



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Componente práctico presentado a la unidad de titulación como
requisito previo a la obtención del título de:

Médico Veterinario Zootecnista

Tema:

“Determinación del momento óptimo de la inseminación artificial con la
observación de células cornificadas del epitelio vaginal en hembras bovina de
la Universidad Técnica de Babahoyo”

Autor:

Byron Willyn Peñafiel Guillén

Tutor:

Dr. Juan Carlos Gómez Villalva Msc.

Babahoyo - Los Ríos - Ecuador

2016

i. DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mis padres Willyn Oswaldo Peñafiel Castro y Grimanesa de los Ángeles Guillén Chaguay. Que por su constancia y amor supieron inculcarme buenos valores que me servirán a los largo de mi vida.

A mi hermano Jairon Oswaldo Peñafiel Guillén por su compañía, confianza y apoyo.

ii. AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios por haberme dado la vida y permitirme culminar con una de mis metas.

A la Universidad Técnica de Babahoyo por haberme formado como profesional durante esta etapa.

A la PhD. Danilda Hufana-Duran por su confianza, su motivación, sus consejos y por haber compartido con un poco de sus conocimientos adquiridos en el transcurso de su vida profesional.

Al Ing. Agr. PhD. Walter Reyes Borja por haber hecho lo posible para que se lleve a cabo el proyecto, ya que sin su ayuda y conocimientos no hubiese sido posible realizar este trabajo.

A mi tutor el Dr. Msc. Juan Carlos Gómez Villalva el mismo que me sirvió de guía durante el proceso de este trabajo.

Al Ing. Lenin Arana Vera por haberme asistido con su apoyo fundamental en el transcurso del trabajo realizado y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Emilio Wong por haber prestado su servicio al momento de hacer el diagnóstico de preñez.

Al Sr. Loren Olsen y al Dr. Ignacio Macías quienes aportaron con una parte elemental para que se llevara a cabo la inseminación artificial.

A los docentes que me han acompañado durante el largo camino, brindándome siempre su orientación con profesionalismo ético en la adquisición de sus sabios conocimientos y afianzando mi formación.

iii. INDICE

Contenido

I.- INTRODUCCIÓN	6
1.1 Objetivo General	7
1.2 Objetivos Específicos	7
II. REVISIÓN DE LITERATURA	8
2.1. Estructuras reproductivas en bovinos	8
2.2. Células epiteliales vaginales	9
2.3. Fases del ciclo estral	10
2.4. Factores que inciden en el estro	11
2.5. Métodos de detección de celo	12
2.6. Inseminación artificial	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. UBICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL ÁREA EXPERIMENTAL.....	15
3.2. MATERIAL GENÉTICO.....	15
3.3. MATERIAL DE CAMPO	15
3.4. MATERIAL DE LABORATORIO	15
3.5. FACTORES ESTUDIADOS	15
3.6. MÉTODOS	16
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
3.8. MANEJO DEL ENSAYO	17
3.8.1. Signos, Síntomas del Estro y Citología Vaginal	17
3.8.2. Inseminación Artificial (IA) y/o Monta del Toro, Citología Vaginal y Diagnóstico de Preñez.....	18
3.9. VARIABLES EVALUADAS.....	19
3.9.1. Presencia o Ausencia de Secreción de Moco Vaginal.....	19
3.9.2. Reflejos Corporales	19
3.9.3. Tipo de Células Epiteliales Vaginales	19
3.9.4. Diagnóstico de Preñez	19
IV. RESULTADOS	20
4.1. Signos, Síntomas del Estro y Citología Vaginal.....	20
4.2. Inseminación Artificial (IA) y/o Monta del Toro, Citología Vaginal y Diagnóstico de Preñez.	20

V. DISCUSIÓN.....	28
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	29
VII. RESUMEN	30
SUMMARY	31
VIII. LITERATURA CITADA	32
ANEXOS	35

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Registro de reproducción y las razones de la inseminación de los animales utilizados en el estudio.....	21
Tabla 2. Método práctico para determinar el momento óptimo para la inseminación artificial en hembras bovinas.....	23
Tabla 3. Índice de cornificación e intervalo de días después que se observó el último pico de cornificación durante la IA o la monta del toro de los animales preñados, no preñados y anestro.	27
Tabla 4. Edad de las hembras bovinas, número de partos, condición corporal, y el período postparto en días de las preñadas, no preñadas, y en anestro.....	27
Tabla 5. Perfil de los 17 animales utilizados para determinar los cambios diurnos de las células epiteliales vaginales.	35

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cambios diurnos en las células epiteliales vaginales de bovino, durante un periodo de observación de 60 días.	24
Figura 2. Cambios diurnos en el porcentaje de células parabasales, intermedias tardías y cornificadas en hembras bovinas con baja condición corporal	25
Figura 3. Cambios morfológicos en las células epiteliales vaginales en bovino, en diferentes estados del ciclo estral.....	26
Figura 4. Las células epiteliales vaginales dominantes antes, durante y después del estro en bovinos.	26
Figura 5. Animales utilizados en el ensayo.....	36
Figura 6. Células epiteliales vaginales en bovino.....	36
Figura 7. Citología Vaginal en hembras bovinas.	36
Figura 8. Inseminación artificial y/o monta natural	36
Figura 9. Diagnóstico de preñez.....	36

I.- INTRODUCCIÓN

Según Aguayo, (2015). La ganadería, es una actividad generalizada y desarrollada prácticamente en todo el país, es considerada como un renglón socioeconómico para el desarrollo del campo; ha sido y es cuestionada fuertemente por su desempeño productivo e impacto ambiental. Por lo tanto debe equilibrarse en un nivel tecnológico aceptable y sostenible.

La detección de hembras que se encuentran con conducta de celo es uno de los aspectos más importantes en los programas de Inseminación Artificial (IA.) ya que normalmente a partir de dicha manifestación se planifica el momento de la siembra de semen. (Catalano & Callejas, 2001)

Cuando la detección de celos se realiza de forma tradicional, es decir, por signos visibles durante la presencia del estro (inmovilización a la monta, nerviosismo general, olfateo de la vulva o de la orina de otros animales, vulva rosada e inflamada con desprendimiento de un moco claro, entre otros); solo se alcanza a identificar el 43 % de las vacas que entran en calor, esto deja a muchas vacas sin inseminación oportuna. (Iñiguez, 2014)

“Por otro lado, la incidencia del estro, está influenciada por varios factores entre ellos la edad, raza genotipo, peso corporal, nutrición, ambiente y cambios hormonales” (Duchens & De los Reyes, 2012) que desencadenan procesos fisiológicos que actúan sobre el epitelio vaginal preparándolo para la cópula, este efecto causa un incremento en el número de capas celulares, provocando cambios en la morfología de las células epiteliales.

Dichos cambios en el epitelio vaginal marcan el cambio de las células epiteliales de no cornificadas a células cornificadas. Así, el primer día del estro se presenta con el 80% o más de células epiteliales cornificadas o superficiales según estudios realizados en perras (Escobedo H., 2008), (Mansilla G., 2008), en búfalos 45-65% (Duran, y otros, 2015)

1.1 Objetivo General

Identificación del momento óptimo de la inseminación artificial considerando los porcentajes de células cornificadas del epitelio vaginal en hembras bovinas.

1.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el cambio morfológico de las células del epitelio vaginal como indicador del tiempo exacto para la inseminación artificial.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Estructuras reproductivas en bovinos

La vagina está localizada en la parte craneal al vestíbulo y se extiende cranealmente por cerca de 8 pulgadas hasta la entrada del cérvix. Está protegida por epitelio estratificado escamoso no queratinizado. La vagina actúa de receptor del semen cuando se realiza la monta natural. Este órgano puede ser un impedimento para llegar al blanco en IA por dos razones; primero, los pliegues de la vagina que ocurren en vacas abiertas a la movilidad referida en la sección de introducción y segundo el fornix, que rodea la entrada del cérvix, que es el resultado de la gruesa musculatura del cérvix que se proyecta en la vagina y su diámetro reducido comparado con la vagina (Rivera, 2009)

El cérvix mide de 4 a 5 pulgadas de largo y unas 2 pulgadas de ancho, el mismo que es de suma importancia en la reproducción bovina. El cérvix es una rápida disminución del tamaño del tracto reproductivo que da protección al útero a la entrada externa de contaminantes, que de otra manera entrarían desde la vagina. Durante la preñez el cérvix crea un tapón natural (tapón cervical) para formar un medio estéril y seguro en el que se alojara el feto, la ruptura de dicho tapón durante esta etapa que algunas veces puede suceder durante una inseminación errónea, (de una vaca preñada) puede provocar un aborto. (Rivera, 2009)

Desde el punto de vista anatómico el útero se puede dividir en cuerpo del útero y dos cuernos.

El cuerpo del útero, inmediatamente después del cérvix, pasa a ser el Blanco o punto de depósito del semen durante la inseminación artificial. Los cuernos uterinos son la continuación directa del cuerpo del útero cada cuerno es una estructura cilíndrica y simétrica de 8-12 pulgadas de longitud y cerca de 2 pulgadas de diámetro dependiendo de la edad del animal, después de la bifurcación externa y continuando en forma craneal los cuernos se doblan en posición ventro-caudal y después se vuelven a doblar en forma dorsal. (Rivera, 2009)

Los ovarios son los órganos principales del aparato reproductor femenino. Tienen dos importantes funciones: la producción de Óvulos y la producción de hormonas, principalmente Estrógenos y Progesterona, en las distintas etapas del ciclo estral. En la superficie del Ovario se pueden detectar dos estructuras diferentes: Folículos y Cuerpo Lúteo. Los Folículos son estructuras llenos de fluidos, que contienen los óvulos en desarrollo; el CL crece sobre el sitio de la ovulación del celo anterior y normalmente tiene una corona sobre su estructura, el mismo que facilita su identificación durante la palpación rectal. (Dejarnette & Nebel, s.f.)

2.2. Células epiteliales vaginales

Las células epiteliales vaginales son provenientes de la descamación continuada y cíclica del epitelio pavimentos que recubre las paredes vaginales. Esta renovación está ligada a los cambios hormonales especialmente, y casi exclusivamente, a los de los niveles de estrógenos sanguíneos. Los mecanismos y las características de este recambio son prácticamente idénticos en la perra y en la gata. (Prats Esteve, 2001)

Células parabasales: tienen un tamaño algo mayor que las basales, con una relación núcleo/citoplasma de 0'2; el diámetro del núcleo es menor que la distancia entre éste y la membrana celular. El núcleo todavía esférico o redondeado tiene perfil menos regular, ovaladas o alargadas. (Prats Esteve, 2001)

Células intermedias: el tamaño es prácticamente el doble que las células paranasales, con una relación núcleo/citoplasma de 0'06, y por tanto un diámetro nuclear mucho menor que la distancia entre el núcleo y la membrana celular. El núcleo todavía es redondeado o levemente ovalado, moderadamente picnótico, su citoplasma es más irregular, con bordes sinuosos aunque sin angulaciones. (Prats Esteve, 2001)

Células superficiales queratinizadas o cornificadas: Son el último eslabón del envejecimiento celular, careciendo de núcleo y de estructuras celulares diferenciables ya que su tamaño es algo menor que las superficiales porque ya han empezado a sufrir un "arrugamiento", son células anucleadas o con sólo leves restos nucleares, poseen un citoplasma irregular con bordes angulados, doblados sobre sí mismos. (Prats Esteve, 2001)

2.3. Fases del ciclo estral

Al ciclo estral también se lo llama celo o calor, y varía normalmente entre 17 a 24 días, considerándose 21 días como el tiempo promedio, el mismo que está compuesto por las siguientes fases: Proestro, estro, metaestro, diestro.

La fase del proestro se inicia con la regresión del cuerpo lúteo desde el ciclo anterior o luteolisis y culmina con el inicio del estro o celo; tiene un tiempo de duración de dos o tres días. La destrucción de cuerpo lúteo ocurre gracias a la acción de la $PGF2\alpha$ de origen uterino (Rippe, 2009) en el proestro la cornificación vaginal aumenta gradualmente. La cornificación completa generalmente se da antes del pico de LH. El estro o celo se define citológicamente como la cornificación completa con más del 75% de las células anucleadas.

El estro es la etapa o periodo sexual más intenso del ciclo estral y se denomina calor o celo, el cual dura aproximadamente 18 horas. Este momento se hace notorio cuando la vaca se queda inmóvil permitiendo ser montada por otra vaca o por el toro. Entre 10 a 12 horas después de que la vaca ya no permite ser montada sucede la ovulación, el ovulo es liberado y el periodo de calor o celo termina. (Iñiguez, 2014)

Según Wiltbank et al., 2002 citado por (Rippe, 2009) “Los signos de estro ocurren gracias a la presencia de los estrógenos provenientes del folículo. En cierto momento los niveles de estrógenos son lo suficientemente altos en concentración y duración como para inducir los síntomas de celo o calor.”

El metaestro tiene una duración de 3 a 5 días. Durante esta fase ocurre la ovulación, que tiene lugar entre 28 a 32 horas después de haber iniciado el celo, o entre 10 a 15 horas de haber culminado los signos de celo en respuesta al pico preovulatorio de LH. Después de la ovulación se produce una hemorragia y el folículo se llena de sangre, convirtiéndose en una estructura conocida como cuerpo hemorrágico. El proceso siguiente es la luteinización de las células foliculares que se transforman en células luteales; estos cambios se dan entre el día 5 a 7 del ciclo, finalizando así la fase del metaestro e iniciando la fase lútea o diestro. (Rippe, 2009)

El diestro es la fase que se caracteriza por la presencia y dominio del cuerpo lúteo en el ovario y la producción de progesterona, está regulada por las secreciones de las

glándulas pituitaria anterior, útero, ovario y la presencia de un embrión; y va desde el día 5 del ciclo estral hasta el día 18. Esta regulación de la secreción de progesterona está controlada por un equilibrio de estímulos: uno luteotrópico o que estimula la progesterona y otro luteolítico o que inhibe la progesterona; ambos estímulos son secretados al mismo tiempo durante el ciclo estral. (Rippe, 2009)

2.4. Factores que inciden en el estro

La edad en la madurez sexual en el ganado bovino puede variar de acuerdo a su raza y el medio ambiente donde habita, pero si las condiciones de manejo son muy buenas, las vaquillas pueden mostrar celo anticipadamente. Animales precoces, con buen crecimiento y desarrollo, que quedan preñados a los 14-15 meses y logran un parto alrededor de los 24 meses de edad, comenzaran a producir leche temprano y tendrán una mejor vida productiva y por lo tanto una buena eficiencia económica.

El celo en los bovinos surge cuando alcanzan los 12 a 17 meses, edad donde se logra la madurez de los órganos reproductivos, se inicia la secreción de gonadotropinas (GnRH) desde el hipotálamo y la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), desde la hipófisis. La FSH estimula al aparato reproductivo y el óvulo empieza a madurar dentro del ovario, después de la maduración del óvulo, queda preparado para ovular y ser fertilizado, es en este momento cuando el animal demuestra celo.

En el ganado bovino uno de los factores importantes es la nutrición que regula el retorno a la actividad cíclica luego del parto en los mismos. Si es inadecuada la ingesta de nutrientes y los almacenamientos corporales son escasos, el número de días entre el parto y el primer estro se incrementa y es la causa principal por el cual las vacas fracasan al concebir durante la temporada de servicio.

La nutrición indebida suprime el estro en las hembras jóvenes en crecimiento más que en las adultas. Los bajos niveles de energía llevan a inactividad ovárica y anestro en vacas productoras. Las deficiencias en minerales o vitaminas provocan anestro. La falta de fósforo en bovinos causa defunción ovárica, que a su vez lleva al retraso de la pubertad, signos deprimidos de estro. En las vacas jóvenes que se alimentan con dietas deficientes en manganeso se experimentan alteraciones ováricas que van desde signos débiles de estro hasta el anestro. La falta de vitamina A y E pueden ocasionar ciclos estrales irregulares o anestro.

2.5. Métodos de detección de celo

La detección de celo es uno de factores indispensable para la inseminación artificial (IA) por lo tanto existen diferentes maneras:

Uno de los métodos más económicos que consiste en la observación del comportamiento de la hembra, ya sea cuando hay presencia del moco Cérvico-vaginal que pueden manchar la cola y zonas vecinas, enrojecimiento y edema (hinchazón) de la vulva, orinar frecuente y corto, la hembra monta a otras hembras y permite ser montada, esto también es reconocido como signos de la actividad sexual y el celo entre las hembras bovinas. Otras manifestaciones fisiológicas como inapetencia, elevación de la temperatura y la disminución de la producción láctea requieren de mayor atención y son de poca importancia en la ganadería de doble propósito. (Ramírez & Vieras, 2006)

(Toros vasectomizados), Esta operación se basa en la desviación del pene en un ángulo de 45 o 500 de su posición natural. Estos toros conservan todas las características sexuales y seminales y solamente quedan imposibilitados para introducir el pene. (Bespin, Rivero, & Morgado, 2007)... Impidiendo así una preñez indeseable o la transmisión de enfermedades venéreas. El uso de estos animales mejora la detección de celo, en especial en aquellas fincas con fallas en la detección de celo o ausencia de registros, además, es importante tener en cuenta el efecto de bioestimulación que ejerce la presencia del macho, apresurando el reinicio de la actividad cíclica posparto.

Hembras androgenizadas mejora la intensidad de detección de celo, cuando son utilizadas en combinación con pintura o detectores de presión en base de la cola, o arnés marcadores (chinball: tiene una esfera que al ser presionada permite la salida de la tinta). Según (Bespin, Rivero, & Morgado, 2007).... Este sistema se realiza con tratamiento de testosterona y la vaca presenta una conducta sexual característica del macho y por lo tanto se utiliza con buenos resultados en la detección del celo en los bovinos utilizando vacas de 3 años en promedio, que posean una talla adecuada y que sean dominantes en la finca.

Según (SCR Engineers Ltd, 2006) citado por (López L., 2011)Entre las opciones tecnológicas está el HEATIME, que mediante un sensor (TAG) ubicado en el cuello de la vaca, monitorea la actividad del animal, si es alta o es baja, mediante un rango, le aproxima la hora en la cual la vaca entra en mayor actividad.

La citología vaginal es una técnica sencilla y rápida de realizar además de tener un bajo costo, los frotis pueden remitirse a cualquier laboratorio veterinario especializado, pero cualquier clínico con una mínima infraestructura (métodos de tinción y microscopio) puede procesarlos e interpretarlos ya que los cambios del epitelio vaginal son un reflejo válido de las variaciones hormonales del ciclo sexual de la hembra.

Mediante la citología vaginal lo que pueden detectarse en el frotis, su identificación, número, características, etc. Pueden ser hematíes, células de serie blanca, células glandulares, células epiteliales (parabasales, intermedias”tempranas y tardías” y cornificadas) espermatozoides, etc.

Fases del ciclo estral en perra mediante la citología vaginal y células epiteliales vaginales:

Anestro es frotis pobre en células, aquí predominan células basales y parabasales. Proestro aparecen células intermedias y superficiales en el inicio, dominando estas últimas a medida que avanza la fase. Estro predominio absoluto de células superficiales cada vez con un porcentaje mayor de queratinización y ausencia de núcleo a medida que avanza la fase. Metaestro (diestro) en el inicio vuelven a hacer su aparición, junto a las células superficiales, células basófilas, intermedias y parabasales, que acaban dominando el frotis en pocos días. (Stornelli, Savignone, Tittarelli, & Stornelli, 2006)

2.6. Inseminación artificial

Según (Duran, y otros, 2015) La inseminación artificial es una tecnología reproductiva aplicada comúnmente en programas de mejoramiento genético

Tal como lo menciona (Iñiguez, 2014) el momento óptimo para la inseminación depende de cuando ocurre la ovulación en relación al calor y durante cuánto tiempo el semen permanece viable. Generalmente el semen es viable durante unas 24 horas mientras que la viabilidad del óvulo es de únicamente cuatro horas; así, el tiempo para llevar a cabo la fecundación es muy corto. Por ello, según lo utilizado Hay dos reglas principales para lograr la inseminación en el momento oportuno. La regla AM/PM ha sido utilizado tradicionalmente por los productores, si se observa a la hembra en calor durante la mañana deben de ser inseminada en la tarde cerca del anochecer.

La inseminación artificial en ganado bovino, es una actividad que consiste en depositar el semen en el cuerpo del útero de la hembra de forma manual en el momento más adecuado para obtener una alta probabilidad de que la hembra quede gestante en el mismo proceso de IA (Inseminación artificial), donde la participación del macho queda limitada.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL ÁREA EXPERIMENTAL

El siguiente trabajo investigativo se llevó a cabo durante 120 días en la ciudad de Babahoyo, en el área de Ganadería de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (FACIAG) perteneciente a la Universidad Técnica de Babahoyo, ubicada en el km 7 ½ de la vía Babahoyo – Montalvo de la Provincia de Los Ríos, a una altura 7 msnm cuya localización geográfica es 01° 47' 49" S latitud, una longitud 79° 32' 00" W, precipitación promedio anual de 1987.04 mm, con temperaturas promedios de 25°C¹.

3.2. MATERIAL GENÉTICO

El siguiente estudio fue realizado con 17 hembras bovinas con los siguientes cruces de razas Brown swiss, Holstein Friesian, Jersey y Brahman.

3.3. MATERIAL DE CAMPO

- Isopos
- Placas
- Guantes
- Papel
- Metanol
- Ácido acético
- Termómetro
- Alcohol

3.4. MATERIAL DE LABORATORIO

- Microscopio
- Placas
- Papel
- Tinción de giemza
- Agua destilada
- Alcohol

3.5. FACTORES ESTUDIADOS

Citología de células epiteliales vaginales y reflejos corporales.

3.6. MÉTODOS

Se utilizaron los métodos: inductivos-deductivos, deductivos-inductivos y el método experimental.

3.7. ANALISIS ESTADÍSTICO

Los datos se sometieron a un T-test y GLM del Sistema de Análisis Estadístico (SAS Institute, versión 9.4, Cary, NC, EE.UU.). Las diferencias entre las medias de los tratamientos se determinaron mediante el uso de pruebas de rangos múltiples de Duncan. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

3.8. MANEJO DEL ENSAYO

Se realizó la observación diaria de signos y síntomas de celo en las 17 hembras y la respectiva evaluación de frotis vaginal de cada una de ellas para correlacionar entre las células epiteliales vaginales cornificadas y el momento ideal para la inseminación artificial en función del estro. Los animales fueron colocados en la manga del corral para su evaluación y muestreo (Figura 5, A). La inseminación y monta natural se procedió a realizar cuando los niveles de células cornificadas se encontraban en mayor porcentaje, para la monta natural se utilizó un toro de raza Girolando (Figura 5, B).

3.8.1. Signos, Síntomas del Estro y Citología Vaginal

Los signos y síntomas de celo tales como las orejas erectas y presencia o descarga de moco. La recopilación de datos se llevó a cabo alrededor de las 07:00-8:30 AM por un período de 120 días. Al momento de evaluar, se anotaron los códigos de cada una de las hembras.

Con respecto a la citología vaginal, previamente se limpiaban las vulvas de los animales evaluados, con agua y se secaba con toallas limpias de papel. Para el muestreo se utilizó un hisopo seco estéril de 6 pulgadas, el cual se insertaba las tres cuartas partes en la cavidad vaginal, de tal manera que permitía alcanzar el epitelio vaginal de donde se extraían las células epiteliales. El hisopo se giraba suavemente 90° para recoger la muestra suficiente de células vaginales e inmediatamente se retiraba.

Inmediatamente se realizaba el frotis tomando el hisopo que contenía la muestra y se untaba haciendo un giro suave evitando deslizar sobre el portaobjeto de vidrio limpio y seco, pre-marcado con la identificación del animal, fecha y número de la placa. Dos portaobjetos con la muestra vaginal por cada animal fueron preparados. Para fijar las células epiteliales al portaobjeto, estos fueron sumergidos por 2 a 3 veces consecutivas en metanol puro y provocar la deshidratación de las células, e inmediatamente a una solución de ácido acético: metanol en una proporción de 1:3, durante al menos 10 segundos para permitir la adherencia de las células a la placa. La placa se dejó al aire libre para su secado por alrededor de 5 minutos.

Después del secado de las placas, las células vaginales se tiñeron con Giemsa por el periodo de 2 a 5 minutos, aplicándolo sobre la placa con un gotero hasta cubrir la superficie de la misma. Las placas fueron lavadas con una piceta que contenía agua

destilada, aplicando el chorro desde la parte superior, luego fueron secadas al aire. Las placas se observaron utilizando un microscopio compuesto, iniciando con el objetivo x20 y posteriormente con el objetivo x40. Sobre las placas teñidas se realizaron las lecturas de los estadios de las células epiteliales presentes. Se contabilizaron al menos 100 células por cada portaobjeto que al momento de la evaluación se clasificaron como parabasales, intermedias tempranas, intermedias, intermedias tardías, y cornificadas/queratinizadas.

3.8.2. Inseminación Artificial (IA) y/o Monta del Toro, Citología Vaginal y Diagnóstico de Preñez.

Después de monitorear 3 ciclos de estro, las hembras que fueron muestreadas y que reportaron altos porcentajes de células cornificadas, fueron inseminadas artificialmente y/o expuestas al toro cuando la inseminación no era posible. Para IA, se utilizaron dos orígenes de semen congelado. El primero de un Brahman rojo proporcionado por el Sr. Loren Olsen de la Hacienda Victoria ubicada en Bucay - Guayas y el segundo de raza Holstein proporcionado por el Dr. Ignacio Macías de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí (ESPAM-MFL). Una sola dosis de semen fue inseminada en los animales que presentaron altos porcentajes de células cornificadas. Al mismo tiempo se consideraron los signos y síntomas visuales que manifestaban las hembras. En la última etapa del estudio, se consideró confinar el toro conjuntamente con la hembra reportada con altos porcentajes de células cornificadas para verificar y confirmar la manifestación de estro. La inseminación fue realizada por dos especialistas que manejaban la técnica. El diagnóstico de preñez fue realizado a los 45 días, insertando la sonda conjuntamente con la mano, provista de un guante ginecológico vía rectal, el cual detectaba la fase de crecimiento del feto.

Los 11 animales que fueron inseminados y/o por monta natural se separaron en tres formas: Inseminadas considerando el porcentaje de células cornificadas, células cornificadas y presencia de reflejos corporales y por los reflejos corporales y secreción de moco. Las seis hembras restantes no fueron inseminadas y/o montadas debido a la ausencia del estro.

3.9.VARIABLES EVALUADAS

3.9.1. Presencia o Ausencia de Secreción de Moco Vaginal

Durante la toma de muestra de las células epiteliales vaginales se realizó la evaluación visual de la presencia o ausencia de moco vaginal. El moco evaluado tenía la característica cristalina y viscoso.

3.9.2. Reflejos Corporales

Los reflejos corporales fueron verificados observando el elevamiento de la cola y orejas erectas cuando se presionaba con la palma de la mano en el dorso y de esta manera comprobar si el animal estaba en celo.

3.9.3. Tipo de Células Epiteliales Vaginales

Para clasificar las células epiteliales vaginales, se utilizó el método descrito por Duran *et al.* (2015) utilizado en búfalos de agua y adaptado a este estudio. Las células fueron clasificadas como: Parabasales cuando las células son de tamaño pequeño con núcleo grande y ooplasma pequeño. Intermedias Temprana cuando el núcleo es grande, pero el ooplasma ha comenzado a expandirse en todas las direcciones. Intermedia cuando el núcleo de la célula se ha reducido en tamaño y el ooplasma que rodea el núcleo se ha expandido completamente. Intermedias Tardías cuando el núcleo se redujo significativamente en tamaño y el ooplasma está completamente expandido, y Cornificada o queratinizada cuando el núcleo está ausente y con ooplasma ampliado en gran medida. Los datos registrados fueron los porcentajes de las diferentes etapas de células epiteliales vaginales, tales como: parabasales, intermedias tempranas, intermedias, intermedias tardías, y cornificadas/queratinizadas, como se muestra en la Figura 6.

3.9.4. Diagnóstico de Preñez

El diagnóstico de gestación de las hembras servidas, ya sea de forma natural o por inseminación, se llevó a cabo mediante ecografía. El diagnóstico de gestación se realizó utilizando un ecógrafo de marca Imago 2.5, a los 45 días después de la inseminación artificial o monta natural.

IV. RESULTADOS

4.1. Signos, Síntomas del Estro y Citología Vaginal

En la Tabla 1, se describen los resultados obtenidos de la inseminación y/o monta natural realizada en los animales evaluados. De estos animales, once (64,7%, 11/17) fueron servidos a través de la inseminación artificial o por un toro y seis (35,3%, 6/17) no se inseminaron debido a la ausencia de signos clínicos o visuales del estro.

Cuando se consideraron la presencia de células cornificadas y los reflejos corporales, dos hembras (18,2%, 2/11), presentaron reflejos durante el estro y valores de > 40% de células cornificadas, combinadas con un alto porcentaje de células intermedias tardías con un valor de > 30% (Tabla 1), con esta información se confinaron las hembras en celo, montadas por el toro reproductor.

Con respecto a la observación de los reflejos corporales y secreción de moco, dos de los animales (18,2%, 2/11, código: 8217 y 8182) fueron servidas considerando los signos visuales de estro (reflejos corporales) y descarga de moco, sin embargo; los porcentajes de células cornificadas estuvieron en valores de <40% (Tabla 1).

4.2. Inseminación Artificial (IA) y/o Monta del Toro, Citología Vaginal y Diagnóstico de Preñez.

Conforme los resultados obtenidos que se presentan en la Tabla 1, considerando el porcentaje de células cornificadas, de los once animales; siete (63,6%, 7/11) mostraron > 60% de células cornificadas, mientras que las células intermedias se expresaron en porcentajes < 35%, razón por lo que se decidió la inseminación en seis de ellas y una fue confinada con el toro.

Tabla 1. Registro de reproducción y las razones de la inseminación de los animales utilizados en el estudio.

Razón de la inseminación y/o monta	Número de animales	Código del animal	Toro/IA	% Células Cornificadas	% Células Intermedias tardías	(%) Preñez	(%) No Preñadas
Considerando el porcentaje de células cornificadas	7(63.6) ^a	8167	IA-MAGAP	58.5	35.6	2(28.6) ^a	5(83.3)
		8202	IA-UTB ¹	68.4	10.5		
		8203	IA-MAGAP	61.2	09.0		
		8189	Toro	86.2	13.0		
		8195	IA-UTB ²	70.0	25.9		
		8180	IA-UTB ²	67.7	15.3		
		8191	IA-UTB ²	74.1	16.3		
Células cornificadas y presencia de reflejos corporales	2(18.2) ^b	8153	Toro	40.0	30.0	2(100) ^b	0
		8205	Toro	40.5	46.8		
Por reflejos corporales y secreción de moco	2(18.2) ^b	8217	IA-UTB ²	30.2	68.8	0(0.0) ^c	0
		8182	IA-UTB ² Y	26.0	27.9		
			Toro				
TOTAL	11					4 (36.4)	7 (63.6)

¹ Semen para IA proveniente de la granja del Sr. Loren Olsen, Bucay, Guayas, ² Semen procedente de la ESPAM, Calceta, Manabí.

Prueba de rangos múltiples de Duncan.

Los datos en la misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

De los animales que fueron concebidos (% Preñez), cuatro (36,4%, 4/11) quedaron preñadas de los cuales 2 (50,0%) eran de un grupo de animales inseminados considerando el porcentaje de > 50% de células cornificadas que presentaron al momento de la evaluación, resultando una tasa de preñez del 28,6% (2/7). Las otras 2 (50%) hembras preñadas fueron inseminadas basado tanto en el alto porcentaje de células cornificadas, como en el alto porcentaje > 30% de células intermedias, combinadas con los reflejos corporales, lográndose un 100% (2/2) en la tasa de preñez. Las hembras que fueron inseminadas considerando los reflejos corporales como referencia y la presencia de secreción mucosa, resultaron en un 0% de preñez (Tabla 1).

Los cambios diurnos en los patrones mostrados en los porcentajes de células cornificadas como resultado de las evaluaciones diarias en los animales utilizados en este estudio varían con la fluctuación ocasional. Cambios fluctuantes son observados a través del ciclo del estro con una onda distinta sobre los cambios en las diferentes etapas de células. El análisis exhaustivo sobre los cambios en las células vaginales que muestra ondas distintas, se llevó a cabo la inseminación artificial durante el aumento observado del porcentaje de las células cornificadas durante el tercer pico > 60% (Figura 1).

La Figura 2, muestra la fluctuación de las ondas más claramente del momento exacto en que se decidió a realizar la inseminación artificial o monta natural.

Las Figuras 1 y 2, muestran los cambios fluctuantes de la presencia de las células parabasales, intermedias temprana, intermedias e intermedias tardías y las cornificadas. Los patrones de onda sobre el incremento de las células cornificadas en los diferentes intervalos fueron notados antes de que se observe un pico distinto (flechas rojas, Figura4). Utilizando estos picos de la presencia de células cornificadas como referencia, ciclos estrales de entre 21 a 29 días, fue registrado en todos los animales con un promedio de 27,1 días. De los 11 animales que fueron evaluados diariamente, sólo cuatro (36,4%) mostraron una ocurrencia consistente de pico cornificación a 29 días de intervalo. El resto de hembras (63,6%) tuvieron una ocurrencia irregular de los picos de cornificación que fluctuaban desde 1 a 8 días, con una media de 4,4 días.

La Figura 3, muestra las diferentes etapas morfológicas de las células epiteliales vaginales observadas. En el día 0, día del estro, las células parabasales (A, flecha roja) están en la media de incidencia de 1,4%, siendo más prominentes en el día 1,

presentando valores de 43,1%; luego, se observa una disminución en el día 2 hasta el siguiente ciclo que aparecen en niveles de 1-9%. Posteriormente, las células intermedias (A, B, C, flechas amarillas, azules y verdes) dominan en el patrón de ondas. Antes del pico (> 60%) de las células cornificadas (D, flecha negra), las células vaginales que dominan (> 30%) son las células intermedias tardías (B,C, flecha verde) y éstas ocurren al menos entre 1 a 7 días antes del pico, con un promedio de 3 días.

En la Figura. 4 se presenta las células epiteliales vaginales dominantes antes, durante y después del estro en bovino.

La Tabla 1, presenta las referencias de preñez que resultaron en la determinación del tiempo óptimo para la inseminación artificial o monta en hembras bovinas. Los resultados mostraron que la preñez se logró cuando el estro fue determinado mediante el uso de la citología vaginal especialmente si se combinaba con los signos visuales del estro. El índice de cornificación de > 60% parece ser un buen indicador del estro en hembras bovinas. La inseminación artificial o monta natural realizada cuando el índice de cornificación es <35% resultó ser no beneficiosa. En este estudio se encontró que los signos visuales solamente, son indicadores pobres para la determinación del período evidente del estro. Estos signos fueron considerados para la inseminación artificial y/o monta; sin embargo, los resultados mostraron la no preñez de las hembras.

Tabla 2. Método práctico para determinar el momento óptimo para la inseminación artificial en hembras bovinas

Grupo de animales después de la IA/ toro y el diagnóstico de preñez	Referencia de IA/toro	N	Referencia de cornificación		IA/toro por cornificación	
			Intervalo después del último pico, días ± SD	Cornificación % ± SD	Intervalo de referencia de la cornificación Días ± SD	Cornificación %±SD
Preñadas	Citología vaginal	2	28	88.7	26	68.4
	Citología vaginal con signos visuales	2	21.7±12	79.6±13	20.5±11	61.7±4
No-preñadas	Citología vaginal	4	19.2±9	76.7±8	16.0±16	64.5±5
	Signos visuales	3	22.7±1	61.0±15	20.0±8	34.9±13

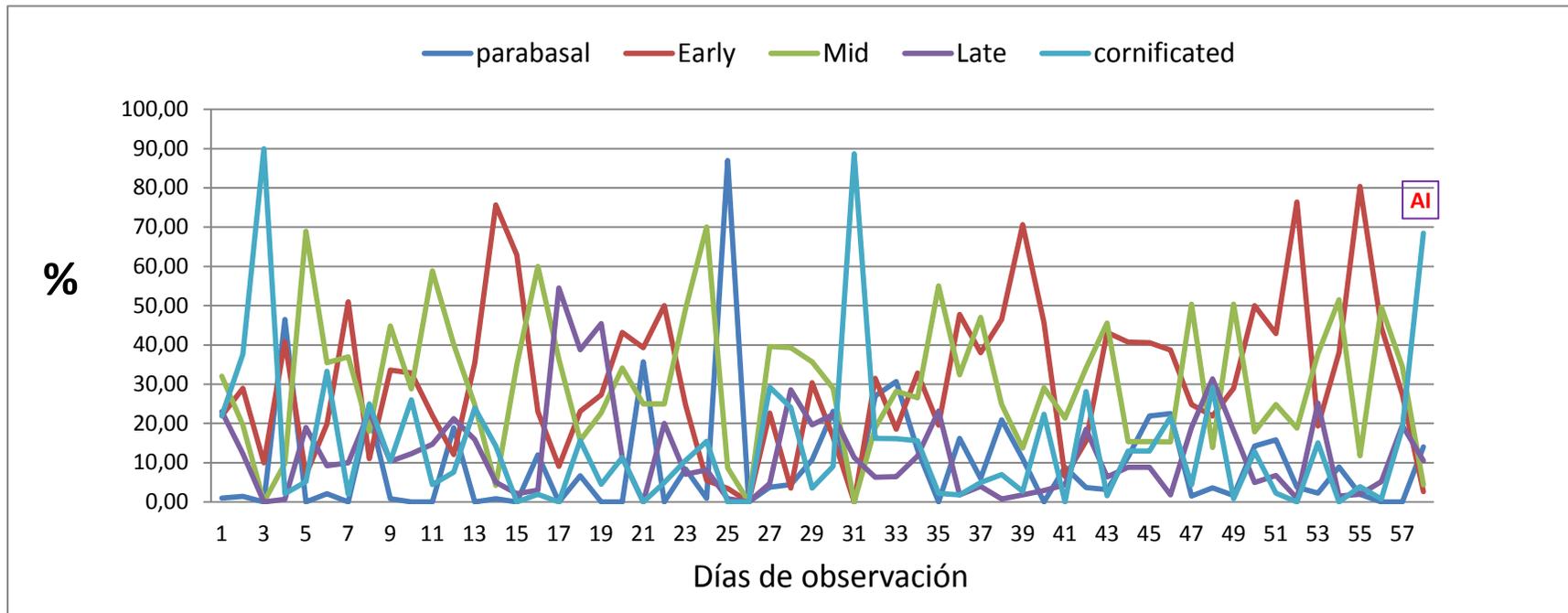


Figura 1. Cambios diarios en las células epiteliales vaginales de bovino, durante un periodo de observación de 60 días.

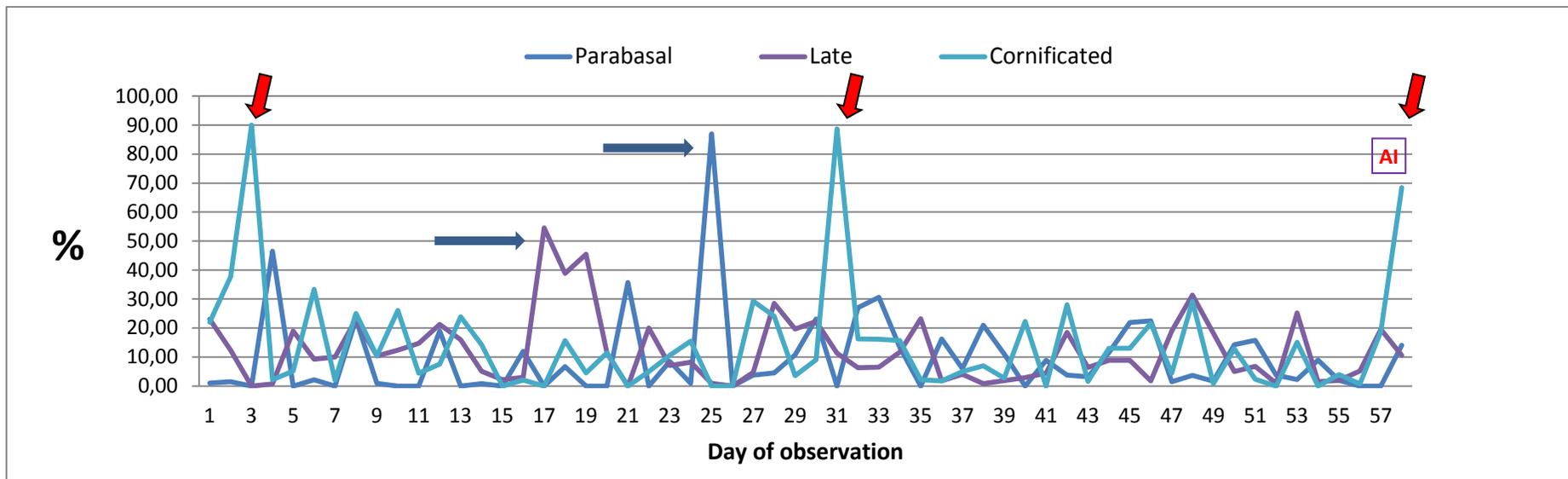


Figura 2. Cambios diarios en el porcentaje de células parabasales, intermedias tardías y cornificadas en hembras bovinas con baja condición corporal como indicador de la hora exacta para la inseminación artificial o monta natural.

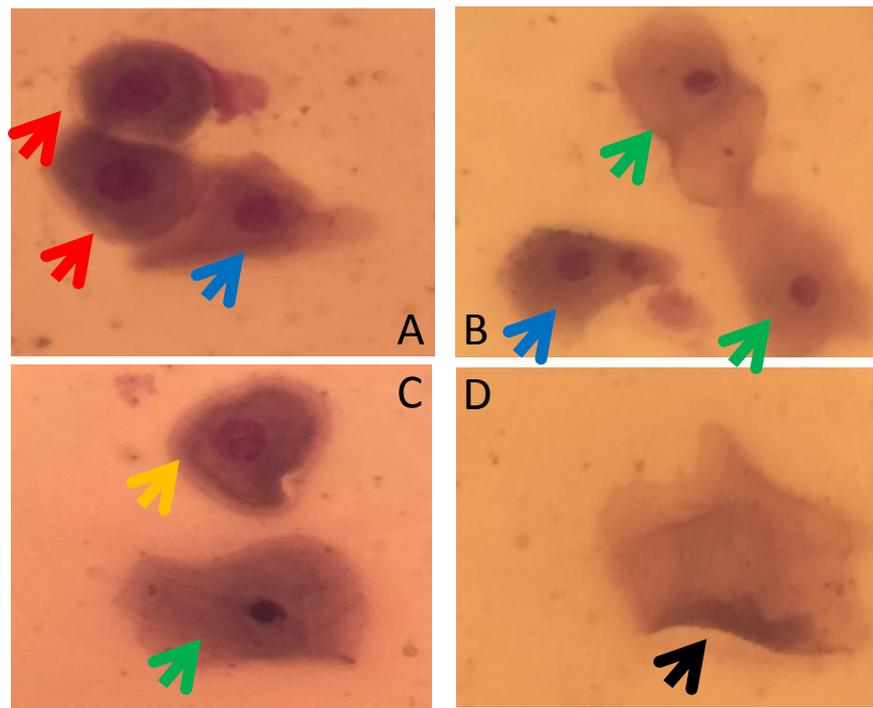


Figura 3. Cambios morfológicos en las células epiteliales vaginales en bovino, en diferentes estados del ciclo estral. Parabasales (A, en flecha roja), Intermedia temprana (C, flecha amarilla), intermedia (A,B, flecha Azul), intermedia tardía (B,C, flecha verde) y Cornificadas o queratinizadas (D, flecha negra).

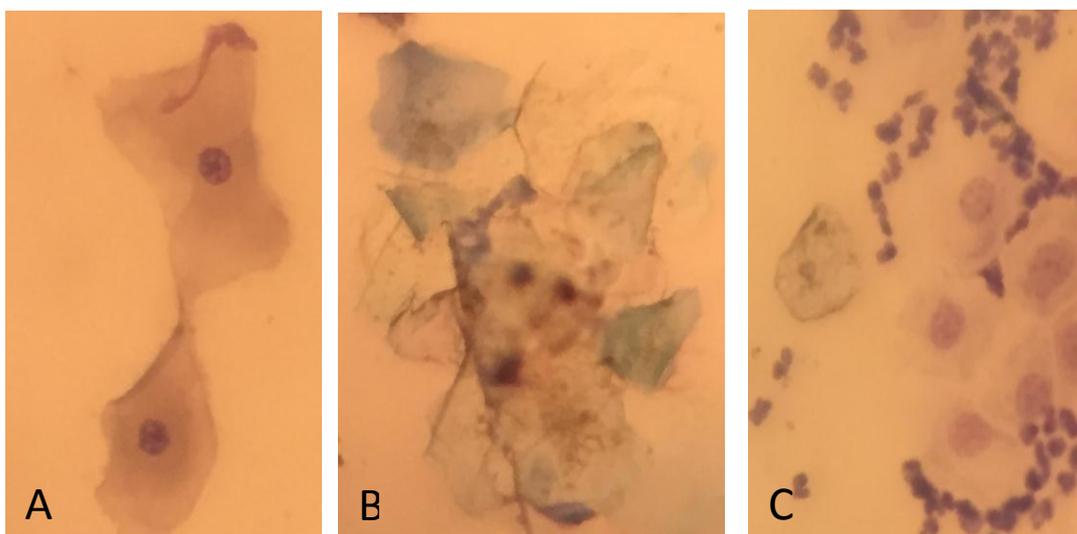


Figura 4. Las células epiteliales vaginales dominantes antes, durante y después del estro en bovino. A) Células en etapa intermedia tardía presentes en el día -7 al día -1 antes del estro. B) Células cornificadas o queratinizadas presentes durante el día del estro. C) Células parabasales con pocas cornificadas y con presencia de células sanguíneas, presentes en el día 1 después del estro.

La Tabla 3, presenta el índice de cornificación y el intervalo de días después que se observó el último pico de cornificación durante la IA y/o la monta del toro de los animales que fueron preñados y no preñados. Las hembras que presentaron anestro no fueron inseminadas y/o montadas, debido a la falta de porcentajes altos de cornificación que reportó el frotis vaginal. Las hembras que fueron artificialmente inseminadas o sometidas al toro tuvieron el mismo índice de cornificación e intervalos de días después de la observación del pico de la cornificación previa. Los animales en anestro tienen significativamente ($P < 0,01$) menor porcentaje de cornificación y tienen más largo el intervalo del estro.

Tabla 3. Índice de cornificación e intervalo de días después que se observó el último pico de cornificación durante la IA o la monta del toro de los animales preñados, no preñados y anestro.

Grupo de animales	Índice de cornificación,% \pm SD	Intervalo desde el pico de cornificación anterior, Días \pm SD
Preñadas	69.6 \pm 12.5	24 \pm 7.4
No-preñadas	68.6 \pm 13.8	23.7 \pm 2.0
Anestro	35.3 \pm 13.9	26.6 \pm 13.5

Cuando el resultado de la IA y el apareamiento del toro fueron evaluados en base a la edad, número de partos, la condición corporal, y período de días en post-parto, no hubo evidencia significativa de que estos parámetros influyeran en el éxito del resultado de reproducción, esto significa que otros factores pudieran estar implicados (Tabla 4).

Tabla 4. Edad de las hembras bovinas, número de partos, condición corporal, y el período post-parto en días de las preñadas, no preñadas, y en anestro.

Grupo de animales	Edad \pm SD	Número de Parto \pm SD	Condición corporal \pm SD	Período post-parto, días
Preñadas	5.9 \pm 4.0	3 \pm 2.8	2.4 \pm 0.5	221.25 \pm 169.8
No preñadas	3.4 \pm 0.53	1.1 \pm 0.38	2.5 \pm 0.4	241 \pm 152.1
Anestro	6.0 \pm 1.5	2.8 \pm 1.2	2.5 \pm 0.4	153 \pm 109.7

V. DISCUSIÓN

Los altos porcentajes de células cornificadas nos conducen a decidir el momento exacto de la inseminación artificial y/o monta, estos resultados concuerdan con Shille, (1989) y Wright, (1991) citado por (Sánchez & Rubilar, 2001) quienes realizaron un trabajo de investigación en hembras caninas, indicaron que la presencia de más de un 80% de células cornificadas observadas en frotis vaginales reproductivamente sanas son consideradas como estro.

La secreción de moco cervico-vaginal no es signo de que se obtenga la concepción utilizando inseminación artificial y/o monta natural, estos resultados concuerdan con lo expresado por (Díaz de Ramírez & Beloso, 2002) los mismos que mencionan que la descarga de moco cervico-vaginal no es un indicador para realizar la inseminación artificial, ya que es una condición que no se expresa en todas las hembras.

Con respecto a los resultados obtenidos cuando se evaluó la condición corporal, probablemente la pobre condición corporal que tenían los animales < 3.0 (en escala de 1 a 5) durante el tiempo de evaluación es una de las razones de la manifestación anormal del estro e incluso provocar anestro en los animales. Estos resultados coinciden con la investigación realizada por los autores Houghton, Lemenager, Horstman, & Hendrix., (1990), citado por (Madrigal, Colín, & Hallford, 2001) quienes han encontrado que las hembras bovinas con condición corporal < 3.0 (en escala de 1 a 5) presentan un periodo de anestro posparto de 28 a 58 días más largo que el de las hembras con condición corporal > 3.0 .

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- La técnica de citología vaginal es eficiente en mostrar los estadios de las células epiteliales vaginales a lo largo del periodo del estro en las hembras bovinas.
- La presencia de células cornificadas mayor del 40% combinada con células intermedias tardías con un promedio superior al 30% y los reflejos corporales se determina el momento óptimo para la inseminación artificial.
- La presencia moco y signos visuales no son indicadores suficientes para poder determinar el momento óptimo de la inseminación artificial.

RECOMENDACIONES

Las variaciones de los datos registrados con respecto a la fluctuación de los porcentajes de las células epiteliales vaginales a lo largo de los ciclos evaluados es debido a la baja condición corporal por balance negativo nutricional presente en el hato ganadero.

Se recomienda que se realice nuevos estudios utilizando hembras en mejores condiciones medio ambientales y nutricionales.

VII. RESUMEN

En Ecuador la técnica de inseminación artificial es utilizada por los ganaderos; sin embargo, la baja eficiencia de la misma provoca que menos animales se preñen anualmente, traduciéndose en baja producción de leche y carne. Este estudio tuvo como objetivos, determinar el cambio morfológico de las células del epitelio vaginal como indicador del tiempo exacto para la inseminación artificial y definir un método práctico para la determinación del tiempo óptimo de inseminación artificial en hembras bovinas. En los predios del área de Ganadería de la Universidad Técnica de Babahoyo, por un periodo de 120 días se realizó un estudio utilizando 17 hembras bovinas, tomando como factores las variables de: citología de células epiteliales vaginales, signos y síntomas del estro y porcentajes de preñez después de la inseminación artificial y/o monta natural.

Esto con la finalidad de determinar el método para la identificación del momento óptimo de la inseminación artificial considerando los porcentajes de células cornificadas del epitelio vaginal en hembras bovinas. Utilizando un microscopio compuesto, se realizó la evaluación de las placas que contenía el frotis vaginal, la misma que permitió la clasificación de células como parabasales, intermedias tempranas, intermedias, intermedias tardías, y cornificadas/queratinizadas; por lo cual fue considerado el mayor porcentaje de las células epiteliales vaginales cornificadas para el momento óptimo de la inseminación artificial y/o monta natural.

Los resultados indicaron que la técnica de citología vaginal fue muy clara en mostrar los estadios de las células epiteliales vaginales a lo largo del periodo del estro en las hembras bovinas. También, considerando las células cornificadas presentes en altos porcentajes, es posible obtener hasta el 30% de preñez. La presencia de células cornificadas >40% combinadas con un alto porcentaje de células intermedias tardías >30% y los reflejos corporales más el confinamiento con el toro reproductor se logra un 100% de preñez. La presencia de los signos visuales solamente no son indicadores para la determinación del período del estro, ya que cuando fueron considerados para la inseminación artificial y/o monta; las hembras no se diagnosticaron preñadas. Por irregularidad de los datos registrados con respecto a la fluctuación de los porcentajes de las células epiteliales vaginales causados probablemente por la condición corporal de los animales, se recomienda establecer nuevos estudios utilizando hembras con buena condición corporal.

SUMMARY

In Ecuador, the artificial insemination technique in bovine is used by farmers; however, the low efficiency causes fewer pregnant animals annually, resulting in low production of milk and meat. This study aimed to determine the morphological changes of vaginal epithelium cells as an indicator of the exact time for artificial insemination and define a practical method for determining the optimum time for artificial insemination in bovine females. In the livestock area of the Universidad Técnica de Babahoyo, during a period of 120 days, a study using 17 females cattle was performed, using as factors variables as: cytology of vaginal epithelial cells, signs and symptoms of estrus and pregnancy rates after artificial insemination and / or natural service.

This in order determine the method for identifying the optimal timing of artificial insemination based on the percentage of cornified vaginal epithelial cells in bovine females. Using a compound microscope, the evaluation of the slides containing the vaginal smear was performed, allowing to evaluate the presents cells and categorizing it as parabasal, intermediate early, middle, late intermediate, and cornified / keratinized; so it was considered the highest percentage of cornified vaginal epithelial cells for the optimal timing of artificial insemination and / or natural service. The results indicated that the smear technique was very clear in showing the stages of vaginal epithelial cells throughout the period of estrus in bovine females.

Also, considering the cornified cells present in high percentages, it is possible to obtain up to 30% pregnancy rate. The presence of cornified cells > 40% combined with a high percentage of late intermediate cells > 30% and the body reflexes confinement with breeding bull 100% pregnancy rate is achieved. The presence of visual signs are not only indicators for determining the period of estrus, since when were considered for artificial insemination and / or mounted; females were diagnosed not pregnant. Due to the irregularity of the recorded data with respect to the fluctuation of the percentage of vaginal epithelial cells, probably caused by the body condition of the animals, it is recommended to establish new studies using females with good body condition.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aguayo, H. (27 de Mayo de 2015). <http://fedegan.ec/situacion-actual-de-la-ganaderia-ecuatoriana-y-la-propuesta-de-fedegan-para-su-sostenibilidad/>. Recuperado el 10 de 12 de 2015, de <http://fedegan.ec/suscribete-a-nuestro-boletin/>
- Bespin, A., Rivero, I., & Morgado, A. (2007). Historia y uso de la inseminación artificial en la Agropecuaria “La Fundación”. *I Simposio: Tecnologías apropiadas para la ganadería de los llanos de Venezuela.*, (págs. 145-176). Guárico.
- Catalano, R., & Callejas, S. (2001). Detección de celo en bovinos, factores que la afectan y métodos de ayuda. *REVISTA DE MEDICINA VETERINARIA*, 82, 17-22.
- Correa Orozco, A., & Uribe Velásquez, L. F. (2010). La Condición Corporal Como Herramienta Para Pronosticar el. *Fac.Nal.Agr.Medellín*, 63(2), 5607-5619.
- Dejarnette, M., & Nebel, R. (s.f.). Anatomía y Fisiología de la Reproducción Bovina. *Select Reproductive Solutions*, 1-6.
- Díaz de Ramírez, A., & Belloso, E. (2002). Conducta sexual y signos del celo en ganado mestizo de doble propósito. *Revista científica*, XII(2), 431-433.
- Duchens, M., & De los Reyes, M. (01 de 2012). *CICLO ESTRAL DE LA HEMBRA BOVINA*. Recuperado el 04 de 01 de 2016, de <http://www.reproduccionanimal.net>
- Duran, P., Corpuz, H. K., Gaspar, D. C., Misola, C. M., Munar, M. P., & Hufana-Duran, D. (2015). Non-invasive clinical diagnosis of estrus for AI synchronization using vaginal cytology in three bubaline breeds in the Philippines. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(1), 562-567.
- Escobedo H., W. S. (2008). *Diagnóstico del celo por medio de citología vaginal en perras*. UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA - FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA - ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA , Guatemala.
- Houghton, P., Lemenager, R., Horstman, L., & Hendrix. (1990). Effects of body composition, pre- and postpartum energy level and early weaning on reproductive performance of beef cows and preweaning calf gain. *J animl sci*, 1328-1446.
- Houghton, P., Lemenager, R., Horstman, L., Hendrix, K., & Moss, G. (1990). Effects of body composition, pre- and postpartum energy level and early weaning on reproductive performance of beef cows and preweaning calf gain. *Journal of Animal Science*, 68(5), 1438-1446.

- Iñiguez, F. (2014). Fundamentos fisiológicos de la sincronización de la ovulación para IATF en la vaca. *Bovinos Info al día*, 10. Recuperado el 23 de Septiembre de 2015
- Islas, E., & Gutierrez, J. d. (2015). *Manual de Prácticas de Reproducción Animal Asistida*. Recuperado el 15 de abril de 2015, de www.uaa.mx:
<http://www.uaa.mx/centros/cca/MVZ/M/7/Manualdepracticass32-1531.pdf>
- López L., M. V. (2011). *EVALUACIÓN DE FECUNDIDAD EN VACAS HOLSTEIN FRIESIAN INSEMINADAS A DIFERENTES TIEMPOS DEL UMBRAL DETECTADO POR EL SISTEMA HEATIME*. SANGOLQUI - PICHINCHA: ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO.
- Madrigal, M., Colín, J., & Hallford, D. M. (2001). Influencia de la condición corporal y la bioestimulación sobre la eficiencia reproductiva en vacas de raza Simmental en agostadero. *Veterinaria México*, 32(2), 87-92.
- Mansilla G., E. A. (2008). *INDUCCIÓN DE ESTRO Y OVULACIÓN EN PERRAS (Canis lupus familiaris) MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE EXTRACTO HIPOFISIARIO EQUINO (HAP) DESCRIPCIÓN CITOLÓGICA Y CLÍNICA*. Valdivia - Chile.
- maria, c., & caoello suarez, m. e. (2013).
- Prats Esteve, A. (02 de 2001). Citología vaginal y examen del esperma. *XVIII CONGRESO ANUAL. 277. CITOLOGIA VAGINAL.*, (págs. 277-288). Recuperado el 13 de 10 de 2015, de Citología vaginal y examen del esperma:
http://www.advanceveterinary.com/Amvac00_02/2001/seminario03.pdf
- Ramírez, L., & Vieras, F. B. (2006). CONOZCA LA CONDUCTA SEXUAL Y EL CELO DE SUS VACAS . *Mundo Pecuario*, 2(2), 23-26.
- Rippe, C. A. (2009). Ciclo estral. *Dairy Cattle Reproduction Conference*, (págs. 111-116).
- Rivera, H. (2009). REVISION ANATOMICA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LAS VACAS. *2009 Dairy Cattle Reproduction Conference*, (págs. 103-109).
- Sánchez, A., & Rubilar, J. (. (2001). Obtención de cachorros mediante inseminación artificial con semen canino refrigerado. *Archivos de medicina veterinaria*, 33(1), 105-110.
- SCR Engineers Ltd. (2006). *Manual de Instalación Heatime Versión 3.1*. ISRAEL.
- Stornelli, M. A., Savignone, C., Tittarelli, C., & Stornelli, M. C. (2006). Citología Vaginal en caninos: Metodología y Aplicaciones Clínicas. *Veterinaria Cuyana*, 1, 15-19.

- Wagner, J., Lusby, K., Oltjen, J., Rakestraw, J., R.P, W., & WaltersL.E.: (1988).
Carcass composition in mature Hereford cows: estimation and effect on daily
metabolizable energy requirement during winter. *Journal of Animal Science*,
66(3), 603-612.
- Wettemann2, P., Lents, C. A., Ciccioi, N. H., White, F. J., & Rubio, I. (08 de agosto de
2002). Nutritional- and suckling-mediated anovulation in beef cows1. *Journal of
Animal Science*, 81(14), 48-59.

ANEXOS

Tabla 5 Perfil de los 17 animales utilizados para determinar los cambios diurnos de las células epiteliales vaginales.

Código	Edad (años)	Número de partos	Días post parto	Raza	Condición Corporal	Breeding result
8183	4.5	2	90	Brown Swiss	2.5	AE
8189	3.0	1	121	Brown Swiss	2.5	NP
8191	3.5	1	369	Brown Swiss	2.5	NP
8195	2.5	1	85	Brown Swiss	2.0	NP
8167	7.0	3	213	Brown Swiss	3.0	NP
8180	3.5	1	76	Brown Swiss	3.0	NP
8205	3.0	1	86	Brown Swiss	2.5	Pregnant
8211	4.0	1	331	Brown Swiss	2.0	AE
8182	4.0	1	459	Brown Swiss	3.0	Pregnant
8153	11.0	7	463	Brown Swiss	2.0	Pregnant
8162	7.5	4	72	Brown Swiss	2.0	AE
8173	6.5	3	62	Brown Swiss	2.5	AE
8203	4.0	2	335	Jersey	2.0	AE
8213	6.0	3	118	Jersey	3.0	NP
8161	7.5	4	245	Holstein	3.0	NP
8217	2.5	1	123	Holstein	2.0	AE
8202	3.5	1	244	Holstein	2.5	Pregnant



Figura 5 Animales utilizados en el ensayo: Hembras dispuestas en columna dentro de la manga para la toma de muestras de células epiteliales vaginales (A); Reproductor utilizado en el ensayo para la monta natural (B).

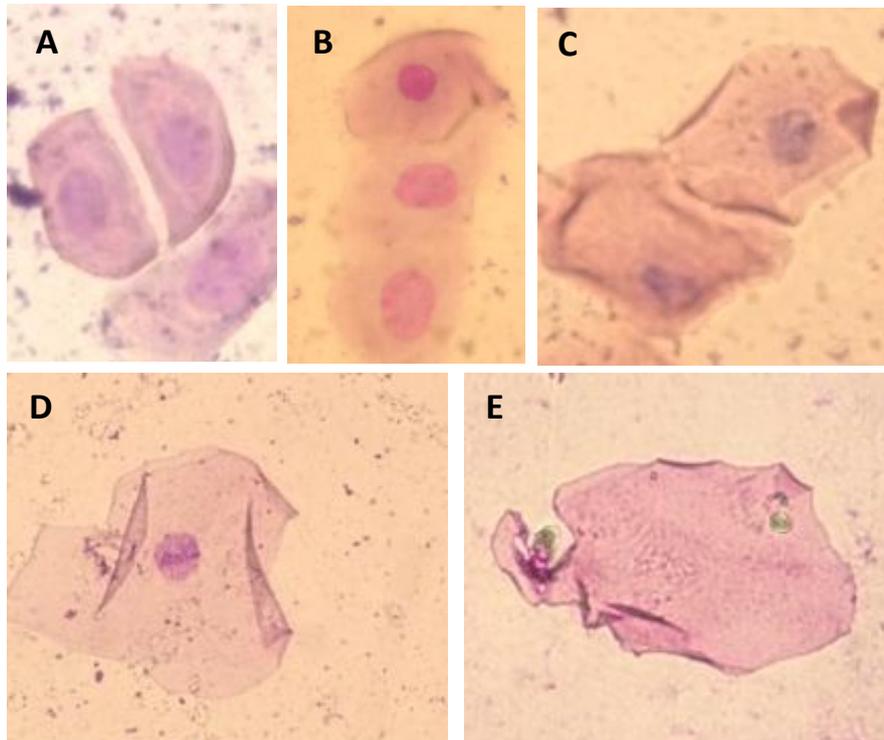


Figura 6. Células epiteliales vaginales en bovino. A) Células Parabasales, B) intermedias tempranas, C) Intermedias, D) Intermedias tardías y E) Cornificadas/queratinizadas (Fotos provistas por la Dra. Danilda Hufana – Duran).



Figura 7. Citología Vaginal en hembras bovinas: Frotis vaginal (A), Adherencia de la muestra en el portaobjeto (B), Tinción de la placa con giemsa (C) y observación de la muestra en un microscopio compuesto y registro de las células epiteliales vaginales (D).



Figura 8. Inseminación artificial y/o monta natural: Tanque de nitrógeno líquido que contenía las pajuelas de semen (A), inseminación artificial (B), monta del toro reproductor (C).



Figura 9. Diagnóstico de preñez: Marca del ecógrafo (A), diagnostico de gestación mediante ultrasonido por la vía transrectal (B), ecografía (C).