

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

Colegio en Ciencias Agropecuarias

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Maestría en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

“Evaluación del efecto de diferentes métodos de desinfección y la reutilización de un dispositivo intravaginal a base de silicona (CIDR) sobre la microbiota vaginal.”

Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA:

JESUS ANTONIO CEBALLOS RUBIO

DIRECTORA:

DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

CO-DIRECTORA:

DR. MIGUEL ÁNGEL RODRÍGUEZ GAXIOLA

ASESORES:

DRA. NOHEMÍ CASTRO DEL CAMPO

DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

MC. JAIME ELEAZAR BORBOLLA IBARRA

Culiacán, Sinaloa, México; a Enero de 2020

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **Jesus Antonio Ceballos Rubio**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTORA

DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

CODIRECTORA

DR. MIGUEL ÁNGEL RODRÍGUEZ GAXIOLA

ASESORA

DRA. NOHEMÍ CASTRO DEL CAMPO

ASESOR

DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

ASESOR

DR. JAIME ELEAZAR BORBOLLA IBARRA

CULIACÁN, SINALOA, a Enero de 2020.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL FUERTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 20 de enero del año 2020, la que suscribe Jesús Antonio Ceballos Rubio, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 17594545, de la Unidad Académica Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho y del Dr. Miguel Angel Rodriguez Gaxiola y cede los derechos del trabajo titulado “Evaluación del efecto de diferentes métodos de desinfección y la reutilización de un dispositivo intravaginal a base de silicona (CIDR) sobre la microbiota vaginal”, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE

Jesús Antonio Ceballos Rubio

Contenido Pagina

ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. Revisión de literatura	3
2.1 Introducción y contexto de la producción caprina.	3
2.2 Sistemas de producción de caprinos.	3
2.2.1 Sistemas Extensivos	3
2.2.2 Intensivos	3
2.2.3 Semi-intensivos	4
2.3 Producción caprina en México.	4
2.4 Fisiología reproductiva de la cabra	5
2.4.1 Pubertad caprina	5
2.4.2 Ciclo reproductivo de la cabra	6
2.4.3 Desarrollo y dinámica follicular	7
2.4.4 Proceso y mecanismo de la ovulación	9
2.4.5 Formación del cuerpo lúteo	9
2.5 Anestro estacional y el fotoperiodo.	10
2.6 Control de la reproducción	12
2.7 Métodos de inducción y sincronización del estro	13
2.7.1 Métodos naturales	14
2.7.2 Métodos farmacológicos	17
2.8.1 La microbiota normal	24
2.8.2 Microorganismos que forman parte de la microbiota.	25
2.8.3 Consecuencias del rompimiento de la homeostasis vaginal	27
2.8.4 Efecto de la utilización de CIDR en el microcosmos vaginal	27
2.9 Tratamientos utilizados para la reutilización del CIDR	28
2.9.1 Metodos de esterilización	28
2.9.2 Metodos de desinfección	30
III. HIPÓTESIS	32
IV. OBJETIVOS	32
4.1 Objetivo general.	32
4.2 Objetivo específico.	32
V. MATERIALES Y MÉTODOS	32

VI. Resultados y Discusiones	36
VII Conclusiones	40
VIII. LITERATURA CITADA	42

I. INTRODUCCIÓN

En las unidades de producción de carne el número de animales comercializados por año es el principal factor que determina la rentabilidad de la empresa, lo cual depende, en gran medida, de la eficiencia reproductiva del rebaño (Partida *et al.*, 2013). Las cabras son animales poliestrónicos estacionales, teniendo en cuenta esto, los implantes de progestágeno intravaginal se utilizan con frecuencia para la inducción del estro o la sincronización, lo que puede permitir una mejor planificación de la gestión reproductiva y son cruciales para la inseminación a tiempo fijo (Amiridis y Cseh, 2012).

Los dispositivos intravaginales son producidos a base de poliuretano y/o en un molde de silicona, donde contiene progesterona natural o sintética. Existen diferentes variantes de dispositivos intravaginales liberadores de hormonas, entre los que se encuentran básicamente 2 grupos, las esponjas de poliuretano de alta densidad y los dispositivos compuestos a base de silicona. Las esponjas son impregnadas con acetato de medroxiprogesterona (MAP) o acetato de fluorogestona (FGA); y los dispositivos de silicona son impregnados con progesterona (CIDR, Cronipres CO, DICO), los cuales varían en tamaño, forma y número de veces que pueden reutilizarse (Manes y Ungerfeld, 2015).

El uso de dispositivos intravaginales, independientemente de su composición (silicona o poliuretano), puede generar cambios en la flora bacteriana normal del moco vaginal (Manes *et al.*, 2010). Esto debido a la acción física, a la constante absorción y retención de secreciones vaginales (AL-Hamedawí *et al.*, 2003), así como también al efecto inmunosupresor de los progestágenos presentes en los dispositivos (Lewis, 2003).

La flora vaginal aislada normalmente en ovejas y cabras es Gram positiva, predominando las especies del género *Bacillus* spp. Al retirar los dispositivos (esponjas o dispositivos de silicona) la flora predominante cambia a Gram negativa, prevaleciendo las Enterobacterias, siendo *Escherichia* spp. la especie aislada con

mayor frecuencia (Manes et al., 2010). Así como, ya se informó del aislamiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococo* sp. y *Listeria* sp. (Shallali et al., 2001).

Cuando es retirado el implante, se observan comúnmente signos clínicos de vaginitis, así como una descarga vaginal mucopurulenta (Penna et al., 2013). La presencia de secreción purulenta y descargas vaginales anormales fétidas han sido relacionadas con la alta incidencia de óvulos no fertilizados en animales inseminados y superovulados artificialmente, con alteración de desarrollo embrionario y las tasas de embarazo reducidos, embriones poco después transferidos (Scudamore, 1988).

Hoy en día, existe una amplia literatura sobre el efecto sobre la microbiota vaginal ocasionado por el uso de estos dispositivos intravaginales, sin embargo, es poca la información obtenida hasta el momento sobre los efectos negativos en la reutilización de CIDR, a pesar de ser una práctica muy común por los ganaderos para el ahorro de costos de producción.

II. Revisión de literatura

2.1 Introducción y contexto de la producción caprina.

Los caprinos han jugado un papel de suma importancia en el abastecimiento de carne a nivel mundial, ya que amplios núcleos poblacionales en países en desarrollo dependen de estas especies para su alimentación. En el 2012, se estimó que más del 90% de la carne caprina producida en el mundo proviene de países en desarrollo, en el que destacan los países asiáticos con más del 50% de la producción, sobresaliendo los países como China, India, Pakistán, Nigeria y Bangladesh, entre otros (FAO, 2014).

Los alimentos de origen caprino tiene una gran importancia en la nutrición rural de los países y zonas más pobres, especialmente en poblaciones de riesgo (niños y mujeres embarazadas o en lactancia), aportando a través de sus principales productos y derivados como la carne, la leche y la sangre, proteínas de alto valor biológico. El incremento acelerado en el inventario caprino en el mundo que se ha observado en los últimos 25 años particularmente en países pobres, indican que esta especie animal es una alternativa importante para cubrir las necesidades de alimentación de una creciente población humana (FAO, 2014).

2.2 Sistemas de producción de caprinos.

2.2.1 Sistemas Extensivos

Este sistema de producción requiere de grandes extensiones de terreno ya que las cabras se alimentan pastoreando a voluntad en forma semi-nómada o sedentaria. Presenta la ventaja de abaratar costos en alimentación e instalaciones pero generalmente sus rendimientos productivos son menores (Aréchiga *et al.*, 2008).

2.2.2 Intensivos

Este sistema requiere de instalaciones para una producción estabulada, y de la provisión de concentrados alimenticios de gran valor proteico y energético. Presenta la desventaja de requerir mayores costos pero facilita el manejo de los animales y

se obtienen mejores índices productivos en producción de carne y leche (Aréchiga *et al.*, 2008).

2.2.3 Semi-intensivos

Este sistema representa una combinación de los dos anteriores. Los animales pastorean y ramonean y en la tarde-noche los animales se estabulan y se les proporciona un suplemento alimenticio. Requiere la inversión en instalaciones y alimentos concentrados. Generalmente, presenta mejores rendimientos productivos que en el sistema extensivo (CEA, 2001 ; MEA, 1990).

Los sistemas de producción caprina, están sufriendo cambios importantes, debido en parte a la adaptación que requieren hacia las nuevas prioridades en la calidad de los productos, así como rentabilidad por los cambios necesarios en la estructura y sistema de explotación, muy relacionados con las bruscas variaciones en precios de materias primas y productos, y con un control cada vez más exhaustivo del bienestar animal (Aréchiga *et al.*, 2008).

2.3 Producción caprina en México.

En 2012, de acuerdo a datos de la FAO, México tuvo un total de 2.4 millones de animales sacrificados, con lo que se ubicó en el vigésimo noveno lugar en cuanto al número de cabezas en este rubro, las cuales representaron el 0.5% del total mundial; en cuanto a la producción de carne en canal, en ese mismo año, México ocupó el vigésimo lugar a nivel mundial, produciendo un total de 41.5 mil toneladas métricas, con lo que contribuyó con el 0.8% del total mundial (FAO, 2014).

En cuanto al destino de los alimentos derivados de las cabras, se estima que alrededor del 75% de los caprinos en el país se crían extensivamente para la producción de carne, mientras que la producción de leche es ocasional. La leche caprina representa el 5% de la producción láctea nacional, de la cual una alta proporción se destina a la industria de dulces, quesos y otros productos (Hernández, 2000).

En el 2012 se tenían aproximadamente 8.7 millones de cabezas, de las que poco más del 50% fueron aportados por los estados de Puebla, Oaxaca, Coahuila, Guerrero y San Luis Potosí; mientras que los Estados que ocuparon los últimos lugares fueron para ese mismo año Campeche, Quintana Roo, Tabasco, Yucatán y Distrito Federal, quienes reportan niveles muy bajos o insignificantes relacionados a tal producto (SIAP, 2014).

2.4 Fisiología reproductiva de la cabra

2.4.1 Pubertad caprina

Uno de los factores importantes para determinar el rendimiento de la producción durante toda la vida en la cabra es la pubertad (Greyling, 2010), siendo este un proceso donde la cabra va adquirir su competencia reproductiva y este inicio va depender de la capacidad de las neuronas del hipotálamo en poder generar a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en niveles suficientes para promover y apoyar la gametogénesis, esteroidogénesis y el desarrollo de los 7 tejidos reproductivos (Senger, 2012). Este cominezo en la pubertad de las cabras se encuentra influenciada por factores genéticos, medio ambientales y sociales, tales como la nutrición, el peso corporal, el tipo y época de nacimiento, el fotoperiodo y el efecto macho; debido a esto, la edad en que se presenta el primer celo es muy variada entre las razas de cabras y entre ellas mismas (López, 2005).

En el hipotálamo, esta maduración implica tanto de una neurogénesis como de una sinaptogénesis; y donde sustancias como el opioide, la catecolamina, la prostaglandina, la serotonina y especialmente la melatonina, logran tener participación tanto en la estimulación como inhibición de ciertos núcleos neuronales, que al mismo tiempo controlan la producción y secreción de GnRH (Romero y Meneses, 2001). La hormona leptina, la cual se encuentra producida por las células grasas, logran tener una función relevante en el envío de señales nutricionales al cerebro en los mamíferos, además logra ser supuestamente un factor permisible del

inicio de la pubertad; esta expresión y secreción de leptina se va encontrar relacionada con la presencia de grasa corporal en el organismo, la cual es muy afectada por la alimentación (Senger, 2012).

En general, un indicador de que las cabrillas han logrado alcanzar la pubertad es su peso corporal, donde la actividad reproductiva se inicia cuando estas han alcanzado un peso corporal de 35 a 45 kg (Greyling, 2010; Villanueva, 2008), y esto ocurre entre los seis y 12 meses de edad, dependiendo del sistema de explotación (Jainudeen et al., 2002). En cabras Saanen generalmente el inicio de su pubertad es alrededor de los 217 días (siete meses) de vida (Greyling, 2010). Es importante saber que cabra joven o cabrilla no debería de ser utilizada para la reproducción antes de que esta logre alcanzar un 60 – 70 % de su peso corporal adulto, o hasta los siete meses de edad, ya que una monta prematura retardará el crecimiento y desarrollo de la cabra y el feto (Gutiérrez et al., 2008; López, 2006; Bonilla, 2001).

2.4.2 Ciclo reproductivo de la cabra

El ciclo estral comprende todos aquellos cambios morfológicos y fisiológicos que se producen en el ovario y en el tracto genital de la hembra no gestante, que desencadenan la expresión del celo, la ovulación, la posible fecundación y posterior implantación del embrión (Fatet et al., 2011). Estos cambios se suceden de forma regular durante los periodos de actividad sexual cíclica correspondientes a la estación reproductiva (Chemineau y Delgadillo, 1994).

En el curso de la estación reproductiva, la cabra presenta ciclos estrales con una duración variable, alrededor de 21 días, que se asocia generalmente con una ovulación que se produce de 30-36 horas después del inicio del estro (González-Stagnaro et al., 1993). Se entiende por ciclo sexual el intervalo de tiempo entre la sucesión de dos celos o dos ovulaciones. Una característica que se observa en esta especie es la aparición de ciclos cortos (de 3 a 9 días) al inicio de su estación reproductiva (Chemineau et al., 1992a).

El ciclo estral se divide en dos fases: la fase folicular que se corresponde con las fases de proestro y estro, y la fase luteal que se corresponde con el metaestro y el

diestro. El proceso ovulatorio sucede a los cambios morfológicos (crecimiento y reclutamiento folicular), bioquímicos (maduración folicular) y funcionales (regulación endocrina) que se desencadenan en el ovario (Evans y Maxwell, 2003).

El celo se manifiesta en la cabra por un incremento en su actividad física, así como pequeñas descargas de mucus por la vagina, agitaciones constantes de la cola, aumento en la frecuencia de micción y enrojecimiento de la vulva (BonDurant, 1981). El comportamiento de celo se divide en dos fases: atracción del sexo opuesto o proceptividad y receptividad (Beach F.A., 1976). La primera consiste en la búsqueda y estimulación del macho por parte de la hembra, y en la segunda se produce el reflejo de inmovilización de la cabra como respuesta al estímulo por parte del macho, lo que induce a la monta y a la cópula (Fabre-Nys, 2000).

2.4.3 Desarrollo y dinámica folicular

Los ovarios sufren cambios morfológicos (reclutamiento y crecimiento folicular), bioquímicos (maduración del folículo ovárico) y fisiológicos (regulaciones endocrinas) en el ciclo estral, los cuales conllevan a la ovulación (Fatet et al., 2011). En este proceso el desarrollo folicular evoluciona de forma ondulatoria a lo largo del ciclo estral (Figura 2), donde una onda folicular, la cual emerge cada cuatro a seis días (Cruz et al., 2005), se caracteriza por la presencia de eventos dependientes de gonadotropina en el crecimiento folicular, las cuales son el reclutamiento, la selección y la dominancia folicular (Driancourt, 2001). El ciclo estral se va a encontrar comprendido por dos grandes fases, dependiendo de las estructuras ováricas predominantes, que son la fase folicular y la fase luteal (Gutiérrez et al., 2008).

La fase folicular inicia con la regresión del cuerpo lúteo y finaliza con la ovulación, donde el esteroide gonadal dominante es el estradiol y tiene una duración de 4 a 5 días (Fatet et al., 2011). Durante esta fase la adenohipófisis secreta la FSH, la cual estimula el crecimiento folicular ovárico (Morello y Chemineau, 2004) y se encuentra regulada por la inhibina (Simões, 2015). Durante la fase folicular se recluta un grupo de folículos antrales, dependientes de gonadotropina, de 2 a 3 mm (milímetros) de

diámetro, y estos ingresan a su crecimiento terminal, donde solo dos o tres de estos folículos alcanzan los 4 mm de diámetro y se seleccionan para luego entrar en la fase de dominancia folicular. Bajo la influencia de la LH, estos folículos ovulatorios llegan a la fase pre-ovulatoria, donde van a presentar un diámetro de 6 a 9 mm, mientras que los folículos subordinados se degeneran, a este suceso se llama atresia folicular ((Fatet et al., 2011). Estos folículos pre-ovulatorios secretan estradiol, los cuales se ven incrementados en las concentraciones periféricas en sangre; induciendo al comportamiento receptivo de la hembra; este estradiol actúa como mediador importante en el suceso de retroalimentación positiva sobre el eje hipotálamo – hipófisis, por consiguiente se da el aumento en la secreción de GnRH induciendo a la oleada pre-ovulatoria de LH, la cual induce la ovulación y posteriormente a la luteinización de las células foliculares (Chanvallon y De Crémoux, 2012).

Después de la fase folicular, cuando se ha liberado el óvulo, el resto del folículo se transforma en un cuerpo lúteo, este evento de transformación se encuentra en la fase denominada fase luteal, la cual dura entre 16 a 17 días (Fatet et al., 2011) y donde la hormona dominante es la hormona progesterona, secretada durante la actividad del cuerpo lúteo (Senger, 2012). Esta progesterona inhibe la secreción de GnRH y LH previniendo así el desarrollo de folículos, este suceso se llama retroalimentación negativa, y la FSH se produce a intervalos más o menos regulares, lo que permite la renovación de las ondas foliculares (Morello y Chemineau, 2004).

Autores como Senger (2012), Fatet et al. (2011) y Gutierréz et al. (2008), mencionan que estas dos fases se pueden subdividir de acuerdo a las características endocrinas y conductuales que manifiestan las cabras en:

- Fase Folicular: proestro y estro.
- Fase Luteal: metaestro y diestro.

2.4.4 Proceso y mecanismo de la ovulación

La ovulación en cabras se da entre las 30 a 35 horas después de haber iniciado el estro (Simões et al., 2008) y es la consecuencia de la secreción rápida preovulatoria de las gonadotropinas durante el inicio del estro, cuando la progesterona logra disminuir a sus mínimas concentraciones sanguíneas, y del incremento del estrógeno plasmático cuando alcanza sus valores máximos en el ciclo reproductivo (Silva y Price, 2000). Este incremento de estradiol se encuentra seguido de una elevación súbita de LH o también llamado pico preovulatorio de LH (Hawken et al., 2009), el cual se da entre las 20 a 28 horas después de haberse iniciado el estro en las cabras (Fatet et al., 2011).

Morello y Chemineau (2004), así como Squires (2003), indicaron que “el pico preovulatorio de LH es una secreción pulsátil de alta frecuencia y de baja amplitud, a la cual se atribuye tanto la ruptura de la pared folicular como de la ovulación; donde el folículo dominante preovulatorio, vendría a ser el responsable de la inducción del estro y oleada preovulatoria de LH”. Nunes et al. (2010), describieron que el tamaño del folículo preovulatorio, al momento de la ovulación, en raza Toggenburg es de 7.4 mm de diámetro, similar al tamaño reportado por Maffili et al. (2005), en cabras de raza Saanen, que es de 7 mm de diámetro.

2.4.5 Formación del cuerpo lúteo

Durante el evento de la ovulación, donde el líquido folicular escapa del folículo ovárico, ocurre que la pared del folículo ovárico se desploma y permite que las células tecaes y las células de la granulosa se mezclen, formando así una glándula que consiste en células de tejido conectivo, células tecaes y células de la granulosa (Senger, 2012). Posterior a la ovulación ocurre la formación del cuerpo lúteo por el proceso de luteinización; el cual se define como el proceso mediante el cual las células del folículo ovárico se transforman en tejido lúteo (Senger, 2012) y es detectable, vía ultrasonografía transrectal, a partir del día 3 posterior a la monta (Kandiel et al., 2010).

Las células del folículo ovárico se logran diferenciar en células esteroideogénicas luteales, donde las células de la granulosa forman a las células luteales grandes y las células tecales forman a las células luteales pequeñas (Morello y Chemineau, 2004). Estas células luteales presentan características diferentes, donde las células luteales grandes van a secretar la mayor cantidad de progesterona de forma continua, los cuales son insensibles a los pulsos de la LH, además de secretar oxitocina; y las células luteales pequeñas casi no producen progesterona basal, pero son responsables de la secreción de progesterona mediada por la LH (Gutiérrez et al., 2008).

Los valores plasmáticos de la progesterona, dentro del ciclo estral, empiezan a aumentar más de 1 ng/ml a partir del día 2 (Romano et al., 2017; Menchaca y Rubianes, 2001), para luego alcanzar una meseta el día 9 del ciclo estral (llegando hasta los 12 ng/ml), este valor se mantienen hasta los días 16 y 18 del ciclo estral, donde se da el evento de la luteólisis o regresión del cuerpo lúteo, por acción de la prostaglandina F₂α (PGF₂α), secretada por el útero no grávido; luego de la luteólisis, los niveles de progesterona empiezan a decrecer, alcanzando valores por debajo a 1 ng/ml en 24 horas, y se marca el final de la fase luteal en el ciclo estral (Fatet et al., 2011; Nunes et al., 2010).

2.5 Anestro estacional y el fotoperiodo.

El fotoperiodo se puede definir como la variación estacional de la duración del número diario de horas de luz (Malpaux, 2006; Chemineau et al., 2010). La importancia del fotoperiodo en el control de la estacionalidad reproductiva de las especies animales se debe a que es una variable medioambiental muy estable, siendo la señal que todas las especies utilizan para establecer su periodo de actividad reproductiva en función de la estación más favorables para los partos y la duración de la gestación (Gómez-Brunet et al., 2012).

Los caprinos son llamados especies de días cortos, debido a que el periodo de actividad reproductiva ocurre en otoño-invierno, cuando el fotoperiodo es decreciente, esta información de los días cortos (8 horas de luz diarias) se traduce en señales estimuladoras, una vez que los días largos han cumplido los efectos inhibitorios y generado la sensibilidad al cambio hacia los días cortos (Chemineau et al, 1992b).

Las variaciones en la duración del día inducen cambios en la secreción de melatonina, que es el transductor que transforma la señal fotoperiódica en una señal endocrina, provocando cambios en la secreción de gonadotropinas. La información fotoperiódica es traducida por la glándula pineal estableciendo un ritmo circadiano de su secreción, exclusivamente nocturna, lo que implica una mayor amplitud de su periodo de secreción en los días más cortos del año. (Malpoux, 2006). La melatonina no sólo se sintetiza en la glándula pineal, sino que también lo hace en otras estructuras donde se encuentra el complejo enzimático suficiente para su síntesis, como en la retina, tracto gastrointestinal, glándula lacrimal y en los leucocitos (Pang et al., 1993), sin embargo, la síntesis a nivel de la glándula pineal es la más importante (Gatica., 2012)

La información fotoperiódica es captada por las células ganglionares de la retina, conducida a través del tracto retinohipotalámico (TRH) y transmitida a los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo, principal reloj circadiano de los mamíferos, desde donde llega hasta los ganglios cervicales superiores pasando por los núcleos paraventriculares, y por último, a la glándula pineal (Tamarkin et al., 1985). Esta glándula tiene como misión la síntesis de melatonina, que se sintetiza únicamente durante las horas de oscuridad, ya que la información lumínica captada por la retina durante el día inhibe la síntesis de la hormona. De esta manera, hay una mayor duración de la secreción de melatonina durante los días cortos y respecto de los días largos (Delgadillo et al., 2001). La percepción de esta duración permite a los animales, entre otras muchas funciones, regular su actividad reproductiva.

2.6 Control de la reproducción

Algunas razas de ovinos y caprinos originarios o adaptados a latitudes subtropicales presentan estacionalidad en su actividad reproductiva (Carillo et al., 2010, Delgadillo et al., 2003). Debido a las débiles variaciones fotoperiódicas que se registran en las regiones subtropicales, y a las importantes variaciones estacionales de la disponibilidad de alimento para los animales mantenidos en condiciones extensivas, algunos autores han sugerido que la alimentación es el principal factor que determina la actividad sexual en estas zonas (Delgadillo et al., 2003).

Sin embargo, la estacionalidad reproductiva también se ha observado en los animales mantenidos en estabulación y con buena condición corporal, la actividad estral y ovárica inician en septiembre y terminan en febrero (Duarte et al., 2008). Lo anterior sugiere que la estacionalidad reproductiva de los caprinos locales del norte de México no depende primordialmente de la disponibilidad alimentaria. Esto sugiere que la alimentación, aunque no es el factor regulador principal, actúa como modulador de la actividad sexual de las hembras caprinas locales del norte de México, tal como fue propuesto para las razas originarias de las zonas templadas (De Santiago-Miramontes *et al.*, 2008; Malpoux, 1999).

El sector ganadero en nuestro país, desde un punto de vista productivo parte de la base de poseer razas susceptibles de dar buenos rendimientos en condiciones ambientales y de manejo favorables, pero presenta como contrapartida una gran dependencia del medio y unos escasos rendimientos reproductivos, limitados genéticamente y muy condicionados por factores externos. Teniendo como base las consideraciones anteriores, el manejo de las explotaciones animales debe tender hacia la mejora en calidad y cantidad de sus producciones, por ello, en la actualidad se realiza un gran esfuerzo para superar las limitaciones de productividad, de las especies domésticas, que derivan de la reproducción natural no controlada.

En el manejo reproductivo, se deben considerar dos campos bien diferenciados:

- El control y mejora de la eficacia reproductiva, que determina la disminución de los períodos improductivos con incremento de la fertilidad y prolificidad.
- El uso de tecnologías de la reproducción como herramienta esencial en los programas de selección y mejora genética, tales como la inseminación artificial (I.A.) y la producción y transferencia de embriones.

El control de la reproducción permite inducir la actividad sexual de las cabras, o bien, reducir la época de empadre y pariciones con una fertilidad normal, que implicaría un ahorro en la mano de obra, mejores ingresos al vender los productos caprinos en la época de mayor demanda y aumento de la eficiencia reproductiva del rebaño (Vargas y López, 1991).

2.7 Métodos de inducción y sincronización del estro

Dada la estacionalidad reproductiva de la cabra, no siempre es posible obtener buenos resultados en la distribución del parto durante todo el año utilizando el celo natural (Blaga et al., 2016). Es por eso que la Biotecnología Reproductiva ofrece métodos que ayudan a tener una producción elevada y ordenada, uno de estos métodos son las sincronizaciones de celo en cabras; ya que este control en la reproducción del ganado caprino es una herramienta de gran utilidad en los servicios con empadre controlado y en los programas de inseminación artificial (Simões, 2016), además permite programar el periodo de partos orientados a épocas del año cuando los precios de los productos son más altos, reducir el periodo entre partos (periodo improductivo reproductivamente) (Abecia et al., 2011), optimizar la prolificidad y obtener lotes homogéneos de crías al parto, mejora los pesos al destete de las crías (Alemán, 2003; Ince y Köker, 2011) y; finalmente, aumentar la velocidad de la mejora genética (Chemineau et al., 1993). Existen diversos métodos para la sincronización el estro o celo en cabras, los cuales varían según su eficiencia y según los recursos que se logren necesitar para ser realizados

(Quinteros, 2003). Estos se pueden dividir en dos grandes categorías principales que son los métodos naturales y los farmacológicos (López, 2006).

2.7.1 Métodos naturales

El método natural es más barato y consisten en el cambio en el ambiente de los animales, que se logra con la introducción del macho, manipulación del fotoperiodo y cambios en la dieta, pero no agrupa tan estrechamente a las hembras en estro y solo se puede utilizar en ciertas regiones y en determinadas épocas del año (Evans y Maxwell, 1990).

2.7.1.1 Efecto macho

El efecto macho consiste en la introducción de machos sexualmente activos en un grupo de hembras con capacidad reproductiva, que previamente han sido aisladas de los machos, con el objetivo de inducir y sincronizar el celo y la ovulación (Velarde, 2006). El efecto macho se puede utilizar durante la temporada reproductiva o durante el periodo de anestro, cuando se combina adecuadamente con un tratamiento fotoperiódico (Fatet y Tuauden, 2013). Para trabajar con el efecto macho, tanto los machos como las hembras deberán de estar alejados totalmente, donde no haya contacto alguno entre ellos; esta separación no debiera ser menor a 21 días antes de la fecha prevista de la introducción de los machos (Delgadillo et al., 2003), aunque existe otros autores que mencionan un tiempo no menor a los 45 días (Flores et al., 2000) ó 60 días (Edmondson et al., 2011). Este periodo de separación suficientemente prolongado entre ambos sexos, así como la calidad de los estímulos producidos, logran ser indispensables para la eficacia del efecto macho (Quinteros, 2003); pero Véliz et al. (2004), reportaron que la falta de separación de ambos sexos no impide a las cabras estimular una actividad reproductiva al someterlas al efecto macho. En un rebaño es necesario mantener el 10 % de los machos, ya que los machos deben introducirse en el lote de hembras respetando una relación óptima de un macho por cada diez cabras presentes en el establecimiento (Chemineau et al., 2003).

Bonilla (2001), señaló que “existe una estimulación por parte del macho hacia la hembra a través del contacto físico, junto con ciertas particularidades como la emisión de feromonas”, además existe otros estímulos como el visual, el auditivo y la percepción olfatoria de los machos por parte de las hembras; dando como resultado de esta integración de información sensorial proveniente del macho, un incremento rápido en la secreción de LH en las hembras (Fernández et al., 2011; Hawken et al., 2009), el cual culmina con un pico preovulatorio de esta hormona, provocando la ovulación (Zarazaga et al., 2018; Luna et al., 2008; Delgadillo et al., 2003). Después de la exposición de los machos a las hembras, la mayoría de las cabras muestran estros fértiles a los 30 días (Rivera, 2012).

Velarde (2006), menciona que el 40 % de las cabras presentan ovulaciones silenciosas en la primera ovulación y son seguidas de un ciclo ovulatorio de corta duración, que en promedio dura entre cinco a siete días; en estos casos la fertilidad es más baja que en los ciclos normales (Rivera, 2012). Después de este ciclo corto se produce otra ovulación que se acompaña de un ciclo ovulatorio de duración normal en las cabras (Delgadillo et al., 2003), permitiendo así tener una fertilidad similar a la presentada durante la temporada reproductiva natural (Flores et al., 2000). El contacto entre los machos y hembras debe de ser de forma continua durante al menos 2 semanas, donde el macho debe poder moverse libremente entre las cabras las 24 horas del día (Fatet y Tvauden, 2013), esto asegura que del 14 al 33 % de las hembras entren en celo entre el primer y tercer día posterior a la introducción del macho, se sabe que este celo no es fértil, pero entre el séptimo y décimo-segundo día podemos encontrar un 70 a 90 % de hembras con celos fértiles (Martínez, 2007).

En una temporada no reproductiva normal, para que tenga un efecto beneficioso la introducción de los machos con las hembras, en forma previa es importante que éstos logren ser estimulados sexualmente, debido a que el descenso en el rendimiento reproductivo que se presenta durante la temporada no reproductiva es la causa primordial de fracasos en este tipo de sistema de sincronización de celo,

sobre todo en determinadas razas de caprinos o latitudes donde la estacionalidad de éstos es muy marcada (Chasles et al., 2016; Carrillo et al., 2011). En Tacna, Perú, Sánchez et al. (2013), realizaron el efecto macho a un grupo de cabras criollas, obteniendo una tasa de estro del 87.5 % al final del tratamiento con una tasa de fertilidad del 81 %. En climas tropicales, donde la estacionalidad es prácticamente nula o es poco evidente, Flores et al. (2010), reportaron que los machos pueden inducir una actividad sexual en las hembras en cualquier época del año, utilizando el efecto macho.

La inducción y sincronización del celo en cabras por el efecto macho es una técnica relevante en el manejo reproductivo, ya que tiene ventajas donde se incluyen la reducción directa de costos, la prevención de respuestas inmunitarias no deseadas mediante el uso de eCG, la reducción de residuos hormonales en cabras tratadas y; como consecuencia de todo ello, a nivel del medio ambiente, se cumple con los principios ecológicos y de bienestar animal (Viana et al., 2016).

2.7.1.2 Tratamiento fotoperiódico

El fotoperiodo es el principal regulador de la estacionalidad de la reproducción en cabras, por lo tanto, la manipulación de éste mediante un tratamiento lumínico permite controlar la estacionalidad, haciendo posible la reproducción fuera de la temporada reproductiva natural (Menchaca y Ungerfeld, 2017). Este sistema consiste básicamente en someter a los animales a una alternancia de días largos (DL), donde se mantiene 16 horas luz de forma continua, y días cortos (DC), donde se mantiene de ocho a 12 horas luz de forma continua (Morello y Chemineau, 2004). En DL la aplicación continua de luz artificial es desde las 06:00 hasta las 22:00 horas o alternando luz artificial con luz natural, donde la aplicación de luz artificial es desde las 06:00 hasta las 09:00 horas, después se tiene luz natural desde las 09:00 hasta 16:00 horas y finalmente se da luz artificial desde las 16:00 hasta las 22:00 horas (Fatet y Tuauden, 2013); resultando importante lograr mantener una óptima relación tanto en las horas luz como de oscuridad (16:8), con el fin de lograr un correcto estímulo en las cabras (Chemineau et al., 2003).

Esta exposición de un mayor número de horas luz (DL) en los animales, logra provocar que la concentración de melatonina se encuentre en niveles basales por un mayor número de horas; y lo que ocurre en la cabra es que el estímulo de luz, el cual ingresa por la retina del ojo, inhibe la conversión de seratonina a melatonina en la glándula pineal (Haibel, 1990). Para estimular la luz artificial, las instalaciones deben estar equipadas con lámparas fluorescentes que proporcione una intensidad de luz de 200 lux (Arrebola et al., 2014) a la altura de los ojos de los animales; otros autores mencionan que también se puede utilizar una intensidad de luz de 300 lux, pero esta intensidad de luz va acompañada, en el protocolo, de un tratamiento con melatonina (Delgadillo et al., 2016). Se considera que el periodo ideal para trabajar este tratamiento fotoperiódico es de 2.5 a 3 meses de días largos, seguidos de días cortos, siendo los primeros los que inician la preparación de los animales para el posterior efecto de los segundos (Celi, 2013).

Resulta importante que tanto las hembras como los machos reciban el mismo tratamiento, con el fin de que al momento de la cópula o inseminación artificial estos animales se encuentren sexualmente activos (Fatet y Tvauden, 2013); ya que se ha reportado que los machos cuando reciben tratamiento fotoperiódico, estos incrementan sus niveles de testosterona y con ello su líbido (Ponce et al., 2014). En general, el uso exclusivo del tratamiento fotoperiódico con luz artificial, o alternando luz artificial con luz natural, para inducir la actividad sexual requiere del empleo de métodos adicionales como el uso del efecto macho (Fernández et al., 2011) o el uso de melatonina (Delgadillo et al., 2016).

2.7.2 Métodos farmacológicos

Los métodos farmacológicos para sincronizar ciclos estrales se basan en el uso de hormonas exógenas para controlar la reproducción en las hembras (Greyling, 2010), esto se basa en ciertos posibles actos sobre el ciclo reproductivo normal, tanto para determinar el momento de la de manifestación del celo y de la ovulación durante la temporada reproductiva, como la inducción del ciclo reproductivo en temporada de

anestro estacional (Corteel, 1971). Estos métodos farmacológicos logran sincronizar celos y ovulaciones agrupando a cierto número de animales, logrando así programar partos orientados a épocas del año cuando los precios de los productos son más altos (Velarde, 2006). Además, estos métodos son de gran ayuda en los protocolos de inseminación artificial y transferencias (Rahman et al., 2008; Knights y Singh, 2016). La sincronización de celo y ovulación, utilizando estos métodos farmacológicos, no solo provee un número aceptable de hembras en celo, sino también de un aceptable nivel de fertilidad ya sea con monta natural o inseminación artificial (Rivera, 2012). En las últimas décadas, la sincronización de celo y ovulación fuera de temporada reproductiva se están basando en el uso de dispositivos intravaginales impregnados con progesterona, o sus análogos sintéticos, en conjunto con la administración de la eCG o PMSG y la prostaglandina (Simões, 2015).

2.7.2.1 Uso de progestágenos

Dutt y Casida (1948) realizaron los primeros trabajos con progesterona para sincronizar el estro, en dicho trabajo se utilizó de manera inyectable (subcutáneo) esta hormona, a una dosis de 5 y 10 mg disuelta en aceite de maíz; donde los resultados finales de la tasa de fertilidad que se obtuvo fueron bajos, probablemente debido a la persistencia de dicha hormona en el organismo del animal. Posteriormente, surgió la opción de utilizar los dispositivos intravaginales que contienen progestágenos y que permiten, al ser removidos abruptamente de la vagina, disminuir drásticamente las concentraciones circulantes de esta hormona (Vilariño, 2012). El éxito que supuso en los ovinos, al usar este método basado en el empleo de progestágeno aplicado vía intravaginal en un soporte de esponja de poliuretano (Robinson, 1965); llevó a que se realizaran las primeras investigaciones en el ganado caprino, obteniendo buenos resultados (Corteel et al., 1967). Las formas comerciales más utilizadas de progestágenos impregnados en esponjas vaginales son el acetato de fluorogestona (FGA), que contiene de 20 a 40 mg/esponja, y el acetato de medroxiprogesterona (MAP), que contiene 60

mg/esponja (Abecia et al., 2011), presentando estas una mayor efectividad que la progesterona natural a dosis más bajas (Mogedas, 2016).

2.7.2.2 Esponjas intravaginales.

Las esponjas intravaginales han sido el tratamiento tradicional de elección para la sincronización del celo en los pequeños rumiantes durante la estación de cría y el anestro. Estas esponjas son impregnadas con dosis bajas de progestágenos. Actualmente se encuentran disponibles dos tipos de esponjas comerciales basadas ya sea en acetato de fluorogestona (FGA) conocido comercialmente como Cronogest (Intervet, Angers, France), o de acetato de medroxiprogesterona (MAP) conocido comercialmente como Veramix (Pharmacia & Upjohn, Orangeville, Canada). Las esponjas intravaginales son usualmente insertadas por períodos de 9 a 19 d y se usan en conjunción con PMSG, particularmente cuando se está fuera de la temporada reproductiva, la PMSG se inyecta al momento de retirar la esponja o bien 48 h antes de su retiro, las hembras generalmente exhiben celo entre las 24 a 48 h posteriores al retiro de la esponja. Sin embargo, la respuesta al estro y la fertilidad varía grandemente dependiendo de la especie, raza, el manejo de co-tratamientos y el sistema de monta (Wildevaux, 2000). Una comparación de esponjas intravaginales conteniendo 15, 30, 45 y 60 mg de MAP se utilizaron en ovejas Corriedale, sin encontrarse diferencias entre las dosis respecto al porcentaje y tasa de ovulación (96.8 % y 1.25, respectivamente) (Iglesias et al., 1997). Este resultado sugiere que la dosis de MAP de 25% (60 mg) de la fórmula comercial puede ser suficiente para inducir el estro en esta raza de ovinos. En este mismo experimento se probó el insertar después del estro una esponja con MAP (30 mg) por siete días, no encontrándose beneficios respecto a la tasa de parición o en el número de corderos nacidos, sin embargo, el porcentaje de ovejas que retornaron al estro fue reducido de 27 a 16%.

El uso de gonadotropinas es rutinariamente incorporado a los sistemas de sincronización de estro con dispositivos intravaginales en ovejas anovulatorias. El

producto más comúnmente utilizado es la PMSG (eCG). Una limitación de la PMSG es que su actividad biológica de larga acción causa un reclutamiento continuo de folículos antrales, lo cual resulta en un gran número de folículos sin ovular, particularmente cuando se utilizan dosis para superovulación (Armstrong et al., 1983). Se han realizado varios estudios para evaluar diferentes dosis de PMSG, el tiempo al que debe aplicarse ésta, así como otras alternativas de gonadotropinas. Uno de estos estudios (Zaiem et al., 1996) comparó tres dosis de PMSG (300, 450 y 600 UI) utilizadas conjuntamente con esponjas impregnadas de FGA (40 mg, 14d) en ovejas durante el anestro. Las tres dosis de PMSG produjeron tasas de fertilidad similares (81.2 a 84.3%), las cuales fueron mayores que las obtenidas con el tratamiento control, el cual solo usaba FGA (57.5 %). La prolificidad con el tratamiento control no fue diferente del tratamiento con dosis de 300 UI de PMSG (130.4 y 133.3 %, respectivamente), sin embargo, la prolificidad se incrementó con las dosis de 450 y 600 UI de PMSG (155.5 y 176.9 %, respectivamente), los que sugiere que dosis de 450 a 600 UI de PMSG es lo recomendable en estas condiciones.

Otra potencial limitante en el uso de PMSG ha sido el reciente descubrimiento de que la fertilidad disminuye después del uso prolongado de esta hormona (revisado por Baril et al., 1998). Un proyecto realizado por Bodin et al. (1997) involucró nueve hatos comerciales de ovejas lecheras, siete de los cuales fueron sujetos a un tratamiento estándar con esponjas impregnadas de FGA (40 mg, 14d), con la inyección de 500 a 550UI de PMSG al momento del retiro de la esponja, y dos hatos sirvieron como control. Se colectaron muestras sanguíneas al momento de la inserción de la esponja y posteriormente a los 20 d, y se revisó la presencia de anticuerpos anti PMSG. En el 95 % de las ovejas de los hatos control las tasas de ligamiento a PMSG fueron menores al 1.5 %, mientras que en las ovejas de los hatos tratados hubo una tasa de ligamiento del 14.7 %, aunque estos estudios no fueron correlacionados con la edad de la oveja ni con tratamientos previos con PMSG. Similares resultados de anticuerpos anti PMSG han sido reportados en cabras (Baril et al., 1992). En las hembras en donde el ligamiento con PMSG es

mayor al 5% un retraso en el inicio del estro fue notado en el 37.9% de los casos, mientras que solo en un 7.4% de casos hubo retraso en el comienzo del estro cuando el ligamiento era menor al 5% (Baril et al., 1996), este retraso en el inicio del estro se ha sugerido como una de las causas de la reducción de la fertilidad que se aprecia en hembras tratadas repetidamente con PMSG (Baril et al., 1993). La gonadotropina sérica de la yegua preñada (PMSG) es más utilizada porque es de larga duración y sólo se requiere una inyección. La dosis depende de la raza y la época del año en que se aplique; debe ser de 400-500 UI para hembras en estación reproductiva y 600-750 UI fuera de estación (Cordova et al., 2008).

Ritar (1993) comparó diferentes dosis de PMSG en relación a la utilización de esponjas intravaginales con dispositivo intravaginal (CIDR) durante la estación sexual y en el período de anestro estacional en latitudes 20° y 28° S, observando que la aparición del estro, con la misma dosificación (200 UI) de PMSG, ocurre antes con la retirada del CIDR de que con las esponjas, pues, con el CIDR el comportamiento del estro y el pico de LH estarían también adelantados con la ovulación precoz, como ocurre en ovinos.

2.7.2.3 CIDR

A principios de la década de 1980, en Nueva Zelanda, se diseñó el CIDR (Controlled Internal Drug Release), un dispositivo de silicona de administración intravaginal, en forma de T, impregnado con 0.3 gramos de progesterona sobre una espina inerte de nylon (Welch et al., 1984). Desde entonces, este otro tipo de dispositivo ha sido ampliamente difundido en todo el mundo debido a su fácil aplicación y aceptables resultados (Vilariño, 2012). En la actualidad, existen dos tipos de CIDR, los cuales se encuentran disponibles para pequeños rumiantes que son los CIDR-S (oveja) y CIDR-G (cabra); siendo este último el que más comúnmente se aplica (Wildeus, 2000); además los protocolos para la sincronización del celo suelen ser similares al usado con las esponjas intravaginales, donde autores reportan haber trabajado con un tratamiento largo (13 a 16 días) (Romano, 2004), como corto (5 a 9 días) (Nogueira et al., 2011); obteniendo buenos resultados.

Durante el anestro estacional el uso de progestágenos induce al desarrollo de folículos ováricos normales, luego de retirar la esponja junto con el progestágeno, los folículos pueden ovular durante la estación en que la reproducción fracasa normalmente a causa de la retroalimentación negativa hormonal (Kausar et al., 2009; Simões, 2015); es por ello que resulta necesario el uso de hormonas gonadotrópicas, como PMSG o eCG, para estimular la madurez folicular y la ovulación (Córdova et al., 2008). También se ha descrito el uso de prostaglandinas y sus análogos durante el tratamiento de esponjas intravaginales con eCG, el cual se administra 48 horas antes de retirar la esponja intravaginal; esto permite promover la luteólisis de un potencial cuerpo lúteo y reducir los niveles de progesterona que hay en el organismo del animal, logrando un mayor tiempo de actividad de la hormona eCG y un mejor reclutamiento y maduración de los folículos (Menchaca et al., 2007; Abecia et al., 2011). Sin embargo, Dogan et al. (2005), mencionan que el uso de prostaglandina puede no ser necesaria, ya que esta no demuestra un efecto beneficioso significativo en la respuesta de presentación del estro.

La eCG es utilizada para mejorar la concentración de los celos, la maduración folicular, la fertilidad y la tasa ovulatoria, en dosis que varían de 200 a 600 UI., según raza, peso del animal, época de año, lactancia, efecto macho u otros factores ambientales (Maxwell W.M.C., 1986; Romano J.E. y cols., 1996; Wildeus S., 2000; Boscós C.M. Y cols., 2002; Leboeuf, B., 2003).

Además, Boland M.P y cols. (1981) probaron que la eCG aumenta el porcentaje de partos en pequeños rumiantes de una manera dependiente de la dosis por un incremento de la tasa de la ovulación y del estro sincronizado.

Los tratamientos largos de 16 días con progestágenos se han asociado con una menor fertilidad. Al disminuir el tiempo de los tratamientos se facilita el manejo, se reduce al mínimo el posible flujo vaginal e infección y se incrementa la fertilidad

(Viñoles C. *et al.*, 2001; Diskin M.G. *et al.*, 2002). Por esto, cada vez más se practican tratamientos cortos de 5-12 días más la administración de una dosis de prostaglandina y eCG desde 48 horas antes de la retirada de las esponjas hasta en el mismo momento de la retirada (Wildeus S., 2000; Holtz W., 2005). Los protocolos cortos han demostrado su eficacia en la inducción de celo en épocas de anestro, obteniendo una respuesta similar a los protocolos largos (Letelier *et al.*, 2009). Un período más corto de tratamiento con el dispositivo intravaginal debería estar relacionado con una menor incidencia de inflamación e infección vaginal, presumiblemente conduciendo a mejores rendimientos de fertilidad después de la reproducción natural o la inseminación cervical (Martínez-Ros *et al.*, 2018).

Se han publicado muy pocos trabajos reproductivos realizado en cabras y estos pocos trabajos, donde se ha utilizado esponjas intravaginales para la sincronización del estro, reportan una tasa de celo de 100% (Celi *et al.*, 2010) en temporada reproductiva, este dato difiere con lo reportado por Holtz *et al.* (2008), que lograron encontrar 71 % tasa de celo en temporada reproductiva, en regiones tropicales. Sin embargo, Amle *et al.* (2017), reportaron una tasa de celo temporada reproductiva del 100 %, en regiones tropicales. Otros de los pocos trabajos realizados en el país sobre sincronización de celo en caprinos fueron reportado por Sandoval *et al.* (2013), los cuales trabajaron con CIDR durante la temporada de anestro y obtuvieron una tasa de celo del 100%.

2.8 Microbiota vaginal en rumiantes.

La vagina es un órgano que posee diversas funciones: es el conducto excretor del útero, es el órgano del coito, es el conducto del parto, su permeabilidad permite el paso de medicamentos, tiene capacidad inmunitaria y actúa como medio de depuración o defensa contra los microorganismos (Alba y Silveira, 2006; Boscán, *et al.*, 2010). Y es aquí donde radica la importancia del estudio de los microorganismos que habitan en dicho órgano, además en el ambiente vaginal residen bacterias con potencial de patogenicidad categoría 1, es decir, que causan frecuentemente endometritis (Boscán *et al.*, 2010).

Al igual que el resto del organismo este órgano presenta procesos que actúan a manera de defensa ante bacterias que ascienden al tracto genital, siendo esta misma, una barrera física para evitar la proliferación de patógenos hacia el resto del tracto reproductivo. Este órgano cuenta con ciertos blindajes como: el moco secretado que actúa como barrera fisiológica; la invasión de polimorfonucleares describe una barrera inmune en respuesta a los desafíos bacterianos y los procesos inflamatorios y como último freno para la defensa del tracto genital ante la invasión microbiana (Boscán *et al*, 2010).

La vagina de algunas especies animales como los rumiantes, la perra y la mujer presentan una flora microbiana mixta, compuesta por microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y anaerobios estrictos. Esta mezcla incluye a los saprofitos, patógenos potenciales y oportunistas, ellos están adaptados al modo de vida no invasivo, determinados por las limitaciones del ambiente, es decir, pueden proliferar y producir enfermedades si son introducidos en localizaciones extrañas (Boscán *et al*, 2010).

2.8.1 La microbiota normal

El tracto genital de las hembras posee flora bacteriana en casi toda su extensión, a excepción del útero, ya que allí por lo general no habitan microorganismos, aunque esto puede variar de acuerdo con el estatus inmunológico del animal (Sánchez *et al*, 2011) y la etapa del ciclo estral en la que se encuentre la hembra. Cada parte del tracto reproductivo tiene un modo de defensa ante microorganismos que puedan interferir en el mantenimiento de la homeostasis. Existen defensas uterinas como las contracciones posteriores al parto, la involución uterina y la secreción de hormonas como los estrógenos que favorecen la respuesta inmunitaria; así mismo el cérvix y sus secreciones juegan un papel fundamental en el comportamiento reproductivo de los mamíferos (Ata *et al.*, 2010), porque además de proteger del paso de agentes patógenos también juega un papel fundamental en la detección

del celo, la evaluación del estado reproductivo y el mantenimiento del ambiente estéril del útero.

La vagina por ser la parte del tracto reproductivo más expuesta, posee mayor número de bacterias (Sánchez *et al*, 2011). Bajo condiciones normales, este ambiente es estable, protegiendo al hospedador del ataque de microorganismos saprofitos patógenos o potencialmente patógenos (Otero *et al.*, 2000). Existen diferentes tipos de microbiota dentro del organismo. Hay flora residente, transitoria u oportunista, si existe alguna alteración los microorganismos transitorios pueden responder aprovechando la situación, es decir, proliferar y producir una enfermedad (Fernández, 2006).

2.8.2 Microorganismos que forman parte de la microbiota.

Streptococcus sp. Se ha relacionado con diversos problemas reproductivos en bovinos, entre los que se encuentran: cervicitis, metritis y aborto; las enfermedades reproductivas postparto causadas por esta bacteria comprometen la eficiencia reproductiva (Sánchez *et al.*, 2011).

Staphylococcus sp. Existen especies de esta bacteria que se encuentran de manera normal en la piel y mucosas, tal es el caso del *S. epidermidis* que es integrante de la flora normal de piel pero produce infecciones crecientes de piel y anexos, colonizando cuerpos extraños y también es causa de infecciones profundas en hospedadores inmunocomprometidos (Seija, 2006), por su parte el *S. aureus* es el responsable de una amplia gama de infecciones agudas y crónicas. El primer paso de las infecciones por *S. aureus* es la adherencia a las superficies y colonización de tejidos del organismos infectado (Cucarella *et al.*, 2005).

Lactobacillus sp. Crece generando un beneficio para su hospedero, debido a que la producción de ácido láctico reduce el pH, contribuyendo a la disminución o al retraso del crecimiento de otro tipo de flora potencialmente patógena (Sánchez *et al.*, 2011; Samaniego y Sosa, 2000).

Pseudomona sp. Es un bacilo Gram negativo que produce mastitis, aborto, artritis e infecciones en piel. Posee la capacidad de adaptarse a distintos medios nutricionales, de tal forma que es capaz de utilizar una gran variedad de sustancias como nutrientes para rendir energía y permitir su crecimiento (Tortone y Lucchesi, 2005).

P. aeruginosaes el patógeno más importante dentro del género Pseudomonas, teniendo en cuenta la cantidad y tipos de infecciones (invasivas y toxígenas) que produce, así como la morbilidad y mortalidad que ocasiona. Es un patógeno oportunista que se presenta cuando los mecanismos de defensa del hospedero están alterados, suprimidos o comprometidos (Martínez et al., 2001).

Klebsiellasp. Se ha clasificado como flora uterina normal. No es un patógeno asociado con problemas reproductivos, simplemente se considera como flora acompañante del útero de vacas donadoras de embriones (Sánchez et al., 2011).

E. coli. Esta bacteria coloniza el intestino pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos (Rodríguez - Ángeles, 2002). Se puede aislar unos días después del parto, con un porcentaje del 36% el cual se ha relacionado con contaminación de los machos. En Argentina, se reportó el aislamiento del microorganismo en un 29% de los animales que presentaron problemas del tracto reproductivo como metritis y descargas uterinas con olor fétido (Sánchez et al., 2011).

Otras bacterias reportadas son *micrococos spp*, *enterobacter spp*, *bacilos spp* y *corinobacterium spp*. en cabras principalmente. Las frecuencias en los aislamientos difieren, Penna et al., (2013) los microorganismos con mayor prevalencia fueron *estreptococos spp*. y *estafilococos spp*. como bacterias Gram positivas, *E. coli* fue la bacteria Gram negativas mayormente encontrada, en contraste, Gomez et al. (2006) la batería Gram positiva fue *micrococos spp*. con una frecuencia de 89% y Gram negativa fue *E. coli*

Entre estas bacterias existen algunas asociaciones que hacen que un organismo no patógeno se convierta en patógeno; tal es el caso de *T. pyogenes* con *E. coli* que son causantes de infecciones uterinas postparto en bovinos (Sánchez et al., 2011), además de esta asociación, se sabe que *T. pyogenes* necesita previamente la acción sinérgica de otras bacterias anaerobias, gram negativas obligadas como *Fusobacterium necrophorum*, causando entonces severas endometritis con marcada destrucción celular (Fernández, 2006). Las bacterias patógenas como *E. coli* estimulan la secreción de prostaglandina E2 en cultivos de células endometriales y en explantes de tejidos in vitro, lo que puede afectar la función del cuerpo lúteo (Williams et al., 2007) y por ende el mantenimiento de la gestación, produciendo de esta manera un aborto.

2.8.3 Consecuencias del rompimiento de la homeostasis vaginal

Al presentarse problemas de esta índole como reabsorciones embrionarias, abortos (tempranos o tardíos), metritis, nacimiento de crías muertas o débiles y muertes perinatales, entre otras, lo que en última instancia afecta la fertilidad del hato (González et al, 2007), esto provocado por la afectación al equilibrio del ambiente en el que se desarrollan estas bacterias, que a menos que produzcan toxinas o penetren en grandes cantidades, sólo pueden influir en la fertilidad cuando se retienen durante largos períodos a causa de un retraso en la involución del útero (Bavera, 2005).

2.8.4 Efecto de la utilización de CIDR en el microcosmos vaginal

El uso de los dispositivos intravaginales entre ellos el CIDR son asociados con descargas vaginales anormales y fétidas al momento de su retiro (Abecia et al., 2012). Las causas pueden estar relacionadas principalmente con un efecto físico que provoca una retención constante de las secreciones vaginales cuando los dispositivos intravaginales se mantienen durante largos períodos de tiempo, así

como también al efecto inmunosupresor de los progestágenos presentes en los dispositivos (Lewis, 2003; Al-Hamedawi et al., 2003). lo que puede crear una predisposición a la proliferación y los cambios en la composición de la microbiota local (Sargison et al., 2007; Vasconcelos et al., 2016). Cambios en los que destaca el estar constituida principalmente por bacterias Gram positivas (antes de introducir el dispositivo) y el pasar a ser predominantemente Gram negativa (al momento del retiro), estos cambios en la microbiota vaginal inducen inflamación e infección asociadas con descargas anormales, sin embargo, la microbiota vuelve a su estado normal al momento de presentar celo, demostrando así la capacidad del animal por mantener las condiciones más óptimas para llevar acabo los procesos de reproducción (Vasconcelos et al., 2016;Martinez-Ros et al., 2018).

En algunos casos el uso de estos dispositivos puede traer consigo efectos sobre los rendimientos de fertilidad, la inducción de vaginitis constituye un problema opuesto a los principios del bienestar animal, en estos caso se puede suministrar antibióticos para ayudar a alcanzar el equilibrio nuevamente, no obstante, se ha reportado que el uso indiscriminado de antibióticos ha dado como consecuencia la resistencia de las bacterias no solo a uno sino a diversos antibióticos y a su vez causando una deficiencia el tratamiento (Penna et al., 2013; Martinez-Ros et al., 2018).

2.9 Tratamientos utilizados para la reutilización del CIDR

El fabricante recomienda el uso del CIDR sólo una vez, sin embargo, cuando éste es retirado de la vagina aún contiene progesterona y la cantidad residual depende del tiempo que duró insertado, por lo cual la reutilización del CIDR se ha investigado (Martínez et al., 2003; Stevenson et al., 2003; Colazo et al., 2004). Los tratamiento a los que se someten estos dispositivos se pueden clasificar en metdoso de desinfección y métodos de esterilización.

2.9.1 Metodos de esterilización

La esterilización es definida por la O.M.S. como el proceso de saneamiento más alto de letalidad y seguridad cuya finalidad es la aniquilación de cualquier

microorganismo presente en un objeto, sea patógeno o no patógeno incluidas formas esporuladas, hongos, virus y priones, este término es absoluto ya que se considera al objeto estéril o no estéril sin rangos intermedios.

Autoclave

La esterilización con calor húmedo, se utiliza principalmente con el autoclave. El autoclave, desarrollado por CHAMBERLAND en 1884, es un aparato constituido por una caldera, que se puede cerrar herméticamente con una tapa metálica y que presenta una resistencia eléctrica en su interior (antiguamente por gas) que calienta el agua. Este aparato permite que en el interior de la caldera se desplace el aire por una válvula de purga, dejando que se acumule posteriormente vapor saturado a presión, que alcanza temperaturas superiores a los 100°C sin que se produzca ebullición (LEWIS, 2002).

El material a esterilizar se introduce en el interior de la cámara, se somete al vapor de agua con sobrepresión (lo más común: 1,1 atmósferas), hasta alcanzar temperaturas adecuadas para la eliminación de los microorganismos y todas las formas de resistencia, sin que se produzca ebullición de los medios líquidos. Las temperaturas y los tiempos de exposición pueden variar dependiendo del material a esterilizar. El procedimiento más habitual de esterilización consiste en someter el material a una temperatura de 121°C (1.1 atmósferas o 15 lb/in² o p.s.i.), durante 15-20 minutos (LEWIS, 2002).

Luz ultra-violeta

Las radiaciones de distinto tipo se utilizan también en microbiología con la finalidad de la esterilización (LAMBERT y HANSEN, 1998). La más utilizada en el laboratorio de microbiología es la radiación ultravioleta (UV) de una longitud de onda de unos 260 nm. Aunque suele ser poco eficaz debido a su escaso poder de penetración en los materiales, tales como vidrio, agua, películas de suciedad, sin embargo, es muy útil para esterilizar el aire y las superficies, así, se suelen colocar en cabinas de flujo laminar, en habitaciones estériles, quirófanos, etc.

2.9.2 Métodos de desinfección

La desinfección es un proceso por el cual se eliminan relativamente microorganismos patógenos de objetos inanimados, se confunde éste término con el proceso de esterilización porque existen varios niveles de desinfección desde una esterilización química a una mínima reducción del número de microorganismos contaminantes (Rutala y Weber, 2008).

Desinfección de alto nivel (D.A.N.):

Elimina a todos los microorganismos, por lo que en condiciones especiales pueden esterilizar, entre ellos se encuentran: orthophthaldehído, glutaraldehído, ácido paracético, dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno, formaldehído, entre otros.

Desinfección de nivel intermedio (D.N.I.):

La capacidad de letalidad es sólo para bacterias vegetativas y algunas esporas bacterianas, los más conocidos en este grupo son: fenoles e hipoclorito de sodio.

Desinfección de bajo nivel (D.B.N.):

Es realizado por agentes químicos que eliminan bacterias vegetativas, hongos y algunos virus en un período de tiempo corto (menos de 10 minutos), como por ejemplo, el grupo de amonios cuaternarios.

Cloruro de benzalconio:

El cloruro de benzalconio (CB) es un compuesto cuaternario de amonio (CCA), cuya fórmula condensada es n-alquil-metil-bencil-cloruro de amonio. Su acción se ha atribuido a la inactivación de las enzimas productoras de energía, desnaturalización de las proteínas celulares esenciales y la ruptura de la membrana celular. Son activos contra bacterias y algunos virus, hongos y protozoos. Tiene propiedades fungicidas, específicamente sobre los géneros Trichophyton, Epidermophyton" y

"Candida. Las soluciones de cloruro de benzalkonium son agentes biocidas de rápida acción con una moderadamente larga duración de acción. Las esporas bacterianas son consideradas como resistentes (Acosta-Gío *et al.*, 2001).

Las soluciones son bacteriostáticas o bactericidas en función de su concentración. Las bacterias gram-positivas son generalmente más susceptibles que las Gram-negativas. La actividad no se ve muy afectada por el pH, pero aumenta considerablemente en temperaturas más altas y tiempos de exposición prolongados (Acosta-Gío *et al.*, 2001).

Cerri *et al.*, (2005) no encontraron diferencias en las concentraciones plasmáticas de P4 en vacas lecheras que recibieron un dispositivo nuevo, o un inserto desinfectado en autoclave y utilizado durante 7 días. Cuicas-Huerta *et al.*, (2018) evaluaron 2 métodos para tratar CIDR reutilizados, un grupo fue tratado con cloruro, mientras el otro fue sometido a un proceso de esterilización en autoclave, y concluyeron "El proceso de desinfección/limpieza de los dispositivos CIDR, no afectó el contenido y disponibilidad de su progestágeno, por lo que pueden ser utilizados nuevamente en el proceso de sincronización del estro en vacas bajo condiciones de trópico seco".

Uribe-Velásquez *et al.*, (2013) realizaron un estudio en cabras sobre el uso de CIDR reutilizado asociado tanto a protocolos cortos como largos, en el cual determinaron la factibilidad de la reutilización de estos dispositivos en la inducción de estro en los animales, teniendo como resultado la inducción de celo en las hembras en todos los tratamientos, en contraparte, la mayor tasa de preñes se obtuvo usando el protocolo corto. Hernández *et al.*, (2008) concluyeron que es factible la reutilización de estos dispositivos hasta por dos ocasiones. Para servicio natural o inseminación artificial es de gran valor por su reducción en 50 % de los costos (Devincenzi *et al.*, 2005).

III. HIPÓTESIS

La microbiota vaginal aumentará su concentración con la reutilización de CIDR sin importar el método para tratar los dispositivos, sin embargo al reutilizar el dispositivo se observará una mayor concentración bacteriana.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Evaluar los cambios en la microbiota vaginal de los animales inducidos a estro con CIDR nuevo y reutilizados tratados con los tres diferentes métodos

4.2 Objetivo específico.

1. Cuantificar las poblaciones de bacterias asociadas a vaginitis.
2. Identificar las bacterias aisladas asociadas a vaginitis en reutilización del CIDR.
3. Evaluar la resistencia a antibiótico de las bacterias identificadas.
4. Identificar el método más efectivo para tratar los CIDR's.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar del experimento

El experimento se realizó en la unidad de producción ovina y caprina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa. El análisis de las muestras se fue realizando en el laboratorio de bacteriología de la misma Facultad. El experimento se realizó en el periodo Mayo-Julio del año 2018.

5.2 Asignación de grupos

Se seleccionaron 15 cabras no gestante, las cuales se dividieron en 3 grupos homogéneos, considerando raza, y edad.

5.3 Tratamientos para los CIDR

Los tratamientos para los dispositivos fueron:

- Luz ultravioleta: Se introdujeron los dispositivos en una campana de flujo laminar, para ser expuestos la mitad de la superficie del CIDR durante 15 minutos a una distancia de aproximadamente 30 cm de la fuente de luz U.V., posteriormente la otra mitad durante el mismo tiempo.
- Cloruro de benzalconio: Se preparó una solución de cloruro de benzalconio a concentración 1:10, se sumergieron los CIDR durante 5 minutos en la solución, el exceso de la solución fue limpiado con una gasa estéril.
- Autoclave: Los dispositivos fueron envueltos en papel estroza con cinta estéril para ser introducidos al autoclave, se sometieron a una temperatura de 121 °C, una presión de 15 PSI (libra por pulgada cuadrada), por un tiempo de 15 minutos. Se puso el autoclave en modo para esterilizar líquidos, esto para evitar una liberación rápida de la presión y el agua en el equipo pudiese contaminar el dispositivo.

Los CIDR fueron envueltos en gasas estériles, depositados en frascos estériles de plástico y fueron aislados de la luz.

5.4 Asignación de tratamientos

Los tratamientos fueron seleccionados al azar, en una hoja se anotaron los tratamientos, se recortaron, doblaron, introdujeron en un recipiente, revolvieron y se procedió a tomar un papelito, el primero (Autoclave) correspondía al grupo 1 de los animales, así sucesivamente hasta completar los 3 grupos.

5.5 Protocolo de sincronización

Los dispositivos (CIDR) se introdujeron en cada uno de los animales (día 0), el retiro se realizó a los 5 días, el día del retiro fue suministrada una inyección intramuscular de 300 U.I de eCG.

5.6 Desarrollo del experimento

El CIDR fue retirado a los 5 días de ser implantado y se procedió a realizar un hisopado vaginal nuevamente, una vez retirado se identificará a cual animal corresponde. Los dispositivos intravaginales fueron esterilizados y desinfectados utilizando los siguientes métodos: autoclave (5 dispositivos), Luz ultravioleta (5 dispositivos) y cloruro de benzalconio (5 dispositivos). cuando los animales presentaron celo fue tomada otra muestra. Los CIDR fueron reutilizados e insertados a los mismos animales y se repitió el proceso en dos ocasiones más (dispositivo reutilizado una vez y dispositivo reutilizado por segunda ocasión).

5.7 Toma de muestra

Se lavó la vulva y desinfectó con alcohol al 70% y secados con sanitas. Con el objetivo de no contaminar el hisopo con microorganismos que no fueran parte de

la microbiota vaginal del animal, utilizando guantes de latex previamente desinfectados, se tomaron los labios cuidadosamente y se abrieron. Con un hisopo haciendo movimientos giratorios dentro de la vagina del animal se tomó una muestra, posteriormente el hisopo se depositó en un tubo con solución (cada tubo contenía 10 ml de solución salina).

5.8 Transporte de las muestras

Todas las muestras fueron depositadas en un recipiente hermético y con hielo para ser transportadas posteriormente al laboratorio de bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia de la universidad autónoma de Sinaloa.

5.9 Disoluciones

Con la ayuda de un vortex se homogeneizaron las muestras, posteriormente, utilizando una micropipeta se tomaron una muestra para hacer las siguientes diluciones: 1:10, 1:100, 1:1000.

5.10 Cultivo de bacterias

Para la preparación de la solución agar sangre se utilizó agar base agar sangre, y se le adicionó sangre equina hasta alcanzar una concentración de 7% de sangre. Se utilizaron cajas petris de plástico, en las cuales se vertieron 20 ml de agar base sangre previamente preparado, se dejaron gelificar, posteriormente para la prueba de esterilidad, las cajas con el agar fueron puestas en la incubadora a 37 °C por 24 horas.

Las diluciones una vez preparadas fueron homogenizadas utilizando un vortex, posteriormente con la ayuda de una micropipeta se tomaron 100 µL de la dilución y en el centro de la placa de agar sangre con la ayuda de un espaciador celular haciendo movimientos giratorios se dispersó la muestra por toda la superficie de la

placa, una vez la muestra en fuera absorbida por el agar y se incubaron por 24 horas a una temperatura de 37 °C.

5.11 Preparación de pruebas bioquímicas

Se realizaron 5 pruebas bioquímicas para cada una de las muestras. Las muestras se prepararon en tubos de ensayo de la mL, Sulfuro Indol Motilidad (SIM) (4 mL/tubo), TSI (6 mL/tubo), LIA (6 mL/tubo), citrato de Simmons (6 mL/tubo), G. N. (6 mL/tubo). Los tubos de ensayos con los diferentes medios de cultivo se esterilizaron en autoclave por 15 minutos a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 lbf/ui². Los tubos de ensayos con medios de cultivo de G.N. y SIM fueron puestos en gradillas, mientras que los tubos de TSI, LIA y citrato de Simmons fueron puestos en una superficie con una inclinación de 15° en una superficie plana. Se dejaron secar los tubos de ensayos hasta su gelificación.

5.12 Aislamiento

Las colonias fueron clasificadas por sus características macroscópicas (forma de la colonia, color de la colonia y tamaño de la colonia), así como sus características microscópicas (tamaño, forma y con la implementación de la técnica de tinción Gram para la diferenciación de las bacterias Gram + y Gram -) y con la ayuda de las pruebas bioquímicas.

Con el ayuda de un asa bacteriológica se tomo una muestra de cada colonia diferente presente en cada placa, Se sembró cada una de las muestras en agar sangre mediante la técnica de estriado por agotamiento y se dejaron en la incubadora por 24 hrs. una temperatura de 37°C.

5.13 Análisis de resistencia

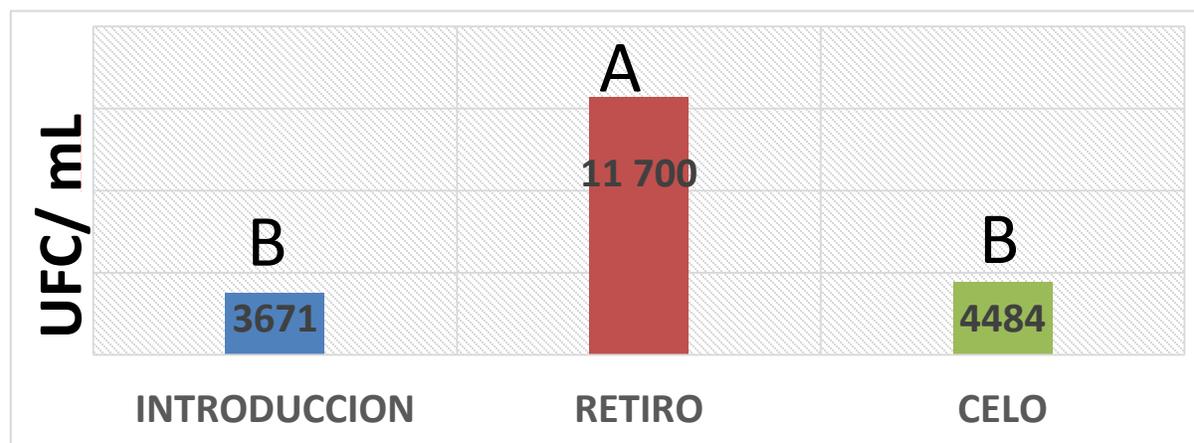
Se preparó un medio agar de Mueller-Hinton de acuerdo a las instrucciones del fabricante, el pH final a temperatura ambiente estuvo entre 7.2 y 7.4; posteriormente se colocaron 25 mL del medio en cajas de Petri de 90 mm diámetro o 60 mL, de tal forma que la profundidad sea de 4 mm. Las placas fueron guardadas en el refrigerador (2 a 8 °C) en bolsas de plástico, para disminuir la pérdida de agua por evaporación, antes de usarse, las placas se colocaron en una incubadora a 35 °C por 30 minutos para eliminar la humedad excesiva. Con una asa se tocó cuatro ó cinco colonias aisladas del mismo tipo morfológico e incubar en 4 ó 5 mL de medio de cultivo, pudiendo ser caldo Mueller-Hinton o caldo de soya tripticasa; se incubaron a 35 °C hasta que aparezca una turbidez ligera (generalmente entre 2 a 5 horas) la turbidez se ajustó con solución salina estéril o caldo estéril hasta tener una densidad comparable, con un estándar de sulfato de bario. El estándar se preparó mezclando 0.5 mL de BaCl₂ 0.048M (1.175% peso/volumen de BaCl₂·2H₂O) con 99.5 mL de H₂SO₄ al 1% v/v (0.36 N), que es la mitad del estándar No.1 de MacFarland (se denomina a menudo estándar 0.5 de MacFarland) el estándar corresponde a aproximadamente 10⁸ microorganismos/mL. La suspensión ajustada del inóculo no debió permanecer más de 15 a 20 min. Antes de proceder a sembrarla en la caja de Petri. Para inocular el agar se utilizó un hisopo estéril de algodón el cual se humedeció con la suspensión, se quita en el exceso de caldo presionando y girando el hisopo sobre la pared interna del tubo por arriba del nivel del caldo; se estrió en el medio en tres direcciones sobre la totalidad de la superficie del agar, para obtener un inóculo uniforme, se efectuó un último barrido del hisopo sobre el reborde de la caja de Petri y el agar. Cuando el inóculo se secó (de 3 a 5 minutos) se procedió a colocar los sensidiscos.

Los sensidiscos se tomaron con pinza estéril y se colocaron en el medio en un tiempo menor de 15 min. después de haber inculado la placa; los discos se presionaron ligeramente para asegurar un contacto con la superficie. Después de 15 min. de haber colocado los discos, se invirtió la caja de Petri y se puso a incubar a 35 °C. El tiempo de incubación fue de 16-18 hrs. La medición de los halos de inhibición fueron medidos usando una regla.

VI. Resultados y Discusiones

Las unidades formadoras de colonias (UFC's) fueron muy superiores al momento del retiro en comparación con lo obtenido al momento previo a la inserción del dispositivo, sin embargo, la concentración de UFC's en este último y al momento del celo no presenta diferencia estadística (Gráfica. 1). El aumento en la concentración bacteriana es debido principalmente a la acción física del dispositivo al presentar porosidades representa un lugar en el que las bacterias pueden anidarse y reproducirse fácilmente y además el efecto inmunosupresor de la hormona presente en el dispositivo (progesterona), la cual evita que el animal realice acciones para mantener las condiciones estables dentro del microcosmo (vaginal Lewis, 2003; Al-Hamedawi et al., 2003). La disminución de la carga bacteriana al momento del celo se debe a la capacidad del animal para recuperar la homeostasis, debido a que necesita mantener las condiciones adecuadas para llevar a cabo el proceso de reproducción y permitir llegar a la fecundación del ovulo (Menes et al., 2010).

Gráfica 1. efecto del dispositivo intravaginal sobre la microbiota por periodo



Introduccion= antes de colocar el CIDR; Retiro= momento del retiro del dispositivo; Celo momento de haber entrado en celo; Literales diferentes indican diferencia estadística.

Al analizar las unidades formadoras de colonias (UFC) durante los diferentes periodos (colocación, retiro y celo) y hacer una comparación entre la utilización de un dispositivo nuevo y el mismo reutilizado por segunda ocasión sin diferenciar el tratamiento al cual fueron sometidos los dispositivos, se puede observar que no existe diferencia estadística entre ellos en ninguno de los tres periodos (tabla 1).

Tabla 1. UFC's de cada periodo utilizando CIDR nuevo y CIDR reutilizado por segunda ocasión.

PERIODO Mx	UFC			P
	Nuevo	R2	EEM	
Colocación	3357	3986	323	0.34
Retiro	10707	12693	682	0.149
Celo	4300	4679	364	0.612

Nuevo=CIDR nuevo; R2= CIDR reutilizado por segunda ocasión; EEM= error estándar de la media; P= probabilidad de error; *Se acepta diferencia cuando $P \leq 0.05$.

En una comparación de los distintos tratamiento empleado para desinfectar los dispositivos, es posible observar que las unidades formadoras de colonias en el periodo de colocación y retiro se comportaron prácticamente iguales al no presentar diferencia estadística, sin embargo al momento del retiro que es donde se observa la mayor concentración de bacterias si hubo diferencia estadística entre los tiramientos, en los tratamiento de cloruro de benzalconio y autoclave se logra observar una menor carga bacteriana respecto a luz ultravioleta (tabla 2).

Cloruro de benzalconio es un [sufactante](#) catiónico cuya acción germicida la ejerce por cambio de la tensión superficial en superficies que contacta (ministerio de salud Vasco, 2011), es empleado en solución líquida y permite impregnar el área interior de los dispositivos; El autoclave es un método de esterilización que se basa en la utilización de calor húmedo, empleando altas presiones permite al vapor de agua adquirir mucha energía en forma de calor, a su vez, esto permite que el vapor impregne el material por completo, traspasando este calor hasta llegar a un equilibrio térmico, la temperatura alcanzada es de 121 °C la cual permite eliminar el 100% de los microorganismos presentes (Philip, 2011).

Cloruro de benzalconio y autoclave permite eliminar los microorganismos de la parte interna como de la parte externa del dispositivo, mientras la luz ultravioleta elimina solo la parte externa que esta expuesta a los rayos ultravioletas, esta longitud de onda no es capaz de traspasar el material de silicona. Los dispositivos al poseer mayor carga bacteriana ayudaran a un mayor rompimiento de la homeostasis vaginal lo que da como resultado una mayor carga bacteriana.

Tabla 2. UFC's en los diferentes periodos con los tres tratamientos de desinfección.

UFC					
PERIODO	CI-B	AC	U.V.	EEM	P
Mx					
Colocación	3200	4230	3563	323	0.40
Retiro	12360	9790	13263	682	0.095
Celo	3760^B	4120^{AB}	5863^A	364	0.047

CI-B= cloruro de benzalconio; AC=autoclave; U.V.= Ultravioleta; EEM= error estándar de la media; P= probabilidad de error; Las literales diferentes indican diferencia estadística.

Se realizó un análisis para determinar si existe diferencia entre los tratamientos de desinfección en cada periodo con los dispositivos nuevos y reutilizados por segunda ocasión (tabla 3), en el periodo de inserción no se observa diferencia estadística entre los tratamientos con dispositivos nuevos y reutilizados por segunda ocasión.

En el periodo de retiro únicamente se observa diferencia estadística entre los tramítenos con los dispositivos reutilizados por segunda ocasión, autoclave demostró ser el tratamiento donde la concentración bacteriana fue menor, en los tramítenos de cloruro de benzalconio y luz ultravioleta no se observa diferencia estadística entre ellos. Autoclave y luz ultravioleta son métodos de desinfección, lo que significa que eliminan el 99.999999% de las bacterias, sin embargo, la autoclave puede penetrar a través del dispositivo y eliminar no solo los microorganismos de la superficie como es el caso de la esterilización utilizando luz ultravioleta (HUPP. J, 2010).

Tabla 3. Comparación de la concentración de unidades formadoras de colonias (UFC) en los diferentes tratamientos con CIDR nuevo y reutilizado por segunda ocasión en los 3 periodos.

UFC					
PERIODO	CI	AC	UV	EEM	P
Mx					
<u>Inserción</u>					
Nuevo	2720	4520	2700	590	0.36
R2	3680	3940	4425	264	0.56
<u>Retiro</u>					
Nuevo	10400	10400	11475	906	0.88
R2	14320^A	9180^B	15050^A	980	0.012
<u>Celo</u>					
Nuevo	3400	3880	5950	662	0.29
R2	4120	4360	5775	327	0.09

Nuevo= CIDR Nuevo; R2= CIDR reutilizado por segunda ocasión; CI= cloruro de benzalconio; AC= Autoclave; UV= luz ultraviolet ;EMM= error estándar de la media; las literales diferentes indicant diferencia estadística.

Al comparar el comportamiento de la microbiota vaginal con la implementación de los dispositivos nuevos y reutilizados en los diferentes periodos por tratamientos (tabla 4), no se observa diferencia estadística en periodo de inserción del dispositivo.

En el periodo de retiro del dispositivo se puede observar una diferencia estadística y una tendencia en las concentraciones bacterianas en la reutilización del dispositivo respecto al dispositivo nuevo con el método de luz ultravioleta y cloruro de benzalconio respectivamente, esto se debe a la incapacidad de los tratamientos por eliminar completamente a las bacterias presentes en ellos, es sabido que las bacterias Gram negativas son las que principalmente se asocian a descargas mucopurulentas y vaginitis, cloruro de benzalconio es incapaz de eliminar en su totalidad las bacterias Gram negativas, lo que permite que al momento de la reinsertación del dispositivo estas entren de nuevo y hagan un mayor desequilibrio dando como resultados la proliferación bacteriana (Acosta Glo et al., 2000; Ministerio de Salud Vasco, 2011). En el tratamiento con autoclave no se logra observar una diferencia estadística entre la concentración bacteriana con el uso de dispositivos nuevos y reutilizados por segunda ocasión, es decir, la concentración bacteriana fue prácticamente la misma, esto se le atribuye a la capacidad de este método de esterilización de eliminar prestamente a todos los microorganismos presentes en el dispositivo (PHILIP D., 2011; HUPP J., 2010).

Tabla 4. Comparación de la concentración de unidades formadoras de colonias (UFC) utilizando CIDR nuevo y reutilizado por segunda ocasión en los 3 periodos con diferente tratamiento .

Periodo	n	UFC		EEM	P
		Nuevo	R2		
Mx					
<u>Inserción</u>					
CI-B	5	2720	3680	368	0.21
Autoclave	5	4520	3940	722	0.71
UV	4	2700	4425	505	0.084
<u>Retiro</u>					
CI-B	5	10400	14320	1057	0.057
Autoclave	5	10400	9180	1061	0.59
UV	4	11475	15050	1266	0.173
<u>Celo</u>					
CI-B	5	3400	4120	405	0.40
Autoclave	5	3880	4360	465	0.63
UV	4	5950	5775	887	0.93

Nuevo= CIDR Nuevo; R2= CIDR reutilizado por segunda ocasión; CI-B= cloruro de benzalconio; AC= Autoclave; UV= luz ultraviolet ; n= tamaño de muestra; EMM= error estándar de la media.; las literales diferentes indican diferencia estadística.

Tabla 1. Tabla de frecuencia de bacterias aisladas resistentes a los diferentes antibióticos.

	CPF	CLM	E	PE	TE	CF	DC	GE	SXT	VA
Estafilococos spp	57.1	57.1	14.3	71.4	14.3	57.1	28.6	14.3	35.7	35.7
Estreptococos spp	21.4	7.1	7.1	50	21.4	14.3	14.3	21.4	21.4	50
	CF	CFX	CPF	CL	NF	AK	GE	NET	NOF	SXT
E. coli	85.7	0	14.3	7.1	42.9	92.9	14.3	14.3	7.1	14.3

Ampicilina (AM), Cefalotina (CF), Cefotaxima (CFX), Ciprofoxacina (CPF), Clindamicina (CLM), Dicloxacilina (DC), Eritromicina (E), Gentamicina (GE), Penicilina (PE), Tetracilina (TE), Sulfametoxazol/ Trimetroprim (STX), y Vancomicina (VA), Cloranfenicol (CL), Netilmicina (NET), Nitrofurantoina (NF) y Norfloxacin (NOF).

VII Conclusiones

Sin importar el método utilizado las concentraciones bacterianas aumentan cuando es introducido el dispositivo, esto por la acción física del dispositivo, sin embargo esto no representa un gran riesgo para el animal, debido a su capacidad para recuperar la homeostasis una vez es retirado el dispositivo. Las concentraciones en la microbiota vaginal de los animales aumenta al momento de reutilizar el dispositivo, sin embargo, es posible reutilizar un dispositivo intravaginal (CIDR) hasta dos ocasiones utilizando un método de esterilización como lo es el autoclave, este método demostró no presentar diferencia entre la concentración bacteriana obtenida al momento del retiro del dispositivo nuevo y reutilizado por segunda ocasión. Al implementar un método como autoclave que elimina prácticamente todas las bacterias presentes el dispositivo ayuda a evitar la diseminación de cepas bacterianas multirresistentes de un animal a otro.

VIII. LITERATURA CITADA