

CASOS CLÍNICOS



Infertilidad en una perra con historia de falla reproductiva recurrente asociada con tumor de células de la granulosa



María S González D^{1,2}, Zoot, MV; Liliana Fernández³, MVZ; Sandra Saldarriaga³, MVZ; Diego Aranzazu⁴, MV, Esp.; Juan G Maldonado E^{2,4}, MVZ, PhD.

¹Universidad CES, y ²Mediservet Ltd; ³Práctica clínica privada; ⁴Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias (Centauro), Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
juanguimal@agronica.udea.edu.co

(Recibido: 13 junio, 2005; aceptado: 31 agosto, 2005)

Resumen

Una perra de la raza Bulldog fue atendida a los 3 años y 7 meses de edad con la siguiente historia clínica: primer celo a los 17 meses de edad y celos sucesivos en lapsos regulares cada 6 meses, fue inseminada con semen de un macho fértil, con base en el seguimiento por citología o la cuantificación de niveles séricos de progesterona, pero en ninguna ocasión quedó gestante (ecografía negativa entre los días 32 y 36 post-inseminación). Al día 6° del inicio del proestro del quinto celo se hizo examen ecográfico, se halló un quiste de 15 mm de diámetro y engrosamiento del endometrio. La perra fue sometida a laparotomía exploratoria, donde se halló hiperplasia bilateral de la mucosa de las fimbrias (de 10 mm de espesor, aproximadamente), aumento del diámetro de los oviductos y del cuello uterino, estructuras de 6 a 15 mm de diámetro que semejaban folículos en ambos oviductos, algunos translúcidos, unos de aspecto hemorrágico y otros de aspecto blanquecino. En los ovarios se hallaron estructuras compatibles con quistes, una de ellas la que se observó en la ecografía. En la mucosa uterina se hallaron múltiples quistes de 2 a 5 mm de diámetro. Se encontró esplenomegalia de la porción craneal y fibrosis de la porción caudal del bazo. La histopatología reveló una hiperplasia de las glándulas endometriales, engrosamiento de la mucosa del oviducto, salpingitis aguda y aumento de tejido graso de aspecto hemorrágico en el oviducto; en ambos ovarios se hallaron focos múltiples de tumores de células de la granulosa en patrón de células de empalizada (Sertoli) y quístico. En el bazo se halló esplenitis supurativa aguda y esclerosiderosis, un hallazgo compatible con hemorragias esplénicas debidas a estímulo estrogénico persistente. Los hallazgos se discuten en el contexto de una respuesta hiperestrogénica asociada con el tumor de las células de la granulosa y su posible relación con la historia de infertilidad en los celos anteriores. De conformidad con la información disponible en nuestro medio, el presente es el primer reporte en Colombia sobre tumor bilateral de células de la granulosa en perras.

Palabras clave: citología, endometrial, fimbrias, hiperplasia, infertilidad, patrón de Sertoli, quistes.

Introducción

En la literatura científica internacional es abundante la información sobre la incidencia y la etiopatogenia de muchas de las patologías ováricas asociadas con infertilidad en especies de animales domésticos como los bovinos (9, 12,

32), los equinos (20, 33), y los porcinos (5, 6). Por el contrario, es muy escasa la información disponible sobre las patologías del desarrollo folicular en la perra, así como la relación entre las patologías ováricas y la infertilidad (34).

El desarrollo creciente de las técnicas de reproducción asistida en caninos y la disponibilidad de medios diagnósticos como la citología vaginal (37, 39), las mediciones hormonales en suero (13, 21, 36) y la ultrasonografía (3, 14, 17), han conllevado un cambio importante en la disponibilidad de herramientas diagnósticas para identificar patologías reproductivas que anteriormente pasaban desapercibidas o eran subdiagnosticadas.

En los últimos años se ha notado un desarrollo importante de las técnicas de reproducción asistida para los criadores de perros, así como la biotecnología reproductiva, donde se dispone de protocolos para la maduración *in vitro* de oocitos (19, 28), la fertilización *in vitro* y el desarrollo *in vitro* de embriones caninos (23, 26). Por lo tanto, el conocimiento de las patologías ováricas y sus posibles mecanismos etiopatogénicos asociados, es un área de creciente interés, debido a la importancia clínica para el veterinario de pequeñas especies animales que atiende los casos individuales en su consulta particular o en la asesoría reproductiva a los criadores, o para aquellos especialistas interesados en el desarrollo de las técnicas de reproducción asistida y biotecnologías reproductivas.

En Colombia no se tiene una estadística clara de la frecuencia de tumores ováricos en perras a pesar de su presentación en la práctica veterinaria de rutina. Los tumores ováricos más frecuentes informados en la literatura son los tumores de células epiteliales (adenomas, cistadenomas), los tumores del estroma gonadal (entre ellos de células de la granulosa), y los tumores de células germinales o disgerminomas (15, 23, 25, 30).

En el presente trabajo se informa de un caso de tumor de células de la granulosa en un patrón combinado de células de Sertoli y quístico, concomitante con otros hallazgos relacionados con un posible hiperestrogenismo causado por el tumor, en una perra de la raza bulldog con una historia de cuatro intentos previos de monta en sus respectivos celos, sin lograr la gestación en ninguno de ellos.

Evaluación del paciente

Reseña reproductiva

Perra de la raza Bulldog, de tres años y siete meses de edad, nacida en diciembre 23 de 2000, que se atendió por historia de infertilidad previa, en julio de 2004;

clínicamente sana, con bajo peso para el estándar de la raza (18 kg), con manifestaciones clínicas compatibles con proestro/estro. La perra presentó la historia reproductiva siguiente:

Primer celo: la perra lo presentó a los 17 meses de edad (mayo de 2002), cuando fue inseminada con semen proveniente de un macho fértil (confirmado porque dos hembras inseminadas contemporáneamente quedaron gestantes), durante los días 10, 12 y 14 del inicio del proestro, conforme al resultado de la citología vaginal. La perra no quedó gestante (ecografía negativa a los 32 días después de la inseminación).

Segundo celo: la perra lo presentó a los 6 meses del primero (noviembre de 2002), fue inseminada con semen del mismo macho anterior, conforme al protocolo de rutina basado en el resultado de la citología vaginal y tampoco quedó gestante (ecografía negativa a los 32 días post inseminación).

Tercer celo: durante el tercer celo (mayo de 2003), se realizó prueba de progesterona al cuarto día del inicio del celo (concentración = 3.8 ng/ml) y citología; cuatro días después se le repitió la prueba de progesterona (concentración = 25.5 ng/ml), con citología que indicó día de la monta a partir del día 9° del inicio del proestro; se inseminó durante cuatro días consecutivos a partir del día ocho, pero tampoco quedó gestante (ecografía negativa a los 30 días post inseminación).

Cuarto celo: durante el cuarto celo (diciembre de 2003) a la perra se le cuantificó progesterona al segundo día del inicio del proestro (concentración = 1.71 ng/ml), se inició inseminación día de por medio, desde el día tres hasta el día 14 del inicio del proestro, con mediciones de progesterona al 5° (concentración = 2.31 ng/ml), 7° (concentración = 2.70 ng/ml), 9° (concentración = 4.71 ng/ml) y 12° (concentración = 12.5 ng/ml) días del inicio del proestro; el resultado de la citología fue consecuente con los hallazgos hormonales. Tampoco durante este ciclo la perra quedó gestante (ecografía a los 36 días).

Hallazgos clínicos y seguimiento reproductivo

Para el quinto celo se programó examen ecográfico a los 6 días del inicio del proestro, cuando la citología indicó hallazgos compatibles con el proestro. El examen

se practicó mediante ultrasonografía transabdominal (ecógrafo Pie-medical con sonda de 5mHz). En el examen se observaron estructuras hipocogénicas de diámetro diverso en ambos ovarios, que a criterio de los veterinarios fueron considerados de gran tamaño para la talla de la perra y como tal se diagnosticaron como quistes foliculares (véase Figura 1); en el endometrio se halló un engrosamiento ecográfico de

la mucosa (resultados no presentados). Además, se observó una imagen de ecogenicidad intermedia en el ovario izquierdo, cuya relación con una estructura abdominal no se pudo precisar (véase Figura 1-A). La vulva presentó un tamaño exagerado (véase Figura 2-A) y en el cérvix se halló un engrosamiento mayor de lo normal (véase Figura 2-B), que hacía ver su extremo vaginal en forma de hocico de tenca.

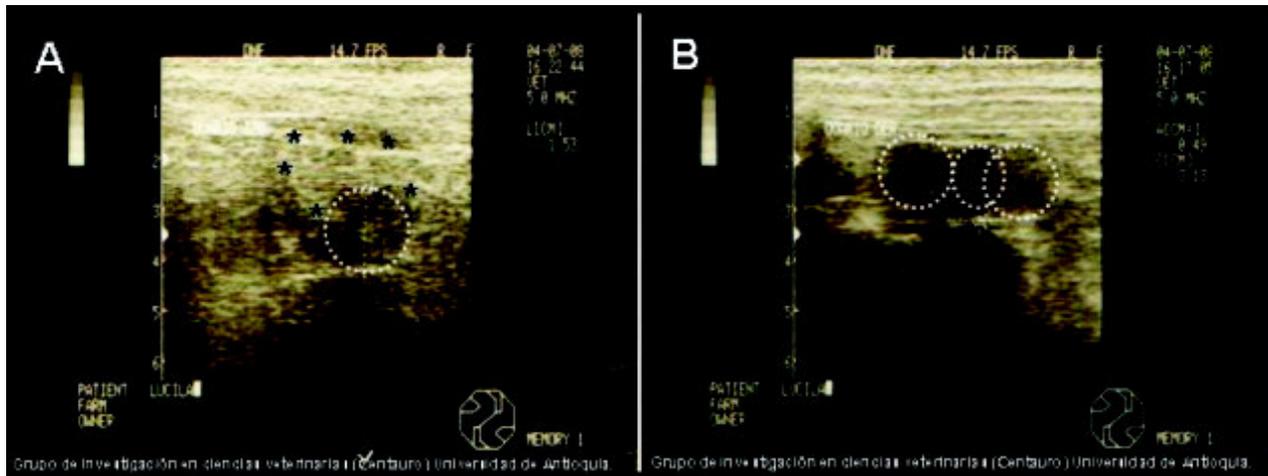


Figura 1. Hallazgos ecográficos al día 6° del inicio del proestro del quinto ciclo. En el ovario izquierdo (A) se observa una estructura quística de 15.3 mm (círculo punteado) y una estructura no identificada en forma de bastón acostado (asteriscos). En el ovario derecho (B) se observan tres quistes (10 a 15 mm de diámetro), de aspecto hipocogénico (círculos punteados) con un folículo central de 4.9 mm, correspondientes a las estructuras quísticas halladas en la respectiva trompa uterina.

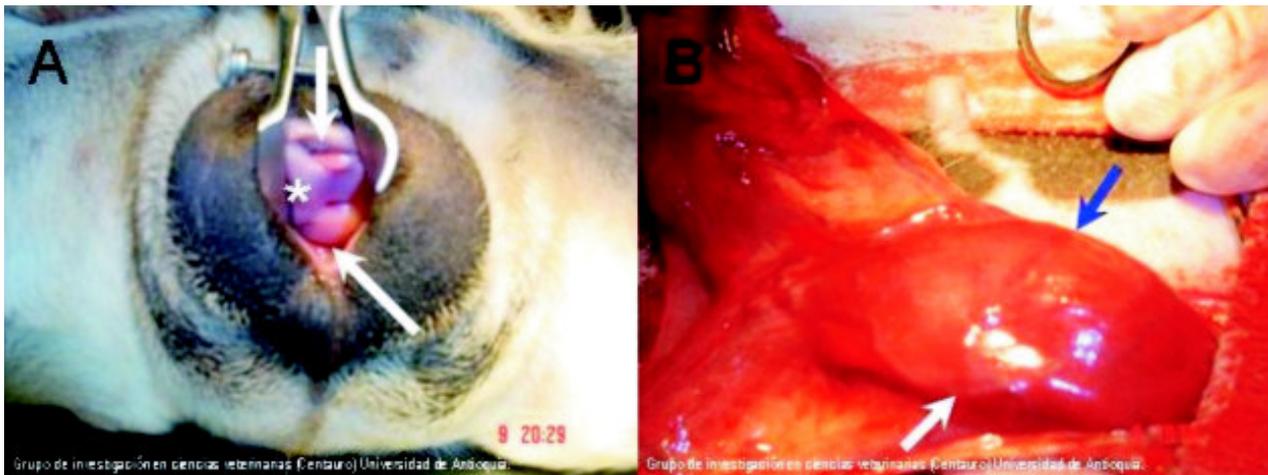


Figura 2. Hallazgos clínicos en: (A) vulva, Se observa aumento notorio de los labios vulvares, cervix aumentado de tamaño protruido hacia la vagina (*) imitando el hocico de tenca (flechas); y (B) cérvix, se observa aumento exagerado (flechas). B; fotografía tomada *in situ*, previo a la extirpación quirúrgica.

Hallazgos durante la laparotomía exploratoria. La perra se sometió al procedimiento de laparotomía exploratoria por la técnica de aproximación ventral, utilizando el esquema de premedicación con sulfato de atropina (0.025 mg/kg s.c.), acepromacina maleato (0.03 mg/kg i.v.), y anestesia con tiletamina-zolacepam

(5 mg/kg i.v.). En el abordaje al útero se halló un engrosamiento de los oviductos y las fimbrias: la mucosa de la fimbria derecha de aspecto congestionado, de aproximadamente 10 mm de grosor (véase Figura 3-A); la mucosa de la fimbria izquierda de aspecto hemorrágico, de aproximadamente 12 mm

de espesor; en ambos casos, el engrosamiento de la mucosa daba la impresión de impedir por completo su adosamiento a la superficie del ovario (véase Figura 3-C). En los oviductos se observó engrosamiento de su diámetro y se hallaron estructuras de diferente diámetro similares a folículos, algunos de aspecto transparente, hemorrágico o blanquecino (véase Figura 3-C).



Figura 3. Hallazgos en: epitelio de las fimbrias (A), se observa aumento de tamaño y hemorragia marcada en fimbria izquierda (flechas); oviducto (B), donde se observa aumento del diámetro y una estructura similar a un quiste (flecha); y (C), quistes múltiples en la trompa uterina izquierda, de aspecto blanquecino y sanguinolento (flechas), con evidencia del agrandamiento de la fimbria (asterisco). A, B: fotografía intraoperatoria; C: fotografías tomada *ex situ*, fuera de la sala operatoria.

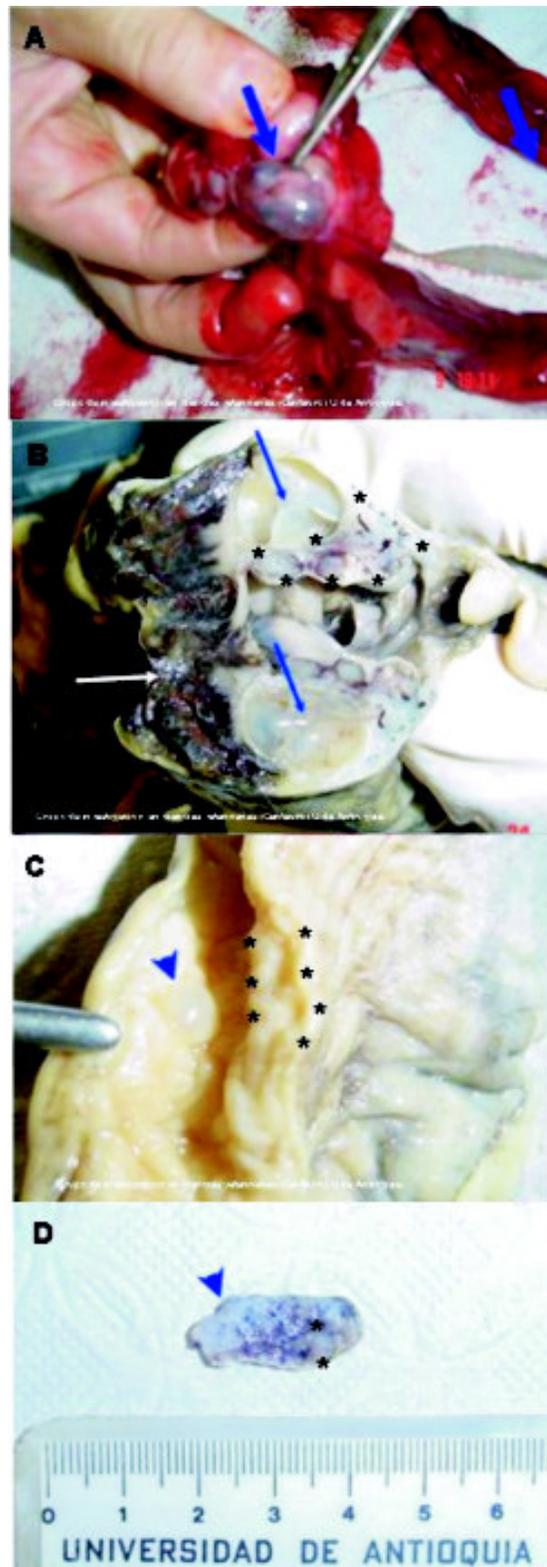


Figura 4. Estructuras quísticas (A) presentes en el oviducto (flechas); B, se observa una estructura quística en el ovario izquierdo con septos conectivos en su interior y otras estructuras quísticas de aspecto hemorrágico (flecha blanca) y los límites del estroma ovárico (asteriscos); C, engrosamiento en la pared del cuerno uterino (asteriscos) y quiste endometrial de 4 mm de diámetro (cabeza de flecha); D, estroma del ovario derecho en donde se observan estructuras quísticas menor tamaño en el estroma.

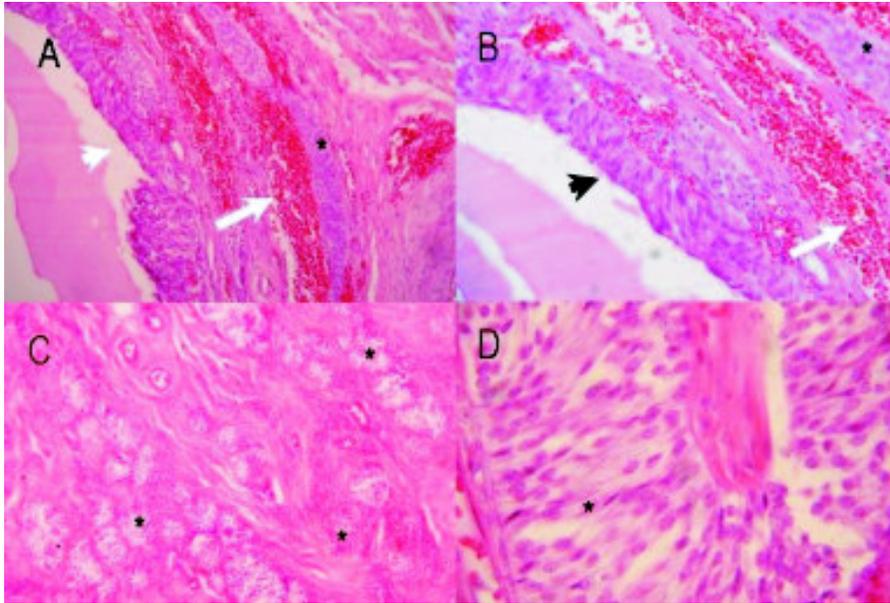


Figura 5. Hallazgos histopatológicos en ovarios. A, tumor de células de la granulosa patrón Sertoli (asterisco) y quiste (flecha), donde se observa la pared del quiste (cabeza de flecha); B, aumento en donde se aprecia la hemorragia del estroma (flecha) y una mayor definición de la pared del quiste revestido por células neoplásicas (cabeza de flecha); C, se observan islotes de células neoplásicas en el estroma ovárico (asteriscos); D, patrón de Sertoli característico con la disposición en empalizada de sus células. A,B, ovario izquierdo; C, D, ovario derecho.

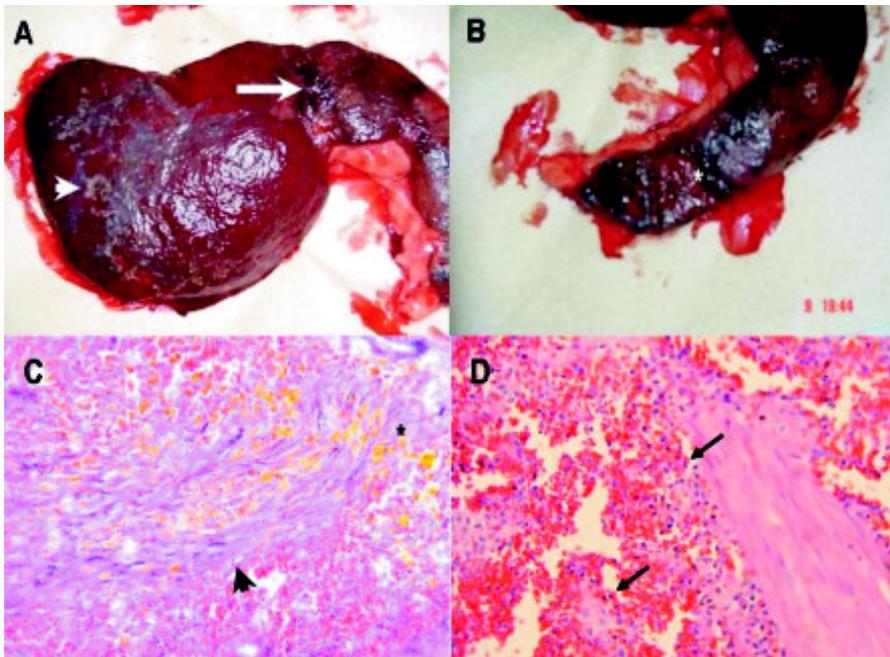


Figura 6. Bazo: A, aumento del tamaño del segmento craneal con estrangulamiento (flecha) y placas blanquecinas (cabeza de flecha); B, segmento caudal del bazo con zonas de infarto hemorrágico (asterisco); C, detalle histológico de los focos blanco-amarillentos de la imagen en A, correspondientes a los cuerpos de Gamma-Gandi; tejido conectivo (cabeza de flecha) y pigmentos de hierro (asterisco); D, presencia de neutrófilos en pulpa roja (flecha), próximos a una trabécula esplénica.

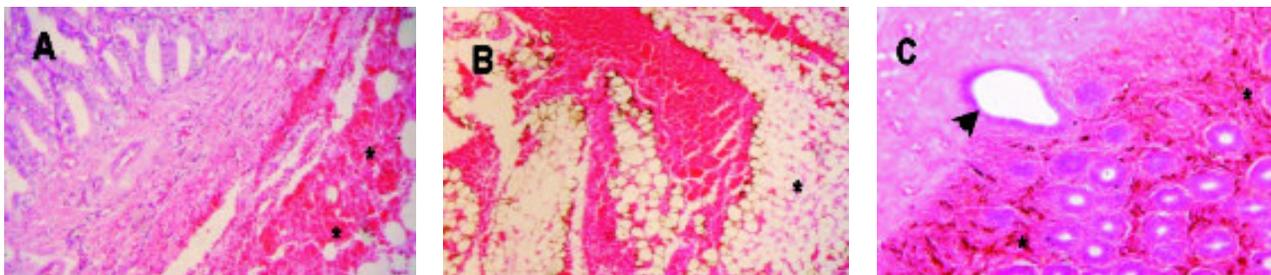


Figura 7. A, trompa uterina en donde se observa la hemorragia de la túnica muscular y la serosa (asterisco); B, detalle de la serosa de la trompa uterina hemorrágica con presencia abundante de tejido adiposo (asterisco); C, mucosa uterina con dilatación quística glandular (cabeza de flecha) y hemorragia del tejido conectivo de la mucosa (asteriscos).

Enfoque de tratamiento

Hallazgos macroscópicos en el útero. Después de la ovariectomía se procedió a incidir los cuernos uterinos *ex situ*, donde se halló un engrosamiento de la mucosa endometrial con presencia de pequeños quistes de 3 a 5 mm de diámetro, de aspecto transparente, hallazgo compatible con una hiperplasia quística endometrial de grado 1 (10, 11). Además, el cérvix se halló con un tamaño aumentado para la talla de la perra (véase Figura 2-B). Al hacer los cortes en las muestras induradas en formalina, se hallaron en los oviductos estructuras redondas de 10 a 16 mm de diámetro, unas de aspecto translúcido, otras de aspecto hemorrágico y una última de aspecto blanquecino (véase Figura 6-A), las cuales se habían confundido inicialmente con quistes ováricos, pero al realizar los cortes para los análisis histopatológicos se constató que se trataba de estructuras del oviducto (véase Figura 6-B).

Hallazgos macroscópicos en los ovarios. En el ovario derecho se halló una estructura quística de 15 mm de diámetro aproximadamente; al ser incidido en un corte sagital, se observó una estructura quística con septo que subdividía el quiste en tres compartimentos, y otros quistes de aspecto hemorrágico hacia el borde libre del ovario (véase Figura 6-C); en el ovario izquierdo se hallaron estructuras similares pero de diámetro menor de 4 mm (véase Figura 6-D).

Hallazgos histopatológicos. Para el estudio histopatológico se tomaron muestras de cuernos uterinos, oviducto, ovarios y bazo, se fijaron en formalina y se procesaron por el procedimiento de rutina para histopatología con tinción con hematoxilina-eosina, en el laboratorio de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia, con los hallazgos siguientes:

1. *Útero.* La mucosa uterina presentó hiperplasia leve a moderada, tanto en el epitelio de revestimiento como en las glándulas endometriales superficiales, con estratificación epitelial y en ocasiones dilatación glandular, y hemorragia severa en el tercio interno del endometrio adyacente (véase Figura 7-A). En el tercio medio del cuerno izquierdo se hallaron estructuras similares, con hemorragia del endometrio superficial e hiperplasia glandular leve (véase Figura 7-B). Además, se hallaron dilataciones quísticas amplias de estructuras glandulares y hemorragia severa y difusa del perimetrio (véase Figura 7-C).
2. *Masa oscura compatible con estructura folicular tomada del oviducto.* El tejido evaluado presentó las características del tejido adiposo blanco, donde esporádicamente se observaron estructuras vasculares arteriales y venosas de mediano calibre, hemorragias severas multifocales con abundante fibrina y hemosiderina, sin evidencia de reacción inflamatoria tisular (véase Figura 7-D).
3. *Trompa uterina.* En los sitios donde hubo buena fijación, se observaron focos esporádicos de hemorragias en los pliegues conectivos de la mucosa (véase Figura 7-E). El tejido adiposo asociado a la serosa (mesosalpinx), presentó hemorragias multifocales severas (véase Figura 7-F).
4. *Ovario derecho.* Se hallaron hemorragias estromales severas. Con frecuencia se observaron islotes bien delimitados de células de la granulosa en patrón de empalizada o patrón de Sertoli; de igual manera, en pequeños agregados sólidos donde los núcleos de las células se orientaban en forma desordenada (véase Figura 7-G). Las células presentaron citoplasmas claros, amplios, con núcleos ovales o redondeados, nucléolo prominente y cromatina fina y dispersa uniforme. De igual manera, se observaron estructuras quísticas delimitadas por epitelio estratificado con células similares a las descritas anteriormente. Se halló abundante líquido eosinófilo dentro de la estructura (véase Figura 7-H).
5. *Ovario izquierdo.* Los hallazgos fueron similares al anterior con predominio de una estructura quística amplia, delimitada por células de la granulosa, apoyadas en un estroma fibroso denso y regular (véase Figura 7-I).
6. *Bazo.* Se halló congestión de la pulpa esplénica, áreas hemorrágicas subcorticales con predominio de focos de esclerosiderosis o capas de Gamma-Gandhi, esplenitis supurativa aguda en patrón focal.

Ovariectomía y esplenectomía. Como consecuencia del hallazgo en las fimbrias y los oviductos se procedió a realizar la ovariectomía. Al hallar en el bazo esplenomegalia del segmento craneal (véase Figura 5-A) y fibrosis del segmento caudal (véase Figura 5-B), se procedió a practicar la esplenectomía.

Seguimiento post-operatorio. La perra se sometió al seguimiento post-operatorio de rutina con medicación antibiótica preventiva con cefalexina (25 mg/kg, vía oral, cada 8 horas/5 días), y terapia analgésica con ketoprofeno (10 mg/kg, vía oral/cada 24 horas/3 días); cuidado de la herida con clorhexidina. Catorce meses, un año después de la operación (julio de 2005), la perra había presentado un estado de salud normal y aumentó de peso hasta alcanzar el estándar de la raza para su talla corporal.

Discusión

Los problemas de fertilidad asociados con patologías ováricas son un fenómeno de una relativa baja frecuencia en la práctica veterinaria de pequeñas especies animales, porque la mayoría de la casuística guarda relación con patologías uterinas, como consecuencia de las infecciones uterinas post-monta, o del manejo farmacológico con hormonas esteroides del celo y de la monta no deseada (7, 27). Hasta hace muy pocos años la mayoría de las patologías ováricas eran subdiagnosticadas o no diagnosticadas en la práctica clínica, debido en parte a las particularidades del ciclo estral de la perra y a la escasa disponibilidad de herramientas diagnósticas para la práctica reproductiva en pequeñas especies animales. Son escasos los informes halados sobre la problemática de la patología ovárica en la perra (1, 2, 41), en especial sobre las condiciones quísticas de los ovarios (10). Los estudios sobre la dinámica folicular (5, 6, 20) o su alteración (9, 12, 31) son abundantes en las hembras de otras especies domésticas, pero son escasos en perras, donde tan sólo se informa de un diámetro folicular máximo de 13 mm sin especificar la raza (8), o de 5.8 mm en la raza beagle. El diámetro hallado en la estructura quística del ovario izquierdo del presente caso fue de 15.3 mm (véase Figura 1-B).

En los ciclos estrales previos la perra había mostrado un comportamiento reproductivo que no permitió sospechar de una patología ovárica de base: a) después de su primer celo presentó celos sucesivos en intervalos regulares de 6 meses, b) el comportamiento de la perra durante el proestro y el estro en cada celo fue consecuente con los hallazgos citológicos, c) la cuantificación de progesterona se mantuvo dentro de los rangos informados por la literatura, lo cual descartó la posibilidad de alteraciones de la luteinización o la ovulación, y d) la no ocurrencia previa de procesos

asociados con anomalías del funcionamiento ovárico tales como el complejo hiperplasia quística endometrial-piometra (CEH-p). A pesar de ello, en ninguno de los celos en los que fue inseminada la perra quedó gestante (conforme a la evidencia ecográfica) ni presentó comportamiento que sugiriera una pseudo gestación.

Al inicio del quinto celo de la perra se programó un seguimiento ultrasonográfico tendiente a evaluar el funcionamiento ovárico, suponiendo que alguna alteración del crecimiento folicular durante el periodo periovulatorio (7) fuera la causa de la infertilidad en los ciclos anteriores. Basados en el hallazgo de estructuras quísticas al realizar el primer examen ultrasonográfico y la historia de infertilidad de los celos anteriores, se tomó la decisión de practicar una laparotomía exploratoria.

El engrosamiento anormal de la mucosa de las fimbrias daba la impresión de un tejido inflamado de color rojo intenso, hemorrágico, que impedía su contacto con la superficie del ovario. Ambos oviductos presentaron un diámetro aumentado, lo cual hizo sospechar que dicha anomalía pudo guardar alguna relación con su historia previa de infertilidad. Por primera vez se informa en la literatura sobre este tipo de lesiones.

Otro hallazgo novedoso fue la presencia de las estructuras similares a quistes en los oviductos, que se habían diagnosticado inicialmente como quistes de origen ovárico, pero al hacer los cortes para histopatología se constató que se originaban en los oviductos. Estas estructuras tenían un aspecto macroscópico hemorrágico y el análisis microscópico reveló un tejido graso con múltiples hemorragias. No fue posible establecer si esta situación anormal del oviducto se presentó sólo durante el presente celo o si por el contrario también había ocurrido en los celos anteriores y fue responsable de los intentos fallidos de gestación por inseminación artificial. El epitelio del oviducto expresa altas concentraciones de receptores de estrógenos durante el proestro (35, 36), lo cual hace pensar que la producción excesiva de estrógenos por las células de la granulosa tumoral, pudo ser la causa del estímulo hormonal responsable de los efectos sobre la proliferación del epitelio y el estroma del oviducto, incluyendo las fimbrias. El estímulo hormonal se presenta tanto en situaciones normales posteriores a la extirpación de los ovarios (29), como en casos de tumores de células de la granulosa (32).

El hallazgo de tumores de células de la granulosa en los ovarios confirmó en gran parte todos los hallazgos del caso clínico, pero no se puede inferir si se trató de una condición única del proestro del quinto celo, o si había ocurrido en los ciclos anteriores. Los resultados de las citologías practicadas coincidieron con una fase de proestro, lo cual puede ser el resultado de la producción hormonal de dichos tumores. De igual modo, la condición tumoral puede explicar el aumento exagerado de la vulva y el cérvix (véase Figura 2), así como también el aumento del diámetro de la mucosa uterina en general, incluyendo la hiperplasia quística endometrial en respuesta a un hiperestrogenismo endógeno (véase Figura 7A-C), sin infección concomitante. El diámetro del cérvix se consideró aumentado por experiencia de los autores, quienes no habían encontrado hallazgos similares en su experiencia clínica y quirúrgica previa. Tampoco se halló en la literatura referencia al estado de los folículos preovulatorios ni el diámetro promedio de los folículos en la perra según su tamaño o grupo racial. Algunos autores (18) han definido un diámetro preovulatorio para la raza Beagle, pero no se halló referencias de la raza Bulldog. Además, la luteinización previa de los folículos en la perra, impide definir con precisión el diámetro preovulatorio (4, 8).

El tumor de células de la granulosa se clasifica dentro del grupo de tumores de células germinales en caninos, grupo que representa la segunda causa de neoplasias ováricas en esta especie (2, 23, 30). Dentro de los tumores de células más frecuentes de células germinales se encuentran los tumores de células de la granulosa (15, 22, 25), y los tumores de células lúteas o de la teca (38, 40). Los tumores de células de la granulosa se pueden presentar en varios patrones: a) patrón difuso, que se presenta como masas tumorales grandes que se pueden diferenciar por palpación o por ultrasonografía transabdominal (22), b) en patrón quístico, que se puede evidenciar por ultrasonografía, y c) en patrón en células empalizadas o patrón de Sertoli (22, 23, 38), que en la mayoría de los casos no ocasiona un aumento considerable del tamaño del ovario.

En el presente caso se halló una combinación de patrón quístico con patrón de Sertoli (véase Figura 7-I). El patrón en empalizada se presentó como múltiples focos en el estroma en ambos ovarios, mientras que el patrón quístico fue predominante en el ovario izquierdo, en cuyo quiste mayor (aquel observado en la ecografía) se observó un septo que al examen histopatológico mostró una conformación de dos capas de células de

la granulosa recubriendo un estroma uni o bicelular, en el que se hallaron algunos capilares (véase Figura 7-G).

Los tumores de células de la granulosa pueden presentar metástasis por su mediano grado de malignidad; sin embargo, el tumor con el patrón de Sertoli tiene una malignidad del 20% en perras (22), lo cual sugiere que en una de cada cinco perras afectadas se puede presentar metástasis, incluyendo aquellas que han sido sometidas a ovariectomía, porque no se tiene certeza de que la siembra de las metástasis se haya establecido o no. Lo anterior resalta la necesidad de enviar los tumores resecados para su estudio histopatológico. La perra del presente estudio no ha presentado ninguna complicación 14 meses después de haber sido sometida a la cirugía.

La hemorragia severa del estroma del ovario y del epitelio uterino, sin evidencia de reacción inflamatoria, sugiere que dicho proceso fue el resultado de la exposición a las concentraciones endógenas de estrógenos aumentados por la actividad secretora del tumor (32). En la perra del presente caso no se tomó muestra para cuantificación hormonal y por esta razón no se conocieron sus niveles estrogénicos al momento del examen clínico, no obstante los hallazgos permiten deducir que la perra se encontraba en una fase del ciclo estral en la que los estrógenos estaban predominando (en proestro tardío, de acuerdo con el resultado de la citología).

Otro hallazgo inquietante en este caso fue la historia de los ciclos estrales anteriores, cuando la perra presentó ciclos sin alteraciones en la duración, ni en los niveles hormonales como se deduce de las citologías practicadas, lo cual sugiere varias posibilidades: 1) que en los ciclos anteriores la perra habría presentado un hiperestrogenismo no asociado con tumor de células de la granulosa, el cual ocasionó hiperplasia de las fimbrias que impidió la fertilización, 2) que en los ciclos anteriores se hubiera presentado el patrón tumoral hallado en el presente ciclo, pero este hubiera revertido hacia la normalidad al finalizar la fase estrogénica, lo cual parece poco probable por evolución hacia la malignidad del tumor de células de la granulosa, o 3) que la condición tumoral se haya instaurado tan solo en último ciclo estral, cuando se atendió la consulta. Esta última posibilidad está sustentada en el hecho de que la gran mayoría de los casos de quistes foliculares asociados o no con tumores de células de la granulosa, cursan con alteraciones en la duración del proestro y del estro, situación que no se había presentado en los ciclos anteriores de la perra.

Debido a que los tumores de células de la granulosa de patrón quístico pueden ser diagnosticados por ultrasonografía, se recomienda a los veterinarios de pequeñas especies animales que tengan mucha precaución cuando observen estructuras foliculares de más de 10 a 14 mm de diámetro, en proporción con la talla de la raza, para que consideren el tumor de células de la granulosa dentro del diagnóstico diferencial, cuando atiendan una perra con historia de infertilidad previa, en especial cuando presente alteraciones en la duración del proestro o del estro.

Respecto de la cuantificación de los niveles de progesterona, se halló un valor de 3.8 ng/ml al cuarto día 25.5 ng/ml al séptimo día del indicio del proestro del tercer ciclo. Hase *et al* (13), hallaron niveles de progesterona de 4.79 ± 0.6 y de 7.63 ± 0.82 ng/ml, al tercer y cuarto día después del pico de LH, respectivamente, con niveles cercanos a 15 ng/ml a los 7 días después del pico de LH (13), valores que concuerdan con los hallados el 4º día del inicio del proestro. Sin embargo, el alto valor observado al día 7º del inicio, sugiere que la perra tuvo una luteinización prematura de sus folículos y quizá había ovulado muchos días antes al momento de iniciar las montas (9º día), cuando estos habían terminado su período fértil (7, 13).

Las mediciones de progesterona halladas en el cuarto ciclo estral, son más fisiológicas y están acordes con lo informado por Hase *et al* para perras Beagle (13). Sin embargo, la cuantificación de los niveles de progesterona es un buen indicador del momento del pico de LH, pero poco puede decir sobre el momento óptimo de la ovulación y en consecuencia de la programación de las inseminaciones. En este sentido es mucho más efectivo el seguimiento por citología vaginal combinado con la cuantificación hormonal.

En el bazo se pudo apreciar en surco que lo dividía en dos partes: la una, aumentada de tamaño donde se evidenció congestión esplénica; la otra, de tamaño reducida donde se pudo apreciar placas blanquecinas en la superficie. Con base en los hallazgos histopatológicos se deduce que el bazo tenía una torsión parcial que fue corregida durante la cirugía y posiblemente fue la causante del aumento observado. Además, el hallazgo histopatológico de esclerosiderosis sugiere que el bazo estuvo sometido a hemorragias continuas posiblemente como resultado del hiperestrogenismo causado por el tumor. La esclerosiderosis es un hallazgo frecuente en el bazo de perros de edad avanzada como resultado del

depósito de hemosiderina en las trabéculas esplénicas producto de la degradación de los glóbulos rojos. Por lo tanto, la esclerosiderosis hallada en este caso de una perra de 3.7 años de edad sugiere que el proceso se había instaurado varios meses atrás y podría ser un indicio de que la condición tumoral podría haber existido desde los ciclos anteriores. Sin embargo, un hallazgo clínico que contradice esta posibilidad es que la perra tuvo celos de curso aparentemente normal como se pudo deducir del manejo de la inseminación basado en las citologías y en las cuantificaciones de progesterona.

El hallazgo de la esplenitis supurativa, podría ser explicado por el cuadro de salpingitis aguda pero no se podría establecer una relación causa efecto, porque al no haber encontrado infección en los cuernos uterinos se podría sospechar de una salpingitis hematógena, lo cual no permite definir si el foco de la infección fue el bazo o la trompa uterina. Un hallazgo importante en este caso fue la presentación de esplenitis focal lo cual descarta una infección sistémica en cuyo caso se presentaría una esplenitis generalizada. Este hecho lo sustenta el estado de salud de la perra. Es posible que exista alguna asociación entre la torsión y la esplenitis, en el segmento del bazo que se halló reducido de tamaño y con las placas blanquecinas.

Conclusión

Una conclusión importante que deja el presente caso, es que en nuestro medio no tenemos un valor de referencia para establecer cual es el diámetro para considerar los folículos ováricos en perras como normal o quístico, lo cual realza la necesidad de realizar estudios sobre la dinámica del desarrollo folicular desde el inicio del proestro hasta el inicio de la luteinización de los folículos y la ovulación, con miras a definir diámetros que se puedan considerar como normales de acuerdo con los diferentes tamaños de las razas (miniatura, pequeño, mediano, grande). Nuestro grupo de investigación en ciencias veterinarias (Centaurus) ha dado inicio a un proyecto de investigación enfocado a estudiar esta situación en condiciones fisiológicas y patológicas.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al laboratorio de patología animal de la Facultad de Ciencias Agrarias por el procesamiento de los tejidos

para el análisis histopatológico. Las actividades del Grupo de investigación en ciencias veterinarias (Centauro), cuentan con el apoyo de la Vicerrectoría

de Investigación de la Universidad de Antioquia, a través de la estrategia de sostenibilidad de grupos de excelencia 2005-2006.

Summary

Infertility in a bitch with history of recurrent reproductive failure associated with granulose cell tumor

A case report of a 3 years and 7 months old Bulldog female dog with a history of infertility in four previous normal estrus cycles is presented. In all four estrous the bitch was inseminated with fresh semen from a fertile Bulldog male, with a mating criteria based on cytology and progesterone levels results, without a successful pregnancy being diagnosed (negative pregnancy test by ultrasound at days 32 to 36 post-insemination). At the 6th day of the beginning of proestrus (of the 5th cycle) an ultrasound examination was performed to check for follicular ovarian activity, during which. Intra operatorium where several follicles ranging from 8 to 15 mm in diameter were found which suggested cystic structures. In addition, an endometrial thickening, and a non identified structure parallel to the left ovary were found, and then an exploratory laparotomy was decided. In the fimbriae a very strong bilateral hyperplasia of fimbrial mucosal was found (10 mm wide, approximately), and increased tubal and uterine cervix diameter. In both ovaries, several follicles ranking from 6 to 15 mm in diameter were found, some of them were of translucent aspect, another hemorrhagic, and others luteinized. Multiple small (2 to 5 mm in diameter) cysts were found in the endometrium. Curiously, both a splenitis of the cranial and fibrosis of the caudal portions of the spleen were found. The histopathology report revealed fimbrial epithelial hyperplasia with acute salpingitis, and endometrial gland hyperplasia with cystic endometrial disease in the uterus. In the spleen, several sclerosiderosis foci, subcortical chronic hemorrhage, and acute suppurative splenitis were found. In the ovaries a bilateral granulose cell tumor was diagnosed exhibiting a mixture of cystic and Sertoli cell patterns. These findings are discussed in the context of a granulose cell tumor-related hyperoestrogenic response and its relationship to the previous reproductive failure of the bitch. Accordingly, this is the first report on a bilateral granulosa cell tumor in dogs.

Key words: canine, cystic endometrial hyperplasia, cysts, cytology, fimbriae, infertility.

Referencias

1. Arnold S, Hubler M, Hauser B, Kaser-Hotz B, Rusch P. Uterine serosal inclusion cysts in a bitch. *J Small Anim Pract* 1996; 37:235-237.
2. Bertazzolo W, Dell'Orco M, Bonfanti U, DeLorenzi D, Masserdotti C, De Marco B, Caniatti M, Roccabianca P. Cytological features of canine ovarian tumours: a retrospective study of 19 cases. *J Small Anim Pract* 2004; 45:539-545.
3. Bigliardi E, Parmigiani E, Cavirani S, Luppi A, Bonati L, Corradi A. Ultrasonography and cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *Reprod Domest Anim* 2004; 39:136-140.
4. Boyd JS, Renton JP, Harvey MJ, Nickson DA, Eckersall PD, Ferguson JM. Problems associated with ultrasonography of the canine ovary around the time of ovulation. *J Reprod Fertil Suppl* 1993; 47:101-105.
5. Clowes EJ, Aherne FX, Schaefer AL, Foxcroft GR, Baracos VE. Parturition body size and body protein loss during lactation influence performance during lactation and ovarian function at weaning in first-parity sows. *J Anim Sci* 2003; 81:1517-1528.
6. Cox NM. Control of follicular development and ovulation rate in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* 1997; 52:31-46.
7. England G, Concannon PW. Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations. En: Concannon PW, England G, Verstegen III J, Linde-Forsberg C (Eds.) Recent advances in small animal reproduction. International Veterinary Information Service, Ithaca NY. 2001.
8. England GC, Allen WE. Real-time ultrasonic imaging of the ovary and uterus of the dog. *J Reprod Fertil Suppl* 1989; 39:91-100.
9. Farin PW, Estill CT. Infertility due to abnormalities of the ovaries in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1993; 9291-308.
10. Fayerer-Hosken RA, Durham DH, Allen S, Miller-Liebl DM, Caudle AB. Follicular cystic ovaries and cystic

- endometrial hyperplasia in a bitch. *J Am Vet Med Assoc* 1992; 201:107-8.
11. Feldman EC, Nelson RW. *Endocrinología y reproducción en perros y gatos*, 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana; México, 2000; 856p.
 12. Garverick HA. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci* 1997; 80:995-1004.
 13. Hase M, Hori T, Kawakami E, Tsutsui T. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. *J Vet Med Sci* 2000; 62:243-248.
 14. Hayer P, Gunzel-Apel AR, Luerssen D, Hoppen HO. Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and the early luteal phase in the bitch. *J Reprod Fertil Suppl* 1993; 47:93-100.
 15. Hayes HM Jr, Young JL Jr. Epidemiologic features of canine ovarian neoplasms. *Gynecol Oncol* 1978; 6:348-353.
 16. Hoffmann B, Busges F, Engel E, Kowalewski MP, Papa P. Regulation of corpus luteum-function in the bitch. *Reprod Domest Anim* 2004; 39:232-240.
 17. Koster K, Poulsen Nautrup C, Gunzel-Apel AR. A Doppler ultrasonographic study of cyclic changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch. *Reproduction* 2001; 122:453-461.
 18. Kutzler MA. Induction and synchronization of estrus in dogs. *Theriogenology* 2005; 64:766-775.
 19. Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E, Macis D. Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 2005; 63:41-59.
 20. Madill S. Reproductive considerations: mare and stallion. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2002; 18:591-619.
 21. Manothaiudom K, Johnston SD, Hegstad RL, Hardy SK. Evaluation of the ICAGEN-Target canine ovulation timing diagnostic test in detecting canine plasma progesterone concentrations. *J Am Anim Hosp Assoc* 1995; 31:57-64.
 22. Nielsen SW, Kennedy PC. Tumors of the genital system. En: Moulton JE. *Tumors in domestic animals* 3rd edition. Capítulo 11. University of California Press, Berkeley. 1990; p479-517.
 23. Norris HJ, Garner FM, Taylor HB. Comparative pathology of ovarian neoplasms. IV. Gonadal stromal tumours of canine species. *J Comp Pathol* 1970; 80:399-405.
 24. Otoi T, Shin T, Kraemer DC, Westhusin ME. Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after in vitro maturation and fertilization. *Reprod Nutr Dev* 2004; 44:631-637.
 25. Patnaik AK, Greenlee PG. Canine ovarian neoplasms: a clinicopathologic study of 71 cases, including histology of 12 granulosa cell tumors. *Vet Pathol* 1987; 24:509-514.
 26. Rodrigues B de A, dos Santos LC, Rodrigues JL. Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes. *Mol Reprod Dev* 2004; 67:215-223.
 27. Romagnoli S, Concannon PW. Clinical Use of Progestins in Bitches and Queens. En: Concannon PW, England G, Verstegen III J, Linde-Forsberg C (Eds.) *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. International Veterinary Information Service, Ithaca NY.
 28. Rota A, Cabianca G. In vitro maturation rates of canine oocytes from anoestrous bitches in simple media. *Reprod Nutr Dev* 2004; 44:105-109.
 29. Sangster C. Ovarian remnant syndrome in a 5-year-old bitch. *Can Vet J* 2005; 46:62-64.
 30. Scully RS. Tumors of the ovary and maldeveloped gonads. *Atlas of tumor pathology, Second Series, Fascicle 16*. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, 1978. p153-173.
 31. Silvia WJ, Hatler TB, Nugent AM, Laranja da Fonseca LF. Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23:167-177.
 32. Sivacolundhu RK, O'Hara AJ, Read RA. Granulosa cell tumour in two speyed bitches. *Aust Vet J* 2001; 79:173-176.
 33. Squires EL, McKinnon AO, Shideler RK. Use of ultrasonography in reproductive management of mares. *Theriogenology* 1988; 29:55-70.
 34. Sugiura K, Nishikawa M, Ishiguro K, Tajima T, Inaba M, Torii R, Hatoya S, Wijewardana V, Kumagai D, Tamada H, Sawada T, Ikehara S, Inaba T. Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. *Immunobiology* 2004; 209:619-627.
 35. Verhage HG, Abel JH Jr, Tietz WJ Jr, Barrau MD. Development and maintenance of the oviductal epithelium during the estrous cycle in the bitch. *Biol Reprod* 1973; 9:460-474.
 36. Vermeirsch H, Van den Broeck W, Simoens P. Immunolocalization of sex steroid hormone receptors in canine vaginal and vulvar tissue and their relation to sex steroid hormone concentrations. *Reprod Fertil Dev* 2002; 14:251-258.
 37. Watts JR, Wright PJ, Lee CS. Endometrial cytology of the normal bitch throughout the reproductive cycle. *J Small Anim Pract* 1998; 39:2-9.
 38. World Health Organization. Tumor classification menu. *Histological classification of tumors of the genital system of domestic animals*. 2001.
 39. Wright PJ, Parry BW. Cytology of the canine reproductive system. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1989; 19:851-874.
 40. Yamini B, VanDenBrink PL, Refsal KR. Ovarian steroid cell tumor resembling luteoma associated with hyperadrenocorticism (Cushing's disease) in a dog. *Vet Pathol* 1997; 34:57-60.