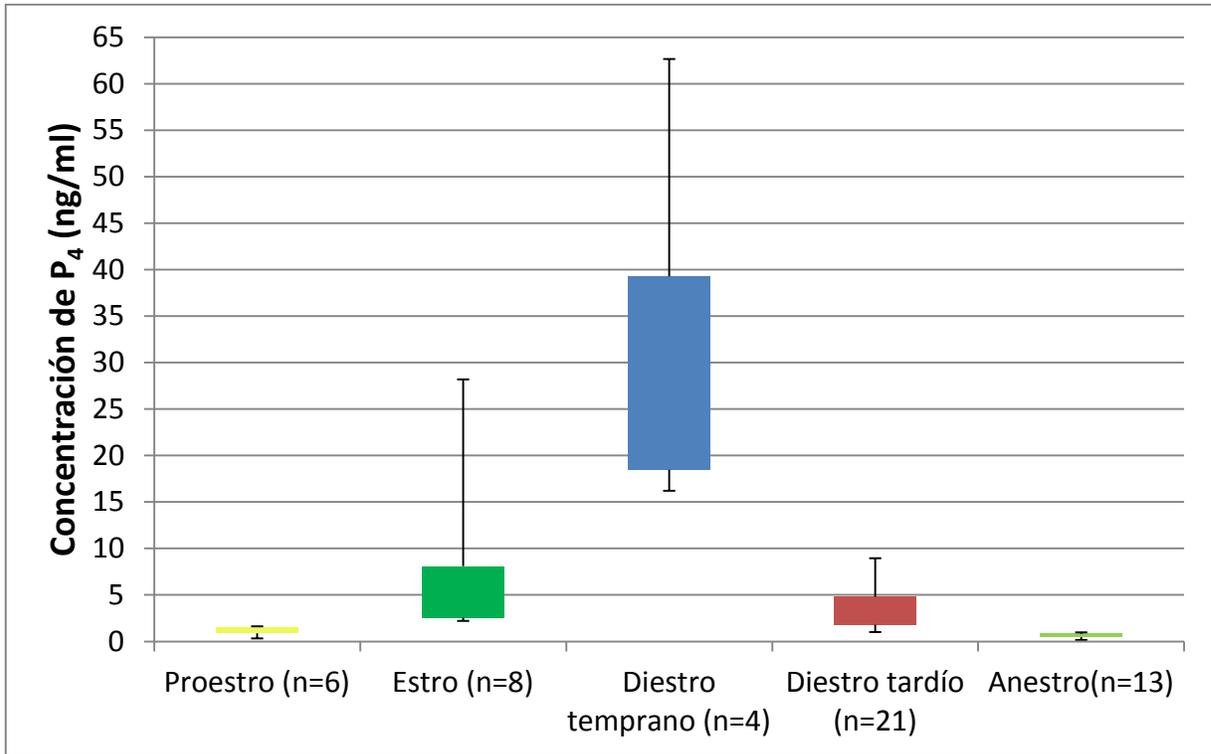
De las muestras individuales de perras presentadas a ovariectomía (OH), en fase de anestro se determinaron concentraciones de 0,17 a 0,97 ng/ml, en proestro de 0,33 a 1,61 ng/ml, en estro de 2,22 a 28,2 ng/ml y en diestro de 1 a 62,67 ng/ml (Tabla nº4). Debido a que la totalidad de las muestras provinieron de diferentes

perras, sólo se pudo reconocer la etapa del ciclo en la que se encontraban, sin poder identificar su día del ciclo. En etapa de anestro, el rango de valores obtenidos permitió clasificarlos en anestro temprano, medio y tardío. En el caso de proestro, la mayoría de las concentraciones encontradas correspondieron a proestro tardío, mayores a 0,6-0,8 ng/ml (Concannon, 1977; Concannon y Verstegen, 2005). En estro, los valores encontrados coinciden con el inicio hasta fines de esta etapa, en donde la concentración puede llegar hasta 30 ng/ml (Concannon *et al.*, 1975; Wild *et al.*, 1979; De Gier *et al.*, 2006). En etapa de diestro, los valores fueron muy disímiles, pudiendo identificarse sólo 4 perras en diestro temprano (Concannon, 2011; Hoffman y Papa, 2011), con un promedio de concentración de P₄ de 32,4 ± 21,23 ng/ml, debido al bajo número de muestras recolectadas (Fig. N°14).

Tabla N°4: Concentraciones de P₄ (ng/ml) detectadas en muestras provenientes de 52 perras presentadas a ovariectomía (OH) en diferentes estados del ciclo estral.

Proestro (n=6)	Estro (n=8)	Diestro temprano (n=4)	Diestro tardío (n=21)	Anestro(n=13)
0,33	2,22	16,22	1	0,17
0,75	2,33	19,22	1,13	0,35
1,2	2,46	31,49	1,23	0,39
1,51	2,79	62,67	1,35	0,48
1,58	3,59		1,37	0,56
1,61	3,71		1,8	0,57
	4,77		1,88	0,69
	9,2		2,09	0,75
	15,78		2,9	0,81
	28,2		2,87	0,85
			3,19	0,91
			3,29	0,96
			3,97	0,97
			4,09	
			4,11	
			4,82	
			4,96	
			5,48	
			6,13	
			7,6	
			8,96	

Fig. N°14: Concentraciones de P₄ (ng/ml) detectadas en muestras provenientes de 52 perras presentadas a ovariectomía (OH) en diferentes estados del ciclo estral.



Los resultados obtenidos en fase de proestro y estro coinciden con lo obtenido en ensayos cuantitativos previos (Eckersall y Harvey, 1987; England *et al.*, 1989; Dietrich y Möller, 1993; Forsberg *et al.*, 1993; Ververidis *et al.*, 2002; Chapwanya *et al.*, 2008). El valor máximo de P₄ encontrado en diestro temprano fue coincidente con la concentración máxima de P₄ determinada por Ververidis *et al.* (2002) que obtuvo valores máximos cercanos a 70 ng/ml en esta etapa. En anestro se obtuvieron concentraciones disímiles de P₄, lo que es indicativo de las posibles diferentes etapas del anestro en que se encontraban las perras. De acuerdo a lo señalado en otros estudios (Olson *et al.*, 1982; Jeffcoate, 1992; Blendinger, 2007; Concannon, 2011) las concentraciones de P₄ variaron de 0,81 a 0,97 ng/ml en anestro temprano, de 0,56 a 0,75 ng/ml en anestro medio y de 0,17 ng/ml a 0,48 ng/ml en anestro tardío.

7. CONCLUSIONES

- Las características del ensayo fueron consideradas satisfactorias tanto analítica como clínicamente, pudiendo ser aplicado con certeza aceptable para la determinación de concentración de P_4 sérica durante los diferentes estados del ciclo estral de la perra.
- La evaluación cuantitativa de progesterona es un indicador confiable de los eventos reproductivos asociados a la ovulación. El aumento de los valores de P_4 que se produce durante el estro pre y post ovulación en la perra puede ser confiablemente medido cuantitativamente con el ELISA desarrollado.
- El ELISA cuantitativo desarrollado puede ser utilizado como una alternativa más económica al RIA, ya que se encontraron altamente correlacionados al evaluar el amplio rango de concentraciones de P_4 sérica en las diferentes fases del ciclo estral de la perra.
- El método de ELISA semicuantitativo es rápido y útil como una guía en la determinación del momento del ciclo estral en que se encuentra la perra, pero para precisar el momento específico del ciclo es necesario un método cuantitativo.

8. BIBLIOGRAFÍA

ARBEITER, K. Anovulatory ovarian cycles in dogs. Journal of Reproduction and Fertility, 47: 453-456, 1993.

ARNSTADT, K.I. y CLEERE, W.F. Enzyme-immunoassay for determination of progesterone in milk from cows. Journal of Reproduction and Fertility, 62:173-180, 1981.

AUKE C. y SCHAEFERS-OKKENS. Section XVIII: Reproductive System, Chapter 297: Estrous Cycle and Breeding Management of the Healthy Bitch. En: ETTINGER, Stephen J. y FELDMAN Edward C. Textbook of Veterinary internal medicine, 7th Edition. Saunders, 2010.pp.1602.

BARBOUR, H. M. Development of an enzyme immunoassay for human placental lactogen using labelled antibodies. J. immunol. Methods, 11: 15-23, 1976.

BASU, A., SHRIVASTAVA, T.G. y MAITRA, S.K. A direct antigen heterologous enzyme immunoassay for measuring progesterone in serum without using displacer. Steroids, 71(3): 222-230, 2006.

BAYEMI, P. H., NSONGKA, V. M., PERERA, B. M. A. O., CAVESTANY, D y WEBB, E. C. Validation of a human progesterone enzyme immunoassay (EIA) kit for use on serum of cattle in Cameroon. Trop Anim Health Prod, 39:335–338, 2007.

BLENDINGER, Konrad. Physiology and pathology of the estrous cycle of the bitch. En: Congresso Internazionale Multisala SCIVAC (56º, 2007, Rimini, Italia). Proceedings of the SCIVAC Congress. Rimini, Italia, SCIVAC Congress, 2007. pp. 73-77.

BOSCH, A. M. G., VAN HELL, H., BRANDS, J. A. M., VAN WEEMEN, B. K. y SCHUURS, A. H. W. M. Clinical Chemistry, 21: 1009-1012, 1975.

BRUGGER, N, OTZDORFF, C, WALTER, B, HOFFMANN, B y BRAUN, J. Quantitative Determination of Progesterone (P4) in Canine Blood Serum Using an Enzyme-linked Fluorescence Assay. Reprod Dom Anim, 46:870–873, 2011.

BUFF, Samuel. Interests and limits of hormonal assay in breeding management. En: Reproduction in companion, exotic and laboratory animal (6º, Septiembre 2005, Nantes, Francia). Proceedings of the 6º EVSSAR European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory. Nantes, Francia, ESAVS-EVSSAR-ENVN, 2005.

CHALONER-LARSSON, G., ANDERSON, R. y EGAN, A. *A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Validation of analytical assays* [en línea]. Geneva: World Health Organization (WHO), 1997 [fecha de consulta: 20 de junio 2012], pp.65-95. Disponible en: www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF/www9666.pdf

CHAPWANYA, A., CLEGG, T., STANLEY, P., VAUGHAN, L. Comparison of the Immulite and RIA assay methods for measuring peripheral blood progesterone levels in Greyhound bitches. *Theriogenology* [en línea]. 2008, vol.70, no.5 [fecha de consulta: 20 de Marzo 2012], pp. 795-799. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X08002999>

CONCANNON, P.W., HANSEL, W. y VISEK, W. J. The Ovarian Cycle of the Bitch: Plasma Estrogen, LH and Progesterone. Biology of Reproduction, 13: 112-121, 1975.

CONCANNON, P.W., HANSEL, W. y MCENTEE, K. Changes in LH, Progesterone and Sexual Behavior Associated with Preovulatory Luteinization in the Bitch. Biology of Reproduction, 17: 604-613, 1977.

CONCANNON, P.W., BUTLER, W.R., HANSEL, W., KNIGHT, P.J., HAMILTON, J.M. Parturition and lactation in the bitch: serum progesterone, cortisol and prolactin. Biology of Reproduction, 19: 1113–1118, 1978.

CONCANNON, P.W. Induction of fertile oestrus in anoestrous dogs by constant infusion of GnRH agonist. J. Reprod. Fertil., 39: 149–160, 1989.

CONCANNON, P. W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. J. Reprod. Fert, 47: 3-27, 1993.

CONCANNON, P.W. y VERSTEGEN, J. Some unique aspects of canine and feline female reproduction important in veterinary practice. En: WSAVA World Congress (30º, 2005, Ciudad de México, México). Proceedings of the World Small Animals Veterinary Association (WSAVA) Congress. Ciudad de México, México, WSAVA, 2005.

CONCANNON, P.W. Endocrinologic Control of Normal Canine Ovarian Function. *Reprod Dom Anim* [en línea]. 2009, Vol. 44, no. 2 [fecha de consulta: 12 de Octubre 2012], pp. 3–15. Disponible en:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2009.01414.x/full>>

CONCANNON, P.W. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science* [en línea]. 2011, Vol.124, no. 3–4 [fecha de consulta: 20 de Marzo 2012], pp. 200-210. Disponible en:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432010004124>>

CULTEK. *Soluciones ELISA: Protocolo y técnicas* [en línea]. Madrid, España: Cultek, 2006 [fecha de consulta: 10 de Marzo 2012]. Disponible en:

<<http://www.cultek.com/link/link.asp?link=/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-Protocolos.pdf>>

DE GIER, J., DIELEMAN S.J., DJAJADININGRAT-LAANEN, S.J., KOOISTRA, H.S., OKKENS, A.C. Differential regulation of the secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone around the time of ovulation in the bitch. *Theriogenology* [en línea]. 2006, vol 66 [fecha de consulta: 03 de Abril 2012], pp.1419–1422. Disponible en: <[http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(06\)00091-4](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(06)00091-4)>

DE LOS REYES, M., DE LANGE, J., MIRANDA, P., PALOMINO, J. y BARROS, C. Effect of human chorionic gonadotropin supplementation during different culture periods on in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, 64 (1): 1-11, 2005.

DE LOS REYES, M., PALOMINO, J., MORENO, R., PARRAGUEZ, V. y BARROS, C. Evaluation of cortical granules and viability evaluation during in vitro maturation of bitch oocytes subjected a long-term culture periods. *The Veterinary Record*, 160 (6): 196-198, 2007.

DE LOS REYES, M., PALOMINO, J. y HETZ, J. Ultrastructural Study of the Canine Zona Pellucida Surface During In Vitro Maturation. *Reprod Dom Anim*, 44(2): 247-250, 2009.

DE LOS REYES, M., PALOMINO, J., PARRAGUEZ, V.H., HIDALGO, M. y SAFFIE, P. Mitochondrial distribution and meiotic development in canine oocytes during in vitro and in vivo maturation. *Theriogenology*, 75 (2): 346-353, 2011.

DE LOS REYES, M., PALOMINO, J., PARRAGUEZ, V.H. y VERGARA, J. Sperm nuclear decondensation after *in vitro* and *in vivo* maturation of canine oocytes. *Reprod Dom Anim*, 47(6): 1-4, 2012.

DIETRICH, E. y MÖLLER, R. Use of a progesterone enzymeimmunoassay to determine the optimal mating time in oestrus bitches. *J. Reprod. Fert.*, 47: 524, 1993.

DRAY, G., ANDRIEU, J.M. y RANAUD, F. Enzyme immunoassay of progesterone at the picogram level using beta-galactosidase as label. Biochim. Biophys, 403(1):131–138, 1975.

ECKERSALL, P.D. y HARVEY, J.A. The use of a bovine plasma progesterone ELISA kit to measure progesterone in equine, ovine and canine plasmas. Veterinary Record, 120: 5-8, 1987.

ELMORE RG, SHULL JW, VARNER DD, MEYERS, PJ. Using progesterone assay kits to determine equine luteal function. Vet Med, 83:250–253, 1988.

ENGLAND, G.C., ALLEN, W.E. y PORTER, D.J. A comparison of radioimmunoassay with quantitative and qualitative enzyme-linked immunoassay for plasma progesterone detection in bitches. Veterinary Record, 125: 107-108, 1989.

ENGLAND, G.C. y VERSTEGEN, J.P. Prediction of parturition in the bitch using semiquantitative ELISA measurement of plasma progesterone concentration. Vet Rec, 139: 496–497, 1996.

ENGLAND, G. y CONCANNON, P.W. Determination of the Optimal Breeding Time in the Bitch: Basic Considerations. *Recent Advances in Small Animal Reproduction* [en línea]. International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA, 2002 [fecha de consulta: 20 de Marzo 2012]. Disponible en: <http://www.ivis.org/advances/concannon/england2/ivis.pdf>

ENGLAND, G.C., YEAGER, A. y CONCANNON, P.W. Ultrasound imaging of the reproductive tract in the bitch. In: recent advances in small animal reproduction. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service, 2003.

FARSTAD, W., MONDAIN-MONVAL, M., HYTTEL, P., SMITH, A.J., MARKENG, D. Periovulatory endocrinology and oocyte maturation unmated, mature blue fox vixens (*Alopex lagopus*). Acta Vet. Scand, 30: 313–319, 1989.

FAYRER-HOSKEN, R. Embryo transfer in the dog and cat. *Theriogenology* [en línea]. 2007, vol. 68, no. 3 [Fecha de consulta: 20 de Junio 2012], pp. 382-385. Disponible en: <[http:// www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(07\)00281-6](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(07)00281-6)>

FEESER, V.R. y LORIA, R.M. Modulation of traumatic brain injury using progesterone and the role of glial cells on its neuroprotective actions. *Journal of Neuroimmunology* [en línea]. 2011, Vol. 237, no.1–2 [fecha de consulta: 15 Agosto 2012], pp. 4–12. Disponible en:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165572811001676>>

FONTAINE, E., MIR, F., VANNIER, F. y FONTBONNE, A. Utilisation du laboratoire en gynécologie et andrologie canines. Revue francophone des laboratoires, 40(420): 57-67, 2010.

FONTBONNE, Alain y LÉVY, Xavier. Determining the optimal time of mating in bitches: particularities. *Rev Bras Reprod Anim* [en línea]. 2007, vol.31, no.1 [Fecha de consulta: 21 de Marzo 2012], pp.128-134. Disponible en:

< <http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB081Levypag128-134.pdf>>

FORSBERG, M., LINDE-FORSBERG, C., KARLSSON, A. y CARLSSON, M.A. Progesterone and oestradiol in canine plasma monitored by enhanced luminescence immunoassays. Journal of Reproduction and Fertility, 47: 127-132, 1993.

GOBELLO, M.C, BROWN, O.A. y RONDERO, J.R. Determinaciones hormonales. Analecta Veterinaria, 18 (1/2): 71-81, 1999.

GOBELLO, C., CONCANNON, P.W. y VERSTEGEN, J. Canine Pseudopregnancy: A Review. *Recent Advances in Small Animal Reproduction* [en línea]. International Veterinary Information Service (www.ivis.org). Ithaca, New York, USA, 2001 [fecha de consulta: 10 de Octubre 2012]. Disponible en:

<<http://www.ivis.org/advances/concannon/gobello/ivis.pdf>>

HANUKOGLU, I. Steroidogenic enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* [en línea]. 1992, Vol. 43, no. 8, pp. 779-804. Disponible en:

<<http://www.science.co.il/hi/pub/Steroid-Hormone-Biosynthesis.pdf>>

HASE, M., HORI, T., KAWAKAMI, E. y TSUTSUI, T. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. *Theriogenology* [en línea]. 2000, Vol. 62, no. 3 [fecha de consulta: 15 de Julio 2012], pp. 243-248. Disponible en:

<http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/62/3/62_3_243/article>

HATZIDAKIS, G., STEFANAKIS, A. y KRAMBOVITIS, E. Comparison of different antibody-conjugate derivatives for the development of a sensitive and specific progesterone assay. *Journal of Reproduction and Fertility*, 97:557-561, 1993.

HAYER, P. y GÜNZEL-APEL, A.R. Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and the early luteal phase in the bitch. *J. Reprod. Fert.*, 47: 93-100, 1993.

HOFFMAN, B., BÜSGES, F., ENGEL, E., KOWALEWSKI, M.P. y PAPA, P. Regulation of Corpus Luteum-function in the Bitch. *Reproduction in Domestic Animals* [en línea]. 2004, Vol. 39 [fecha de consulta: 03 de Abril 2012], pp. 232-240. Disponible en:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2004.00508.x/full>>

HOFFMAN, B. y PAPA, P.C. The Corpus Luteum of the Dog: Source and Target of Steroid Hormones?. *Reproduction in Domestic Animals* [en línea]. 2011, Vol. 45 [fecha de consulta: 03 de Abril 2012], pp. 750-756. Disponible en: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2010.01749.x/full>>

HOLST, P.A., PHEMISTER, R.D. The prenatal development of the dog. Preimplantation events. *Biol. Reprod*, 5:771–779, 1971.

IMMUNOCHEMISTRY TECHNOLOGIES. *ICT ELISA Solutions Catalog* [en línea]. Minnesota, USA: ImmunoChemistry Technologies, LLC, 2011 [fecha de consulta: 21 de Marzo 2012]. Disponible en: <www.immunochemistry.com/ELISASolutions.htm>

INEZÉDY, János, LENGYEL, Tamás y URE, Alan. *Compendium of analytical nomenclature. Spectrochemical Analysis. Processes and techniques. Data interpretation* [en línea]. North Carolina, USA: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 1997 [fecha de consulta: 20 de Junio 2012]. Disponible en: <http://iupac.org/publications/analytical_compendium/>

INTERNATIONAL Organization for Standardization. International Standard - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO/IEC 17025: 2005. Geneva, Switzerland, 2005.

INTERNATIONAL Organization for Standardization. International Standard - Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions. ISO 8402-1:1999. Geneva, Switzerland, 1999.

JEFFCOATE, Ian. 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. *J. Reprod. Fert.* [en línea]. 1992, Vol. 94 [fecha de consulta: 01 de julio 2012], pp. 423-429. Disponible en: <<http://www.reproduction-online.org/content/94/2/423.long>>

JEFFCOATE, Ian. Chapter One: Physiology and Endocrinology of the bitch. En: ENGLAND, Gary, HARVEY, Mike y SIMPSON, Gillian. Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology. United Kingdom, British Small Animal Veterinary Association, 2004. pp. 5.

KAKABAKOS, S.E. y KHOSRAVI, M.J. Direct time-resolved fluorescence immunoassay of progesterone in serum involving the biotin-streptavidin system and the immobilized-antibody approach. Clin Chem, 38(5):725-30, 1992.

KHATUN, S., NARA, S., TRIPATHI, V., RANGARI, K., CHAUBE, S.K., KARIYA, K.K., KUMAR, S., SHRIVASTAV, T.G. Development of ELISA for Measurement of Progesterone Employing 17- α -OH-P-HRP as Enzyme Label. Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 30(2):186-196, 2009.

KOOISTRA, H.S. y OKKENS, A.C. Role of changes in the pulsatile secretion pattern of FSH in initiation of ovarian folliculogenesis in bitches. J Reprod Fertil, 57: 11–14, 2001.

KOOISTRA, H.S. y OKKENS, A.C. Secretion of growth hormone and prolactin during progression of the luteal phase in healthy dogs: a review. Molecular and Cellular Endocrinology, 197: 167- 172, 2002.

KOWALEWSKI, M.P., SCHULER, G., TAUBERT, A., ENGEL, E. y HOFFMANN, B. Expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the canine corpus luteum during diestrus. *Theriogenology* [en línea]. 2006^a, Vol. 66 [fecha de consulta: 28 de mayo 2012], pp. 1423–1430. Disponible en:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X06000276>>

KOWALEWSKI, M.P., MASON, J.I., HOWIE, A.F., MORLEY, S.D., SCHULER, G. y HOFFMAN, B. Characterization of the canine 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and its expression in the corpus luteum during diestrus. *Journal of Steroid Biochemistry &*

Molecular Biology [en línea]. 2006^b, Vol. 101 [fecha de consulta: 20 de Junio 2012], pp. 254-262. Disponible en:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076006002019>>

KOWALEWSKI, M.P y HOFFMAN, B. Molecular cloning and expression of StAR protein in the canine corpus luteum during dioestrus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 116(3):158-61, 2008.

KOWALEWSKI, M.P., MUTEMBEI, H. Y HOFFMANN, B. Canine prostaglandin E2 synthase (PGES) and its receptors (EP2 and EP4): Expression in the corpus luteum during dioestrus. *Animal Reproduction Science*, 109: 319–329, 2008.

KPL. *Technical guide for ELISA* [en línea]. Gaithersburg, Maryland, USA: KPL, inc, 2005 [fecha de consulta: 20 de mayo 2012]. Disponible en:

<<http://www.kpl.com/docs/techdocs/KPL%20ELISA%20Technical%20Guide.pdf>>

LEQUIN, R.M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry* [en línea]. 2005, Vol. 51, no. 12 [fecha de consulta: 20 de marzo 2012], pp. 2415-2418. Disponible en:

<<http://www.clinchem.org/content/51/12/2415.full.pdf+html>>

LUMSDEN, J.H. Laboratory test method validation. *Revue Méd. Vét.*, 151(7): 623-630, 2000.

LUVONI, G.C. y BECCAGLIA, M. The prediction of parturition date in canine pregnancy. *Reprod Domest Anim*, 41 (1): 27–32, Feb 2006.

MARCUS, G.J. y HACKETT, A.J. Use of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of bovine serum and milk progesterone without extraction. *J Dairy Sci*, 69(3):818-24, 1986.

MARINELLI, Lieta, ROTA, Ada, CARNIER, Paolo, DA DALT, Laura y GABAI, Gianfranco. Factors affecting progesterone production in corpora lutea from pregnant and diestrous bitches. *Animal Reproduction Science* [en línea]. 2009, Vol. 114 [fecha de consulta: 20 de Marzo 2012], pp. 289–300. Disponible en:

[http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/anirep/article/S0378-4320\(08\)00410-7](http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/anirep/article/S0378-4320(08)00410-7)

MARSELOO, N., FONTBONNE, A., BASSU, G., RIVIÈRE, S., LEBLANC, B., RAULT, D., BIOURGE, V. y CHASTANT-MAILLARD, S. Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in the bitch. En: International Symposium on Canine and Feline Reproduction (5th, 2004, São Paulo, Brazil). Proceedings of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. São Paulo, Brazil, SP: ISCFR, 2004.

MATAMOROS, R., GOMEZ, C. y ANDAUR, M. Hormonas de utilidad diagnóstica en Medicina Veterinaria. *Arch. med. vet.* [en línea]. 2002, Vol. 34, no. 2 [fecha de consulta: 20 de Marzo 2012], pp.167-182. Disponible en:

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2002000200003&lng=es&nrm=iso

MICHEL, E., SPÖRRI, M., OHLERTH, S. y REICHLER, I.M. Prediction of Parturition Date in the Bitch and Queen. *Reprod Dom Anim* [en línea]. 2011, Vol. 46 [fecha de consulta: 12 de abril 2012], pp. 926–932. Disponible en:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2011.01763.x/pdf>

MILLER, W.L. Molecular biology of steroid hormone synthesis, Endocr Rev., 9: 295–318, 1988.

MILLER, S., MORTON, M.S. y TURKES, A. Chemiluminescence immunoassay for progesterone in plasma incorporating acridinium ester labelled antigen. Ann Clin Biochem, 25:27-34, 1988.

MILLER, James y MILLER, Jane. Capítulo 5: Métodos de calibración en análisis instrumental: regresión y correlación. En su: Estadística y quimiometría para química analítica, cuarta edición. Madrid, España, Pearson Educación S.A., 2002. pp. 111-151.

MILLER, Walter L. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochimica et Biophysica Acta* [en línea]. 2007, Vol. 1771 [fecha de consulta: 06 de Agosto 2012], pp. 663–676. Disponible en: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388198107000431>>

MOL, J., VAN GARDEREN, E., RUTTEMAN, G.R. y RIJNBERK, A. New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary gland of dogs, cats and humans. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* [en línea]. 1996, Vol. 57 [fecha de consulta: 20 de mayo 2012], pp. 67–71. Disponible en: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0960076095002510>>

MORIYOSHI, M., NOZOKI, K., OHTAKI, T. Measurement of gestagen concentration in feces using a bovine milk progesterone quantitative test EIA kit and its application to early pregnancy diagnosis in the sow. *J Vet Med Sci*, 59:695–701, 1997.

MOXON, R., COPLEY, D. y ENGLAND, G. C. W. 2010. Technical and financial evaluation of assays for progesterone in canine practice in the UK. *Veterinary Record* [en línea]. 2010, Vol. 167 [fecha de consulta: 20 de mayo 2012], pp. 528-531. Disponible en: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/167/14/528.long>>

MUNRO, C. y STABENFELDT, G. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J. Endocrinol*, 101: 41–49, 1984.

NAGY, P., SOLTI, L., KULCSÁR, M., REICZIGEL, J., HUSZENICZA, G., ABAVÁRY, K., WÖLFLING, A. Progesterone determination in equine plasma using different immunoassays. Acta Vet Hung, 46(4):501-13, 1998.

NISHIYAMA, T., TSUMAGARI, S., ITO, M., KIMURA, J., WATANABE, G., TAYA, K. y TAKEISHI, M. Immunohistochemical study of steroidogenic enzymes in the ovary and placenta during pregnancy in the dog. Anat Histol Embryol, 28: 125–129, 1999.

OCHOA Azze, Rolando. Sistemas ELISA en ensayos clínicos de vacunas y estudios seroepidemiológicos. *Tesis (Doctorado en Ciencias Médicas)*. Ciudad de La Habana, Cuba, Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana, 2001.

OKKENS, A.C. y KOOISTRA, H.S. Anoestrus in the dog: a fascinating story. *Reprod. Domest. Anim.* [en línea]. 2006, Vol. 41 [fecha de consulta: 06 de junio 2012], pp. 291-296. Disponible en:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2006.00702.x/pdf>>

OMURA, T. Y MOROHASHI, K. Gene regulation of steroidogenesis. J Steroid Biochem Mol Biol, 53(1-6):19-25, Junio 1995.

ONCLIN y VERSTEGEN. Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant beagle bitches. J. Reprod. Fert., 51: 203-208, 1997.

PAYNE, Anita y HALES, Dale. Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. *Endocrine Reviews* [en línea]. 2004, Vol. 25, no. 6 [fecha de consulta: 08 de mayo 2012], pp. 947-970. Disponible en:

<<http://edrv.endojournals.org/content/25/6/947.full>>

PHEMISTER, R. D., HOIST, P. A., SPANO, J. S. y HOPWOOD, M. L. Time of ovulation in the Beagle bitch. *Biol. Reprod.* [en línea]. 1973, Vol. 8 [fecha de consulta: 15 de junio 2012], pp. 74-82. Disponible en: <http://www.biolreprod.org/content/8/1/74.full.pdf+html>

POST, Klaas, COOK, Susan, J. y RAWLINGS, Norman C. The evaluation of an enzyme immunoassay for the assessment of progesterone in canine plasma. Can Vet J, 31: 708-709, 1990.

PRAKASH, B.S., MEYER, H.H.D. y VAN DE WIEL, D.F.M. Sensitive enzyme immunoassay of progesterone in skim milk using second-antibody technique. Animal Reproduction Science, 16: 225-235, 1988.

RENTON, J.P., BOYD, J.S., ECKERSALL, P.D., FERGUSON, J.M., HARVEY, M.J., MULLANEY, J., et al. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). J Reprod Fertil, 93:221–31, 1991.

REYNAUD, K., FONTBONNE, A., MARSELOO, N., THOUMIRE, S., CHEBROUT, M., VIARIS DE LESEGNO, C. y CHASTANT-MAILLARD, S. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. Reproduction, 130: 193-201, 2005.

REYNAUD, Karine, FONTBONNE, Alain, MARSELOO, Noël, VIARIS DE LESEGNO, Christine, SAINT-DIZIER, Marie y CHASTANT-MAILLARD, Sylvie. In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: A review. Theriogenology, 66: 1685-1693, 2006.

ROMAGNOLI, S. E. Canine cryptorchidism. Vet. Clin. North Amer. Small Anim. Pract., 21: 533- 544, 1991.

ROMAGNOLI S. y CONCANNON P. W. Clinical use of progestins in bitches and queens: A review. *Recent Advances in Small Animal Reproduction* [en línea]. International Veterinary Information Service, Ithaca NY, 2003 [fecha de consulta: 20 de Marzo 2012]. Disponible en:

<<http://www.ivis.org/newsletter/archives/Nov05/nov2105.htm>>

ROOT KUSTRITZ, M.V. Uso de kits comerciales para ensayos de hormona luteinizante y de progesterona en el manejo reproductivo canino. *Recent Advances in Small Animal* [en línea]. International Veterinary Information Service (www.ivis.org). Ithaca, New York, USA, 2001 [fecha de consulta: 20 de Marzo 2012]. Disponible en:

<http://www.ivis.org/advances/Concannon/root2_es/IVIS.pdf>

ROOT KUSTRITZ, M.V. Managing the Reproductive Cycle in the Bitch. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* [en línea]. 2012, vol. 42, no.3 [fecha de consulta: 20 de mayo 2012], pp. 423–437. Disponible en:

< [http://www.vetsmall.theclinics.com/article/S0195-5616\(12\)00013-7](http://www.vetsmall.theclinics.com/article/S0195-5616(12)00013-7)>

SEEGER, K., THUROW, H., HAEDE, W. y KNAPP, E. An enzyme immunoassay (EIA) for progesterone in horse plasma. *J. Immunol Methods*, 28: 211-217, 1979.

SEKI, M., YAMAZAKI, Y., WATANABE, N., ISHII, K., KINOSHITA, Y., AIHARA, T., TAKEIRI, S., OTOI, T. Prediction of the optimal day of mating in the bitch using a bovine plasma progesterone ELISA kit. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(1): 201–201, 2007.

SHRIVASTAV, T.G., CHAUBE, S.K., CHARU, RANGARI, K., KARIYA, K.P., SINGH, R. y NAGENDRA, A. Enzyme linked immunosorbent assay for milk progesterone. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 31(4): 301-313, 2010.

SONGSASEN N. y WILDT D.E. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. Anim Reprod Sci, 98(1-2):2–22, Marzo 2007.

SONNACK, M. Untersuchungen zur Bildung, Regression und Funktionalität des Corpus Luteum der nicht graviden Hündin, morphologische und biochemische Aspekte. Diss med vet, Justus-Liebig-Universität Gießen, 2009.

STIMSON, W. H. y SINCLAIR, J. M. An immunoassay for a pregnancy associated alpha-macroglobulin using antibody enzyme conjugates. FEBS Letters, 47: 190-192, 1974.

STOVRING, M., MOE, L. y GLATTRE, E. A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate. APMIS, 105: 590–596, 1997.

TANI, H., INABA, T., TAMADA, H., SAWADA, T., MORI, J. y TORII, R. Increasing gonadotropin-releasing hormone release by perfused hypothalamus from early to late anestrus in the beagle bitch. Neurosci. Lett, 207: 1–4, 1996.

THERMO SCIENTIFIC PIERCE. *ELISA technical guide and protocols* [en línea]. Thermo Fisher Scientific Inc., 2010 [fecha de consulta: 20 de Marzo 2012]. Disponible en: <<http://www.piercenet.com/files/TR0065-ELISA-guide.pdf>>

THERMO SCIENTIFIC PIERCE. *Overview of ELISA* [en línea]. Thermo Fisher Scientific Inc., 2012 [fecha de consulta: 20 de Marzo 2012]. Disponible en: <<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=F88ADEC9-1B43-4585-922E-836FE09D8403>>

THURÓCZY, J., WÖLFLING, A., TIBOLD, A., BALOGH, L., JÁNOKI, G. y SOLTÍ, L. Effect of anticoagulants and sampling time on results of progesterone determination

in canine blood samples. *Reproduction in Domestic Animals* [en línea]. 2003, Vol. 38, no. 5 [fecha de consulta: 20 de Marzo 2012] pp. 386-389. Disponible en:
< <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-0531.2003.00450.x/full>>

TSUITSUI, T. Studies on the reproduction in the dog. V. On cleavage and transport of fertilized ova in the oviduct. *Jpn J Anim Reprod*, 21:70-75, 1975.

VAN DE WIEL, D.F.M. y KOOPS, W. Development and validation of an enzyme immunoassay for progesterone in bovine milk or blood plasma. *Animal Reproduction Science* [en línea]. 1986, Vol.10, no. 3 [fecha de consulta: 20 de Marzo 2012] pp. 201-213. Disponible en:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037843208690031X>>

VAN HELL, H., BOSCH, A. M. G., BRANDS, J. A. M., VAN WEEMEN, B. K. y SCHUURS, A. H. W. M. Pregnancy monitoring with enzyme-immunoassays for human placental lactogen and total oestrogens. *Z. Analyt. Chem.*, 279: 143, 1976.

VAN WEEMEN, B. K. y SCHUURS, A. H. W. M. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters*, 15: 232-236, 1971.

VAN WEEMEN, B. K. y SCHUURS, A. H. W. M. Immunoassay using Hapten-enzyme conjugates. *FEBS Letters*, 24: 77-81, 1972.

VAN WEEMEN, B. K. y SCHUURS, A. H. W. M. Immunoassay using antibody-enzyme conjugates. *FEBS Letters*, 43: 215-218, 1974.

VAN WEEMEN, B. K. y SCHUURS, A. H. W. M. The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme labelled oestrogen on the characteristics of oestrogen enzyme immunoassays. *Immunochemistry*, 12: 667, 1975.

VERMEULEN, M. A. E. Ovarian Color-Doppler Ultrasonography to Predict Ovulation in the Bitch. *Tesis (Médico Veterinario)*. Louisiana State University, Abril 2009.

VERSTEGEN-ONCLIN, K. y VERSTEGEN, J. Endocrinology of pregnancy in the dog: A review. *Theriogenology*, 70: 291-299, 2008.

VERVERIDIS, H.N., BOSCO, C.M., STEFANAKIS, A. y KRAMBOVITIS, E. Use of enzymeimmunoassay for oestradiol-17beta and progesterone quantification in canine serum. *Animal Reproduction Science* [en línea]. 2002, vol. 69, no. 1-2 [fecha de consulta: 20 de Marzo 2012], pp. 53–64. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432001001713>

VOLLER, A., BARTLETT, A. y BIDWELL D.E. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of Clinical Pathology* [en línea]. 1978, vol. 31, no. 6 [fecha de consulta: 28 de Marzo 2012], pp. 507-520. Disponible en: <http://jcp.bmj.com/content/31/6/507.full.pdf>

WALLACE, S.S., MAHAFFEY, M.B., MILLER, D.M., THOMPSON, F.N. y CHAKRABORTY, P.K. Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the estrous cycle. *Am Journal Vet. Res*, 53(2): 209-215, 1992.

WILDT, D.E., CHAKRABORTY, P. K., PANKO, W. B. y SEAGER, S. W. J. Relationship of Reproductive Behavior, Serum Luteinizing Hormone and Time of Ovulation in the Bitch. *Biology of Reproduction*, 18: 561-570, 1978.

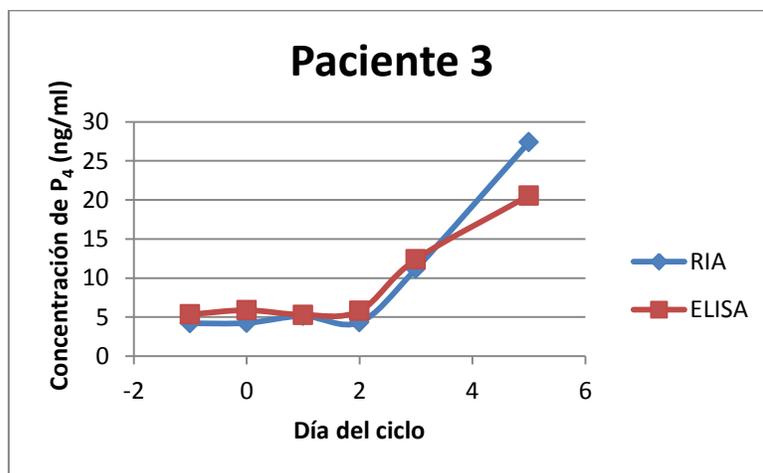
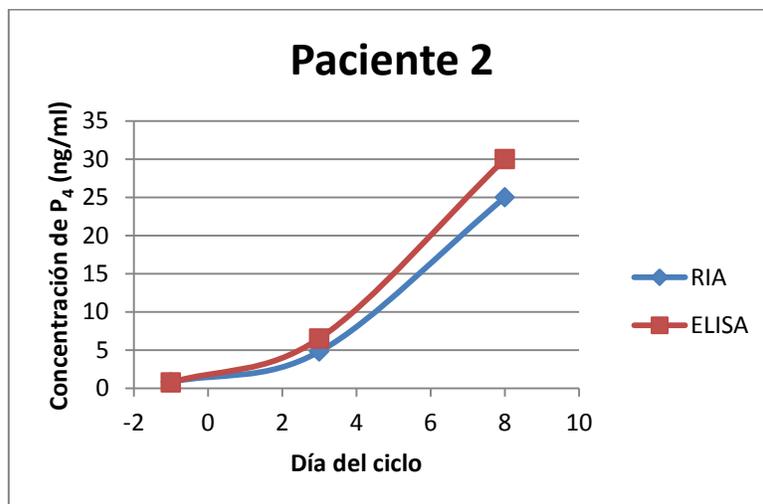
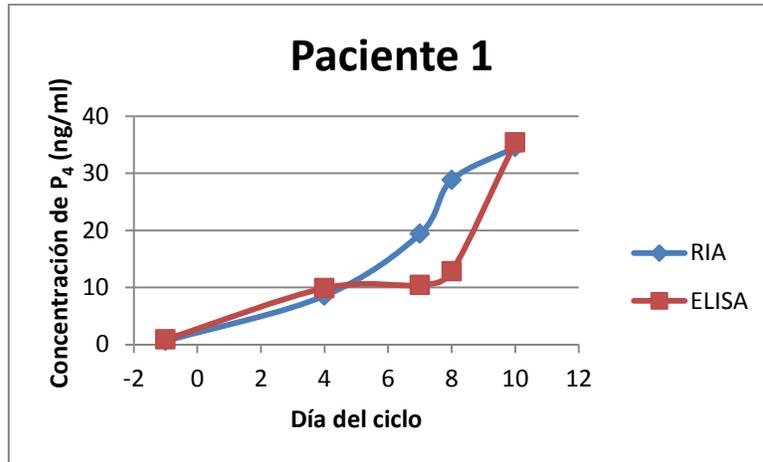
WILDT, D. E., PANKO, W. B., CHAKRABORTY, P. K. y SEAGER, S. W. Relationship of serum estrone, estradiol-17beta and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch. *Biol. Reprod*, 20: 648–658, 1979.

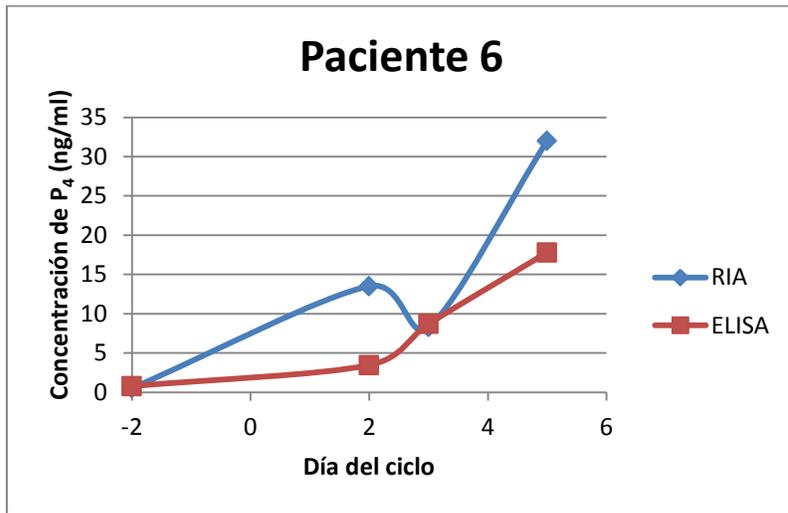
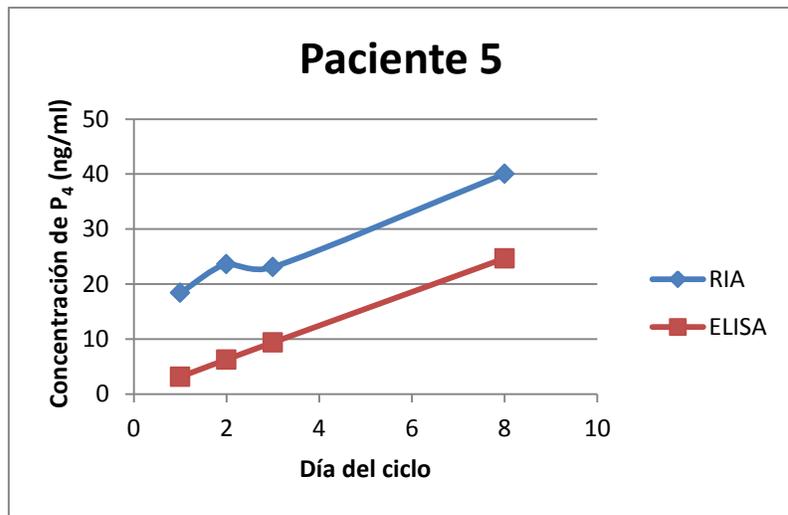
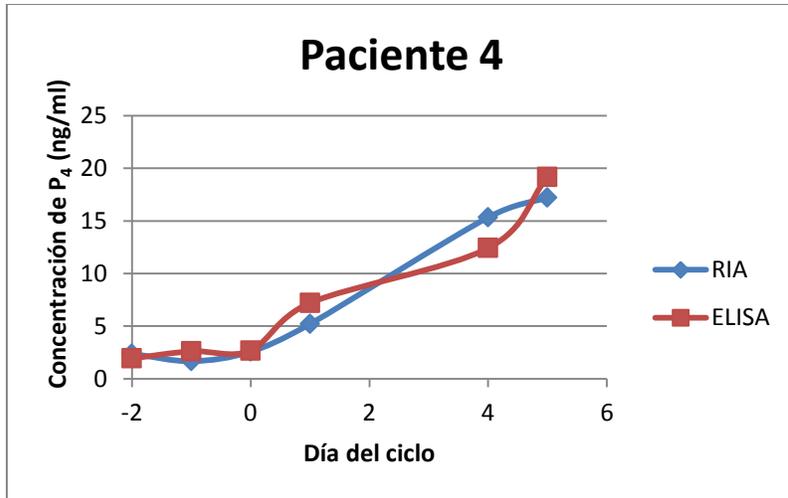
YAMADA, S., SHIMAZU, Y., KAWANO, Y., NAKAZAWA, M. y TOYADA, Y. In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. J Reprod Ferti, 47:227–9, 1993.

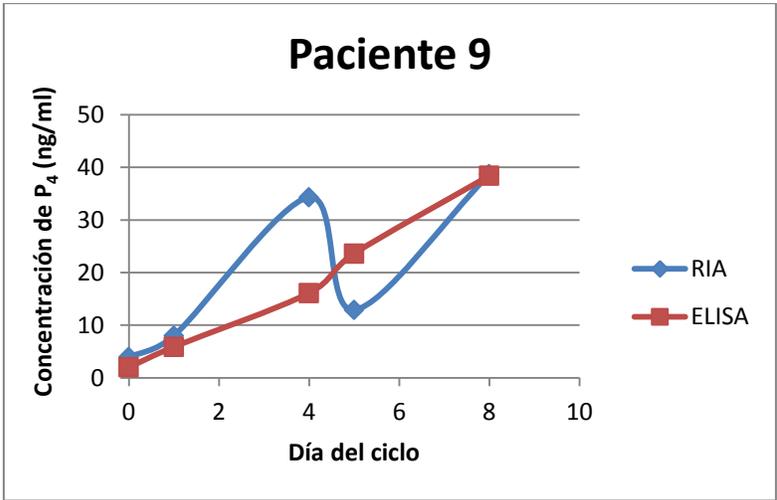
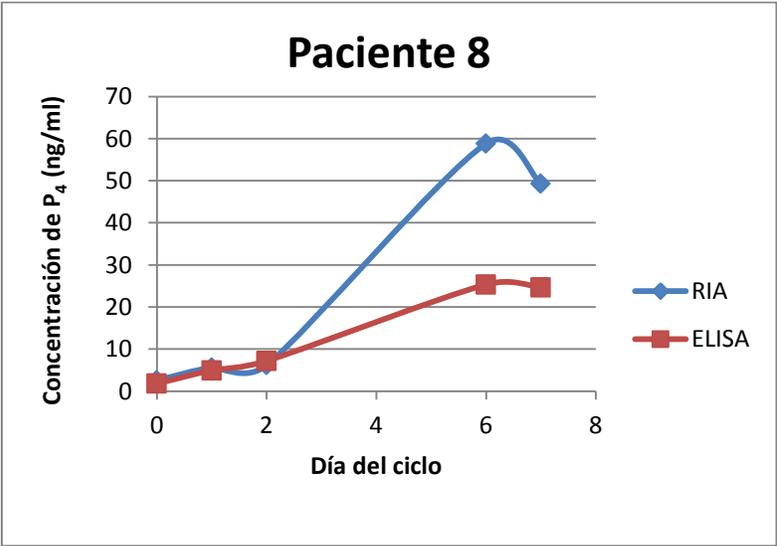
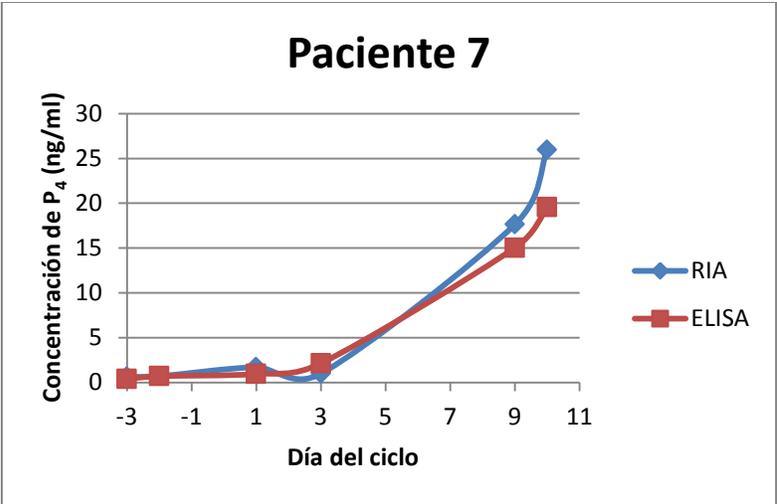
YORDE, D. E., SASSE, E. A., WANG, T. Y., HUSSA, R. O. y GARANCIS, J. C. Competitive enzyme linked immunoassay with use of soluble enzyme/antibody immune complexes for labelling. I. Measurement of human choriogonadotropin. Clin. Chem., 22: 1372-1377, 1976.

9. ANEXOS

Anexo nº 1: Concentraciones de P_4 determinadas por RIA y ELISA en 9 pacientes durante proestro y estro.







Anexo nº 2: Evaluación de concentraciones de P₄ determinadas por RIA y ELISA semicuantitativo y cuantitativo, citología vaginal de 9 pacientes durante proestro y estro.

Paciente 1					
Muestra	Día del ciclo(1)	Concentraciones de Progesterona (ng/ml)			Citología vaginal
		RIA	ELISA cuantitativo	ELISA semicuantitativo	
25-08-2011	-1	0,60	0,9	<1	Predominancia de células intermedias
30-08-2011	4	8,55	9,89	2,5-8	80% de células superficiales
02-09-2011	7	19,37	10,45	>8	más del 90% de células anucleadas
03-09-2011	8	28,81	12,85	>8	más del 90% de células anucleadas
05-09-2011	10	34,54	35,39	>8	más del 90% de células anucleadas

Paciente 2					
Muestra	Día del ciclo(1)	Concentraciones de Progesterona (ng/ml)			Citología vaginal
		RIA	ELISA cuantitativo	ELISA semicuantitativo	
02-09-2011	-1	0,82	0,75	<1	más del 80% de células superficiales
07-09-2011	3	4,80	6,52	2,5-8	más del 80% de células superficiales
12-09-2011	8	24,99	30	>8	más del 90% de células anucleadas

Paciente 3					
Muestra	Día del ciclo(1)	Concentraciones de Progesterona (ng/ml)			Citología vaginal
		RIA	ELISA cuantitativo	ELISA semicuantitativo	
26-03-2012	0	4,20	5,34	2,5-8	más del 80% de células superficiales
27-03-2012	1	4,25	5,88	2,5-8	más del 90% de células anucleadas
28-03-2012	2	5,14	5,29	2,5-8	más del 90% de células anucleadas
29-03-2012	3	4,33	5,8	2,5-8	más del 90% de células anucleadas
30-03-2012	4	11,19	12,4	>8	Células anucleadas y superficiales
02-04-2012	5	27,38	20,55	>8	Células superficiales en su mayoría.

Paciente 4					
Muestra	Día del ciclo(1)	Concentraciones de Progesterona (ng/ml)			Citología vaginal
		RIA	ELISA cuantitativo	ELISA semicuantitativo	
10-04-2012	-2	2,37	1,94	2,5-8	50% células intermedias y 50% superficiales
11-04-2012	-1	1,67	2,61	2,5-8	células intermedias y abundantes superficiales
12-04-2012	0	2,57	2,67	2,5-8	células intermedias y abundantes superficiales
13-0-2012	1	5,21	7,20	2,5-8	>90% de células superficiales
16-04-2012	4	15,33	12,42	2,5-8	>90% de células superficiales
17-04-2012	5	17,22	19,18	>8	células superficiales en su mayoría, algunas intermedias

Paciente 5					
Muestra	Día del ciclo(1)	Concentraciones de Progesterona (ng/ml)			Citología vaginal
		RIA	ELISA cuantitativo	ELISA semicuantitativo	
11-07-2012	1	18,38	3,11	2,5-8	50% células intermedias y 50% superficiales
12-07-2012	2	23,64	6,27	2,5-8	>90% de células superficiales
13-07-2012	3	23,07	9,37	>8	>90% de células superficiales
18-07-2012	8	40,04	24,67	>8	>90% de células anucleadas

Paciente 6					
Muestra	Día del ciclo(1)	Concentraciones de Progesterona (ng/ml)			Citología vaginal
		RIA	ELISA cuantitativo	ELISA semicuantitativo	
19-07-2012	-2	0,51	0,77	<1	>90% de células superficiales
23-07-2012	2	13,51	3,46	2,5-8	>90% de células superficiales
24-07-2012	3	8,29	8,70	2,5-8	>90% de células superficiales
26-07-2012	5	32,02	17,80	>8	>90% de células superficiales

Paciente 7					
Muestra	Día del ciclo(1)	Concentraciones de Progesterona (ng/ml)			Citología vaginal
		RIA	ELISA cuantitativo	ELISA semicuantitativo	
19-07-2012	-3	0,65	0,42	<1	50% células intermedias y 50% superficiales
20-07-2012	-2	0,72	0,72	<1	Células superficiales en su mayoría
23-07-2012	1	1,72	0,97	1-2,5	-
25-07-2012	3	1,01	2,15	2,5-8	Células superficiales en su mayoría, algunas intermedias.
31-07-2012	9	17,66	15,05	>8	-
01-08-2012	10	25,97	19,58	>8	>90% de células anucleadas

Paciente 8					
Muestra	Día del ciclo(1)	Concentraciones de Progesterona (ng/ml)			Citología vaginal
		RIA	ELISA cuantitativo	ELISA semicuantitativo	
21-08-2012	0	2,57	1,80	1-2,5	Células superficiales en su mayoría, pocas intermedias
22-08-2012	1	5,60	4,95	2,5-8	>90% superficiales y anucleadas
23-08-2012	2	6,19	7,20	2,5-8	>90% superficiales y anucleadas
27-08-2012	6	58,84	25,34	>8	-
28-08-2012	7	49,26	24,67	>8	-

Paciente 9					
Muestra	Día del ciclo(1)	Concentraciones de Progesterona (ng/ml)			Citología vaginal
		RIA	ELISA cuantitativo	ELISA semicuantitativo	
23-08-2012	0	3,95	2,00	1-2,5	Células intermedias en su mayoría
24-08-2012	1	8,01	5,90	1-2,5	Células intermedias en su mayoría
27-08-2012	4	34,32	16,12	2,5-8	50% células intermedias y 50% superficiales
28-08-2012	5	12,91	23,60	>8	-
31-08-2012	8	38,71	38,41	>8	-