



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNOPROTECTOR Y SANITARIO DE LA *Ilex guayusa loes* (GUAYUSA) SOBRE EL TRACTO REPRODUCTIVO EN VACAS RECEPTORAS DE EMBRIONES CHAROLÁIS

ANA BEATRIZ MALDONADO VERA

**Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo,
presentado ante el Instituto de Posgrado y Educación Continua de la ESPOCH,
como requisito parcial para la obtención del grado de:**

**MAGÍSTER EN REPRODUCCIÓN ANIMAL MENCIÓN
REPRODUCCIÓN BOVINA.**

RIOBAMBA - ECUADOR

Diciembre 2021

©2021, Ana Beatriz Maldonado Vera

Se autoriza la reproducción parcial o total, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho del Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

CERTIFICACIÓN

EL TRIBUNAL DE TRABAJO DE TITULACIÓN CERTIFICA QUE:

El Trabajo de Titulación modalidad **Proyectos de Investigación y Desarrollo**, titulado “Evaluación del efecto inmunoprotector y sanitario de la *Ilex guayusa loes* (guayusa) sobre el tracto reproductivo en vacas receptoras de embriones Charoláis”, de responsabilidad de la Ing. Ana Beatriz Maldonado Vera, ha sido prolijamente revisado y se autoriza su presentación.

Tribunal:

Ing. Luis Eduardo Hidalgo Almeida; Ph D.
PRESIDENTE

**LUIS EDUARDO
HIDALGO
ALMEIDA**
Firmado digitalmente por LUIS
EDUARDO HIDALGO ALMEIDA.
Nombre de reconocimiento (DN):
c=EC, o=BANCO CENTRAL DEL
ECUADOR, ou=ENTIDAD DE
CERTIFICACION DE INFORMACION
ECIBE, 1=QUITO,
serialNumber=000045791, cn=LUIS
EDUARDO HIDALGO ALMEIDA
Fecha: 2021.12.08 14:37:17 -05'00'

Ing. Byron Leoncio Díaz Monroy; Ph.D.
DIRECTOR

**BYRON
LEONCIO
DIAZ
MONROY**
Firmado
digitalmente por
BYRON LEONCIO
DIAZ MONROY
Fecha: 2021.12.09
21:35:59 -05'00'

Dra. Nelly Ivonne Guananga Díaz; Mag.
MIEMBRO

**NELLY
IVONNE
GUANANGA
DIAZ**
Firmado
digitalmente por
NELLY IVONNE
GUANANGA DIAZ
Fecha: 2021.12.09
21:23:23 -05'00'

Ing. Luis Alfonso Condo Plaza; Ph D.
MIEMBRO

**LUIS ALFONSO
CONDO
PLAZA**
Firmado digitalmente
por LUIS ALFONSO
CONDO PLAZA
Fecha: 2021.12.09
15:29:10 -05'00'

Riobamba, diciembre, 2021

DERECHOS INTELECTUALES

Yo, Ana Beatriz Maldonado Vera, declaro que soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este **Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo**, y que el patrimonio intelectual generado por la misma pertenece exclusivamente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.



ANA BEATRIZ MALDONADO VERA

No. Cédula 140056127-8

DEDICATORIA

A mi madre Laura Vera por todo el amor y sacrificio reflejado en su vida, a mi padre Efraín Maldonado, a mi hermano por estar siempre de forma incondicional y ser mi mejor amigo.

A mis hijas Fabiana y Anaily, las cuales han llenado días de alegría, siendo ellas mi fuerza para continuar adelante y cumplir mis objetivos planteados.

ANA MALDONADO V.

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, y al Instituto de Posgrado y Educación Continua IPEC, por todos los conocimientos impartidos para la formación profesional de su alumnado. A los docentes del IPEC, y amigos que estuvieron a lo largo de la carrera; de manera especial al Ing. Byron Leoncio Díaz Monroy. PhD, Tutor, Dra. Nelly Ivonne Guananga Diaz Mg. Sc.; Ing. Luis Alfonso Condo Plaza. Mg. asesores, quienes han aportado con valiosos criterios para el desarrollo del trabajo de titulación.

ANA MALDONADO V.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	xiv
ABSTARCT.....	xv
CAPITULO I	
INTRODUCCIÓN	1
1 MARCO REFERENCIAL	2
1.1 Problema de investigación	2
1.2 Formulación del problema	4
1.3 Justificación de la investigación.....	4
1.4 Objetivos de la Investigación	5
1.4.1 General	5
1.4.2 Específicos	6
1.5 Hipótesis.....	6
CAPITULO II	
2 MARCO TEÓRICO	7
2.1 Inseminación artificial.....	7
2.2 Raza Charolais.....	9
2.3 Anatomía y fisiología del aparato reproductor femenino bovino	9
2.3.1 Genitales externos	10
2.3.2 Genitales internos.....	10
2.3.3 Ovarios	12
2.4 Tejido del útero	13
2.4.1 Miometrio.....	14
2.4.2 Perimetrio	14

2.5	Ambiente uterino controlado.....	14
2.6	Control materno de la receptividad uterina.	15
2.7	Producción de leche endometrial.	15
2.8	Aumento de la permeabilidad vascular.	16
2.9	Modificación morfo fisiológica del útero.....	16
2.10	Modificación de la respuesta inmune materna.	17
2.11	Estructura histológica y funciones del cérvix y la vagina	17
2.12	Microbiota normal vaginal y uterina.....	19
2.13	Microbiota uterino.....	21
2.13.1	En hembras clínicamente sanas.....	22
2.13.2	En la gestación y en el puerperio.....	22
2.13.3	En vacas infecundas	23
2.13.4	En vacas con infecciones clínicas	24
2.14	Transferencia de embriones.....	25
2.15	Principios de la técnica de transplante de embriones	26
2.16	Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la receptora en un programa de transferencia de embriones.	26
2.17	Selección de hembras receptoras.....	27
2.18	Manejo de receptoras.....	27
2.19	Sincronización de receptoras.....	29
2.20	Factores que afectan la tasa de concepción en receptoras transferidas en tiempo fijo.	30
2.21	El <i>illex guayusa loes</i> (Guayusa).	31
2.21.1	Tronco	32
2.21.2	Hojas.....	33
2.21.3	Interacción Con Fármacos.....	35
2.21.4	Toxicidad.....	35

2.22	Composición de la Guayusa	36
2.23	Aminoácidos en la guayusa.....	38
2.24	Antioxidantes	38
CAPÍTULO III.....		40
3	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	40
3.1	Localización	40
3.2	Población.....	40
3.3	Variables.....	42
3.3.1	Variable Independiente.....	42
3.3.2	Variables Dependientes.....	42
3.4	Metodología	42
3.5	Diseño de investigación	43
3.6	Métodos de la investigación.....	43
3.7	Enfoque de la investigación	43
3.7.1	El enfoque cuantitativo.....	43
3.7.2	El enfoque cualitativo.....	44
3.8	Alcance de la Investigación.....	44
3.9	Población de Estudio	44
3.10	Selección de la muestra	45
3.11	Tamaño de la muestra.....	45
3.12	Procedimiento experimental.....	45
3.12.1	Selección de las vacas receptoras.....	45
3.12.2	Preparación de equipos y materiales	47
3.12.3	Determinación del celo.....	48
3.12.4	Determinación de la preñez.....	48
3.13	Técnicas de recolección de datos primarios y secundarios	49

3.13.1	Determinar la cantidad de células polimorfas nucleares.	49
3.13.2	Carga bacteriana por tipo en el tracto reproductor de las vacas (cultivo y antibiograma).	50
3.13.3	El pH del tracto reproductor de la vaca.....	50
3.13.4	Peso corporal y porcentaje de preñez.	51
3.14	Instrumentos de recolección de datos primarios y secundarios	51
3.15	Materiales de laboratorio de microbiología.	51
3.16	Métodos de endocrinología en el laboratorio	53
3.17	Metodología para la observación y conteo de células en el laboratorio.....	53
3.18	Métodos estadísticos para procesar los datos recopilados.....	54
CAPÍTULO IV		56
4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN		56
3.19	Peso inicial y final de las vacas	56
3.20	Cuantificación de Células Polimorfo Mononucleares en el tracto reproductivo de las vacas (PMN).	58
3.21	Concentración hormonal de Progesterona en la sangre de las vacas evaluadas.	60
3.22	Concentración hormonal de Estrógenos en la sangre de las vacas evaluadas	64
3.23	Implantación del embrión.....	69
3.24	pH.....	70
3.25	Bacterias encontradas en la vagina de vacas, (<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Shigella spp</i>).	72
CONCLUSIONES		77
RECOMENDACIONES.....		78
BILBIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-3. Características generales del cantón Morona	41
Tabla 2-3. Pasos para seguir para la sincronización de receptoras.....	47
Tabla 3-3. Esquema del experimento.	54
Tabla 4-3. Esquema del ADEVA	55
Tabla 5-4 Parámetros productivos y reproductivos de las vacas Charolais.	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-2. Hoja de la guayusa	33
Figura 2-3. Mapa geográfico de la provincia Morona Santiago.	40
Figura 3-4. Pesos promedios de las vacas.....	57
Figura 4-4. Número de células Polimorfos Mononucleares.	58
Figura 5-4. Niveles de progesterona medidas en sangre.....	61
Figura 6-4. Niveles de estrógeno presentes en la sangre.	64
Figura 7-4. Implantación del embrión.....	69
Figura 8-4. pH obtenido de la vagina de la vaca.....	71
Figura 9-4. Nivel de Escherichia coli.....	72
Figura 10-4. Niveles de Klebsiella spp.	73
Figura 11-4. Niveles de Shigella spp.	73

ÍNDICE DE ANEXOS

- A. CEPILLO (CITOBUS)**
- B. CULTIVO DE BACTERIAS.**
- C. CULTIVO DE BACTERIAS.**
- D. CHEQUEO GINECOLÓGICO.**
- E. TOMA DE MUESTRA PARA CULTIVO DE BACTERIAS.**
- F. TOMA DE MUESTRA DE SANGRE.**
- G. TOMA DE MUESTRA DE SECRECIÓN VAGINAL.**
- H. TÉCNICA CITOBUSH (CEPILLADO VAGINAL).**
- I. APLICACIÓN DE LA SECRECIÓN EN LA PLACA PARA CONTEO DE CÉLULAS (PMN).**
- J. TOMA DE MUESTRA PARA EL CULTIVO DE BACTERIAS.**
- K. CÉLULAS (PMN) VISTO DESDE EL MICROSCOPIO.**
- L. CÉLULAS (PMN) VISTO DESDE EL MICROSCOPIO.**
- M. CÉLULAS (PMN) VISTO DESDE EL MICROSCOPIO.**
- N. RESULTADOS DE LABORATORIO.**

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto inmunoprotector y sanitario de la *Ilex guayusa loes* (guayusa) sobre el tracto reproductivo en vacas. Se desarrolló en la provincia de Morona Santiago; Cantón Morona, Parroquia Macas, en la comunidad del Zapatero, con 20 vacas Charoláis no puras, las mismas que fueron distribuidas en cuatro tratamientos, T0 grupo testigo, T1 100 g, T2 200g, T3 300 g de hojas de guayusa, con cinco repeticiones cada tratamiento. La presente investigación se analizó bajo un modelo matemático general y la separación de medias según Newman, determinándose que la utilización de *Ilex guayusa loes* (guayusa) tiene un efecto inmunoprotector, puesto que la utilización de 300 g de *Ilex guayusa loes* (guayusa) se obtuvo 23,9% de células *Polimorfos Mononucleares*, 25,00 UFC/ml de la bacteria *Escherichia coli* (bacteria que influye en los problemas reproductivos) y un 29,41 % de implantación de los embriones, mientras que la aplicación del T0 permitió registrar 11,76 % de implantación y el 91,0 % de células polimorfos nucleares, y 33,33 UFC/ml, lo cual nos indica que la guayusa influyó en la implantación del embrión, recomendando la utilización de la *Ilex guayusa loes* (guayusa) en la alimentación de vacas para mejorar su estado reproductivo.

Palabras claves: <GUAYUSA (*Ilex guayusa loes*)>, <ANTIOXIDANTE>, <POLIMORFOS NUCLEARES>, <TRANSFERENCIA DE EMBRIÓN>, <VACA (*Bos Indicus*)>.

LUIS
ALBERTO
CAMINOS
VARGAS

Firmado digitalmente por
LUIS ALBERTO CAMINOS
VARGAS
Nombre de reconocimiento
(DN): c=EC, l=ROBAMBA,
serialNumber=0602766976,
cn=LUIS ALBERTO CAMINOS
VARGAS
Fecha: 2021.08.30 18:14:26
-05'00'



0093-DBRAI-UPT-IPEC-2021

ABSTRACT

The objective was to evaluate the immunoprotective and sanitary effect of *Ilex guayusa* loes (guayusa) on the reproductive tract in cows. It was developed in the province of Morona Santiago; Canton Morona, Parish Macas, in the community of Zapatero, with 20 non-purebred Charolais cows, which were distributed in four treatments, T0 control group, T1 100 g, T2 200 g, T3 300 g of guayusa leaves, with five repetitions of each treatment. The present research was analyzed under a general mathematical model and the separation of means according to Newman, determining that the use of *Ilex guayusa* loes (guayusa) has an immunoprotective effect, since the use of 300 g of *Ilex guayusa* loes (guayusa) obtained 23.9% of Polymorphous Mononuclear cells, 25.00 UFC/ml of *Escherichia coli* bacteria (bacteria that influences reproductive problems) and 29, 41 % of embryo implantation, while the application of T0 allowed to register 11.76 % of implantation and 91.0 % of nuclear polymorph cells , and 33.33 CFU/ml, which indicates us that guayusa influenced embryo implantation, recommending the use of *Ilex guayusa* loes (guayusa) in the feeding of cows to improve their reproductive status.

Key Words: <GUAYUSA (*Ilex guayusa* loes)>, <ANTIOXIDANT>, <NUCLEAR POLYMORPHOS>, <EMBRYO TRANSFER>, <COW (*Bos Indicus*)>.

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

Diversos factores influyen en la reproducción de las hembras bovinas, entre los que se encuentran el manejo, nutrición, sanidad, humedad, temperatura, baja calidad de los pastos, deficiente cultura para la detección de celos, el tipo de geografía irregular, y la genética de los animales.

Estos factores han provocado que los ganaderos no obtengan un ternero al año por vaca, dando como resultado un bajo crecimiento de su hato ganadero de acuerdo con los años de trabajo y esfuerzo invertidos, muchos ganaderos han tenido que vender sus animales y sus fincas debido a que es un trabajo muy sacrificado y de poca remuneración económica.

En la Región Oriental el principal problema que enfrenta la ganadería es la mala calidad de los pastos, lo que afecta directamente a la nutrición de los animales alterando la fisiología normal de la reproducción de las vacas. Siendo el Oriente una región de suelos muy pobres, provoca que los ganaderos tengan que realizar gastos adicionales en abonos para mejorar la calidad de los suelos, y por ende que se eleve el costo de producción para los ganaderos.

La transferencia de embrión en la región Amazónica está en auge, queriendo mejorar el hato ganadero de una manera más rápida, sincronizando a las vacas receptoras con un buen manejo sanitario y nutricional principalmente, no teniendo que ser de raza estas vacas receptoras, ya que menos pureza son más rústicas y predecibles para recibir el embrión y llegar a un final exitoso que sería el desarrollo del embrión y su parto su nacimiento de un ejemplar de alta genética.

Varios ganaderos dan a conocer que la (*Ilex Guayusa Loes*) es una alternativa natural, que según los pueblos indígenas y colonos, es una excelente planta que ayuda a aumentar la fertilidad en las mujeres, razón por la cual los productores han tomado la decisión de empezar a suministrar la guayusa fresca y molida con sales minerales a sus animales durante los días en los que se realiza el protocolo de IATF y en transferencia de embriones, dando a conocer que han tenido buenos resultados.

Las vacas en un gran porcentaje han quedado gestantes; por esta razón se ha planteado la siguiente hipótesis; La administración de *Ilex guayusa loes* (guayusa) como inmunoprotector y sanitario en la alimentación de vacas, influirá positivamente en el implante de los embriones en madres Charoláis receptoras

MARCO REFERENCIAL

1.1 Problema de investigación

Durante los últimos años se ha venido realizando investigaciones en la rama de la biotecnología, enfocadas la reproducción animal en diferentes especies, perfeccionando hasta alcanzar buenos resultados.

En los bovinos se viene practicando sistemas de reproducción natural y artificial como: la Inseminación (IA) con presencia de estro natural o protocolos de sincronización; la reproducción *in vitro*, la superovulación con sus respectivos trasplantes de embriones; esta última se desarrolla con mayor frecuencia en las ganaderías de la Amazonia Ecuatoriana (ASOCIACION CHAROLAIS).

Este tipo de tecnologías, involucran manipulación del ciclo estral de la vaca, llevándose un seguimiento de ultrasonografía, para observar la eficiencia del protocolo en el ciclo estral y en la ovulación; identificándose ventajas y desventajas en cada uno de los tratamientos; sabiendo que la tasa de preñez es más alta cuando se maneja el tratamiento hormonal para sincronizar la ovulación sin la necesidad de detectar el celo (Cerón y Roura, 2001).

En la transferencia de embriones (TE) se estudia con más frecuencia, a la receptora y la influencia sobre el porcentaje de preñez (Sheldon *et al.*, 2008), interfiriendo varios parámetros en conjunto que deben ser analizados antes de escoger a la vaca receptora como el factor racial, edad, estado fisiológico, estado sanitario, peso, estado nutricional, condición corporal, el manejo y el estudio del tracto reproductivo (Lobus, 1986).

El tracto reproductivo es el que recibe al embrión, tomando en cuenta que las estructuras ováricas presentes en la sincronización del celo, garantizarán la formación de un cuerpo lúteo (CL), que genere concentraciones plasmáticas de progesterona (P4), suficientes para dar un ambiente uterino favorable y se produzca la expresión del interferón Tau (reconocimiento materno) por parte del embrión, para el desarrollo del mismo (Duica y Todovio, 2007).

Una de las causas del fracaso de la transferencia es el ambiente uterino desfavorable, a pesar que el animal estaba con un manejo sanitario, nutricional y protocolos hormonales controlados, similares a la donadora del embrión; intervienen factores como: el estrés del animal, el cambio de la nutrición balanceada, los cambios climáticos. o por el movimiento del animal hasta el lugar de la transferencia del embrión (TE) (Perez y Simon, 2001).

Uno de los factores que intervienen en la reproducción es la nutrición el cual puede ser modificado por el hombre de acuerdo con la necesidad del animal. Ipek *et al.*, (2012) propone que una modificación de la nutrición en rumiantes mediante la suplementación de aditivos con propiedades antioxidantes mitiga los efectos nocivos de estrés oxidativo y promueve un impacto directo sobre el comportamiento productivo y reproductivo en vacas lecheras. Considerando que el efecto antioxidantes y balance de energía influye en la función de neutrófilos y la respuesta inmune (Sheldon *et al.*, 2008).

LeBlanc (2014) manifiesta que la inmunidad innata de leucocitos (neutrófilos) polimorfo mononucleares (PMN) es el mecanismo predominante de defensa inmune temprana tanto en la ubre y en útero. Por lo tanto, es necesario tomar en cuenta que, para la receptividad del embrión en el utero, depende de la correcta sincronía del eje conceptus-cuerpo lúteo-endometrio (Diaz y Alba 1980).

En esta investigación nos enfocaremos en el endometrio donde se encuentran los polimorfos mononucleares PMN, los cuales son células fagocíticas en el útero y constituyen la primera línea de defensa frente a infecciones en el endometrio, reclutados desde la circulación periférica hacia la luz uterina para fagocitar y controlar la invasión bacteriana (Sheldon y Dobson, 2004).

No se ha realizado investigaciones sobre el efecto de la guayusa a nivel del organismo de la vaca, el cual mejore a nivel del aparato reproductivo, solo se conoce de manera empírica los efectos por parte de los ganaderos que han venido notando una mejora en la parte reproductiva de estos animales.

La guayusa se ha venido utilizando como una bebida relajante, energética y también para mejorar la fertilidad en las mujeres, por ello se estudió el efecto inmunoprotector y sanitario de *Ilex guayusa* Loes (guayusa) en el tracto reproductivo de la vaca, evaluando los polimorfos mononucleares (PMN), y la relación con las hormonas y la presencia de bacterias en la vagina de la vaca.

1.2 **Formulación del problema**

¿Cuál es el efecto inmunoprotector y sanitario de la *ILex guayusa loes* (guayusa) sobre el tracto reproductivo?

1.3 **Justificación de la investigación**

Todas las especies zootécnicas, para que expongan su potencial genético en su producción ya sea de carne o de leche, deben tener un manejo adecuado tomando en cuenta varios aspectos como es la alimentación, manejo sanitario, ambiente, etc.; para tener efectos económicos favorables, así en el caso de las vacas donadoras de embriones, se debe tratar de obtener el mayor número de embriones fértiles y a la vez las receptoras deben tener las mismas condiciones ambientales uterinas, la cual se pretendió mejorar con la aplicación en la dieta de las vacas la guayusa *Illex guayusa loes*, para que el embrión sea reconocido en el útero de la receptora, llegando al final de su gestación, y así obtener un ternero nacido vivo.

Se conoce poco acerca de la naturaleza, funcionamiento y cómo se podría lograr una mayor eficiencia reproductiva al disminuir la mortalidad embrionaria, la cual es una importante limitante. El ambiente receptivo en el útero, o ambiente embriotrófico, es la capacidad del organismo materno para hospedar el embrión exitosamente.

Sabiendo que el estrés se produce con mucha frecuencia y variada intensidad en las vacas por múltiples factores, afectando la homeostasis del cuerpo animal pudiendo ser este de origen externo o interno en condiciones extremas, reduciendo la eficacia de sus sistemas de control, al tiempo que desencadena un patrón intrínseco, que prepara al organismo para la lucha o la huida; el cual puede llegar a adaptarse o causar estrés.

La respuesta general del organismo ante el estrés se establece mediante la activación de 2 ejes: el Eje Simpático-Adrenal y el Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal, por ello, el estrés es el conjunto de ajustes fisiológicos relacionados con la excitación de los sistemas Nervioso Central, Vegetativo Simpático y Glándulas Adrenales. Las catecolaminas y los glucocorticoides son las principales hormonas que actúan en la respuesta al estrés.

Los sistemas hormonales que regulan la reproducción se conectan a la respuesta de estrés y están profundamente influidos por ella. Por ejemplo, el estrés por desnutrición o climas extremos, inhibe la liberación de hormonas gonadotrópicas (Lobus, 1986).

Por otro lado, las consecuencias del estrés sobre la reproducción de la vaca están caracterizadas por el anestro, ovulación retardada o ausente, menor índice de concepción, mortalidad embrionaria y esterilidad.

El efecto oxidativo por estrés es conocido por relacionar especies reactivas de oxígeno e hidrógeno provocando enfermedades inflamatorias.

Un antioxidante es una molécula lo suficientemente estable para donar un electrón a un radical libre y neutralizarlo, reduciendo de este modo su capacidad de hacer daño (Lobo *et al.*, 2010).

Varias especies de guayusa (*Ilex guayusa loes*) son utilizadas a nivel mundial con el fin de elaborar bebidas con propiedades medicinales para su consumo diario. De estas plantas se han aislado compuestos como polifenoles, flavonoides, saponinas y glucósidos que poseen actividades antiinflamatorias, antimicrobianas, antiparasitarias y antioxidantes. Estas características convierten al género *Ilex* en una fuente botánica de compuestos activos con potencial uso farmacéutico (Hao *et al.*, 2013).

En esta investigación se estudió a las células polimorfo mono mononucleares (PMN), los cuales son los responsables primarios del mantenimiento de las defensas normales del hospedero contra los microorganismos invasores en el útero de la vaca como en diferentes partes del organismo del animal.

A nivel de la vagina de la vaca actúan las células polimórficas, en defensa de los microorganismos invasores al ambiente uterino, por ello esta investigación determinó el efecto anti oxidativo de la guayusa (*Ilex guayusa loes*), midiendo las células polimórficas mediante el método de (CITOBURSH), en el tracto reproductivo de la vaca, luego de la alimentación con guayusa y posteriormente se realizó la transferencia de los embriones TE).

1.4 Objetivos de la Investigación

1.4.1 General

Evaluar el efecto inmunoprotector y sanitario de la *Ilex guayusa loes* (guayusa) sobre el tracto reproductivo en vacas.

1.4.2 Específicos

- Identificar las células polimorfonucleares en el tejido vaginal de las vacas receptoras de embriones alimentadas con y sin guayusa.
- Determinar la carga bacteriana del tracto reproductivo de las vacas receptoras de embriones alimentadas con y sin guayusa.
- Identificar los niveles hormonales de progesterona y estrógeno en la sangre de las vacas alimentadas con y sin guayusa

1.5 Hipótesis

La administración de *Ilex guayusa loes* (guayusa) como inmunoprotector y factor sanitario en la alimentación de vacas, influye en el implante de los embriones Charoláis en madres receptoras

CAPÍTULO II

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Inseminación artificial

El uso de la inseminación artificial ha permitido obtener excelentes resultados, por medio de estos protocolos se ha logrado acortar los días abiertos en las vacas y sumado a esto, varios ganaderos dan a conocer que la guayusa (*Ilex guayusa loes*) es una alternativa natural, que, según los pueblos indígenas y colonos, es una excelente planta que ayuda a aumentar la fertilidad en las mujeres.

Varios ganaderos han tomado la decisión de empezar a suministrar la guayusa fresca y molida con sales minerales a sus animales durante los días en los que se realiza el protocolo de sincronización para la posterior inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), dando a conocer que han tenido buenos resultados, ya que las vacas en un gran porcentaje han quedado gestantes.

En la actualidad con nuevas tecnologías que se han ido desarrollando, se sigue empleando la guayusa (*Ilex guayusa loes*) en la alimentación en vacas donadoras y receptoras de embriones, sabiendo que económicamente las ganancias no son las esperadas con esta última tecnología (transferencia de embriones), puesto que su eficiencia podría ser mayor.

Dentro de su composición química los fitoestrógenos presentes en la Guayusa (*Ilex guayusa loes*), son sustancias que estructural y funcionalmente son similares al 17-β estradiol o que producen efectos estrogénicos.

Los fitoestrógenos tienen una importante actividad que los estrógenos u hormonas sexuales femeninas. Esta peculiar acción “hormonal” confiere a los fitoestrógenos algunas características muy interesantes en la prevención y tratamiento del desequilibrio hormonal y otras enfermedades (Correa, 1989); (García H. , 1975).

Extractos hidroalcohólicos de la guayusa (*Ilex guayusa loes*) también han sido utilizados para comprobar el efecto estrogénico en ratas albinas (*Rattus norvegicus*) debido a la identificación de fitoestrógenos tales como : ononin, quercetina, y B sitosterol ; en diferentes dosis , produjeron un efecto estrogénico sobre los ovarios , útero y estradiol sérico de ratas inmaduras.

Concluyendo que el empleo de la guayusa (*Ilex guayusa loes*) resultaría beneficioso en el tratamiento de algunos casos de infertilidad en mujeres (Tuquinga, 2013) .

También se midió en vacas el nivel de la hormona luteinizante (LH), pero en esta investigación no se encontró ninguna diferencia significativa (Arias, 2013).

Los cofanes y Secoyas emplean la guayusa (*Ilex guayusa loes*) para tratar dolencias, mientras que los Tsáchilas beben la infusión de las hojas como antipirético, las mujeres se realizan baños de vapor para mitigar dolores antes y después del parto, y como analgésicos en dolencias menstruales (Dueñas *et al.*, 2016).

En la actualidad, su uso es más difundido como bebida estimulante y energizante (Runa, 2018). Un experimento realizado en ratas demostró que tiene propiedades terapéuticas, disminuyen el índice glucosúrico de los diabéticos (García H. , 1975); (Swanston *et al.*, 1989); (Bussmann *et al.*, 2011) comprobaron la actividad antimicrobiana. (Ruiz y Roque 2009) encontraron actividad antifúngica.

También en terneros como promotor de crecimiento, teniendo un beneficio positivo en cuanto al desarrollo y ganancia de peso del animal, favoreciendo los resultados del estudio financiero, pudiendo ser considerado como un promotor de crecimiento (Erazo, 2015).

Tomando en cuenta que frente a situaciones de estrés el organismo animal desencadena una serie de reacciones, que involucran la participación de ciertas zonas del sistema nervioso central y sistema nervioso autónomo (SNC y SNA), las cuales adaptan al organismo para que éste responda ante dicha situación de peligro o amenaza.

La gestación y lactancia en vacas lecheras son estados fisiológicos y son susceptibles a experimentar estrés metabólico y consecuentemente estrés oxidativo pudiendo estar relacionada con enfermedades metabólicas durante el período de transición (Celi *et al.*, 2010); (Celi y Gabai, 2015).

Para disminuir estos factores de riesgo es importante lograr una progresiva adaptación del rumen en especial en aquellas dietas donde existe desafíos de cantidad y calidad de alimento (Celi *et al.*, 2010).

Dentro de la alimentación podemos aumentar el sistema inmune de los animales evitando que el estrés que sufren las vacas por diferentes factores, afecte la parte reproductiva; teniendo en cuenta que el número de estos leucocitos (neutrófilos) polimorfo mononucleares (PMN); se encuentra reducida en las vacas después del parto, que puede predisponer al establecimiento de la

enfermedad uterina (Sheldon y Dobson, 2004); (Boer *et al.*, 2015). La salud reproductiva constituye un factor muy importante dentro de la eficiencia reproductiva (LeBlanc S. , 2008).

2.2 **Raza Charolais**

Es originario del Distrito de Charol, en el centro - este de Francia. Es una región muy fértil, quebrada, con desniveles de 500 metros entre los valles y las cimas, con muy buenos pastizales y clima semicontinental atenuado.

Los bovinos de la zona eran del tipo jurásico, de pelaje blanco y amarillo claro, pequeño y poco precoces. Claudio Mathieu, a partir de 1770, comienza a mejorar la raza, proporcionándoles, mediante cultivos, una alimentación abundante. Se mejora la aptitud carnicera y su precocidad mediante consanguinidad y selección, una alimentación racional y una infusión de sangre Shorthorn entre 1822 y 1845.

Piel de mediano espesor, suave, flexible. Mucosas rosadas, de un solo color uniforme, sin manchas. Pelo corto, de color blanco o blanco crema, sin manchas o lunares. A campo toman un tinte blanco pajizo (blanc froment).

Animal alto y largo con buen despegue del suelo, cuerpo voluminoso y cilíndrico, convexilíneo, con nalga convexa, masas musculares bien desarrolladas, pero no exageradamente marcadas, sin delimitaciones muy marcadas entre músculos.

Carne magra con veteado. Hay una variedad astada y una mocha. La astada tiene cuernos medianos, curvados hacia adelante. Para demostrar su genética en el fenotipo debe recibir una muy buena alimentación. (Williams, 1965)

2.3 **Anatomía y fisiología del aparato reproductor femenino bovino**

El aparato genital femenino es el órgano de reproducción de las hembras. Está capacitado para la producción de ovocitos y facilita su unión con los espermatozoides, así como el posterior alojamiento del embrión y el feto hasta el nacimiento. Para su estudio el aparato reproductivo de la hembra se ha clasificado en órganos genitales externos e internos (Gasquez y Blanco, 2004).

2.3.1 Genitales externos

Constituidos por: el vestíbulo, labios mayores, labios menores, clítoris, glándulas vestibulares

2.3.1.1 Vestíbulo

Según Gasquez y Blanco (2004), manifiesta que el vestíbulo de la vaca se extiende hasta el sitio donde el orificio uretral externo se abre en su superficie ventral. La pared del vestíbulo es similar a la de la zona posterior de la vagina, aunque existe mayor cantidad de tejido linfoide nodular en la zona superficial de la lámina propia-submucosa.

En la pared vestibular existe gran cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos, además de un laberinto de espacios cavernosos que se comportan como un tejido eréctil. En el tejido conectivo de la pared se pueden observar las denominadas glándulas vestibulares mayores y menores, que son glándulas túbulo alveolares mucosas.

2.3.1.2 Vulva

Según Quíntela *et al.*, (2006) indica que la vulva es la apertura externa del aparato reproductor; ella tiene dos funciones principales: abrirse para permitir la cópula y sirve como parte del canal de parto.

Incluidos en la estructura vulvar están los labios y el clítoris. Los labios de la vulva están ubicados a los lados de la apertura vulvar, y tienen aspecto seco y arrugado cuando la vaca no está en celo. En la medida que el animal se acerque al celo, la vulva empezará a hincharse y tomará una apariencia rojiza y húmeda.

2.3.2 Genitales internos

Constituidos por: vagina, cérvix, útero, oviductos o trompas de Falopio, ovarios.

Los órganos genitales internos como el cérvix y el útero están sostenidos por el ligamento ancho. Este ligamento consta del meso ovario, que sostiene al ovario; el mesosálpinx, que sostiene el oviducto; y el mesometrio, que sostiene al útero. En bovinos, la inserción del ligamento ancho es dorso lateral en la región del íleon, el útero está dispuesto como los cuernos de un carnero, con la convexidad dorsal y los ovarios situados cerca de la pelvis (Hafez y Hafez, 2007).

2.3.2.1 *Vagina*

Según Sisson *et al.*, (2005), manifiestan que la vagina se extiende desde la apertura uretral hasta el cérvix. Durante la monta natural, el eyaculado es depositado en la porción anterior de la vagina. La vagina también sirve como parte del canal de parto.

2.3.2.2 *Cérvix*

El cérvix es un órgano de paredes gruesas, que establece la conexión entre la vagina y el útero. Es un órgano fibroso formado predominantemente por tejido conectivo con pequeñas cantidades de tejido muscular liso (Duches, 2010); (Baruseli *et al.*, 2003).

El cérvix o cuello uterino se caracteriza por una pared gruesa y una luz estrecha. Presenta varias prominencias que tiene la forma de bordes transversales alternados en espiral que se conocen como anillos cervicales.

Esta estructura anatómica se encuentra perfectamente cerrada excepto durante el estro, cuando se relaja ligeramente y permite la entrada de espermatozoides al útero. La secreción mucosa del cuello uterino se expulsa por la vulva.

2.3.2.3 *Útero*

Según Grossman y Sisson (2000) el útero consta de dos cuernos uterinos y un cuerpo. Tiene un tabique que separa los dos cuernos, y un cuerpo uterino prominente. Ambos lados del útero están unidos a las paredes pélvicas y abdominales por el ligamento ancho.

Es el componente fundamental del aparato genital femenino que tiene como función el asentamiento e implantación del óvulo en caso de ser fecundado, aquí posteriormente se aloja el producto permitiendo el desarrollo del feto hasta el parto, momento en que ayuda con las contracciones a la expulsión del feto.

2.3.2.4 Oviductos

Según Gasquez y Blanco (2004) indica que los oviductos pueden dividirse en cuatro segmentos funcionales: las fimbrias, en forma de ovan, el infundíbulo, abertura abdominal en forma de embudo cerca del ovario; el ampulla, dilatada y más distal, y el istmo, la porción proximal estrecha del oviducto, que conecta a este con la luz uterina.

La mucosa del oviducto está constituida por pliegues primarios, secundarios y terciarios. La del ampulla está dispuesto en pliegues elevados y ramificados cuya altura disminuye hacia el istmo y que se convierten en bordes bajos en la unión uterotubárica, donde se unen el oviducto y el cuerno uterino correspondiente.

Según Hafez y Hafez (2007), manifiesta que las contracciones de los oviductos facilitan la mezcla de su contenido, ayudan a desnudar el ovulo, facilitan la fecundación al incrementar el contacto entre espermatozoides y óvulo.

2.3.3 Ovarios

Según Grossman y Sisson (2000) manifiestan que los ovarios de la vaca miden normalmente de 3.5 a 4 cm de longitud, 2.5 cm de ancho y tienen alrededor de 1.5 cm de grueso en su porción mayor, el peso es de 15 a 20 g.

En bovinos el ovario tiene forma de almendra. El ovario se constituye como un cuerpo ovoide en el que es posible distinguir una zona gruesa periférica, o corteza, y una zona interna o médula. La corteza está recubierta por una lámina continua de epitelio denominado epitelio germinal que cuando alcanza el hilio ovárico se continúa con el mesotelio del repliegue peritoneal.

Debajo del epitelio germinal hay una capa de tejido conectivo fibroso denominado túnica albugínea. La medula es la zona central del ovario, compuesta por tejido conectivo laxo con fibras musculares lisas y abundante inervación y vascularización. Los vasos sanguíneos de esta zona son muy tortuosos y de gran tamaño (Gasquez y Blanco, 2004).

2.4 Tejido del útero

El útero es el lugar de implantación del óvulo cuando es fecundado y donde se desarrolla la placenta y el feto. En la mayoría de las especies presenta dos cuernos, un cuerpo y un cuello o cérvix. Su pared consta de tres capas:

- Endometrio (mucosa y submucosa)
- Miometrio (muscular)
- Perimetrio (serosa).

Endometrio

Según Salazar *et al.*, (2012), manifiesta que el endometrio presenta dos zonas que difieren en su estructura y función:

Zona superficial o funcional: degenera total o parcialmente durante un ciclo reproductor y puede perderse en alguna especie, regenerándose a partir de la zona basal. Está revestida por un epitelio que en rumiantes puede ser simple cilíndrico y/o pseudoestratificado.

La altura de las células epiteliales está relacionada con el estado hormonal de la hembra a lo largo del ciclo estral. En los rumiantes, en esta zona y especialmente en el estro, hay un aumento del fluido intercelular constituyendo un edema endometrial.

Zona profunda o basal: se presenta durante todo el ciclo y está constituida por un tejido conectivo laxo menos celular.

Según Salazar *et al.*, (2012) manifiestan que el endometrio se modifica en el ciclo sexual pudiéndose diferenciar tres fases:

Fase proliferativa: coincide con el crecimiento de los folículos ováricos y la secreción de estrógenos y se caracteriza por un aumento de grosor en el endometrio debido a la hipertrofia e hiperplasia de las glándulas y al alargamiento de las arterias helicinas.

Fase secretora: coincide con el periodo en el que el cuerpo lúteo es funcional y hay secreción de progesterona y se caracteriza porque el endometrio alcanza su máximo grosor y hay un desarrollo máximo de las glándulas y un alargamiento máximo de las arterias. En esta fase es en la que aparece el edema endometrial.

Esta es la situación óptima para recibir al óvulo fecundado. Si eso no ocurre, se pasa a la siguiente fase.

Fase de involución: coincide con la desaparición de los estímulos hormonales y se caracteriza porque hay una disminución en el grosor del endometrio por una involución de glándulas y arterias, volviendo a la fase de reposo o preproliferativa.

2.4.1 Miometrio

Según Hafez y Hafez, (2007) manifiesta que el miometrio está constituido por dos capas de músculo liso, una circular interna muy gruesa y otra longitudinal externa más fina. Ambas aumentan de grosor durante la gestación. Entre ambas o en profundidad a la interna se desarrolla una zona con gran cantidad de vasos sanguíneos

2.4.2 Perimetrio

Está constituido por tejido conectivo laxo muy vascularizado con fibras musculares lisas que aparece recubierto por un mesotelio (Salazar *et al.*, 2012).

2.5 Ambiente uterino controlado

Está controlada por la madre a través de las relaciones entre los estrógenos (E2) y la Progesterona (P4); y por el trofoblasto mediante la secreción de interferón Tau (INFt).

Los estrógenos se sintetizan en las células foliculares del ovario y determinan los cambios fisicoquímicos, morfológicos y del comportamiento expresadas por la hembra durante el celo. La P4 Gonella - Ambiente receptivo uterino es sintetizada por el cuerpo lúteo (CL), y promueve la manutención de la gestación (Callejas, 2001).

Cuando la fertilización y desarrollo embrionario son exitosos, el INFt ejerce su efecto luteotrópico entre los días 15 y 19 de la gestación (Peiris *et al.*, 1998); (Wang y Goff, 2003); desencadenando el proceso de reconocimiento materno de la gestación para evitar la regresión luteal y asegurar la sobrevivencia del embrión (Spencer *et al.*, 2004).

Además, el INFt estimula al organismo materno para producir un microambiente que le provea al embrión condiciones nutricionales, inmunológicas y fisiológicas óptimas para su propio desarrollo (Hansen, 2002).

2.6 Control materno de la receptividad uterina.

La mayor liberación de la hormona luteinizante (“pico” de LH) induce la ovulación y posterior luteinización del folículo dominante (Callejas, 2001), que da lugar a la formación de un cuerpo lúteo que debe ser capaz de producir niveles de P 4 adecuados para que se establezca un ambiente receptivo en el útero (Roberts *et al.*, 1996).

Sin embargo, para que la P4 pueda ejercer su función, debe darse una previa sensibilización por parte de los estrógenos durante la fase folicular (Spencer *et al.*, 2004); que determinan un aumento y una mayor permisividad de la permeabilidad vascular uterina permitiendo el paso al lumen uterino de proteínas, en especial la albúmina (Rabbani y Rogers 2001).

Las hormonas esteroides al llegar al endometrio activan o desactivan la expresión de determinados genes, modificando así la síntesis de proteínas (Ding *et al.*, 1994); (Kayser *et al.*, 2006).

Algunos de ellos tienen mayor expresión durante el estro y otros durante el diestro (Mitko *et al.*, 2008), de manera que el correcto balance entre el E2 y la P4 determina que se de una condición adecuada del ambiente receptivo en el útero, al modificar la síntesis de proteínas en el endometrio (Ding *et al.*, 1994).

2.7 Producción de leche endometrial.

Las secreciones uterinas son necesarias para el crecimiento de los blastocistos, su migración, implantación y activación de su genoma (Hernández, 1995).

En los rumiantes, el conceptus está libre en el lumen uterino antes de la implantación y depende de la leche endometrial para su correcto desarrollo (Peiris *et al.*, 1998).

El control que ejerce la P4 sobre las secreciones uterinas ha sido corroborado por una gran variedad de experimentos, en donde se ha observado similitud de dichas secreciones en hembras cíclicas y preñadas hacia los mismos días postovulación (Ding *et al.*, 1994); (Kayser *et al.*, 2006).

Las proteínas de la leche endometrial son de vital importancia para el desarrollo del conceptus, pero se desconoce la función de muchas de ellas, fundamentalmente por la complejidad de la composición del proteoma (en las ovejas, está constituido por 2000-5000 polipéptidos) (Lee *et al.*, 1998) porque varían según el momento del ciclo estral y/o, porque más del 50% de ellas son de origen plasmático (albúmina e inmunoglobulinas).

Ante estas circunstancias, es difícil el estudio de las demás proteínas secretadas por el útero (Abdi-Dezfuli y Poyser 1993). Hay algunas de ellas identificadas, como la uteroferrina y la proteína unida al retinol (RBP), que, en su orden, son fuente de hierro y retinol para el conceptus, la superfamilia de las serpinas y algunos factores de crecimiento (Lee *et al.*, 1998).

2.8 Aumento de la permeabilidad vascular.

Durante la fase folicular del ciclo estral, en virtud de los altos niveles de estrógenos plasmáticos, hay marcado aumento en la formación de nuevos vasos sanguíneos y paso de proteínas desde los capilares hacia la luz del útero (Lee *et al.*, 2006).

2.9 Modificación morfo fisiológica del útero.

A lo largo del ciclo estral, la P4 determina los cambios histológicos del útero (Kayser *et al.*, 2006). “Los estrógenos estimulan la vascularidad del endometrio durante el estro y aumentan la actividad muscular uterina, en tanto que la P4 provoca disminución de la motilidad y crecimiento de los epitelios de revestimiento y glandular del endometrio” (Díaz y Alba, 1980).

Los cambios morfológicos del útero debidos al control materno, se observan en todo el órgano, mientras que el conceptus los induce sobre la zona de preferencia para la implantación (Rabbani y Rogers, 2001).

El control materno se hace principalmente a través de la P4, la cual, en la fase luteal, inhibe la expresión de algunas moléculas de la familia de factores de crecimiento (VEGF, Factor de Crecimiento Epidermal y sus receptores específicos), que son normalmente estimulados durante la fase folicular por acción del estradiol.

Por ende, durante la fase luteal disminuye el edema y aumenta la producción glandular del útero (Cullinan- Bove y Koos, 1993). Por acción del EGF hay un aumento en el tamaño y función de las glándulas endometriales (Wang *et al.*, 2007). Según (Díaz y Alba, 1980), encontraron que existe un aumento significativo en el desarrollo del epitelio durante la fase luteal del ciclo estral, además de una mayor actividad secretora.

El control materno del ambiente embriotrófico sucede normalmente en todos los ciclos estrales. Si no hay una señal de reconocimiento materno habrá lisis del CL y se dará inicio a un nuevo ciclo estral (Hansen, 2002). Cuando termina el diestro, la oxitocina estimula la producción de

prostaglandina F2 α (PGF2 α) en el endometrio, principal molécula luteolítica en los rumiantes (Niswender *et al.*, 1994).

Los mecanismos luteolíticos que se originan en el endometrio uterino requieren de una secuencia de efectos producidos por las hormonas progesterona (P4), estrógeno (E2) y oxitocina, las cuales actúan a través de sus receptores específicos (Spencer *et al.*, 2004); (Olivera, 2007).

2.10 **Modificación de la respuesta inmune materna.**

El INFt modifica el sistema inmune materno, para que éste no reconozca al conceptus como un antígeno. El trofoblasto presenta una variación en el complejo mayor de histocompatibilidad (Huddleston y Schust, 2004) de manera que no es reconocido fácilmente por la línea de defensa materna. Sin embargo, esta modificación no es suficiente y el conceptus debe asegurar su supervivencia, modificando la respuesta inmune materna.

En experimentos realizados con cultivos de células endometriales de vaca (línea celular: BEND), sometidos a 100 ng/ml de INFt por 24 horas, se encontró que se secretaba una proteína conocida como Factor Inhibitorio de Migración de Macrófagos (MIF), el cual se encarga de impedir la salida de macrófagos desde los capilares sanguíneos hasta el lumen uterino y evitar agresiones al embrión (Wang y Goff, 2003).

2.11 **Estructura histológica y funciones del cérvix y la vagina**

El cérvix uterino de la hembra bovina es un órgano semejante a un esfínter que separa anatómicamente y fisiológicamente el útero de la vagina. La capa mucosa tiene un aspecto plegado típico con pliegues primarios y numerosos pliegues secundarios; con esta estructura aumenta la superficie de la mucosa (Trautmann y Fiebiger, 1950).

Según los numerosos pliegues del canal cervical que imitan glándulas, están cubiertos por una capa de epitelio cilíndrico y secretor alto, que segrega en las fases del ciclo estral distintas cantidades y cualidades de moco cervical

Este moco cervical consta de macromoléculas de mucina de origen epitelial, compuestas de glucoproteínas del tipo sialomucina que contienen cerca de 25% de aminoácidos y 75% de carbohidratos.

Las proteínas del moco cervical incluyen pre albúmina, lipoproteína, albúmina, beta globulinas y gamma globulinas. Contiene varias enzimas: glucoronidasa, amilasa, fosforilasa, esterasas y fosfatasas. Según las características biofísicas, el mococervical presenta varias propiedades reológicas como arborización, elasticidad, viscosidad, tixotropia y adhesividad (Hafez y Hafez, 2007).

El comportamiento estral del moco cervical desaparece en la fase luteínica y durante la gestación y se convierte en una masa densa, turbia, altamente viscosa y escasa que obtura el canal cervical. La vagina es un órgano que posee diversas funciones: es el conducto excretor del útero, es el órgano femenino 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.

La mucosa vaginal presenta pliegues longitudinales y carece de glándulas, en su posición anterior forma pliegues transversales. El mucus que normalmente se encuentra en la mucosa vaginal y que aumenta considerablemente en la hembra en celo, procede principalmente del cuello, desde donde fluye al lumen vaginal.

Microscópicamente, la mucosa se encuentra cubierta por el epitelio vaginal, que en el tercio craneal es cilíndrico, mientras que en las zonas caudales se convierte en epitelio estratificado. La propia zona de la mucosa se encuentra constituida por tejido conectivo que forma un cuerpo papilar no bien definido (Trautmann y Fiebiger, 1950).

La mucosa vaginal está libre de glándulas y la secreción se realiza por medio de sus células secretoras epiteliales. (Garverick y Smith, 1993). En la vaca hay una extensa formación de células en forma de copa, en la región craneal de la vagina que segrega mucus.

Durante el proestro y principios del estro se incrementa la cantidad de mucus y en el metaestro su producción decrece, se hace más denso y toma un color blancuzco amarillento, de apariencia opaca, a causa de la presencia de gran cantidad de epitelio descamado (Cupps y Cole 1990).

La mucosa de la vagina y de la vulva, está dotadas de sensibilidad frente a los irritantes. Aun cuando la vagina tiene un origen en los conductos de Muller, el epitelio original es sustituido por otro escamoso estratificado del seno urogenital. Este epitelio prolifera bajo la influencia de estrógenos y entonces es más resistente a la infección.

Este incremento de la resistencia puede ser debido a factores mecánicos en el epitelio engrosado y queratinizado y a la producción local de ácido láctico procedente del glucógeno que se deposita en el epitelio bajo la influencia de estrógeno (Jubb *et al.*, 1985).

Las modificaciones de la vagina anterior son superponibles a las que tienen lugar en el conducto cervical, en el que la secreción mucosa durante el celo es particularmente abundante. Los frotis realizados de la vagina de la vaca en el período estral contienen algunas células cornificadas, grandes células epiteliales y numerosos leucocitos; estos disminuyen en la fase post estral, mientras que las grandes células epiteliales predominan, aproximadamente hasta el octavo día. El porcentaje de células cornificadas aumenta mucho a partir del noveno día y son abundantes hasta el día 16 a 17. Las modificaciones de la cornificación vaginal no son lo suficientemente pronunciadas como para poder permitir un diagnóstico fácil y eficaz del estado del ciclo estral en la vaca (Derivaux, 1982).

El líquido vaginal está compuesto principalmente de un trasudado de la pared vaginal, mezcla de secreciones de la vulva, glándulas sebáceas y sudoríparas, amalgamado con moco cervical, líquidos del oviducto y endometrio y células exfoliadas del epitelio vaginal (Hafez, 1996).

Según Wehrend *et al.*, 2003 reporta que se ha observado que el pH de la vagina de la vaca sana oscila entre valores de $6,92 \pm 0,51$ y el del cuello entre $6,22 \pm 0,31$.

2.12 Microbiota normal vaginal y uterina

El cuerpo de los mamíferos debido a que mantiene relativamente estables su pH, temperatura y un aporte constante de nutrientes, provee un hábitat favorable para una gran cantidad y variedad de microorganismos. Esta gran mezcla de microorganismos adaptada al cuerpo del animal recibe el nombre de microflora, aunque el término más preciso es el de microbiota (Silveira, 2006).

El microbiota normal comprende bacterias, hongos y protozoos que viven dentro o sobre los animales normales sin producir enfermedad. Se incluyen en este microbiota muchos microorganismos saprofitos, patógenos potenciales y oportunistas. Es esencial tener algún conocimiento del microbiota normal para poder juzgar el significado probable de los gérmenes aislados. (Silveira, 2006).

Antes del nacimiento el feto mamífero sano está libre de microorganismos. El primer encuentro del recién nacido con los microorganismos es en el canal del parto y especialmente en la vagina. El recién nacido adquiere los microorganismos, primero, por contacto superficial, tragando o

inhalando y, posteriormente mediante los alimentos, el agua, los objetos y el contacto con otros animales.

Cada parte del cuerpo del animal, con sus condiciones ambientales especiales, tiene su propia mezcla de microorganismos. En un corto período de tiempo el joven animal tendrá el mismo tipo general de microbiota que un animal adulto que viva en el mismo ambiente. La naturaleza de este microbiota va a depender de factores tales como la higiene, la dieta, las condiciones zootécnicas y de explotación (Silveira, 2006).

La variedad de microorganismos que compone el microbiota puede clasificarse en dos grupos: Microbiota residente; Microbiota transitoria.

El microbiota residente está compuesto de tipos relativamente fijos de gérmenes, los cuales se encuentran consistentemente en un sitio dado a una edad dada; si se trastorna, se restablece espontáneamente con rapidez.

Los microorganismos que están siempre presentes en un lugar del cuerpo son comensales, forma de simbiosis que se caracteriza por la asociación mutua pero casi indiferente entre bacterias y organismos superiores.

Por ejemplo, las bacterias normalmente presentes en la mucosa uterina son comensales, aunque algunas cepas sean, dicho más exactamente, oportunistas. El hecho de que prosperen en un área determinada depende de diversos factores tales como: temperatura, humedad, pH, presencia de nutrientes y sustancias inhibitorias, etc. (Silveira, 2006).

Su presencia no es esencial a la vida, sin embargo, el microbiota residente de algunos sitios y de algunas especies animales, juega un papel definido en el mantenimiento de la salud y de las funciones normales. Su importancia es tal, que se le considera entre los factores que condicionan la resistencia natural a las enfermedades transmisibles (Rodríguez, 2002).

Los microbios residentes son inocuos y pueden ser beneficiosos en su localización normal en el hospedero y en ausencia de anormalidades coincidentes. Pueden producir enfermedades si son introducidos en localizaciones extrañas y si concurren factores predisponentes. Por estas razones los miembros del microbiota residente que se encuentran en procesos patológicos son denominados oportunistas.

El microbiota transitorio está formado por miembros no patógenos o sólo potencialmente patógenos, hospedados en la piel o las mucosas durante horas, días o semanas; provienen del ambiente, no producen enfermedades y no se establecen por sí mismos permanentemente en la superficie.

Los miembros del microbiota transitorio son generalmente de poca significación, en tanto que el microbiota residente permanezca sin alterarse, pero si ésta se altera, los microorganismos transitorios pueden responder aprovechando la situación; proliferan y pueden llegar a producir enfermedades (Silveira, 2006).

El uso incorrecto de antibióticos suprime el microbiota normal y favorecen el desarrollo y proliferación de bacterias patógenas que originan trastornos graves. Estas alteraciones son aún más frecuentes cuando un antibiótico inadecuado se administra por vía oral.

No obstante, existen circunstancias clínicas donde está plenamente justificado el uso de antibióticos; todo es una cuestión de riesgo que debe ser evaluada en cada oportunidad por el clínico ya que muchas veces se verá obligado a utilizar muchos de estos antibióticos por lo que se debe tener en cuenta siempre la edad del animal, el tipo de antibiótico, la vía a utilizar, el ritmo horario y la duración del tratamiento (Rodríguez, 2002); (Calvo, 2004).

2.13 Microbiota uterino

La clase y número de microorganismos del microbiota uterino varían ampliamente en distintas circunstancias, como son: (Fernández *et al.*, 2006). El microbiota normal de los animales jóvenes difiere notablemente de la de los animales de más edad.

Existen particularidades según se trate de hembras adultas clínicamente sanas, gestantes, en puerperio o de vacas con repetición de servicios o con infecciones clínicas. El microbiota normal está influenciado por las condiciones ambientales del país.

Los resultados pueden ser de poco valor cuando no se tiene en cuenta algunos factores tales como: el método y la frecuencia del muestreo, el medio donde se toman las muestras, el estado reproductivo y el origen de los microorganismos aislados

2.13.1 En hembras clínicamente sanas

Como señalamos anteriormente, se conoce que muchos gérmenes que forman parte del microbiota natural residente o transitoria del aparato reproductor femenino sin producir trastornos, pueden transformarse en patógenos cuando la resistencia local y general del animal se debilita y se rompe el equilibrio biológico.

Según estas consideraciones las especies de bacterias aisladas en el cérvix y el útero pertenecen al microbiota natural con el carácter de patógenos facultativos (Fernández *et al.*, 2006).

En investigaciones realizadas en las condiciones de Cuba en vacas en diferentes períodos del ciclo estral, la frecuencia de aislamientos de bacterias a partir del moco cervical y del lumen uterino es relativamente elevada, informándose porcentajes entre 40 y más del 80%.

Los géneros y especies más frecuentemente aislados son *E. coli*, otras enterobacterias, *Pseudomonas* sp, *S. aureus*, *taphylococcus* sp, *S. pyogenes*, *Streptococcus* sp, *Enterococcus faecalis* y otros (Fernández y Dimoso, 1984).

2.13.2 En la gestación y en el puerperio

Durante la gestación y el parto, el cuello y el útero no permanecen estériles, por lo que el hallazgo de microorganismos saprofitos en estos períodos es fisiológico. El útero bajo estas condiciones fisiológicas tolera un crecimiento latente de bacterias sin que necesariamente causen daños ni a la madre ni al feto. Este estado fisiológico difiere generalmente del estado patológico sólo en la falta de virulencia de las bacterias y los hallazgos del microbiota natural en estas condiciones, son los mismos que suelen producir reacciones inflamatorias en el útero y en el cérvix. (Rysaneck, 1970).

La presencia de ciertos microorganismos considerados condicionalmente patógenos en secreciones cervicales y uterinas de hembras gestantes, puede tener su origen en la asepsia inadecuada en el momento del parto.

Por desconocimiento de que en ese período existen condiciones óptimas para que muchos gérmenes del microbiota normal, permitiendo que exacerben su virulencia acompañados por otros microorganismos del medio externo y originen un cuadro infeccioso cuando el mecanismo fisiológico de defensa en el ambiente uterino está alterado (Fernández *et al.*, 2006).

Según Jubb *et al.*, (1985); Benesh,(1966) la progesterona influye en las condiciones para el crecimiento bacteriano son favorables.

El microbiota cultivado durante el período puerperal temprano, presenta un amplio espectro de contaminantes ambientales tales como, *E. coli*, *A. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp, *P. multocida* y varias especies anaerobias como *Clostridium* sp, *Bacteroides* sp. y *Fusobacterium* sp.

Sin embargo, a medida que la involución uterina progresa, la mayoría de esas bacterias son eliminadas, de tal forma, que a las cuatro semanas los cultivos bacteriológicos son negativos o se reducen considerablemente mecanismo que le confiere el carácter de transitoria a este microbiota (Hussain *et al.*, 1990); (De Luca, 2003).

Es posible que los mecanismos defensivos del útero no actúen erradicando totalmente el microbiota y es probable que el propio microbiota pueda proteger el endometrio de la invasión de otros gérmenes, según se explicó antes.

2.13.3 En vacas infecundas

El ambiente uterino tiene la capacidad y "*obligación*" de favorecer el desarrollo embrionario normal, de modo que cualquier alteración del mismo compromete la supervivencia del embrión y propicia la aparición de celos repetidos. Se ha observado correlación entre las vacas repetidoras de celos y diferentes grados de anormalidad en el endometrio (Santana *et al.*, 1998).

La frecuencia más elevada de los aislamientos en el útero puede explicarse por el incremento de la multiplicación bacteriana en vacas con repetición de celos, debido a la endometritis subclínica.

De hecho, aparecen con frecuencia fallos reproductivos después de que un animal haya sufrido metritis (Fernández *et al.*, 2006).

Las infecciones uterinas específicas e inespecíficas, repercuten negativamente sobre la mayoría de los índices reproductivos, reduciendo la tasa de involución uterina y cervical posparto y, alterando el desarrollo folicular ovárico (Lewis, 1997); así como pérdida del producto, repetición de celos y aumento del intervalo entre partos (Santana *et al.*, 1998).

En investigaciones realizadas en tres provincias de Cuba el germen más frecuentemente aislado a partir de secreciones cérvico-vaginales de vacas con trastornos inflamatorios del tracto genital

es el *A. pyogenes*, siguiéndole en incidencia el *Streptococcus* sp. y la *E. coli*. (González *et al.*, 1978); (Díaz y Alba, 1980).

También estos microorganismos se aislaron de secreciones cervicales de vacas con infecciones puerperales (Martínez, 1975).

2.13.4 En vacas con infecciones clínicas

En los exudados y biopsias realizadas en las vacas con metritis, se confirma que en su etiología participan siempre más de un agente microbiano (Samodelkin y Gavrilov 1997).

Los gérmenes aislados de casos de endometritis bovina constituyen una amplia gama de contaminantes ambientales, pero los más consistentemente asociados con las lesiones inflamatorias del endometrio han sido *A. pyogenes*, *E. coli*, *Streptococcus* hemolítico y *Pasteurella hemolítica* (García *et al.*, 1990); (Bonnett y Martin, 1995).

Se ha encontrado que algunas especies anaerobias como *Bacteroides* sp. y *Fusobacterium* sp. Se asocian con *A. pyogenes* para producir las lesiones inflamatorias (Griffin *et al.*, 1975); (Bretzlaff, 1987).

Según Vanden *et al.*, (1992) entre las bacterias anaerobias aisladas en el útero de la vaca con infección uterina se encuentran *Arcanobacterium pyogenes*, *Porphyromonas melaninogenicus*, *Bacterioides (fragilis, levii, oralis y melaninogenicus)* y *Clostridium (perfringens y esporogenes)*.

Sin embargo para (Youngquist y Shore, 1997) son: *Streptococcus* (a hemolítico y *pyogenes*); *Staphylococcus (aureus y epidermidis)*, *Escherichia coli* (no hemolítica y hemolítica), *Lactobacillus* sp, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *P. hemolítica* y *enterobacterias* sp. En algunos casos se pueden aislar *Mycoplasma* sp, *Chlamydia* sp, *C. albicans*, *A. fumigatus*, *Mucor* sp, *T. foetus* y los virus rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV).

El *Arcanobacterium pyogenes* es una bacteria incapaz de dañar el epitelio del útero intacto y para hacerlo necesita previamente la acción sinérgica de otras bacterias anaerobias Gram negativas obligadas como *Fusobacterium necrophorum*, causando entonces severas endometritis con marcada destrucción celular (Takács *et al.*, 1990); (Dohmen *et al.*, 1995).

Para convertirse en patógeno y burlar el mecanismo de defensa uterino el *Arcanobacterium pyogenes* produce un factor de crecimiento que favorece el desarrollo de *F. necrophorum*; más

tarde este agente sintetiza y libera una toxina (leucotoxina) con propiedades leucocidas que favorecen la difusión de *Arcanobacterium pyogenes* a través del tejido y lo protege de ser fagocitados.

Con frecuencia, la asociación de *Arcanobacterium pyogenes* y *Fusobacterium necrophorum*, persiste por un tiempo mayor que el resto de otras (De Bois y Manspeaker, 1986); (Dohmen y Lohuis, 1996).

El *A. pyogenes* es el principal provocador de los procesos inflamatorios crónicos del cérvix y el útero incluyendo la piometra, metritis puerperal, así como los abortos embrionarios, lo que significa que el mismo juega un importante papel en la génesis de la repetición de servicios en las vacas (Hussain *et al.*, 1990); (Bartlett *et al.*, 1986).

En la hembra, generalmente se lo aísla en vacas cuyo intervalo parto/concepción se encuentra aumentado. *Arcanobacterium pyogenes* invade el útero de la mayoría de las vacas pos parto, ocasionando una metritis puerperal la cual se resuelve en pocos días si el animal no tiene problemas de fertilidad o no ha sufrido distocia o retención de membranas fetales.

Si las defensas uterinas no pueden eliminar la infección, se desarrolla una piometra generalmente a los 10 días de la primera ovulación pos parto con secuelas para la futura eficiencia reproductiva. También *Arcanobacterium pyogenes* es causante esporádico de aborto, aunque su incidencia suele oscilar entre 1,5-3%.

El aborto ocurre en el último tercio de la gestación dejando generalmente como secuela metritis purulenta y retención de las membranas fetales (Roppel y Campero, 1998).

2.14 **Transferencia de embriones**

Segun Hapez (1989) la primera transferencia de embriones en conejos en el año de 1890 con buenos resultados, trasplantó embriones en ovejas y cabras.

Según Willet (1951) se hizo el primer trasplante de embriones en bovinos con muy buenos resultados en este año, en esta misma especie se logró producir embriones congelados a largo plazo en el año 1973.

Según Rosario (1983), en el Ecuador la transferencia de embriones comenzó en el año de 1981 primero con un sin número de ciclo de conferencias en la facultad de medicina veterinaria y zootécnia de la Universidad Central del Ecuador.

En el año de 1985 se ejecutaron trasplantes en ganado vacuno con embriones frescos y empezaron a nacer los primeros terneros con este trabajo. En 1987 dos terneros nacieron en Ecuador como resultado de la transferencia de embriones congelados.

2.15 Principios de la técnica de trasplante de embriones

La TE es una técnica que consiste en seleccionar una hembra donante, genéticamente superior, a la cual se le sincroniza el estro por medio de tratamientos hormonales. A continuación, se induce una multiovulación con la ayuda de Gonadotropinas, técnica por la que se busca que la hembra donante de embriones lleve varios folículos hasta el estado ovulatorio para obtener un mayor número de oocitos viables.

Se considera que hubo respuesta al tratamiento cuando se producen más de dos ovulaciones efectivas (Tribulo, 2002); estos oocitos son fecundados por medio de la liberación de material seminal a nivel uterino, inseminación artificial (IA); en este proceso se pueden hacer dos o tres IA, según el protocolo de superovulación o multiovulación (Baruselli y Oliveira, 2003).

Finalmente, los embriones son recuperados del útero el día 7 postinseminación, cuando aún no se han implantado a la superficie uterina (Gorlach, 1999). Estas estructuras después de ser recuperadas pueden ser transplantadas a hembras receptoras, que reciben el embrión en fresco, las cuales van a servir como madres substitutas durante el período gestacional.

El embrión también puede ser sometido a criopreservación para ser almacenado, previa selección según su estadio y calidad (Gordon, 1999). Las hembras que van a recibir un embrión en su útero deben estar en el mismo período fisiológico, postestro, que las hembras de las que se obtuvieron los embriones.

Es necesario controlar el ciclo estral de esta hembra receptora, para que se encuentre en el día siete postovulación; esta sincronía junto con ciertas características sanitarias y de manejo, permiten efectuar el trasplante del embrión a la hembra receptora (Gonzales-Stagnaro, 2001).

2.16 Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la receptora en un programa de transferencia de embriones.

La raza de los animales a utilizar, selección de la hembra donante, así como de la hembra receptora, manejo de las hembras, respuesta de los animales a los tratamientos de sincronización, técnica para realizar la TE, día en que se efectúe la transferencia del embrión, calidad del embrión,

respuesta de la receptora al embrión transplantado, interacción embrión-hembra han sido estudiados tratando de estandarizarlos para obtener mejores resultados.

Pero sin duda uno de los factores más importantes en la obtención de resultados positivos, representados en preñeces y nacimientos, es la óptima selección de la hembra que va a recibir un embrión en su útero, dispone de tal manera que pueda brindarle unas condiciones adecuadas que permitan la supervivencia, implantación y desarrollo de éste (Spell *et al.*, 2001).

Por este motivo, es de suma importancia conocer los cambios que transcurren durante el ciclo estral y en las primeras fases del desarrollo embrionario, para así poder determinar claramente los factores que van a incidir de una manera directa sobre la eficiencia en un programa de TE (Bo *et al.*, 2013).

2.17 Selección de hembras receptoras.

En el éxito de un programa de TE influyen muchos factores, pero tal vez uno de los más importantes es la selección de las hembras receptoras; estas deben ser saludables y reproductivamente sanas (Huertas y Huerta, 1991).

Verificando la presencia de estructuras ováricas. El objeto de la exploración y valoración es rechazar animales con anormalidades como: órganos sexuales juveniles, hermafroditismo, ninfomanía, endometritis, entre otros, que no tenga ninguna alteración ni deformidad a nivel de cuello uterino.

Además, que sean serológicamente negativas a las enfermedades infectocontagiosas que afecten las características reproductivas de estos animales. Si se utilizan hembras en período de postparto, estas deben presentar un útero libre de infecciones, debe haber pasado por lo menos tres meses de haber ocurrido su último parto y no estar en etapa de amamantamiento a la cría. Además de tener un comportamiento estral cíclico y no presentar sobrepeso (Hafez, 2000).

2.18 Manejo de receptoras

Así mismo debe llevarse a cabo un excelente programa de detección de calores, contar con un personal capacitado para el manejo de los animales y contar con unas buenas instalaciones para realizar un manejo adecuado de las hembras (Gomez, 2005).

Las receptoras forman una parte esencial del programa de TE y también uno de los problemas más serios. Las buenas receptoras son caras, su mantenimiento costoso y su estado de salud es crítico para el éxito de la TE.

Desde el punto de vista reproductivo una buena receptora es la hembra capaz de recibir un embrión y llevarlo a término. El tamaño de la receptora dependerá del tipo de animal (embrión) que se transferirá.

De acuerdo con las tendencias actuales, particularmente en las razas para carne, se busca un gran tamaño de ternero con pesos al nacimiento de 40 o 50 kg y aún más. Por lo tanto, no se deben tener dudas de elegir hembras de gran tamaño (Albeiro, 2002).

Uno de los grandes inconvenientes que se presentan en los programas de transferencias de embriones es el manejo de las receptoras (Bo *et al.*, 1996). La edad de la receptora es un aspecto importante en el cual, sin embargo, no hay coincidencias entre autores.

En general se difiere en el criterio si es mejor una vaquillona que una vaca que ya ha parido alguna vez. Una forma de tomar el problema que puede resumir las diferentes posiciones es la siguiente: la vaquillona permite obtener tasas de preñez ligeramente superiores, sin embargo, los problemas de manejo durante la gestación, el parto y la lactancia pueden producir resultados finales inferiores a los de las vacas.

El uso de vacas múltiparas, con historia reproductiva conocida, que garantiza en cierta manera su comportamiento futuro, sumado al hecho de tener menos problemas de parto, hace que éste sea finalmente el animal de elección (Albeiro, 2002).

Según Merchán y Sandro (2017). De acuerdo a su experiencia bajo condiciones extensivas los resultados con vacas jóvenes (primera y segunda parición) han sido superiores a los obtenidos con vaquillonas y los problemas de parto en las primeras son casi inexistentes.

El manejo de alimentación de las receptoras es vital en el éxito final de la transferencia. La hembra gestará y amamantará a los terneros de mayor valor del establecimiento. Criará terneros que son mayores a los que hubiera producido y deberá proveer nutrientes en forma suficiente para que se exprese el potencial genético del ternero.

Lo ideal es obtener receptoras del propio establecimiento con el consiguiente conocimiento de su historia reproductiva. Estas vacas serán a su vez portadoras de inmunidad a las bacterias y virus locales y la pasarán a sus crías. Su stress será menor al haber sido criadas en el lugar.

En general las tasas de preñez que se obtienen en este tipo de receptoras suelen superar en 10 a 15% a las obtenidas en animales recientemente incorporados (Albeiro, 2002).

El éxito de cualquier programa de transferencia de embriones está condicionado por una sumatoria de factores, dentro de los cuales las receptoras juegan un papel trascendente tanto en el resultado físico del porcentaje de preñez logrado como el resultado económico final del programa (Tribulo, 2002).

Cada receptora podrá tener tres oportunidades "buenas" de quedar gestante. Esto significa haber sido transferida correctamente con un buen embrión. Las tasas de gestación en la primera y segunda transferencia son similares y disminuyen en la tercera oportunidad.

Luego de esto la caída es alta y no justifica el mantenimiento de esta vaca. La tasa de abortos en las receptoras preñadas puede ser ligeramente superior a la de vacas servidas normalmente. Por ello nunca se deberá entregar una receptora sin verificar previamente su estado de gestación.

En síntesis, el manejo de las receptoras incluye la elección de hembras de buena calidad que sean reproductivamente aptas, que tengan un buen nivel de alimentación y estén libres de enfermedades.

Los sistemas para conseguirlas son tan variados como oportunidades aparezcan. No olvidar que las receptoras constituyen uno de los puntos clave de la TE exitosa y por ello deberán ser tratadas en consecuencia (Albeiro, 2002).

2.19 Sincronización de receptoras.

Hay una continua necesidad de simplificar los protocolos de transferencia de embriones bovinos. La incorporación de tratamientos que controlan la dinámica folicular y la ovulación reducen el problema de la detección de celos y ofrecen posibilidades para la aplicación de la transferencia de embriones a tiempo fijo (Bo *et al.*, 2013).

Las tasas de concepción varían entre un 40 a 70% dependiendo del uso de embriones frescos o congelados (Stroud y Hasler, 2006). Uno de los factores que ha impedido la utilización masiva de la

técnica de transferencia de embriones es la detección de celos, principalmente en el ganado *Bos indicus*.

El desarrollo de protocolos efectivos de sincronización de la ovulación para evitar la detección de celos en programas de inseminación artificial (IA), conocidos como programas de IA a Tiempo Fijo (IATF), ha permitido la inseminación masiva de vacas y vaquillonas.

Esto ha traído como consecuencia el desarrollo de métodos de sincronización de la ovulación para facilitar la transferencia de embriones en forma sistemática, o también llamada transferencia embrionaria a tiempo fijo (Bò *et al.*, 2002).

2.20 Factores que afectan la tasa de concepción en receptoras transferidas en tiempo fijo.

Se realizó un experimento para evaluar la influencia de distintos factores del proceso de descongelado y transferencia de embriones bovinos (diferentes del tratamiento de sincronización) sobre el establecimiento de la preñez en receptoras de embriones transferidas a tiempo fijo.

Un factor de especial interés fue el tiempo transcurrido desde que se descongeló el embrión hasta que el embrión fue depositado en el cuerno uterino, que fue tomado como un indicativo del posible efecto de toxicidad del etilenglicol. Estos se clasificaron en 3 períodos: hasta 3 minutos, desde 3,1 hasta 6 minutos y más de 6 minutos (Bo *et al.*, 2013).

Las variables condición corporal, animales vistos o no en celo, lugar de deposición del embrión, clasificación de la transferencia, área del CL, estación del año, tiempo de desde la descongelación a la transferencia y operador no afectaron las tasas de concepción ($P > 0,1$).

Sin embargo, hubo efecto significativo ($P < 0,05$) de la variable historia reproductiva, estadio y calidad del embrión. Las receptoras que fueron vacías a una TETF previa tuvieron una reducción de 7 % de la tasa de concepción comparadas con las receptoras que fueron utilizadas por primera vez o sin historia reproductiva (Bo *et al.*, 2013).

Las variables que afectaron significativamente la tasa de concepción fueron: estadio y calidad del embrión. La tasa de concepción fue mayor para los blastocitos tempranos que para los blastocitos completos y los blastocitos expandidos. Los embriones tienen entre 6,5 a 7,5 días de desarrollo cuando se colectan, lo que corresponde a embriones en estadio de mórula compacta a blastocisto.

Distintos trabajos han evaluado la preñez según el estadio de desarrollo del embrión. En un trabajo se evaluó la transferencia de 5287 embriones criopreservados en glicerol y no hubo diferencias de preñez entre mórulas, blastocistos tempranos, blastocistos o blastocistos expandidos (Hasler, 2001).

2.21 **El *illex guayusa loes* (Guayusa).**

Origen Y Distribución Geográfica

La planta de *I. guayusa* fue descrita por primera vez en 1901 por Theodor Loesner a partir de material estéril recolectado en 1898 por Warszewic en el oriente de Perú. Loesener llamó al acebo *Ilex guayusa*, porque los indígenas de la parte oriental de Colombia, Ecuador y Perú usaban estas hojas para preparar el té medicinal llamado guayusa (Shemluck, 1979).

Según registros históricos, el Ecuador contiene la mayor parte de plantaciones ancestrales de esta planta entre los tres países que se han reportado (Radice y Vidari, 2007).

Al colocar al Ecuador en este contexto, se observa que es uno de los países con mayor cantidad de especies de área, pues ocupando un 0.26 % de territorio en la Tierra posee un 10% de especies existentes en el planeta y se ocupa en el sexto lugar de mega diversidad.

La biodiversidad del país se observa en un elevado número de especies animales y vegetales que han sido reportados en la Costa Sierra y Amazonia (Garcia, 2012).

El género *Ilex* Guayusa con sus diferentes nombres vulgares, Guayusa (Colombia), Aguayusa (Guaiñusa), Guayusa Wayusa (Ecuador) La Guayusa *Ilex* Guayusa es un árbol aromático y medicinal del mismo género. *Ilex* Guayusa crece en el alto putumayo desde Mocoa hasta Simbundo y se entra por el Huillacamino antiguo de pueblo viejo a Mocoa Putumayo.

Está presente en los bosques húmedos tropicales y subtropicales de América del Sur, África y Asia se encuentran alrededor de 170000 especies de plantas vasculares que representan el 68% de las 250000 existente en el planeta (García, 2012).

Se calcula que posee más de 500 especies, De acuerdo con ejemplares depositados en el herbario Nacional Colombiano, esta especie ha sido seleccionada en Colombia en el departamento de Nariño y en la dependencia de Putumayo. El subgénero *Euilex* es el más extenso, puesto que

incluye varias especies en el neotrópico distribuidas en Colombia, Ecuador, Brasil, Uruguay, Paraguay y el norte de Argentina (Berg, 2012).

En el Ecuador, de acuerdo a los registros del Herbario de Loja, la guayusa está presente en las provincias de Sucumbíos, Napo, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe (cantón del Puyo); sin embargo, también registran especímenes en las provincias de Pichincha y Tungurahua. La distribución de la especie se ubica a 1500 msnm (Jorgensen y León 1999).

Datos Taxonómicos

Reino: Plantae

División: Magnoliopsida

Clase: Magnoliophyta

Orden: Aquifoliales

Familia: Aquifoliaceae

Género: *Ilex*

Especie: *I. guayusa*

Nombre binomial: *I. guayusa* L

Nombre común: Guayusa reconocida en la mayoría de las localidades de Ecuador (Jergensen, 2011).

Tamaño de la especie

En general, los individuos de esta especie alcanzan un tamaño promedio de hasta 10 m de altura, poseen un diámetro a la altura del pecho (DAP) de 50-80 cm, tienen una copa irregular y presentan un follaje denso.

Según García (1992) en la localidad de San Luis ubicada cerca de Sevilla Don Bosco (Provincia de Morona Santiago), existe un bosque natural de árboles de guayusa que alcanzan una altura de 20 m y tienen un DAP de 80 a 90 cm. (Radice y Vidary 2012).

2.21.1 Tronco

Tiene un fuste a menudo bifurcado a la altura del pecho, corteza blanca y textura lisa, las ramas son extendidas y flexibles (*Guayusa Ilex guayusa* L, composición química, 2012)

2.21.2 Hojas

Sus hojas tienen la más alta concentración de cafeína de todas las plantas conocidas, la textura es coriáceas, verde oscuro, enteras, oblongo-elípticas, simples, alternas sin estípulas, coriáceas, dentadas, sin pubescencias en el haz y envés, ápice acuminado, base aguda, 15-21 cm de largo, 5- 7,5 cm de ancho, pecíolo corto de 1 cm de largo (Cronquist, 2013)



Figura 1-2. Hoja de la guayusa

Fuente: Tuquinga (2013).

Datos ecológicos

En el Ecuador se la encuentra en la región oriental principalmente Napo Pastaza y en la zona del Puyo originaria de la cuenca amazónica. Entre los pobladores de la región oriental existe la creencia que esta levanta la fuerza y tiene un decisivo poder fecundante o matricial. La guayusa posee una cualidad de enorme de valor terapéutico hasta hoy desconocida (Cronquist, 2013).

Existen varios ejemplos de similitud de usos en el mismo género de plantas con diferentes resultados esto se observa en las familias Aérea, Gesneriacas y piperácea para el tratamiento de mordeduras de serpiente entre los colonos del noroccidente de Pichincha.

Estas analogías sobre los usos de plantas dan una pauta para proponer que se realicen análisis fotoquímicos de las especies géneros y familias utilizadas por lo menos de tres comunidades de poblaciones tradicionales diferentes (Cronquist, 2013).

En el Ecuador, la guayusa está presente en las provincias de Sucumbíos, Napo, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe, además de registros en las provincias de Pichincha y Tungurahua. La distribución de la especie es desde el nivel del mar hasta los 1.500 msnm (Guayusa Ilex guayusa L, composición química, 2012).

Propiedades y usos de La Guayusa

De los cuatro géneros de la familia Aquifoliceae, el género *Ilex* es el de mayor importancia económica, ya que un gran número de especies se emplean como plantas ornamentales y medicinales.

Las especies que se destacan como fuente de varias preparaciones ricas en cafeína y teobromina son *Ilex vomitoria* (yaupon), *Ilexpraguayensis* (yerba mate) e *Ilex guayusa* Loes (guayusa).

Preparada de la misma forma que el té, con un sabor agradable, se dice que la infusión de “guayusa” cura el escalofrío y la infección venérea (*Guayusa Ilex guayusa* L, composición química, 2012).

El doctor Andrade por lo pronto encuentra que la Guayusa contiene 2.3% de cafeína, la cualidad farmacodinámica es un gran tónico y estimulante, cualidad que está relacionada científicamente con el alto contenido de cafeína. También se le usa como estimulante, tónico, estomático, digestivo y emético. Ayuda a la digestión y se afirma que hace una limpieza del estómago y los intestinos (Plan de manejo, *Ilex Guayusa* Loes, 2011).

Bustos, ha verificado las pruebas cuantitativas en la sangre de un paciente, tratándolo durante 20 días con infusiones de Guayusa. El resultado no puede ser más exitoso; mientras el índice glicémico se mantenía en 22% antes del tratamiento, bajo la cifra al 1.01% después de 20 días de tomar las tisanas de Guayusa (Jorgensen y León 1999).

Según Ramírez *et al.*, (2016) contiene las siguientes propiedades:

- Reducción de la susceptibilidad a disnea.
- Vasodilatación.
- Estimulación del músculo esquelético.
- Aumento de la diuresis.
- Estimulación de la función endocrina y exocrina

Por ejemplo (aumento de secreción de ácido clorhídrico en el estómago, aumento de la secreción de catecolaminas por las glándulas adrenales). Otros posibles mecanismos que se han cuestionado son el antagonismo de prostaglandinas. Estos efectos, no obstante, se observan también a altas dosis de teofilina (Ramírez *et al.*, 2016).

Otras propiedades que se pueden manifestar de la guayusa es su acción como estimulante del sistema nervioso, muscular, digestivo y como reductor de los niveles de glucosa en la sangre (Fundación Chankuap, 2014).

Estudios han demostrado que su uso en el tratamiento contra la diabetes en ratones puede retrasar el desarrollo de la estreptozotocina (STZ), sustancia química que se encuentra en el interior de las células pancreáticas que se encargan de la producción de insulina (Swanston *et al.*, 1989).

De igual manera, se ha reportado que el contenido de ácido clorogénico y cafeico presentes en la guayusa tienen la capacidad de reducir la grasa corporal en ratones con sobrepeso inducido, así como los niveles de insulina, triglicéridos y colesterol en la sangre (Cho *et al.*, 2010).

También, ayuda a la prevención de enfermedades cardiovasculares, el envejecimiento prematuro, la reducción de la presión arterial, la regulación del peso corporal y combatir el estrés, por su contenido en L-teanina (Pro Ecuador, 2016).

2.21.3 Interacción Con Fármacos

Pueden presentarse las interacciones propias de la cafeína y, en general, de los derivados de las xantinas (Plan de manejo, Ilex Guayusa Loes, 2011) .

2.21.4 Toxicidad

La administración de la infusión o la decocción no presenta signos de toxicidad aguda a dosis altas. La administración de la infusión a dosis repetidas presenta un comportamiento seguro en estudio con animales.

Los reglamentos que presentan la FAO para la inocuidad son análisis al proceso de industrialización de la hoja de Guayusa, los efectos de un estimulante como la cafeína se debe a que posee un 2.3 % de cafeína en hojas.

Análisis de los laboratorios S.E.S.A. indican que se tiene un 0.523% de cafeína en 200g en hojas secas de guayusa con diferentes tipos de análisis y se hizo un promedio entre los métodos que se aportan este resultado (Mosely, 2012).

Considerando la importancia de conocer sus contraindicaciones, se refiere además que la dosis letal 50 con interpolación indica que la ingesta de 250 mg/kg en cafeína es necesaria para que el organismo desarrolle un cáncer, un informe sobre residuos realizado en el S.E.S.A. indica un nivel de cafeína del 0.523% hojas secas (García, 2012).

2.22 Composición de la Guayusa

Los fitoconstituyentes presentes en la guayusa, resultado del análisis fotoquímico realizado por el laboratorio del Gobierno Regional de Cajamarca se logró evidenciar la presencia de : cafeína, derivados del ácido clorogénico, taninos derivados del catecol, esteroides, quinonas, saponinas, aceites esenciales, triterpenos, lactonas, flavonoides, teobromina y en menor cantidad teofilina, piridoxina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido ascórbico, colina, ácido isobutírico y tisanas (Plan de manejo, Ilex Guayusa Loes, 2011).

2.22.1.1 Cafeína hasta un (2 %):

La cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas, sólido cristalino, blanco y de sabor amargo, que actúa como una droga psicoactiva y estimulante. Su fórmula química es $C_8H_{10}N_4O_2$, su nombre sistemático es 1,3,7-trimetilxantina (Ramírez *et al.*, 2016).

La cafeína del café y otras infusiones es absorbida por el estómago y el intestino delgado dentro de los 45 minutos que siguen a la ingestión para luego ser distribuida a través de todos los tejidos del cuerpo. Su eliminación sigue una cinética de primer orden.

La cafeína, es metabolizada en el hígado por el sistema enzimático del Citocromo P450 oxidasa (específicamente, la isoenzima 1A2) en tres productos metabólicos de la dimetilxantina¹⁷ donde cada uno posee sus propios efectos en el cuerpo, que son:

Paraxantina (84%): Incrementa la lipólisis induciendo el incremento de niveles de glicerol y ácidos grasos libres en el plasma sanguíneo.

Teobromina (12%): Dilata los vasos sanguíneos e incrementa el volumen de orina. La teobromina es también el principal alcaloide en el cacao.

Teofilina (4%): Relaja el músculo liso de los bronquios y es así usado para el tratamiento del asma.

Cada uno de estos metabolitos es luego metabolizado y excretado en la orina. Estimula el corazón y el sistema nervioso central, es un alcaloide de la familia metilxantina, la misma a la que pertenecen la cafeína y la teobromina.

Obteniendo sus características de ser estimulantes del sistema nervioso central y broncodilatadores. Se encuentra naturalmente en el té negro y en el té verde (Ramírez *et al.*, 2016).

La teofilina es especialmente diurética, por lo que ayuda a la eliminación de líquidos, a través de la orina. Su nombre químico es: 1,3 dimetilxantina (Ramírez *et al.*, 2016).

Según García (1975) el resultado del estudio fotoquímico de la guayusa realizado por el laboratorio del Gobierno Regional de Cajamarca. Después de la estabilización de la planta fue el siguiente, donde se procedió a extraer con solventes de polaridad crecientes, concentrar, modificación de pH, separar y purificar los fitoconstituyentes presentes en la planta, la cual se procedió a la identificación de metabolitos secundarios presentes.

- Taninos derivados del catecol.
- Quinonas.
- Alcaloides tipo cafeína.
- Saponinas.
- Flavonoides.
- Aceites esenciales.
- Triterpenos

Los fitoconstituyentes presentes en la guayusa, resultado del análisis fitoquímico realizado por el laboratorio del Gobierno Regional de Cajamarca se logró evidenciar la presencia de: cafeína, derivados del ácido clorogénico, taninos derivados del catecol, esteroides, quinonas, saponinas, aceites esenciales, triterpenos, lactonas.

También flavonoides, teobromina y en menor cantidad teofilina, piridoxina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido ascórbico, colina, ácido isobutírico y tisanas (García H. , 1992) , (Iglesias, 1985), (Rosero, 2007).

2.23 Aminoácidos en la guayusa

Según Fundación Chankuap (2014); Pro Ecuador (2016) manifiestan que la guayusa “posee todos los aminoácidos esenciales”, así como una mayor actividad antioxidante en comparación con el té verde. Su contenido en cafeína y teobromina ayudan a reducir el estado de fatiga física y mental. Según Schultes (1979), contiene un 3,3 % de cafeína, es decir 690 mg, equivalente a 8 tazas de café.

Roque en un estudio realizado mediante una extracción en metanol y solución hidroalcohólica en hojas de guayusa encontraron compuestos fenólicos (Ruiz y Roque 2009).

Dentro de su composición química los fitoestrógenos presentes en la Guayusa, son sustancias que estructural y funcionalmente son similares al 17-β estradiol o que producen efectos estrogénicos. Por esta razón los fitoestrógenos tienen una importante actividad que los estrógenos u hormonas sexuales femeninas.

Esta peculiar acción “hormonal” confiere a los fitoestrógenos algunas características muy interesantes en la prevención y tratamiento del desequilibrio hormonal y otras enfermedades (Correa, 1989); (García, 1975).

Las hojas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes.) son una fuente de antioxidantes con 39.37 ± 7.71 mg EAG/100 g planta en contenido de fenoles totales; 6.07 ± 0.64 mg ET/100 g planta, y de 14.71 ± 5.41 mg ET/100 g planta en capacidad antioxidante medida por los métodos ABTS y DPPH respectivamente (Godoy, 2016).

Según Pro Ecuador (2016) la guayusa posee un 50 % más de capacidad antioxidante en comparación con el té verde (*Camellia sinensis*), contiene todos los aminoácidos esenciales para el ser humano, así como cafeína, teobromina y ácido clorogénico, que son responsables de reducir el estado de fatiga física y mental (Fundación Chankuap, 2014).

2.24 Antioxidantes

Un antioxidante se define como aquella molécula que protege a un blanco biológico contra el daño oxidativo (Halliwell, 2007). Las funciones que puede desempeñar son de prevención (evitar formación de especies reactivas de oxígeno como hidroperóxidos o H₂O₂), intersección (desactivación de radicales mediante el secuestro de iones metálicos o captura de radicales libres) o de reparación (remediar daño una vez sucedido) Rodríguez *et al.*, (2001).

El estudio de los antioxidantes ha incrementado el interés, debido a que publicaciones demuestran que el consumo frecuente de antioxidantes, especialmente los flavonoides, tienen capacidad de captar los radicales libres causantes del estrés oxidativo.

Los métodos espectrofotométricos más usados para determinar la capacidad antioxidante incluyen: capacidad de atrapamiento del catión - radical ABTS del radical DPPH y fenoles totales.

Estos alimentos que contienen sustancias con acción fisiológica, aparte de los componentes nutritivos, que proveen beneficios para la salud son los denominados alimentos funcionales (Heim *et al.*, (2002).

CAPÍTULO III

3 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Localización

El presente trabajo se llevó a cabo en la Provincia de Morona Santiago; Cantón Morona, Parroquia Macas, en las Comunidades del Zapatero.

3.2 Población

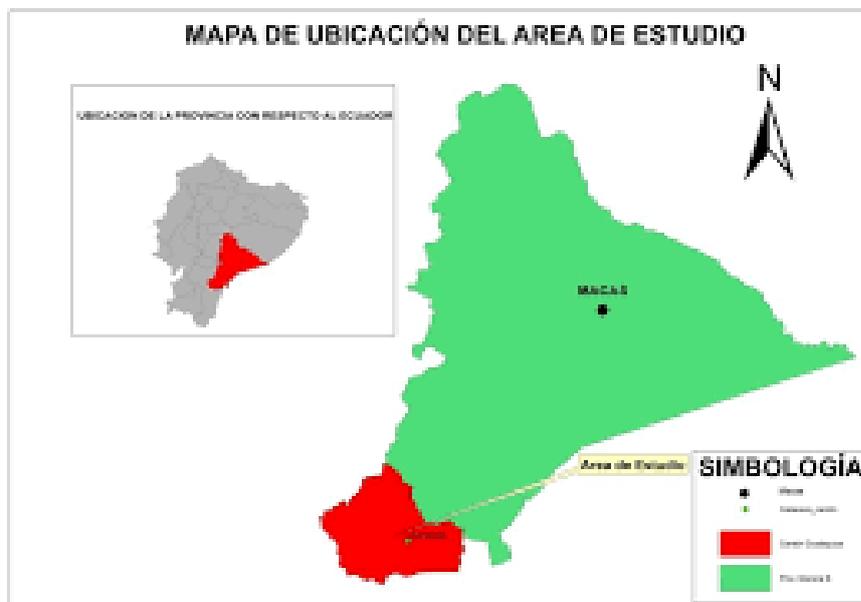


Figura 2-3. Mapa geográfico de la provincia Morona Santiago.

Fuente: <https://www.mapasecuador.net/mapa/mapa-morona-santiago-mapa-turistico.html>

Tabla 1-3. Características generales del cantón Morona

Población	18.984 habitantes
Densidad Poblacional	25 hab /Km ²
Extensión	53.33 km ²
Limite Político Administrativo	Limita al Norte: los cantones de Pablo Sexto y Huamboya Al Sur: con los cantones Sucúa y Logroño. Al Este: con la provincia de Chimborazo. Al Oeste: con el cantón Taisha.
Rango Altitudinal	1,050 m – 1200 msnm
División Política	Morona se divide en nueve parroquias: Parroquia Urbana <ul style="list-style-type: none">• Macas (cabecera cantonal y capital provincial). Parroquias Rurales <ul style="list-style-type: none">• Alshi (Cab. en 9 de Octubre).• General Proaño.• San Isidro.• Sevilla Don Bosco.• Sinaí.• Cuchaentza.• Río Blanco.• Zuña (Zuñac).
Temperatura	14-15°C
Humedad Relativa	79.10%
Relieve	Inclinado e irregular, con muchas pendientes.

Realizado por: Manual de Planificación Estratégica e Indicadores de Desempeño en el Sector Público (2013).

3.3 Variables

3.3.1 Variable Independiente

En la presente investigación se utilizaron cuatro niveles de guayusa (tratamientos) a base de hojas de guayusa. Todos los animales tuvieron una dieta de pasto gramalote y sales minerales.

Tratamiento testigo (T0): Pasto + sales minerales:

Tratamiento 1 (T1): Pasto + sales minerales + guayusa al 10 % + melaza:

Tratamiento 2 (T2): Pasto + sales minerales + guayusa al 20 % + melaza:

Tratamiento 3 (T3): Pasto + sales minerales + guayusa al 30 % + melaza:

3.3.2 Variables Dependientes

Para conocer el efecto inmunoprotector y sanitario que aporta la guayusa en el tracto reproductivo de la vaca receptora de embriones se midió:

- Cantidad de células polimorfas nucleares (número).
- Carga bacteriana por tipo en el tracto reproductor de las vacas (tipo y cantidad).
- pH del tracto reproductor de la vaca.
- Nivel de implantación efectiva del embrión mediante trasplante en las vacas (en %).
- Peso corporal de las vacas antes y después del tratamiento con guayusa (kg).
- Nivel de progesterona y estrógeno en la sangre de las vacas ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).

3.4 Metodología

El presente estudio es una investigación experimental explicativa, ya que se intervino para modificar los factores de estudio y se observaron las variables modificadas o no.

Para ello se conformaron cuatro grupos de vacas de primer parto y se aplicaron diferentes técnicas como la de citobrush, para determinar los niveles de células polimorfo nucleares (PMN) en el útero de la vaca; otra se obtuvo muestras de sangre al vacío para determinar los niveles de progesterona y estrógenos en sangre, y por último la técnica de raspado para determinar los microorganismos y pH en el tracto reproductivo; también se analizó el porcentaje de preñez y la condición corporal.

3.5 Diseño de investigación

En el presente estudio experimental se aplicó el modelo matemático general:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} : Es la respuesta en el i-ésimo tratamiento y la j-ésima observación.

μ : Media general de la población de datos generada en el experimento (gran media).

α_i : Indica el efecto del i-ésimo tratamiento, o sea es el efecto de los niveles o versiones del factor en estudio.

e_{ij} : Errores experimentales asociados, la desviación de la j-ésima replicación del i-ésimo tratamiento (error aleatorio asociado a la respuesta Y_{ij}).

En donde se evaluaron tres tratamientos de consumo de guayusa en vacas más un tratamiento testigo (sin consumo de guayusa), con 5 repeticiones para cada tratamiento.

3.6 Métodos de la investigación

El tipo de investigación a realizarse es experimental explicativa y se aplicó el modelo matemático general: ya que se intenta establecer básicamente relaciones causa-efecto. Más específicamente, cuando se desea estudiar como una variable independiente (causa) modifica una variable dependiente (efecto).

3.7 Enfoque de la investigación

El enfoque de la investigación fue cuantitativa, ya que se tomó medidas en números como es la células polimorfos nucleares, cantidad de hormonas ya sea progesterona P4 o estrógenos E4, también la cantidad de bacterias, el ph y el peso de los animales, y cualitativo porque se observó características y cualidades para llegar a las diferentes conclusiones de acuerdo a los números obtenidos y la observación de las diferentes características que nos indicaban que la vaca siguió con la gestación, llegando a tener éxito la transferencia del embrión.

3.7.1 El enfoque cuantitativo

El enfoque de la investigación se basó en el estudio cuantitativo, donde se midió células de polimorfos nucleares (PMN), hormonas como la progesterona P4 y estrógenos E4, el Ph,

presencia de bacterias y el peso de los animales; ya que existe la necesidad de medir las variables entre sí para establecer que las mismas están correlacionadas, situaciones que se hicieron evidentes a medida que se desarrolló la investigación. La investigación es de tipo cuantitativa porque aborda a profundidad la problemática de la implantación del embrión.

Esta es una investigación con muestra completamente al azar para los diferentes tratamientos:

Dentro de los criterios de selección los animales deben presentar lo siguiente:

- 1) Mínimo un parto (sin problemas reproductivos).
- 2) Condición corporal 3,5 sobre 5.
- 3) Alimentadas el último año con pasto gramalote y sales minerales.
- 4) Buena condición sanitaria (desparasitación y vacunas).

3.7.2 El enfoque cualitativo

Para esta investigación se utilizó embriones de la raza Charoláis, pero las vacas no serán necesariamente de raza Charoláis, ya que estas servirán para un óptimo desarrollo del embrión, del cual mientras más puras de raza son, más delicadas y susceptibles a enfermedades; luego de la ejecución de la investigación se informará el porcentaje de pureza que tienen las receptoras con respecto a la raza Charoláis, las cualidades que se observó en los animales estaba determinado en su aspecto físico buena condición corporal, gestación en desarrollo y adaptabilidad a los diferentes tratamientos hormonales las cuales debían coincidir con la donadora.

3.8 Alcance de la Investigación

En la presente investigación se trata de explicar el efecto de las hojas de guayusa (*Ilex guayusa loes*) en el aparato reproductor de las vacas, mismas que luego de su ingesta al tracto reproductivo este se piensa que actúa directamente en el aparato reproductor de la vaca, teniendo un efecto en el ambiente uterino (en la preñez) luego del trasplante del embrión, y para demostrarlo, se tomaron muestras de vacas receptoras con las mismas condiciones nutricionales de manejo y sanitario, de productores de la ASOCIACION CHAROLAIS dentro de la provincia de Morona Santiago.

3.9 Población de Estudio

La presente investigación se utilizó 20 vacas receptoras de embriones Charoláis, en etapa reproductiva de primer parto.

Unidad de análisis

La unidad de análisis en el presente estudio fue cada vaca con sus correspondientes características.

3.10 Selección de la muestra

Los animales en estudio, fueron muestreados para los diferentes análisis a realizar con el fin de encontrar los valores de las variables a determinar.

3.11 Tamaño de la muestra

En la presente investigación se utilizó un animal por unidad experimental, teniendo 20 animales como tamaño de muestra; ya que esta investigación es experimental el tamaño de la muestra está dada por el número de tratamientos multiplicado por el 1 número de repeticiones.

3.12 Procedimiento experimental

A continuación, se presenta el protocolo que fue utilizado, para el trasplante de embriones.

A las receptoras se le llevo un manejo de estricta alimentación por un lapso de 30 días antes de iniciar el programa, de sincronización, a las cuales se les administro sales minerales a todas las vacas, como de costumbre para evitar alterar su nivel de estrés y tensión.

También mantener su estado nutricional ya que los suelos de la amazonia son pobres en nutrientes y minerales, se homogenizo las vacas, las que faltaban condición corporal (CC) se les suministro más alimento y las de (CC) más alta se le disminuyo un poco el alimento.

3.12.1 Selección de las vacas receptoras

En este paso de selección se consideró algunos factores importantes de los cuales se disponía del 33,33% más de vacas receptoras ya que mediante palpación rectal descartamos las que no cumplieron sus requerimientos como: vaca no cíclica, problemas endometritis, registros de abortos, el cual se tuvo una estricta clasificación para que no varíe los resultados.

En el caso del mérito genético, se tuvo que tomar en cuenta la capacidad de mantener una preñez y su habilidad materna, ya que esto nos llevara al fracaso o a completar el desarrollo del embrión luego de su implantación y tener un parto de ternero vivo en bajos problemas de parto (distocia) como resultado final y destetar la cría con un desarrollo adecuado.

De allí los parámetros para basarnos en la selección los cuales fueron: el tamaño y la edad de los animales, mínimo un parto, posean un aparato reproductivo fisiológica y anatómica en perfecto estado, buena condición finca, libre de enfermedades, buena fertilidad y un ciclo estral regular.

Una vez realizada la pre selección del grupo de receptoras procedimos a verificar su etapa del ciclo reproductivo por medio del chequeo ginecológico, en donde seleccionamos animales únicamente que posean un cuerpo lúteo funcional, y que su aparato reproductivo esté en condiciones de perfecto estado; descartando a los animales que iniciaron la ovulación, con quistes ováricos, quistes latéales, cérvix deforme.

Diagnóstico y evaluación del cuerpo lúteo (CL)

La técnica utilizada fue la palpación rectal, para verificar la presencia de irregularidades en el aparato reproductor de la receptora como: piometra, quistes ováricos, quistes foliculares, y se pudo también determinar la funcionalidad ovárica, ausencia de tono uterino y folículos indispensables de la calidad del CL.

El cuerpo lúteo (CL) se clasifica en tres categorías:

Calidad 1: mayor a 2,5 cm de diámetro.

Calidad 2: igual a 2 cm de diámetro.

Calidad 3: menor a 1,5 cm de diámetro.

La calidad 1 y 2 son cuerpos lúteos aptos, para que la receptora sea transferida.

Sincronización de las receptoras

El jueves 11 de abril del 2019 se aplicó el dispositivo CIDR (P4) más 2cc de Gestavec (P4) junto con 4cc de Grafoleòn (E2), esto permite sincronizar el surgimiento de la onda folicular.

El viernes 19 de abril del 2019 se procedió a retirar el dispositivo CIDR (P4) y se aplicó 2cc de Grafoleòn (E2), esto permite aumentar la detección y precisión del estro, indispensable también la aplicación de Lutalyse (PGF2 α), para la degeneración o destrucción del cuerpo lúteo (luteolisis o regresión del cuerpo luteo).

El día domingo 21 de abril del 2019 se administró 2,5 cc de Fertagyl (GnRH) para disminuir el intervalo entre ovulaciones y estricto control de calores de las receptoras, registramos su identificación del arete, la fecha y la hora de haber iniciado el celo, para mantener la sincronía con el embrión a transferir y el orden de transferencia, ya que son aspectos importantes, para el éxito de la práctica

El día domingo 28 de abril del 2019 se transfirió los embriones, se administrò 5 ml de Flunixin antiinflamatorio, para evitar que produzca prostaglandinas, por la manipulación excesiva del tracto genital más 2,5 cc de fertagyl.

El jueves 16 de mayo del 2019 se procedió a la verificación de preñez mediante palpación.

Tabla 2-3. Pasos para seguir para la sincronización de receptoras.

FECHA DE APLICACIÓN	HORMONA
Jueves 11 de abril del 2019	CIDR (implante) + 0.4cc. Grafoleón (E2) im + 2cc. Gestavec (P4) im.
Viernes 19 de abril del 2019	Retirar el implante + 2cc. Lutalyse (PGF2 α) + 0.2 cc Grafoleón (E2)
Domingo 21 de abril del 2019	2.5cc Fertatil (GnRH) im + control de celos
Domingo 28 de abril del 2019	Transferencia de embriones + 2.5cc Fertagyl + 5ml Flunixin
El jueves 16 de mayo del 2019	Diagnóstico de preñez.

Realizado por: Maldonado, Anita, 2019

3.12.2 Preparación de equipos y materiales

Se realizó la preparación de los materiales con todas las precauciones y posibles necesidades que se pudieran presentar en la transferencia, preparación de mangas (donde se colocan e inmovilizan a los animales para mejor manejo y aplicación del embrión), desinfección del lugar y materiales a ocupar, y un techo de protección control el clima, ya sea luz solar intensa o lluvia.

Transferencia de embrión

Se ordenó todos los materiales y se procedió al chequeo de las receptoras, y con la ayuda de los registros de celos podemos verificar la presencia de un cuerpo lúteo cuyo tamaño dependerá del día que haya pasado el celo, colocando una señal con marcador el lado del ovario que tiene el CL.

Se procedió a limpiar toda el área de la vaina de la vaca con agua y jabón, luego se colocó 5ml de anestesia sin epinefrina por vía epidural y una vez que perdieron sentido en su parte posterior se procedió a la transferencia propiamente dicha.

Para la transferencia en primera instancia seleccionamos el embrión a utilizar tomando en cuenta su edad; tratando de relacionar la sincronía del embrión, con la sincronía de la receptora,

colocamos la pajilla en la pistola y el catéter y aseguramos a la pistola, de igual forma ponemos el chemisse , y se procedió a introducir la pistola por vía vulvar , una vez que se llega al cérvix se retira el chemisse y pasamos la pistola por el cérvix , el punto donde se introduce el embrión es en el último tercio del cuerno uterino.

Finalmente se administró un anti-inflamatorio a las vaconas con mayor manipulación prolongada recibió el tracto reproductivo en el momento de la transferencia, esto es para que evite que produzca prostaglandina que conlleva a la muerte *del* embrión y por último a la administración de la GnRH.

Esta técnica no quirúrgica trans-cervical depende de: Calidad del embrión, estadio, sincronía embrión – receptora, calidad de la receptora, manejo del embrión, técnica de congelado-descongelado y habilidad del técnico para la transferencia.

3.12.3 Determinación del celo

La detección del celo se pudo identificar con la ayuda del programa de sincronización, la cual se diagnosticó a través de percepciones visuales, tales como secreción de moco transparente, vulva edematizada roja, cola levantada, nerviosa muge frecuentemente, monta y se deja montar por las tras vaconas y pérdida del apetito.

3.12.3.1 Palpación de ovarios

Se realizó por método práctico y económico a través de palpación rectal, la que se calificó por medio del método subjetivo, la dilucididad de los ovarios, tamaño de los ovarios y en lo posterior el tamaño del cuerpo lúteo CL.

3.12.4 Determinación de la preñez

El diagnóstico de preñez se realizó a los 45 días post trasplante, la cual se determinó por medio de la palpación rectal, este tiempo depende de la experiencia del técnico.

El embrión implantado en la receptora se afirma que:

El útero se encuentra en la pelvis, un ligero aumento del tamaño del cuerno donde se aloja el embrión, los amnios tienen un tamaño semejante al de un pequeño huevo de gallina, la membrana se desliza en cualquier cuerno y el cuerpo lúteo se encuentra en el ovario adyacente al cuerno preñado.

3.13 Técnicas de recolección de datos primarios y secundarios

3.13.1 Determinar la cantidad de células polimorfas nucleares.

Se tomaron muestras citológicas del endometrio de cada vaca por la técnica de cytobrush, nombre que reciben los cepillos endocervicales, que fueron cortados aproximadamente a cinco cm de largo y enroscados en el extremo del mandril de una pistola universal de inseminación artificial (IA) de acero inoxidable diseñada para este trabajo.

Para proteger la pistola de la contaminación vaginal, se cubrió con una funda descartable. La región perineal y la vulva fueron higienizadas con solución yodada y toallas de papel absorbente.

La pistola de inseminación se introduce, guiada manualmente por la palpación rectal, a través de la vulva, vestíbulo vaginal y vagina pasando a través del cérvix y se coloca en el cuerpo uterino o en la base del cuerno de mayor tamaño en los casos de asimetría, donde el cepillo se expuso de la funda y se procedió a la realización de la toma de muestra dando un giro al mismo en sentido de las agujas del reloj sobre la mucosa uterina.

El cepillo luego fue retraído dentro de la funda y la pistola de inseminación se retiró del útero y vagina. Posteriormente, se realizó frotis rotando cada cepillo con la muestra sobre un porta objetos limpio, y se determinará el porcentaje de Polimorfo nucleares Neutrófilos.

Cada frotis fue realizado sobre un portaobjetos, rotulado con el número de arete correspondiente al animal y la fecha de toma de las muestras. Inmediatamente de realizado el extendido se fijará y almacenará en cajas transportadoras de 50 portaobjetos.

Una vez fijadas se remitieron al laboratorio donde se realizó una tinción Diff Quick. Para cada frotis se contarán un mínimo de 100 (cien) células totales (células epiteliales y células inflamatorias), a partir de las cuales se determinó un porcentaje de células inflamatorias (macrófagos, linfocitos, neutrófilos) de las cuales los neutrófilos son los utilizados para determinar el grado de inflamación de la mucosa uterina.

3.13.2 Carga bacteriana por tipo en el tracto reproductor de las vacas (cultivo y antibiograma).

Una vez que se realizó el frotis obtenido por Cytobrush (citología endometrial), se procedió a sacar con mucho cuidado, evitando contaminar la brocha adaptada a la pistola del cytobrush, poniéndolo dentro de un tubo vacutainer tapa roja, para el transporte al Centro de Diagnóstico Clínico “Cabrera Laboratorios” para el respectivo análisis.

Posteriormente se determinó el crecimiento bacteriano evaluando las características macroscópicas (tamaño, forma, borde, color, superficie y tipo de hemolisis) y microscópicas de cada una de las colonias por tinción Gram.

Se evaluó los niveles hormonales de progesterona y estrógeno en la sangre de las vacas alimentadas o no con guayusa.

Se tomaron las muestras de sangre de los animales en tubos al vacío, para luego ser trasladados al laboratorio donde se realizaron la inmunoanálisis; el cual consiste en que reaccione inmunológicamente en un antisuero específico (*Ac*) se une el antígeno (*Ag*) o la hormona, la cual fue contada para saber la cantidad que produce en ese momento el animal.

3.13.3 El pH del tracto reproductor de la vaca

Una vez seleccionados los animales se procedió a realizar la limpieza de la región bulbar y perianal con abundante agua hasta que ya no se observe restos de heces, secándolo al final. Se utilizó un espéculo previamente desinfectado con solución al 2% de yodo y secado hasta retirar restos de líquido, el cual se introduce en el conducto vaginal con el fin de exponer la zona y facilitar la toma de la muestra.

Se extrajo una tira reactiva del recipiente, cerrándolo inmediatamente y teniendo cuidado de no tocar las áreas reactivas; luego se procedió a colocar un segmento de 3.5 cm. de la tira reactiva en el extremo anterior de un catéter plástico fijándolo con esparadrapo.

Se puso este extremo del catéter en contacto con la pared dorsal de la mucosa vaginal a 10 centímetros aproximados antes de la entrada al cérvix, dejándola aproximadamente 30 segundos para que absorbiera el mucus vaginal.

Posteriormente se colocará la tira en una superficie plana y no absorbente durante 60 segundos para su posterior lectura. La lectura se realizó visualmente de los resultados comparando el color de reacción de la tira con la escala colorimétrica impresa en el recipiente del producto.

3.13.4 Peso corporal y porcentaje de preñez.

El diagnóstico de gestación se lo realizo mediante ecografía uterina.

El peso corporal de las vacas antes y después del tratamiento con guayusa se tomaron con la cinta bovinométrica.

3.14 Instrumentos de recolección de datos primarios y secundarios

Técnicas de recolección de datos:

Para la medición de los polimorfus mono nucleares (PMN) la toma de muestra se lo realizo con la técnica CITOBRUS, y el conteo de las células por tinción.

Para verificar la presencia de bacterias en el tracto reproductivo de la vaca se utilizó la técnica de cultivo de bacterias con el triple agar antes mencionado.

Para medir la cantidad de hormonas en la vaca, se utilizó la técnica de inmunoanálisis.

3.15 Materiales de laboratorio de microbiología.

- Tubos de Tioglicolato
- Medios de Transporte SWAB
- Cajas Petri de Agar Sangre Cordero
- Cajas Petri de Agar EMB
- Cajas Petri de Manitol
- Tubos de Agar TSI
- Tubos de Agar Urea
- Tubos de Agar Citrato
- Tubos de Agar SIM
- Tubos de Agar LIA
- Asas estériles redondas
- Asa estéril recta
- Incubadora

- Frasco de anaerobiosis
- Kit de tinción de Gram

3.15.1.1 Materiales del área de endocrinología

- Tubos eppendorf estériles
- Centrífuga
- Equipo Cobas e 411
- Puntas azules
- Pipeta automática de 500 ul.

3.15.1.2 Materiales para determinar las células polimorfonucleares.

- Placas portaobjetos
- Kit de tinción de gram
- Microscopio

3.15.1.3 Métodos microbiológicos en el laboratorio

- Se recibió la muestra etiquetada (tubo de tioglicolato).
- Se incubó el tubo de tioglicolato 24 horas en la incubadora a 37⁰C.
- Después de la incubación se extendió el inóculo uniformemente con un asa estéril por la superficie del medio de cultivo (Agar sangre cordero, Agar EMB y Agar Manitol), las células diseminadas sobre la superficie formarán colonias aisladas.
- Se incubó los medios de cultivo sembrados en la incubadora a 37⁰C, los medios de Agar Sangre cordero se incubó en un frasco de anaerobiosis hasta 72 horas, y los medios de Agar EMB y Agar manitol se incubaron en aerobios hasta 24 horas.
- Luego se incubaron y se observó el crecimiento de colonias en el agar.
- Las colonias que crecieron en agar EMB, se realizaron una tinción de gram para identificar bacilos gram negativos, por esta razón se tomaron las colonias aisladas de bacilos gram negativos y se procedió a realizar la siembra en los medios de TSI, Citrato, Urea, SIM y LIA, para la identificación de Escherichia coli, estos medios se incuban a 37⁰C por 24 horas.

- Luego de la incubación se compararon los resultados de los medios con una tabla de lectura y se identificó solo E. coli.
- Las colonias que crecieron en agar sangre cordero se procedió a realizar una tinción de gram para identificar otro tipo de bacterias y llegar a la identificación de alguna bacteria patógena en los bovinos, pero no se identificó bacteria patógena alguna.

3.16 Métodos de endocrinología en el laboratorio

- Se recibe las muestras etiquetadas de sangre en tubos tapa roja.
- Se centrifugan las muestras a 3500 rpm durante 10 minutos.
- Se separa el suero de la muestra.
- La cuantificación de Estradiol y Progesterona se realiza mediante la técnica Electroquimioluminiscencia en el equipo Cobas e411.
- Características del equipo:
 - Equipo automatizado de mesa.
 - Fácil manejo
 - Principio: Electroquímico luminiscencia
 - Software: fácil de usar.
 - Calibradores, controles, reactivos y muestras con códigos de barras.
 - Resultados en 20 minutos.
 - Impresión automática de resultados

Características de los reactivos:

- Listos para el uso
- Entre 100 y 200 determinaciones por Kit
- Reactivos con código de barras bidimensional
- Resultados del Kit Rutina en 20 minutos.
- Estabilidad en el equipo de 30 días.
- Se colocan las muestras en el equipo y comienza el proceso.
- Se obtienen los resultados.

3.17 Metodología para la observación y conteo de células en el laboratorio.

- Se recibe las placas porta objetos con las muestras.

- Se deja secar las placas durante 24 horas a temperatura ambiente.
- Una vez secas las placas se procede a teñir con el kit de tinción de gram.
- Tinción gram:
 - Colocar colorante violeta de gamsiana por 1 minuto
 - Lavar la placa con chorro suave de agua destilada
 - Colocar colorante lugol durante 1 minuto
 - Lavar la placa con chorro suave de agua destilada
 - Colocar alcohol acetona durante 20 segundos
 - Lavar la placa con chorro suave de agua destilada
 - Colocar colorante Safranina durante 1 minuto
 - Lavar la placa con chorro suave de agua destilada
- Dejar secar las placas
- Observar al microscopio con lente de 100x.
- Se cuenta el número de polimorfonucleares por campo en 10 campos representativos por muestra.
- Se reporta el número de células observadas por campo.

3.18 Métodos estadísticos para procesar los datos recopilados

Para la recolección de datos se utilizó cuadros y gráficos estadísticos que describieron los resultados obtenidos, por análisis cuantitativo para comprobar la hipótesis del beneficio de la guayusa, como inmunoprotector en el útero de las vacas para el trasplante de embriones.

- ADEVA
- Separación de medias según Newman $p < 0.05$.

Tabla 3-3. Esquema del experimento.

TRATAMIENTO	CODIGO	U. E	REP.	UE/TRAT.
Sin guayusa	T0	1	5	5
10% guayusa	T1	1	5	5
20% guayusa	T2	1	5	5
30% guayusa	T3	1	5	5
Total, de animales				20

UE = # vacas / unidad experimental.

Tabla 4-3. Esquema del ADEVA

FUENTE DE VARIACION	GL
TOTAL	19
TRATAMIENTOS	3
ERROR	16

Realizado por: Maldonado, Ana. 2019

CAPÍTULO IV

4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 1-4 se analiza el peso de las vacas, cantidad de células Polimorfos Mononucleares (PMN), niveles hormonales en sangre (Progesterona y Estrógenos), implantación del embrión, y por último la presencia y conteo bacteriano (*Escherichia Coli*, *Klebsiella spp.*, *Shigella spp.*).

Los cuales responden a los objetivos específicos; tomando en cuenta que se midió el pH, el peso de las vacas y la implantación del embrión, para explicar de mejor manera el efecto de la guayusa como, se detallan los resultados en la tabla 5-4.

Tabla 5-4. Parámetros productivos y reproductivos de las vacas Charolais.

Variables	Niveles de <i>illex guayusa loes</i> (guayusa) en gr.							Prob.	E.E.
	T0	T100	T200	T300					
Peso (kg)	518,00	B 445,20	c 549,50	ab 580,20	a	0,00	19,50		
Nivel de progesterona (ng/ml).	1,00	B 0,16	b 0,66	b 3,12	a	0,41	1,30		
Nivel de estrógenos (ng/ml).	14,65	B 13,08	b 17,45	ab 22,13	a	0,76	6,39		
Implantación del embrión	11,76	B 29,41	a 29,41	a 29,41	a		1,59		
pH del tracto reproductivo de la vaca	6,50	A 6,31	b 6,50	a 5,40	ab	0,03	0,29		
<i>Escherichia Coli</i> (UFC/ml)	33,33	A 16,67	b 25,00	ab 25,00	ab		0,67		
<i>Klebsiella spp.</i> (UFC/ml)	0,00	B 33,33	a 33,33	a 33,33	a		1,00		
<i>Shigella spp.</i> (UFC/ml)	0,00	B 33,33	a 33,33	a 33,33	a		1,00		
Células Polimorfos (%)	91,00	A 48,70	b 48,00	b 23,90	c	0,38	27,05		

Letras iguales no difieren significativamente según Newman ($p < \geq 0.05$).

3.19 Peso inicial y final de las vacas

Para la realización de esta investigación, se midió el peso al inicio y al final al igual que los demás, en esta ocasión se diferenciará entre el inicial y el final para observar si existen cambios o no en el aumento de peso con los diferentes tratamientos, para ello se seleccionaron animales homogéneos, dentro del cual un factor importante fue la edad, utilizándose animales con una edad promedio general de 38,94 +/- 0,28 meses para el programa de transferencia de embriones. En esta ocasión se utilizaron vacas de primer parto.

A continuación, en el gráfico 3-4 se detallan los pesos de las vacas al igual que en la tabla 5-4.

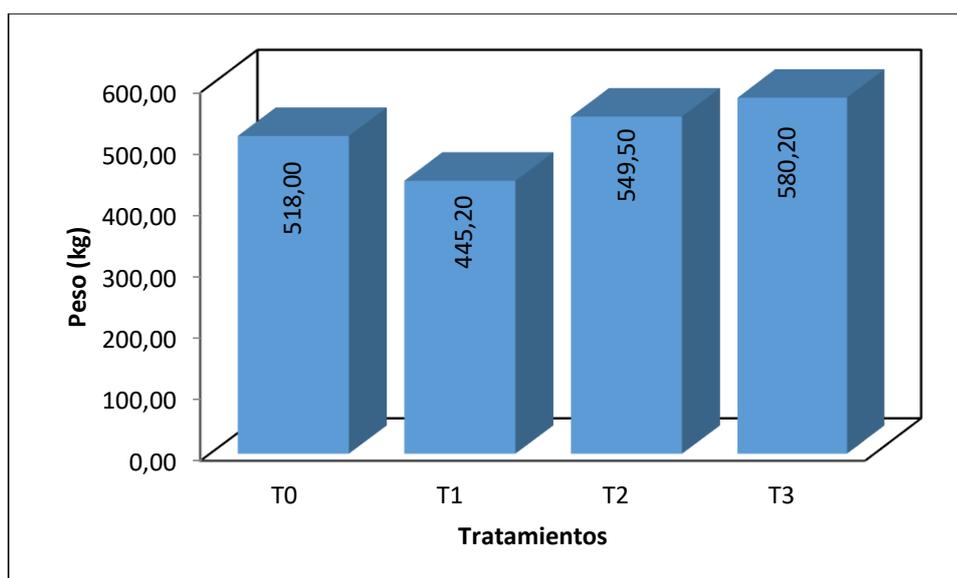


Figura 3-4. Pesos promedios de las vacas

Realizado por: Maldonado, Ana. 2019

Los pesos finales detectados en este estudio tienen una media de 523,22 kg con un valor mínimo de 445,2 kg y un valor máximo de 580,2 kg.

Al inicio se tomaron los pesos dándonos la media del peso inicial de las vacas de los T0, T1, T2, T3 fue de 520,00 kg; 540,00 kg; 516,00 kg; 559,00 kg respectivamente ; y los finales fueron 440,00Kg; 589,00; 450,40 y 571,40, aquí se puede notar que en el T0 y T2 hay una disminución del peso ; y en el T1 y T3 hay un aumento de peso; pero la ganancia de peso de los tratamientos T1 y T3 es posible que se deba a la cantidad de flavonoides de la guayusa , la cual ayuda a la ganancia de peso, los estudios han demostrado que estas sustancias se encuentran la mayoría de las veces, ligados a moléculas de carbohidratos (Erazo, 2015) .

A este tipo de combinación núcleo flavonoide básico + una o varias unidades de carbohidratos, se les denomina como GLICOSIDOS, y cuando no tienen ligadas moléculas de carbohidratos se les denomina Agliconas Flavonoides (Plan de manejo, Ilex Guayusa Loes, 2011).

La mayoría de flavonoides son degradados en condiciones alcalinas fuertes rompiéndose el anillo C, por esta razón resultan no tóxicos para los mamíferos, pues son degradados en las condiciones alcalinas a nivel del intestino.

Según Guayusa *Ilex guayusa L*, composición química (2012), que corrobora a lo reportado por (Erazo, 2015), el cual utilizo guayusa en terneros y asume que los flavonoides y terpenos se comportan como

promotores de crecimiento haciendo que se desarrolle el organismo del animal y consecuentemente se vea favorecida la ganancia de peso; ya que los flavonoides tienen la propiedad de ligarse a las moléculas de carbohidratos.

3.20 Cuantificación de Células Polimorfo Mononucleares en el tracto reproductivo de las vacas (PMN).

A continuación, en el gráfico 4-4 se detallan el número de células Polimorfos Mononucleares (PMN) al igual que en la tabla 5-4.

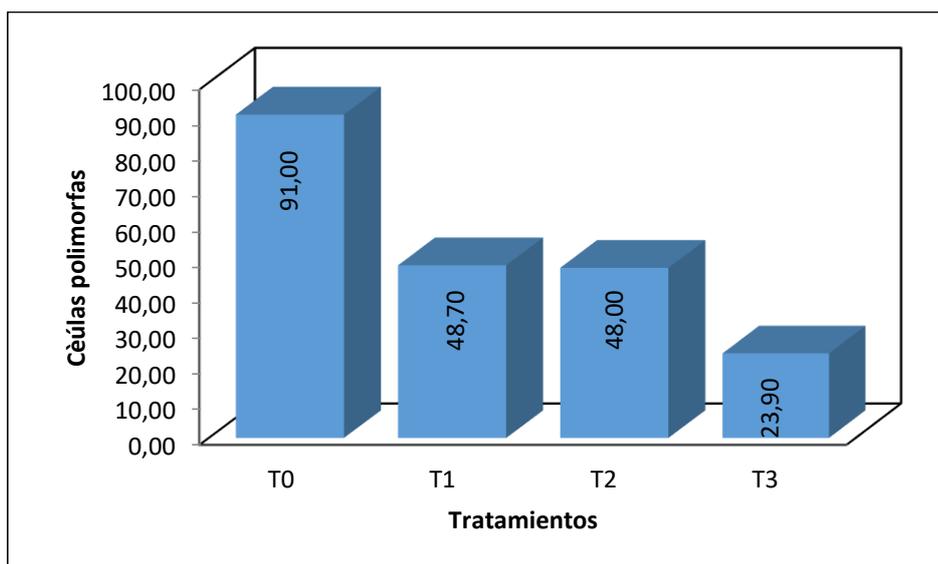


Figura 4-4. Número de células Polimorfos Mononucleares.

Realizado por: Maldonado, Ana. 2019

La presencia de células PMN en las vacas, fueron de 91.00 %, 48.70 %, 48.00 % y 23.90 %, para los T0, T1, T2 y T3 respectivamente entre los cuales existe una diferencia estadística ($P \leq 0.05$).

Observándose que a medida que incrementa los niveles de guayusa en las vacas la presencia de células Polimorfos Mononucleares (PMN) disminuye, como es el caso del T0 con 91,00 % tenemos un aumento de las células (PMN), siendo este resultado mayor a los del T1 48,70 %, T2 48,00 % y T3 23,90 % : Si tenemos mayor cantidad de células (PMN), es debido a que hay una mayor cantidad de agentes patógenos presentes en el endometrio de la vagina, lo cual explica la mayor cantidad en el T0, a la cual no se le dio la guayusa, en cambio en los otros tratamientos el aporte antioxidante de la guayusa ayuda a la defensa e inmunidad a nivel de la vagina de la vaca, notándose que a las que se dio mayor cantidad de guayusa T3 , se obtuvo un resultado menor de células (PMN). Factores dietéticos tales como antioxidantes y balance de energía es probable que sean importantes para la función de neutrófilos y la respuesta inmune (Sheldon *et al.*, 2008).

Según LeBlanc, (2014), manifiesta que la inmunidad innata de leucocitos (neutrófilos) polimorfo mononucleares (PMN) es el mecanismo predominante de defensa inmune temprana tanto en la ubre y en el útero. Se observó en distintos trabajos diferencias en el umbral mínimo de (PMN) utilizado para determinar la presencia de endometritis subclínica.

Por ello, se determinó el valor o punto de corte del % PMN para la endometritis subclínica, es de esta manera que ciertos autores contabilizan el número de células Polimorfos Mononucleares (PMN). El que corresponde con la mejor sensibilidad y especificidad es del 6,18 % (PMN), dicho valor se encuentra cercano al 6,5 % (PMN) reportado por (Galvão, y Col., 2009) y al 5 % propuesto por (Gilbert y col. 2005), (Galvão, y col. 2009); (Plöntzke y col. (2010) y Senosy y col. (2011).

Motivo por el cual se consideró que el punto de corte utilizado por los autores mencionados anteriormente y el obtenido en este trabajo podrían ser empleados como valores de referencia para futuros estudios. El punto de corte de una prueba diagnóstica consiste en la determinación del valor mínimo por encima del cual se puede diagnosticar a un individuo como enfermo. Para lograr determinar el mencionado punto de corte se utiliza un análisis estadístico denominado Curva ROC (Características Operativas del Receptor). El cual consiste en la determinación del valor de diagnóstico con la mayor sensibilidad (probabilidad que para un individuo realmente enfermo el resultado sea positivo) y especificidad (probabilidad que para un individuo realmente sano el resultado sea negativo). El valor de corte obtenido para (PMN) de 5,10% se encuentra cercano al 5.00% de (PMN) recomendado por las publicaciones de Gilber et al. (2005) para Estados Unidos de América y Plöntzke et al. (2010).

Asimismo, el porcentaje obtenido es similar al reportado en investigaciones de endometritis subclínica manifestado por Madoz (2012) quien reporto un 5% de PMN. El valor es menor a los reportados en investigaciones de Argentina de endometritis subclínica manifestado por Rinaudo et al., (2012) quienes obtuvieron valores de PMN N de 6.18% con una sensibilidad del 72.0% y una especificidad del 88.0%.

Los valores de corte reportados en los diferentes trabajos de investigación demuestran que en vacas normales el porcentaje de PMN - N no debería superar el 5%, ya que a partir de este umbral comenzaría a disminuir la eficiencia reproductiva de vacas lecheras, aumentando el Intervalo Parto Concepción (IPC).

Gran parte de las publicaciones internacionales se podría considerar que en ausencia de Endometritis Clínica (EC) una vaca es diagnosticada positiva a Endometritis Subclínica (ES) cuando la citología endometrial presenta >18% (PMN), o >10% (PMN); (Kasimanickam et al., 2004; Sheldon et al., 2006).

A pesar de que estos valores de corte son los aceptados por la mayoría de los investigadores, no existe consenso total, variando los valores de corte entre 4 y 25% PMN (Galvão et al., 2009; Hammon et al., 2006); basadas en estas diferencias, las interpretaciones y comparación de resultados entre diferentes estudios se hace controversial.

El estudio de los antioxidantes ha incrementado el interés, debido a que publicaciones demuestran que el consumo frecuente de antioxidantes, especialmente los flavonoides, tienen capacidad de captar los radicales libres causantes del estrés oxidativo.

Un antioxidante se define como aquella molécula que protege a un blanco biológico contra el daño oxidativo (Halliwell, 2007). Las funciones que puede desempeñar son de prevención (evitar formación de especies reactivas de oxígeno como hidroperóxidos o H₂O₂), intersección (desactivación de radicales mediante el secuestro de iones metálicos o captura de radicales libres) o de reparación (remediar daño una vez sucedido) (Rodríguez, Menéndez, & Trujillo, 2001).

El extracto de *Ilex guayusa loes* (Guayusa) al 80% inhibió una mayor actividad contra radicales libres, con un valor de DPPH expresado con un 23,850 ul/ml, mientras que el té verde tuvo un 32,540 ul/ml. (Rodríguez, Menéndez, & Trujillo, 2001).

3.21 Concentración hormonal de Progesterona en la sangre de las vacas evaluadas.

A continuación, se explica los resultados con el gráfico 5-4 que corresponde al nivel de progesterona detallado en la tabla 5-4.

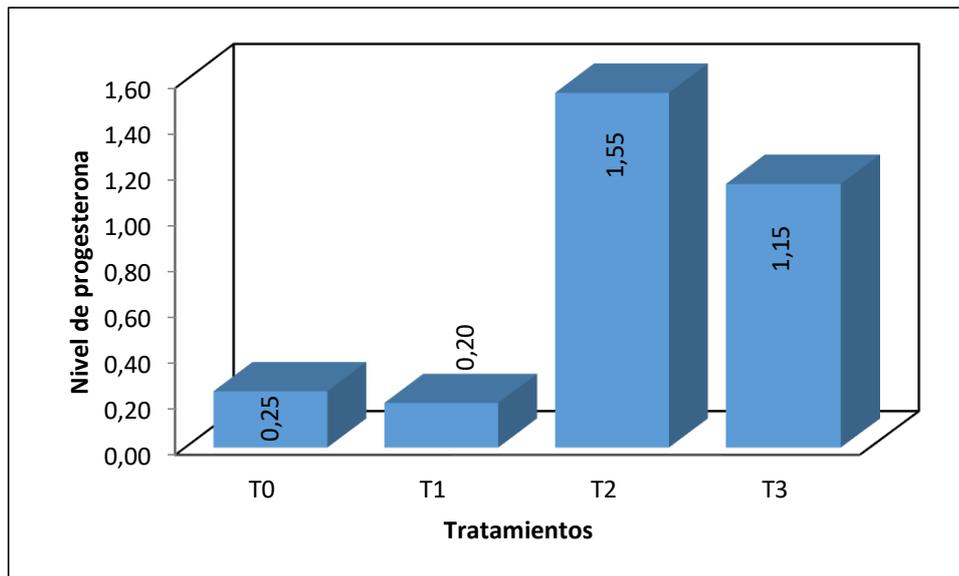


Figura 5-4. Niveles de progesterona medidas en sangre.

Realizado por: Maldonado, Ana. 2019

Los niveles de progesterona detectados en este estudio tienen una media de 0,7875 ng/ml con un valor mínimo de 0,20 ng/ml y un valor máximo de 1,55 ng/ml, notándose una diferencia estadística significativa.

Luego de la ovulación, en la cavidad del folículo colapsado, se forma el cuerpo lúteo, órgano fundamentalmente productor de progesterona. La formación del cuerpo lúteo, marca el inicio de la fase luteal, que comienza con niveles plasmáticos de progesterona basales de 2,5 ng/mL aproximadamente. Entre los días 2-3 post-ovulación, alcanzando picos máximos de 11 ng/mL aproximadamente, a los días 6-7 de la misma; días clave en la yegua preñada por ser el momento en que el embrión arriba al útero (Townson et al., 1989, Neely, 1991).

Se pueden encontrar valores altos de esta hormona alrededor del día 10 después de la ovulación y estos valores se mantienen, y no decaen como en el animal no gestante, alrededor del día 16 ó 17 del ciclo (Peters & Ball, 1995; Hafez & Hafez, 2000).

Consecuentemente, en la vaca gestante, la concentración de progesterona en sangre o leche se mantiene alta alrededor de los días 21 y 24 después de la ovulación y esta será basal en un animal no gestante. Por lo tanto, una muestra tomada en este tiempo puede ser usada como diagnóstico de gestación. Es decir, la prueba de progesterona es considerada una prueba altamente exacta para el diagnóstico de ausencia de gestación permitiendo un nuevo servicio en forma temprana Bazer & col., 1994.

En una investigación se midió los niveles de progesterona en la sangre, en la dinámica folicular tratando dos dosis de progesterona parenteral y CIDR, en fase folicular y luteal, encontrándose los siguientes resultados: como era esperable los animales en anestro, antes de comenzar el tratamiento presentaron valores de P4 en plasma por debajo de los niveles luteales (1ng/mL). Al igual que lo observado por McDougall y col. en 2004.

Luego de realizados los tratamientos, los dos grupos (CIDR y MAD) presentaron concentraciones de P4 por encima de 1ng/mL, existiendo diferencias significativas entre ambos. A favor del MAD, a la hora 4 y 8 post tratamiento ($p < 0,05$). Desde la hora 24, y hasta el final del experimento, los perfiles de P4 para el grupo CIDR se mantuvieron por encima del nivel luteal cayendo por debajo de 1 ng/mL recién en el día 8, es decir, luego de la extracción del dispositivo. Por el contrario, en el trabajo de McDougall J utilizando un CIDR con 1,56 9 de P4 la misma desciende de 1 ng/mL ya en el día 6.

El pico máximo de P4 plasmática se observó en el presente estudio al tercer día de la inserción, siendo éste de 4.1 ng/mL. Valores similares se observaron en el trabajo realizado por Nation y col. en el 2000 en el cual el mayor pico fue de 4 ng/mL, pero observándose éste a las 24 horas de la colocación del CIDR. El grupo MAD por su parte presentó niveles subluteales de P4 ya a la hora 24 del experimento y hasta el final del mismo, similar a lo observado en el trabajo de Cavestany y col. en el que la P4 cayó por debajo de 1 ng/ml a las 48 horas de la administración.

La diferencia en la duración de la P4 en sangre. Observada entre los grupos 1 y 2 del presente experimento la atribuimos a la vía de administración. El CIDR produce una liberación constante y uniforme durante todos los días que está colocado, alcanzando niveles plasmáticos igualmente uniformes (Sorensen, 1982). En cambio, la administración 11M, a pesar de ser en base oleosa, alcanza rápidamente concentraciones plasmáticas muy altas que luego declinan bruscamente.

Todas las vacas repetidoras tuvieron antes del tratamiento niveles de P4 por encima de 1 ng/mL, ya que se encontraban en el día 10 del ciclo, presentando un el funcional. Si bien los valores estuvieron por encima de los niveles basales, estos fueron (Kawate y col., 2004), o incluso se vio una curva de crecimiento de la P4 plasmática en esos días (Sakase y col., 2005).

Al comparar el mismo tratamiento (200 mg de MAD) en vacas en anestro y vacas ciclando, existieron diferencias en la concentración de P4 plasmática alcanzada a la hora 4 y 8 post tratamiento a favor de los animales cíclicos, lo que fue debido a la presencia de P4 endógena en

estos últimos. En el resto del experimento, si bien la diferencia no fue significativa, la tendencia se mantuvo.

Los folículos observados en los animales en anestro tratados con CIDR presentaron una tendencia a ser levemente mayores que los del grupo MAO, durante todo el experimento, aunque estas diferencias no fueron significativas. Esto lo atribuimos a los mayores niveles de progesterona plasmática alcanzados en el grupo MAD, que produjo una menor tasa de crecimiento del folículo dominante y un menor tamaño del mismo.

Por lo tanto, se puede inferir que las diferencias observadas entre ambos grupos se deberían a los efectos de la concentración de P4 generada durante el tratamiento (Callejas y col., 2002; Vasconcelos y col. J 1999).

En ambos tratamientos se vieron al día 9, folículos de bajo tamaño «14,5 mm), que posiblemente deriven en una menor fertilidad. Este menor tamaño puede también deberse a que las vacas no hubieran ovulado luego de la primera dosis de GnRH, lo que disminuiría el tamaño del FD al momento de aplicar la segunda dosis de GnRH (Atkins y col., 2010).

Según informaron Vasconcelos y col. en 2001 folículos pequeños (de 11 t5mm) resultarán, luego de la ovulación, en el de menor tamaño que producirán menores concentraciones de P4, llevando a la reducción de la fertilidad. Pérez Marín y col. reportaron en 2003 que el diámetro medio de los folículos preovulatorios es de $17,8 \pm 3,6\text{mm}$, lo que difiere de nuestros resultados.

3.22 Concentración hormonal de Estrógenos en la sangre de las vacas evaluadas

A continuación, en el gráfico 6-4 se detallan el nivel de estrógenos, al igual que en la tabla 5-4.

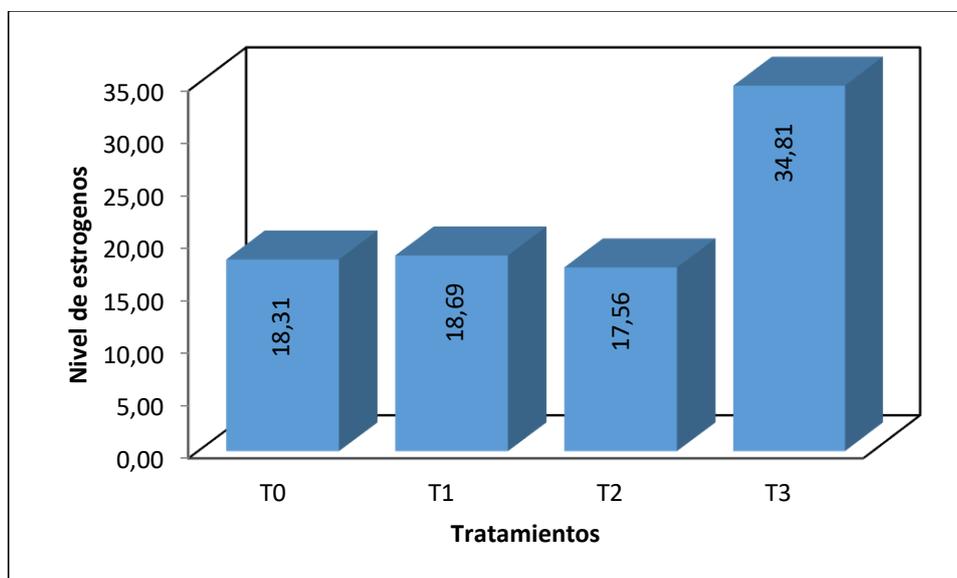


Figura 6-4. Niveles de estrógeno presentes en la sangre.

Realizado por: Maldonado, Ana. 2019

Los niveles de estrógenos detectados en este estudio tienen una media de 22,34 ng/ml con un valor mínimo de 17,56 ng/ml y un valor máximo de 34,81 ng/ml, notándose una diferencia estadística significativa.

La utilización de 15 g de guayusa a las vacas permitió incrementar los estrógenos en mayor proporción, estudios realizados con extracto de guayusa mediante hidroalcohólicos (*Ilex guayusa loes*) se observó un efecto estrogénico (Neely, 1991, Aurich, 2011).

En el T3 donde se utilizó 15g de guayusa se observó los estrógenos en mayor proporción, estudios realizados con extracto hidroalcohólico de *Ilex guayusa loes* (Guayusa) demostraron que tiene un efecto estrogénico. Tomando en cuenta que el crecimiento del folículo dominante, incrementa las concentraciones plasmáticas de estrógenos (Neely, 1991, Aurich, 2011).

Como se observó en ratas albinas (*Rattus norvegicus*), debido a la identificación de fitoestrógenos tales como: ononin, quercetina, y B sitosterol; en diferentes dosis, produjeron un efecto estrogénico sobre los ovarios, útero y estradiol sérico de ratas inmaduras. Concluyendo que el empleo de la guayusa (*Ilex guayusa loes*) resultaría beneficioso en el tratamiento de algunos casos de infertilidad en mujeres (Tuquinga, 2013).

También se midió en vacas el nivel de la hormona luteinizante (LH), aunque no encontraron diferencias significativas (Arias, 2013).

La presencia de fitoestrógenos en la Guayusa (*Ilex guayusa loes*) es evidente, aunque se considera una sustancia estructural y funcionalmente son similares al 17- β estradiol o que producen efectos estrogénicos. Por esta razón los fitoestrógenos tienen una importante actividad que los estrógenos u hormonas sexuales femeninas. Esta acción “hormonal” confiere a los fitoestrógenos algunas características muy interesantes en la prevención y tratamiento del desequilibrio hormonal y otras enfermedades (Correa, 1989); (García H. , 1975).

También puede repercutir en la salud reproductiva como menciona (Adams, 1995; Boué et al., 2003; Chen et al., 2008) como nocivos (amenorrea, miomas endometriales, proliferación del epitelio uterino) (Chandrareddy et. Al 2008).

Los fitoestrógenos han cobrado importancia en los últimos años debido a que las investigaciones realizadas sobre estos compuestos, han dejado en evidencia los efectos que pueden tener sobre la fisiología reproductiva.

A pesar que los fitoestrógenos afectan tanto a machos como hembras, desde el punto de vista zootécnico; es en estas últimas, donde su estudio cobra mayor importancia por las pérdidas económicas que pueden derivarse de su consumo.

Sin embargo, existe controversia sobre los efectos reproductivos, especialmente cuando se comparan las especies animales con los humanos; en las primeras se demuestran efectos negativos sobre la reproducción, mientras que en los últimos se ha demostrado sus efectos tanto benéficos (prevención del cáncer, enfermedades cardíacas, sintomatología de la menopausia y osteoporosis).

Actualmente la problemática en los animales de producción radica en que el consumo de fitoestrógenos se asocia a alteraciones reproductivas, siendo en muchas ocasiones fenómenos subclínicos; lo cual conlleva a un diagnóstico difícil y a la perpetuación del problema en los hatos (Boué et. Al 2003.)

En Colombia los fitoestrógenos son utilizados en prácticas médicas alternativas, aplicaciones bioelectromagnéticas, sanación manual y en terapia de enfermedades. Algunos de éstos

(Isoflavonas) han tenido efectos osteoprotectores y son utilizados con éxito en el tratamiento de patologías óseas como la osteoporosis (Wuttke et al., 2003).

En enfermedades del tracto urogenital, los fitoestrógenos son utilizados para el tratamiento de infecciones vaginales, ya que éstos tienen capacidad de disminuir el pH, lo que previene el ascenso de los agentes patógenos.

Se ha demostrado también que isoflavonoides como la genisteína (GEN), actúan como factores inhibitorios de las células cancerígenas en la glándula mamaria y endometrio, disminuyendo así el riesgo de cáncer de mama y de útero (Bonilla, 2004; Tempfer et. Al 2007).

Los fitoestrógenos parecen tener un efecto sobre la fauna nociva de las plantas, pues sirven de protección a la radiación ultravioleta, actuando como captadoras de radicales libres potencialmente agresivos por su acción oxidante.

Estos potentes antioxidantes vegetales, también se han relacionado con la resistencia de ciertas plantas a determinadas infecciones bacterianas, víricas y micóticas, adicionalmente se relacionan con la regulación del crecimiento vegetal (Bonilla, 2004).

El descubrimiento de los fitoestrógenos se remonta a los años 40, cuando se observó que las ovejas en pastoreo que consumían trébol rojo presentaban múltiples problemas reproductivos. Se encontró que estos tréboles contenían cantidades elevadas de isoflavonas, formononetina y biochanina A, que fueron los primeros fitoestrógenos descubiertos (Whitten, Patisaul y Young, 2002).

Se sabe que la mayoría de las leguminosas contienen fitoestrógenos, cuya concentración varía dependiendo de numerosos factores entre los cuales se encuentran variables como: temperatura, humedad, luminosidad, cantidad y tipo de abono empleado, presencia de hongos, edad de la planta, estado fisiológico, siendo estos factores variables entre especies (Adams, 1995).

La importancia de los fitoestrógenos radica principalmente en que pueden actuar como agonistas o antagonistas estrogénicos, ya que ejercen sus efectos tanto en el macho como en la hembra en tejidos donde existen receptores para estrógenos (ER) (Whitten, Patisaul y Young, 2002).

Los estrógenos favorecen la diferenciación celular y el crecimiento de las glándulas mamarias, el útero, la vagina, los ovarios, los testículos, los epidídimos, la próstata, el sistema vascular (Dubey et al, 2000) y el sistema nervioso (McGarvey et al., 2001), además de controlar un gran número de

funciones corporales, por lo cual las moléculas que simulen estos efectos pueden conllevar a desórdenes fisiológicos clínicos o subclínicos.

En las hembras los fitoestrógenos reducen el porcentaje de concepción. En un ensayo con 608 vacas alimentadas con alfalfa contaminada con el hongo *Pseudopeziza medicaginis* se obtuvo menos del 30% de gestaciones, a pesar de haberse realizado 1.264 inseminaciones en el lapso de un año (Romero et al., 1997).

Este porcentaje de gestaciones se redujo en un 10% adicional al incorporar el número de vacas que tuvieron abortos espontáneos. Aún en las que presentaron gestaciones normales, los niveles de estrógenos estaban alterados (sintomatología característica del síndrome estrogénico).

En cerdos la ingesta de 25-50 mg kg⁻¹ de zearalenona promueve una disminución en el número de lechones nacidos, como también del tamaño de las crías (Sharma y Kalla, 1994). Si a estos resultados se incorporan la pérdida económica y los gastos de manutención del ganado, es entendible la razón por la cual es difícil realizar este tipo de estudios.

Según Adams (1995) encontró una asociación entre la actividad estrogénica en ovejas y el consumo de tréboles; cuando la pastura con la cual se alimentaban las hembras contenía 25 mg kg, se presentó una baja tasa de nacimientos, desarrollo de folículos hemorrágicos, prolapso de útero, metritis y edema uterino.

En vacas lecheras alimentadas con alfalfa seca con un contenido de 68,8 mg kg⁻¹ de COU, se presentó un síndrome estrogénico con características similares al descrito en las ovejas (Romero et al, 1997) .

Los principales efectos en las vacas sometidas al consumo de fitoestrógenos son: desarrollo inmaduro de la glándula mamaria, edema vulvar, descarga de moco cervical, engrosamiento del útero. Algunos animales presentan una predisposición genética o medioambiental a la formación de quistes ováricos, ninfomanía y anestro prologado inducidos por el consumo de fitoestrógenos (Adams, 1995).

El consumo de fitoestrógenos contenidos en los forrajes puede influir en la formación de quistes foliculares en vacas. Aunque el diagnóstico por sintomatología es complejo, los animales del ható empiezan a manifestar los siguientes signos y síntomas que son de utilidad en la observación clínica.

Hay que tener en cuenta que no son patognomónicos: vacas repetidoras, vacas subfértiles e infértiles, abortos, endometritis, estros persistentes, ninfomanía, hiperplasia de mamas, relajación de los ligamentos pélvicos, problemas osteoarticulares, hiperplasia uterina e hiperemia vulvar (Romero et. 1997).

Debido a los problemas que pueden ocasionar los fitoestrógenos en animales en pastoreo, es en los rumiantes donde se han llevado mayores estudios sobre su metabolismo (Adams, 1990). Los fitoestrógenos son ampliamente metabolizados en el rumen, el efecto endógeno de éstos depende principalmente del porcentaje de metabolitos activos que generen.

Compuestos como el 4 metoxi-Coumestrol, tienen alta actividad estrogénica después de su desmetilación, permitiendo así que su grupo hidroxilo se una al receptor de estrógeno. Por otra parte, los fitoestrógenos no solo se activan en el rumen, también se pueden inactivar, convirtiéndose en compuestos no estrogénicos como ácidos orgánicos y fenoles etílicos, tal es el caso de la GEN y la biochinina A.

Algunos fitoestrógenos como la formononetina se pueden absorber rápidamente por las paredes ruminales y ejercer su efecto más rápido. El metabolismo de los fitoestrógenos es muy similar en vacas y ovejas (Adams, 1995).

También se ha estudiado el metabolismo de los fitoestrógenos en caninos de lo cual se sabe que al ingerir compuestos fitoestrogénicos, éstos finalmente se distribuyen y acumulan en tejidos vitales altamente vascularizados (McClain et. 2005).

El consumo de plantas que contienen fitoestrógenos favorece la actividad farmacológica endógena cuyo efecto depende básicamente del tipo, la cantidad y de la especie que lo consuma. Los fitoestrógenos están ampliamente contenidos en gran variedad de plantas y forrajes, destinados al consumo humano y animal, teniendo variabilidad de efectos adversos principalmente en el tracto reproductivo en la mayoría de especies animales.

Debido a que muchos fitoestrógenos tienen la posibilidad de ser agonistas o antagonistas estrogénicos, los efectos varían desde la infertilidad hasta una sobre-respuesta estrogénica, aumentando así las secreciones del tracto reproductivo y alterando el comportamiento animal.

En la actualidad existen vacíos en el conocimiento, por lo que se desconoce si los parámetros reproductivos en los sistemas productivos se han visto afectados por el consumo de forrajes fitoestrogénicos. Quedan dudas en el tema, por lo cual se hace obvia la necesidad de investigaciones que permitan dilucidar los efectos de acuerdo a dosis, especies, efectos nocivos o benéficos, los mecanismos de acción entre otros.

Esto podemos concluir que hay que dar de manera controlada la guayusa ya que los fitoestrógenos tienen ventajas como desventajas en la parte hormonal y reproductiva de los animales, que puede repercutir de una manera negativa en el desarrollo embrionario.

3.23 Implantación del embrión.

A continuación, en el gráfico 7-4 se detallan el porcentaje de implantación del embrión en las vacas receptoras, al igual que en la tabla 5-4.

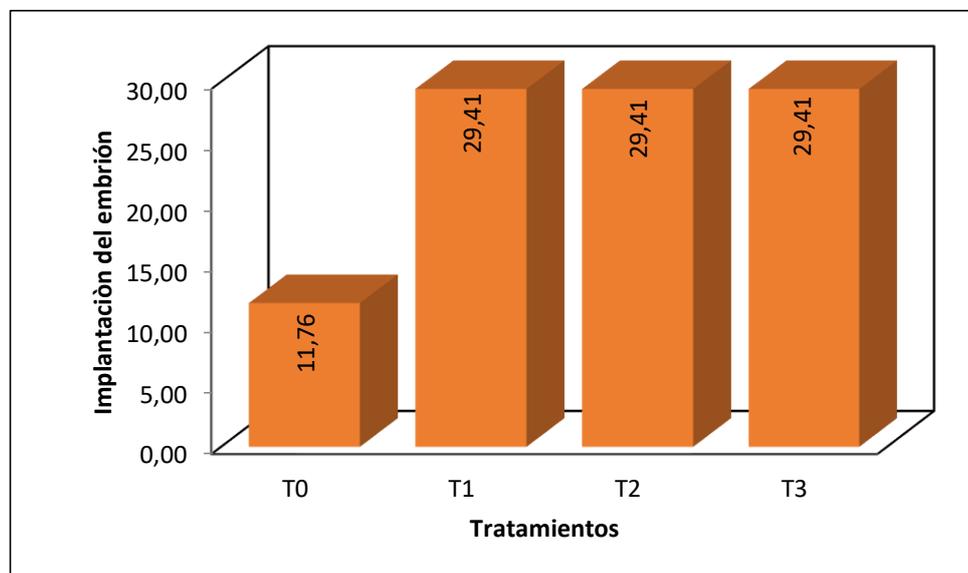


Figura 7-4. Implantación del embrión.

Realizado por: Maldonado, Ana. 2019

El porcentaje de implantación de embrión en las vacas del estudio, fue de la siguiente manera: para el tratamiento testigo (T0) se obtuvo una implantación de apenas un 11,76 %, mientras que para los tratamientos con suministro de Guayusa (T1, T2 y T3) se obtuvo una implantación del 29,41 %, estableciéndose diferencias estadísticas entre los dos valores ($P \leq 0,05$).

Esto permite mencionar que la *Illex guayusa loes* (guayusa) favorece la implantación, debido al efecto antioxidante que ayuda a que desarrollen las defensas de las vacas a nivel del aparato reproductor.

El estrés inducido al animal por la acción de las altas temperaturas entre los días 8 y 17 de preñez altera el ambiente uterino y reduce en un 70% la secreción de proteína trofoblástica bovina, lo cual induce al desencadenamiento del mecanismo luteolítico, afectando de manera directa la viabilidad del embrión (Ross, 2000).

De la misma forma, las vacas con características cárnicas expuestas entre los días 8-16 de la gestación, presentaban una disminución en el peso del conceptus y del diámetro cuerpo lúteo; existen una serie de proteínas encargadas en generar protección contra el choque calórico, las cuales son generadas por el cigoto desde que se da el primer clivaje de sus células, estas proteínas también pueden estar involucradas en mecanismos antioxidantes (Al-Katanani, 2002).

La toxicidad es uno de los factores que al ser encontrados en el animal van a causar alteración de las funciones reproductivas, así como del desarrollo embrionario, esta toxicidad puede ser desencadenada en el animal por la ingestión de fitoestrógenos, los antiestrógenos y algunas sustancias bociógenas que pueden causar alteraciones reproductivas y muerte embrionaria.

Esta toxicidad también puede ser producida por varias especies de plantas como es el caso de las del género *Astragalus* spp y *Oxytropis* spp (*Conium*, *Nicotiana*, *Lupinus*), al ingerir estas plantas se va a producir malformaciones fetales, modificaciones en el balance de los fluidos fetales, así como muerte fetal y aborto, lo cual se atribuye al contenido de alcaloides pirimidínicos (Hernández, 2003).

Concluyendo que las hormonas están en relación a las defensas y a la implantación del embrión por ello hay que tener una dosis controlada al momento de administrar la guayusa, ya que en estas dosis se obtuvo buenos resultados en cuanto a implantación del embrión.

3.24 pH

En el gráfico 8-4 se explica el nivel de pH que se encontró en la vagina de la vaca, detallándose en la tabla 5-4.

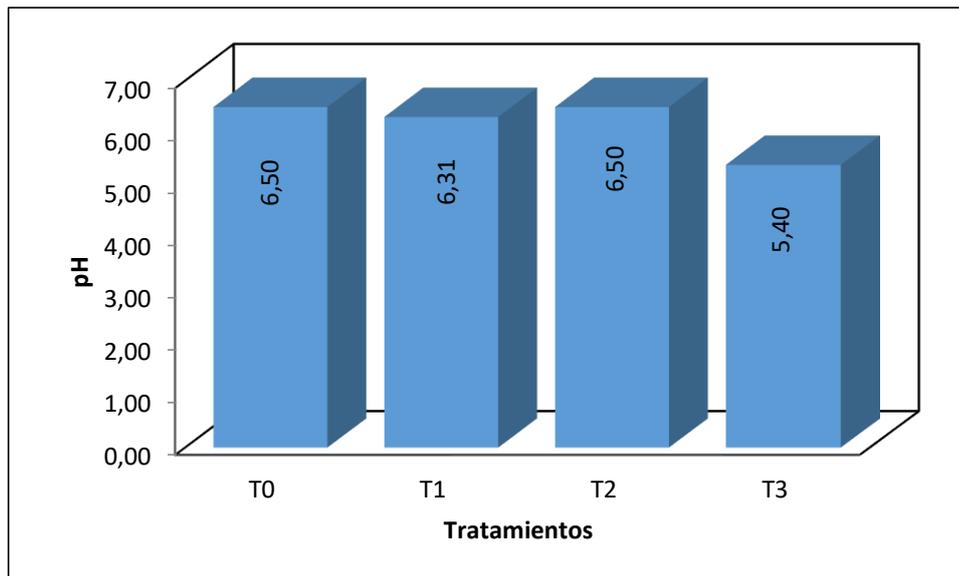


Figura 8-4. pH obtenido de la vagina de la vaca.

Realizado por: Maldonado, Ana. 2019

El pH detectado en este estudio tiene una media de 6,17 con un valor mínimo de 5,40 y un valor máximo de 6,50 correspondiente a los tratamientos, notándose una diferencia estadística significativa entre los tratamientos, siendo estos datos de suma importancia ya que influyen directamente en el implante del embrión, correspondiendo a medios entre neutro y ácido, potenciales de nitrógeno que influye en la implantación del embrión.

Las variaciones en los valores de pH, pueden depender de múltiples factores (entre otros, biológicos, nutricionales, patológicos, climáticos), pero sus efectos en la reducción de la fertilidad del hato, son ampliamente reconocidos (López *et al.* 2008).

En estudios realizados, el 95,29 % de animales tuvieron un pH vaginal menor o igual a 7; mientras que un 4,71 % tuvieron un pH vaginal mayor a 7. Dentro del grupo de animales que tuvieron un pH menor o igual a 7, el 70,59 % perteneció a la raza Holstein, mientras que el 24,71 % perteneció a la raza mestiza. Los valores de pH encontrados en este estudio coinciden con los reportados por Beckwith-Cohen *et al.*, (2012).

Quien encontró valores de pH promedio de 7,35 y 7,58 para novillas y vacas multíparas respectivamente; No obstante, otros autores mencionan que, en estudios anteriores, han citado variaciones de pH vaginal entre 5,52 y 8,60. Esto podría deberse a las diferentes condiciones climáticas, genéticas y de manejo alimenticio, que marcan variaciones en el ganado en las diferentes regiones del planeta (Kadokawa *et al.* 2012).

De acuerdo a los reportes de pH vaginal encontrado en la presente investigación, se puede determinar que los animales estudiados, se encontraban con un tracto reproductivo dentro de los parámetros normales.

3.25 Bacterias encontradas en la vagina de vacas, (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Shigella spp.*).

A continuación, en el gráfico 9-4 se detallan el porcentaje de la bacteria *Escherichia coli*, al igual que en la tabla 5-4.

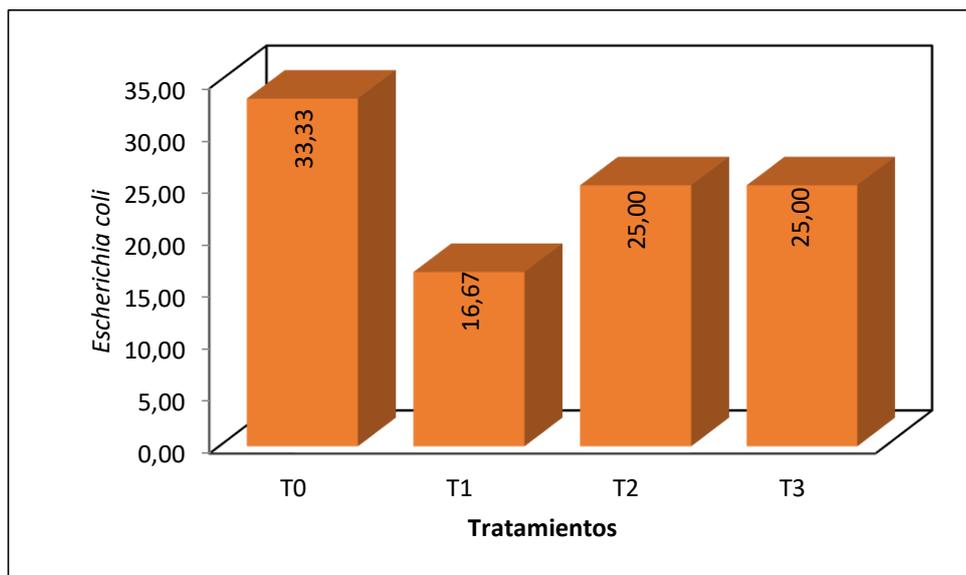


Figura 9-4. Nivel de *Escherichia coli*.

Realizado por: Maldonado, Ana. 2019

Se registró la presencia de *Escherichia coli* obteniéndose una media de 25 UFC/ml con un valor mínimo de 16,67 UFC/ml y un valor máximo de 33,33 UFC/ml.

La presencia de *Escherichia coli* en el tracto reproductivo de las vacas tratadas con 0, 5, 10 y 15 g guayusa fueron 33,33, 16,67, 25,00 y 25,00 UFC/ml respectivamente; valores entre los cuales existen diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) pudiendo señalar que la guayusa puede estar influyendo en el control de la proliferación de este tipo de microorganismos siendo necesaria para tener éxito en la reproducción.

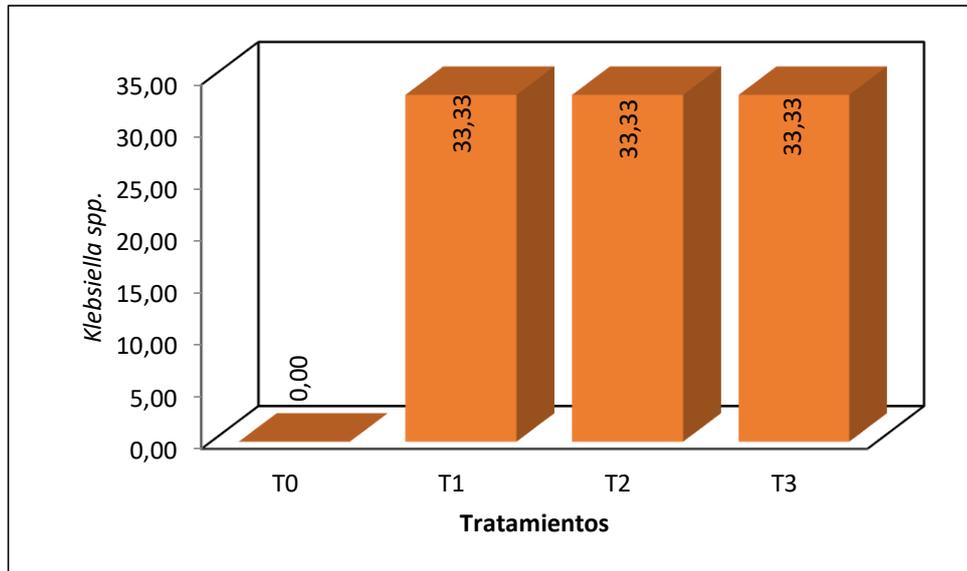


Figura 10-4. Niveles de *Klebsiella spp.*

Realizado por: Maldonado, Ana. 2019

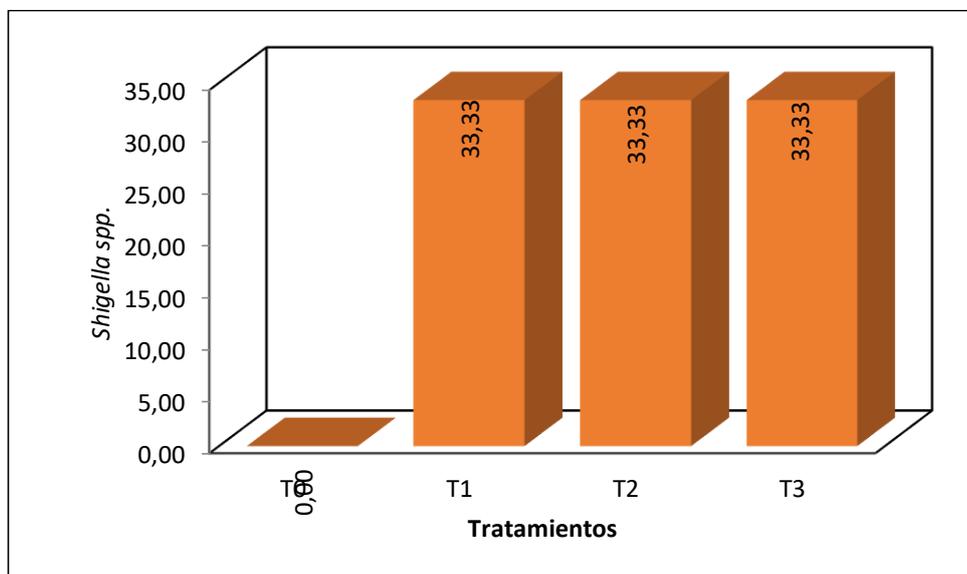


Figura 11-4. Niveles de *Shigella spp.*

Realizado por: Maldonado, Ana. 2019

En algunas vacas se hizo la prueba de dos bacterias más como es el caso de la *Klebsiella spp.*; y *Shigella spp.*; encontrándose en el tratamiento T1, T2 y T3 un valor de 33,33 % y de igual manera se encontró el mismo porcentaje en T1, T2 y T3 un número de 33,33 %; porque no se encontró *Escherichia coli*.

En una investigación realizada la micro flora bacteriana encontrada en las vacas objeto de la investigación fueron en orden de mayor a menor *Pseudomona aeruginosa*. 52.4% (11/21), *Staphylococcus spp.* 47.6%(9/21), *Bacillus spp.* 33.3% (7/21), *Shigella sonnei* 23.9% (5/21), E.

E. coli 14.2% (3/21), *Klebsiella ozaenae*. 9.52% (2/21), *Proteus mirabilis* 4.8% (2/21), *Archanobacterium spp.* 4.8% (1/21).

Las diferentes bacterias, igualmente podrían provenir del semen, a pesar que durante el proceso de producción se adicionan antibióticos de amplio espectro, estos no eliminan la totalidad de las bacterias, las cuales pueden aparecer en los lavados uterinos.

Esta posibilidad es mayor cuando se inseminan las vacas dos veces, cuando una mayor producción de embriones, como fue el procedimiento utilizado en este estudio. Algunas de las bacterias encontrados en nuestro estudio, coinciden con las aisladas del semen del toro entre ellas *P. aeruginosa*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Proteus spp.*, and *Bacillus spp* (Strigelow y Givens, 2000).

La especie de *E. coli* que ocasiona enfermedad uterina es diferente de la *Escherichia coli* patogénica extra intestinal, por lo que se le dio el nombre de *E. coli* patogénica endometrial (EnPEC), esta se adhiere más fácilmente a las células endometriales y estimula una mayor producción de Prostaglandina E2 y Interleukina 8 que es el factor quimotáctico para los neutrófilos (Sheldon et al., 2010).

Adicionalmente se conoce que ciertos productos bacteriales o sustancias derivadas del proceso inflamatorio del útero pueden afectar el crecimiento folicular y finalmente suprimir la ovulación (Peter y Bosu, 1988; Peter et al., 1989).

En vacas de leche con trastornos reproductivos la flora bacteriana normal fue *Lactobacillus spp.* (16.6%), *Klebsiella spp.* (16.6%) y bacterias patógenas como *Streptococcus spp.* B hemolítico (33.3%), *Streptococcus spp* α hemolítico (50%) *Streptococcus spp.* y hemolítico (50%) y *A. pyogenes* (16.6%) (Sánchez et al., 2011).

En otro estudio en vacas Holstein mediante la detección de polimorfismos de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP), la composición bacteriana uterina presentó diferencias de acuerdo con los días posteriores al parto y diferencias entre los hatos (Elkjær et al., 2013).

Dado que la composición del microbiota uterino y sus efectos sobre los desórdenes reproductivos han sido poco estudiada y entendida (Santos y Bilcalho, 2012) un primer paso es la identificación bacteriana, lo cual coincide con los propósitos de este estudio.

En nuestra investigación se ha notado un descenso de bacterias en cuanto a los tratamientos que se dio guayusa, disminuyendo la carga bacteria y con ello dándonos como resultado menos células Polimorfos Mononucleares, gracias a la actividad antioxidante de la *Ilex guayusa loes* (guayusa). Además de otro lado, se considera que la presencia de bacterias en útero no tendría mayor riesgo de trasmisión a las receptoras si se siguen los procedimientos recomendados por la IETS entre ellos el uso de antibióticos en los medios y el lavado de los embriones por lo menos 10 veces, lo que eliminaría la mayoría de bacterias que se pudieran adherir a la zona pelúcida (Stringfellow y Seidel, 1998).

La clase y número de microorganismos del microbiota uterino varían ampliamente en distintas circunstancias (Fernández, Silveira, & López, 2006).

La micro biota normal de los animales jóvenes difiere notablemente de la de los animales de más edad.

Existen particularidades según se trate de hembras adultas clínicamente sanas, gestantes, en puerperio o de vacas con repetición de servicios o con infecciones clínicas.

El microbiota normal está influenciado por las condiciones ambientales del país.

Los resultados pueden ser de poco valor cuando no se tiene en cuenta algunos factores tales como: el método y la frecuencia del muestreo, el medio donde se toman las muestras, el estado reproductivo y el origen de los microorganismos aislados, en el caso de esta investigación se tuvo que hacer ensayos para determinar la manera de transportar la muestra, y el tiempo que debíamos tener para llegar al laboratorio con las muestras debido a nuestro clima.

Como señalamos anteriormente, se conoce que muchos gérmenes que forman parte del microbiota natural residente o transitoria del aparato reproductor femenino sin producir trastornos, pueden transformarse en patógenos cuando la resistencia local y general del animal se debilita y se rompe el equilibrio biológico. Según estas consideraciones las especies de bacterias aisladas en el cérvix y el útero pertenecen al microbiota natural con el carácter de patógenos facultativos. (Fernández, Silveira, & López, 2006).

En investigaciones realizadas en las condiciones de Cuba en vacas en diferentes períodos del ciclo estral, la frecuencia de aislamientos de bacterias a partir del moco cervical y del lumen uterino es relativamente elevada, informándose porcentajes entre 40 y más del 80%. Los géneros y especies más frecuentemente aislados son *E. coli*, otras enterobacterias, *Pseudomonas* sp, *S. aureus*,

taphylococcus sp, *S. pyogenes*, *Streptococcus* sp, *Enterococcus faecalis* y otros. (Fernández & Dimoso, 1984).

La flora bacteriana de la vagina de un animal gestante se la puede encontrar en su parte posterior, mientras que la parte anterior es estéril. Los trabajos que existen sobre los gérmenes son muy escasos, pero los que hay indican una mezcla de bacterias comunes (saprofitos a patógenos o potencialmente patógenos) (Tellez, 1997).

La composición de esta flora varía de acuerdo con los ambientes en donde se encuentran los animales. Más complicado es en animales estabulados, aunque también influye la resistencia genética del animal. Es evidente, que gérmenes patógenos existentes en el ambiente animal puedan también establecerse en todos los sectores del canal genital (Tellez, 1997).

Los microorganismos que están siempre presentes en un lugar del cuerpo son comensales forma de simbiosis que se caracteriza por la asociación mutua pero casi indiferente entre bacterias y organismos superiores. Por ejemplo, las bacterias normalmente presentes en la mucosa uterina son comensales, aunque algunas cepas sean, dicho más exactamente, oportunistas (Fernández, 2006).

CONCLUSIONES

- Los niveles de guayusa suministradas como alimentos a las vacas, favorecieron al sistema inmunitario, verificándose que a mayor suministro de hojas de guayusa hay menor presencia de células polimorfos nucleares (PMN) garantizándose una eficiente protección del sistema reproductivo.
- En base a los resultados obtenidos las bacterias detectadas como causantes de la metritis han sido identificadas como *Escherichia coli*; *Klebsiella spp.* ; y *Shigella spp*; con cargas bacteriana distribuidas en un rango del 1 al 4 UFC.ml⁻¹.
- Se observó un incremento de progesterona (P4) en las vacas que se alimentaron con guayusa, lo cual evidencia el efecto positivo de esta planta y sus componentes en el desarrollo del feto, ya que esta hormona está encargada sobre el mantenimiento de la preñez.
- La producción de Estrógenos encontrados en las vacas evaluadas, evidencia de igual manera la influencia de la guayusa, sobre la mayor producción de esta hormona en los animales lo cual favorece a una mejor presentación de celos.

RECOMENDACIONES

- Realizar otro estudio con mayores niveles de hojas de Guayusa como suplemento alimenticio en vacas.
- Utilizar como suplemento alimenticio de vacas *Ilex guayusa loes* (Guayusa) durante la transferencia de embriones por sus aparentes efectos para mejorar fertilidad.
- Se recomienda realizar nuevas investigaciones, administrando guayusa en la dieta de las vacas, para observar su efecto en los perfiles hormonales (Folículo estimulante, Progesterona y Estrógenos), en las regiones cálidas húmedas del Ecuador.
- Realizar más estudios sobre los antioxidantes que tiene la *Ilex guayusa loes* (guayusa) lo cual ha incrementado el interés científico, debido a que publicaciones demuestran que el consumo frecuente de antioxidantes, especialmente los flavonoides, tienen capacidad de captar los radicales libres causantes del estrés oxidativo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdi-Dezfuli, F., & Poyser, N. (1993). Hormonal control of proteins synthesized and secreted by guinea pig endometrium. *Journal of reproduction and fertility*, 179-188.
- Albeiro, R. (2002). Manejo de donantes y receptoras. *Biotecnología de la reproducción* (www.reprobiotec.com), 9-12. Obtenido de http://www.reprobiotec.com/libro_rojo/capitulo_02.pdf
- Arias, M. (2013). *Evaluación del nivel de LH mediante la adición de guayusa (ILEX GUAYUSA LOES) en vacas criollas con la aplicación de un protocolo de IATF en la provincia del Pastaza, Parroquia 10 de Agosto. . Latacunga .*
- Bartlett, P., Kirk, J., Wilke, M., Kaneene, J., & Mather, E. (1986). Metritis complex in Michigan Holstein-Friesian cattle: incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. *Preventive veterinary medicine*, IV(3), 235-248.
- Baruselli, P., & Oliveira Marques, M. (2003). Últimos avances en superovulación de donantes de razas cebuinas. *IV Seminario de reproducción de grandes animales*.
- Benesh, F. (1966). *Tratado de obstetricia y ginecología veterinaria*. Barcelona: Labor SA.
- Berg, R. (2012). *Nomina anatomica veterinaria*. Editorial Committee.
- Bó, G. (2013). *Simposio Internacional de Reproducción Animal*. Huerta Grande, Córdoba, Argentina: Irac.
- Bó, G., Baruselli, P., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tribulo, R., & . (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 53-72. Obtenido de The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer.
- Bó, G., Baruselli, P., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R., & Mapletoft, R. (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, LVII(1), 53-72.

- Bo, G., Bergfelt, D., Brogliatti, G., Pierson, R., & Mapletoft, R. (1996). Systemic versus local effects of exogenous estradiol on follicular development in heifers. *Theriogenology*, *I*(45), 333.
- Bo, G., Moreno, D., Cutaia, L., & Caccia, M. (2013). *Factores que afectan los porcentajes de preñez en programas de transferencia de embriones*. Bogotá Colombia.
- Bonnett, B., & Martin, S. (1995). Path analysis of peripartum and postpartum events, rectal palpation findings, endometrial biopsy results and reproductive performance in Holstein-Friesian dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, *XXI*(4), 279-288.
- Bretzlaff, K. (1987). Rationale for treatment of endometritis in the dairy cow. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, *III*(3), 593-607.
- Bussmann, R., Ashley, G., Sharon, D., Chait, G., Diaz, D., Pourmand, K., & Chan, R. (2011). Proving that traditional knowledge works: the antibacterial activity of Northern Peruvian medicinal plants. *Ethnobotany Research and Applications*, *IX*, 067-096.
- Callejas, S. (2001). Fisiología del ciclo estral bovino. (G. Palma, Ed.) *Biotecnología de la reproducción*.
- Calvo, M. (2004). *La resistencia bacteriana a los antibióticos*. Exopol.
- Celi, & Gabai. (2015). Oxidant / antioxidant balance in animal nutrition and health: the role of protein oxidation. *Frontiers in Veterinary Science*, 2- 48. Obtenido de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2015.00048/full>
- Celi, P., Di Trana, A., & Claps, S. (2010). Effects of plane of nutrition on oxidative stress in goats during the peripartum period. *The Veterinary Journal*, *CLXXXIV*(1), 95-99.
- Cerón, J., & Roura, J. (2001). Falla en la concepción en el ganado lechero: Evaluación de terapias hormonales. *Veterinaria México*, *XXXII*(4), 279-288.
- Cho, A., Jeon, S., Kim, M., Yeo, J., Seo, K., Choi, M., & Lee, M. (2010). Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology*, *XLVIII*(3), 937-943.
- Correa, B. (1989). *Especies vegetales promisoras* (Vol. I). Bogotá Colombia: Secab.
- Cronquist, A. (2013). *Introducción a la botánica de la Guayusa* . México.

- Cullinan-Bove, K., & Koos, R. (1993). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. En *Endocrinology* (Vol. CXXXIII, págs. 829-837).
- Cupps, P., & Cole, H. (1990). *Reproduccion de los animales domésticos*. Zaragoza: Acribia.
- de Boer, M. B., Heuer, C., Hussein, H., Zheng, T., LeBlanc, S., & McDougall, S. (2015). Associations between intrauterine bacterial infection, reproductive tract inflammation, and reproductive performance in pasture-based dairy cows. *Theriogenology*, 1514-1524.
- De Bois, C., & Manspeaker, J. (1986). Endometrial biopsy of the bovine in current therapy . En W. Saunders, *Current therapy in theriogenology* (págs. 424-426). Philadelphia PA: Morrow DA.
- De Luca, L. (2003). Uso de una antibioterapia combinada en el tratamiento de la endometritis bovina. *Nuestra Cabaña*(326), 54-57.
- Derivaux, J. (1982). *Reproducción de los animales domésticos*. Zaragoza: Acribia.
- Díaz, F., Hernández, A., & Gil, A. (1986). Morfología endometrial y niveles de P4 en el tejido uterino durante el ciclo estral de vacas cebú. *Rev Med Vet Zoot*, 15-27.
- Diaz, R., & Alba, L. (1980). Hallazgos bacteriológicos en secreciones cérvico-vaginales en vacas con trastornos inflamatorios, en la provincia de Sancti Spiritus. Diagnóstico de laboratorio desde 1976 hasta 1980 (Doctoral dissertation, Tesis de postgrado. *Facultad de Ciencia Animal.Universidad Central "*.
- Ding, Y., Zhu, L., Bagchi, M., & Bagchi, I. (1994). Progesterone stimulates calcitonin gene expression in the uterus during implantation. *Endocrinology*, CXXXV(5), 2265-2274.
- Dohmen, & Lohuis, J. (1996). Bacteriología de la endometritis en vacas y sus implicaciones para el tratamiento efectivo. *In XIX Congreso Mundial de Buiatría*.
- Dohmen, M., Lohuis, J., Huszenicza, G., Nagy, P., & Gacs, M. (1995). The relationship between bacteriological and clinical findings in cows with subacute/chronic endometritis. En *Theriogenology* (Vol. XLIII, págs. 1379-1388).

- Dueñas, J., Jarrett, C., Cummins, & Logan-Hines, E. (2016.). Amazonian Guayusa (Ilex guayusa Loes.). *Historical and ethnobotanical overview. Economic botanic*, 85-91.
- Duica, A., Tovío, N., & Grajales, H. (2007). Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de trasplante de embriones bovinos. *Revista de Medicina Veterinaria.*, XXIV, 107-124.
- Dunches, M. (2010). Ciclo estral de la hembra bovina. *Departamento fomento de la producción animal: Facultad de ciencia veterinarias y pecuarias de la universidad de Chile.*
- Erazo, P. (2015). *Evaluación del extracto de guayusa (ilex guayusa loes) en terneros de 1 día a 3 meses de edad como promotor de crecimiento en la provincia de Napo-Baeza.* Latacunga: UTC.
- Fernández, & Dimoso. (1984). Estudio cualitativo y cuantitativo de la flora bacteriológica de las secreciones cervicouterinas de vacas clínicamente sanas. *Facultad de Ciencia Animal. Universidad Central "Marta Abreu".*
- Fernández, A., Silveira, E., & López, O. (2006). *Las infecciones uterinas en la hembra bovina.* Cuba: Redvet,.
- Fundación Chankuap. (2014). *Manual de buenas prácticas de la Guayusa.* Macas. Recuperado el 22 de Septiembre de 2018, de <http://chankuap.org/wp-content/uploads/2014/03/Manual-de-buenas-practicas-de-la-Guayusa.pdf>
- García Barriga, H. (1992). *Flora medicinal de Colombia* (Vol. II). Colombia: Tercer mundo Bogotá.
- García, B. (1975). *Flora medicinal de Colombia. Bogotá.* Colombia: Tercer mundo editores.
- García, H. (1975). *Flora medicinal de botánica médica.* Bogotá- Colombia: Imprenta Nacional de Bogotá.
- García, H. (1992). *Flora medicinal de Botánica Médica* (Vol. II). Bogotá-Colombia: Editorial Tercer Mundo.
- García, H. (2012). *Flora medicinal en Colombia Bogotá.* Bogotá.
- García, H. H. (2012). *Aplicabilidad de las plantas medicinales en las terapias modernas.* Bogota.

- García, P., Martínez, E., Peraza, N., & González, J. (1990). Estudio comparativo del comportamiento de la microflora cérvico-vaginal en hembras recién paridas clínicamente sanas, con endometritis y repitentes de la raza Holstein y sus cruces. *Cub Reprod Anim*, XVIII(2), 25-35.
- Garverick, H., & Smith, M. (1993). Female reproductive physiology and endocrinology of cattle. *Vet Clin North Am. Food Anim Pract*, IX(2), 223.
- Gasquez, A., & Blanco, A. (2004). *Tratado de histología veterinaria*. España: Barcelona.
- Godoy, S. (2016). *Atomización de los antioxidantes de las hojas de guayusa (Ilex guayusa Loes.)*. Loja. Ecuador.
- Gomez, C. (2005). Transferencia de embriones experiencias en Colombia. En *Memorias de reproducción bovina*. Bogotá Colombia: INTERVET.
- Gonzales-Stagnaro, C. (2001). *Reproducción bovina*. Venezuela: Fundación Girarz.
- González, J., Alba, L., & A., F. (1978). Hallazgos bacteriológicos en secreciones cervico-vaginales de vacas infecundas en la provincia de Las Villas. Diagnóstico de Laboratorio desde 1972 hasta 1974. *Rev Centro: Serie Ciencia Anim*, III, 57-64.
- Gordon, I. (1999). *Reproducción controlada del ganado vacuno y búfalos*. . España: Acribia.
- Gorlach, A. (1999). *Transferencia de embriones en el ganado vacuno*. . España: Acribia.
- Griffin, J., Hartigan, P., & Nunn, W. (1975). Non-specific uterine infection and bovine fertility I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks postpartum. *Theriogenology*, I, 91-106.
- Grossman, J. D., & Sisson, S. (2000). Anatomía de los animales domésticos. *Salvat*.
- Guayusa. (2012). *Componentes*. Macas: s.n.
- (2012). *Guayusa Ilex guayusa L, composición química*. Obtenido de <http://es.scribd.com/doc/63647125/guayusa-caracterizacionfitoquimica>
- Hafez, E. (2000). Reproducción e inseminación de los animales domesticos. Kiawah Island, South Carolina, USA: McGraw–Hill Interamericana, 33-144. En South Carolina, *Reproductive Health Center IVF/Andrology International*. (Vol. VII, págs. 33-144). USA: McGraw–Hill Interamericana : Kiawah Island.

- Hafez, E. E. (1996). Ciclos reproductivos. En: Hafez ESE. *Reproducción e inseminación de los animales domésticos*, 89-107.
- Hafez, E., & Hafez, B. (2007). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. . McGraw-hill.
- Halliwell, B. (2007). *Biochemistry of oxidative stress*.
- Hansen, P. (2002). Embryonic mortality in cattle from the embryos perspective. *J Anim Sci*. 80 Suppl: 33-44. *J Anim Sci*, 80 Suppl, 33-44.
- Hao, D., Gu, X., Xiao, P., Liang, Z., Xu, L., & Peng, Y. (2013). Research progress in the phytochemistry and biology of Ilex pharmaceutical resources. En *Acta Pharmaceutica Sinica B* (Vol. III, págs. 8-19).
- Hapez, E. (1989). *Manual Práctico de Inseminación Artificial y Transferencia de Embriones*. Bogotá- Colombia: Edit., Alen Impresores,.
- Hasler, J. (2001). Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 1401-1415.
- Heim, K., Tagliaferro, A., & Bobilya, D. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure - activity relationships. En *The Journal of nutritional biochemistry* (Vol. XIII, págs. 572-584).
- Hernández, A. (1995). Lecturas sobre reproducción bovina. En F. d. Universidad nacional de Colombia, *Aspectos morfofisiológicos de la implantación* (Vol. III). Bogotá, Colombia.
- Holy, L. (1983). *Bases biológicas de la reproducción bovina*. . México DF: Diana.
- <https://www.cambridge.org/core/services/aopcambridge-core/content/view/598913738F82C7FC94A92F60C7C80524/S1751731114000524a.pdf/divclasstitlereproductivetractinflammatorydiseaseinspanclassitalicpostpartumspan-dairycowsdiv.pdf>. (2018).
- Huddleston, H., & Schust, D. (2004). Immune interactions at the maternal-fetal interface: a focus on antigen presentation. *Am J Reprod Immunol*, *LI*, 283-289.
- Huertas, I., & Huertas, V. (1991). Manual práctico y moderno de inseminación artificial.

- Hussain, A., Daniel, R., & O'Boyle, D. (1990). Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows. *Theriogenology*, XXXIV, 291-302.
- Iglesias, J. (1985). Hierbas medicinales de los quichuas del Napo. *I*(1), 11-12-13.
- Ipek, H., Avci, M., Aydilek, N., & Yerturk, M. (2012). The effect of zeolite on oxidant/antioxidant status in healthy dairy cows. *Acta Veterinaria Brno*, LXXXI(1), 43-47. Obtenido de https://actavet.vfu.cz/media/pdf/avb_2012081010043.pdf
- Jergensen, P. M. (2011). *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador*. (s.n, Ed.) Quito :.
- Jorgensen, P., & León-Yáñez, S. (1999). Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. *Monographs in systematic botany from the Missouri botanical garden*, LXXV, 1-1181.
- Jubb, K., Kennedy, P., & Palmer, N. (1985). *Pathology of domestic animals*. San Diego: CA: Academic Press Inc.
- Kayser, J., Kim, J., Cerny, R., & Vallet, J. (2006). *Global characterization of porcine intrauterine proteins during early pregnancy* (Vol. CXXXII). Reproduction.
- LeBlanc, S. (2008). Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance : a review. *The Veterinary Journal*, CLXXVI.(1), 102-114.
- LeBlanc, S. (2014). Reproductive tract inflammatory disease in postpartum dairy cows. *Animal*, VIII(1), 54-63.
- Lee, K., Jeong, J., Tsai, M., Tsai, S., & Lydon, J. (2006). Molecular mechanisms involved in progesterone receptor regulation of uterine function. . *J Steroid Biochem Mol Biol*, 41-50.
- Lee, R., Wheeler, T., & Peterson, A. (1998). Large format, two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of ovine periimplantation uterine luminal fluid proteins: identification of aldose reductase, cytoplasmic actin, and transferrin as conceptus synthesized proteins. 743-752.
- Lewis, G. S. (1997). Uterine health and disorders. Journal of Dairy Science. *Journal of Dairy Science*, LXXX(5), 984-994.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, IV(8), 118.

- Lobus, H. (1986). Bases biológicas de la reproducción bovina . . I, 47-49.
- Maldonado A, c. B. (2010). Transformacion marcista . *caja* , 45-76.
- Maldonado, A. (2007). *djhffff*. Macas.
- Martínez, A. (1975). Estudios bacteriológicos de muestras de secreciones del cuello uterino de vacas en periodos pospartum. *Rev Cub Cienc Vet*, XI(41).
- Mattar, S., & Melo, M. (1998). Estudio etiológico de las enfermedades infecciosas de origen bacteriana. En *Bacteriología clínica*: (Vol. I, págs. 278-322). Santa Fe de Bogotá-Colombia.: CEJA.
- Méndez, L. (2008). Determinación de la microflora bacteriana uterina en vacas donantes de embriones . *Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias*.
- Merchán, M., & Sandro, J. (2017). *Efecto del número de partos, tamaño del cuerpo lúteo y concentración sanguínea de progesterona sobre la tasa de preñez en receptoras de embriones bovinos*. Cuenca - Ecuador: (Master's thesis).
- Ministerio de Agricultura y Ganaderia . (s.f.). *Diagnostico Porductivo del sector Agropecuario de la Parroquia Santa Fé de ganan de la provincia de Chimborazo*.
- Mitko, K., Ulbrich, S., Wenigerkind, H., Sinowatz, F., & Blum, H. (2008). Dynamic changes in messenger RNA profiles of bovine endometrium during the oestrus cycle. *Reproduction*, CXXXV, 225-240.
- Mosely, R. (2012). *Bile secretion*. Philadelphia .
- Niswender, G., Juengel, J., McGuire, W., Belfiore, C., & Wiltbank, M. (1994). Luteal function: the estrues cycle and early pregnancy . *Biol reprod*, 47.
- Olivera, M. (2007). Vías implicadas en la luteólisis bovina. *Rev Col Cienc Pec*, XX, 387-393.
- Peiris, I., Grewal, T., Jeacock, M., Savva, D., & Shepherd, D. (1998). Effect of a novel recombinant bovine interferón and trophoblast secretory products on protein metabolism by endometrial explants from cattle and sheep. *Res Vet Sci*(64), 79-83.
- Perez, M., & Simon, M. (2001). *TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS*.
- Plan de manejo guayusa, Ilex. (2014). *Ilex guayusa loes*.
- Plan de manejo, Ilex Guayusa Loes. (2011). *Fundacion Chanckuap*.

- Pro Ecuador. (2016). *Boletín mensual de comercio exterior*. Recuperado el 17 de Octubre de 2018, de https://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2016/09/PROEC_IC06_68.pdf
- Quintela, L., Diaz, C., Herradón, P., Peña, M., & Becerra, J. (2006). *Ecografía y reproducción en vaca. , España: s.n.* Santiago de Compostela-España.
- Rabbani, M., & Rogers, P. (2001). Role of vascular endothelial growth factor in endometrial vascular events before implantation in rats. *Reproduction* ; 122: 85-90. *Reproduction*, CXXII, 85-90.
- Radice, & Vidary. (2012). *Caracterización fitoquímica de la especie Ilex Guayusa Loes y elaboración de prototipo*. Quito.
- Radice, M., & Vidari, G. (2007). Caracterización fitoquímica de la especie Ilex guayusa Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial. *La Granja*, VI(1), 3-11.
- Ramírez-Aristizabal, I., Ortiz, A., & Ospina-Ocampo, I. (2016). *Determinación de compuestos fenólicos (catequinas, cafeína, ácidos orgánicos) en te verde (camellia sinensis) usando cromatografía líquida de alta resolución (Vol. XXIII)*. Vitae.
- Roberts, R., Xie, S., & Mathialagan, N. (1996). *Maternal recognition of pregnancy*. 54: 294-302. (Vol. LIV). Biol Reprod.
- Rodríguez, E. (2002). Enfermedades de animales, humanas y zoonosis. Sobre la especificidad de la Infección por agentes patógenos. *Profesión Veterinaria (Revista del Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid)*, LIII(108), 62-72.
- Rodríguez, P., Menéndez, L., & Trujillo, L. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista cubana de medicina militar*, XXX(1), 15-20.
- Roppel, M., & Campero, C. (1998). Acción de Actinomyces pyogenes en el tracto reproductor bovino. *Therios*; 27:14-20. *Therios*(XXVII), 14-20.
- Rosario. (1983). . En I. M. inglés), *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. (Vol. I, págs. 2-10). México D.F.: Interamericana.

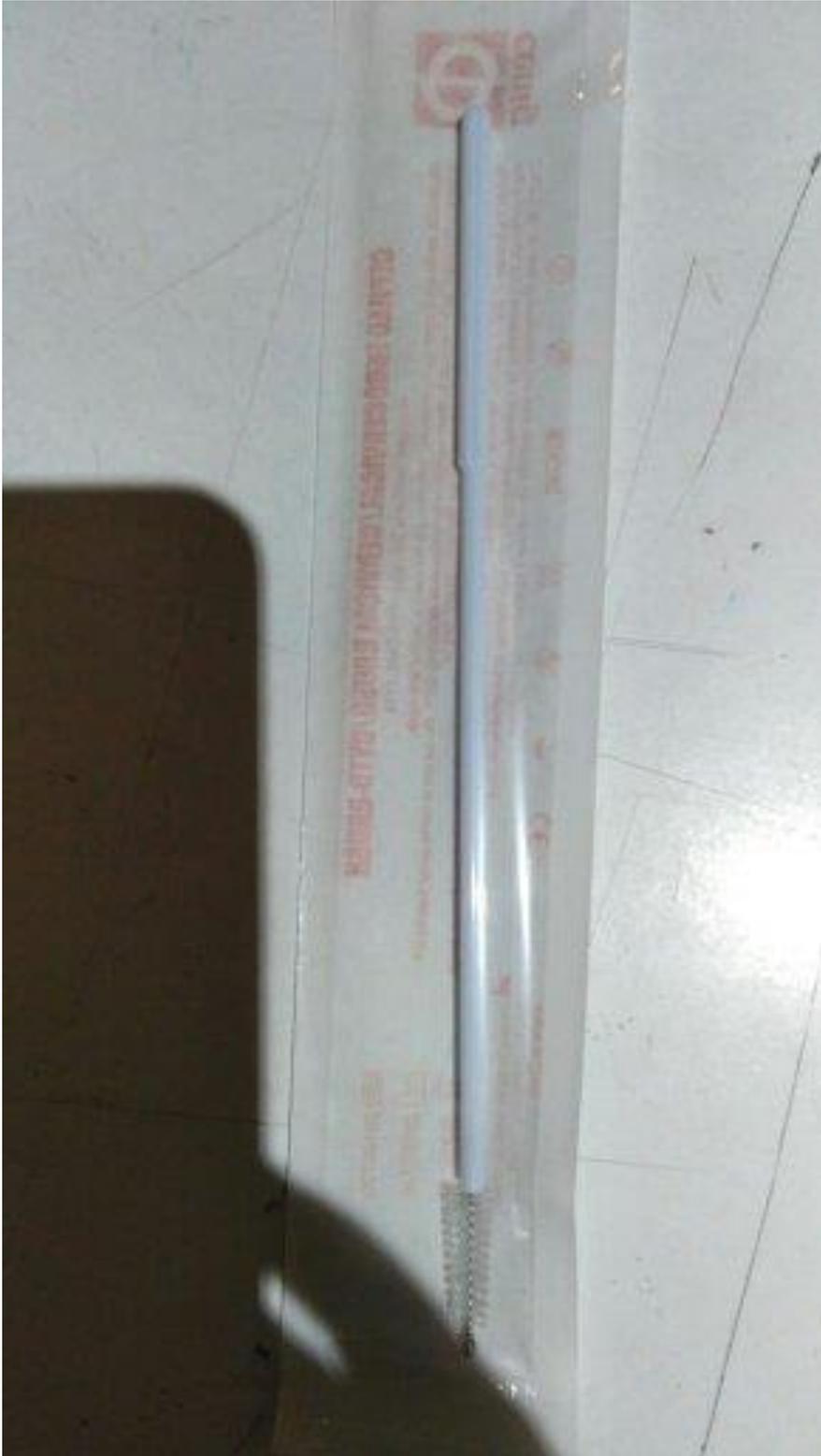
- Rosero, G. (2007). Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de cafeína de un extracto hidroalcohólico de *Ilex Guayusa*. *Laboratorio CIVABI. Universidad Politécnica Salesiana de Quito*, 25-32.
- Ruiz, J., & Roque, M. (2009). Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-orientes peruano. *Ciencia e Investigación*, XII(1), 41-47.
- Runa. (18 de Octubre de 2018). *mother nature's energy drink*. Obtenido de <http://runa.org/our-story/#ecostory-guayusa>
- Rysaneck, M. (1970). Conferencia sobre trastornos inflamatorios del tracto reproductor femenino en bóvidos. *Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas*.
- Salazar, A., Navarro, J., & Pallarés, F. (2012). *Citología e Histología Veterinaria*. España: Universidad de Murcia.
- Samodelkin, A., & Gavriv, A. (1997). Biotechnological methods to combat fertility in meet cattle. *Veterinaria*, XI(32).
- Santana, A., Oba, E., Langoni, H., & Uribe-Velasquez, L. (1998). .Avaliação bacteriológica do endométrio em fêmeas bovinas repetidoras de cio. *Arch Reprod Ani*, VI, 62-71.
- Schultes, R. (1979). Discovery of an ancient guayusa plantation in Colombia. *Botanical Museum Leflets*, XXVII(6), 143-53.
- Sheldon, & Dobson, H. (2004). Postpartum uterine health in cattle. *Animal reproduction science*, LXXXII, , 295-306.
- Sheldon, I., Williams, E., Miller, A., Nash, D., & Herath, S. (2008). Uterine diseases in cattle after parturition. *The Veterinary Journal*, CLXXVI(1), 115-121.
- Shemluck, M. (1979). The flowers of *Ilex guayusa*. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University*, XXVII, 5-6-155-160.
- Silveira, E. (2006). Microbiota (microflora) normal del cuerpo de los animales. . *Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas*. , Santa Clara. Cuba.

- Sisson, S., Grossman, J., & Getty, R. (2005). *Anatomía de los animales domésticos* (Vol. V).
Barcelona España: Masson S.A.
- Spell, A., Beal, W., Corah, L., & Lamb, G. (2001). Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, *LVI*, 287-297.
- Spencer, Johnson, G., Burghardt, R., & Bazer, B. (2004). *Progesterone and placental hormone actions on the uterus: Insights from Domestic Animals* (Vol. LXXI). Biol reprod.
- Spencer, T., Johnson, G., Burghardt, R., & Bazer, F. (2004). *Progesterone and placental hormone actions on the uterus: Insights from Domestic Animals* (Vol. LXXI). Biol Reprod .
- Stroud, B., & Hasler, J. (2006). Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology*, *LXV*, 65-76.
- Swanston, S., Day, C., Flatt, P., Gould, B., & Bailey, C. (1989). Glucaemic effects of traditional European plant treatments for diabetes: Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetic Research*, *X*(2), 69.
- Swanston-Flatt, S., Day, C., Flatt, P., Gould, B., & Bailey, C. (1989). Glycaemic effects of traditional European plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Res*, *X*(2), 69-73.
- Takács, T., Gáthy, Y., Macháty, Z., & Bajmócy, E. (1990). Bacterial contamination of the uterus after parturition and its effect on the reproductive performance of cows on largescale dairy farms. *Theriogenology*, *XXXIII*, 851-865.
- Trautmann, A., & Fiebiger, J. (1950). *Histología y anatomía microscópica comparada de los animales domésticos*. Barcelona: Labor. SA.
- Tribulo, H. (2002). Transferencia de embriones. CGR Biotecnología reproductiva. . *Curso de post-grado en reproducción bovina, IV*. Bogotá- Colombia.
- Tuquinga, M. (2013). *Efecto Estrogénico del Extracto de las Hojas de Guayusa (Ilex guayusa Loes) en Ratas (Ratus norvegicus)*. Riobamba- Ecuador.
- Vanden, A., Bagard, E., Hazan, M., & Kride, C. (1992). *Rationale for 12:36 treatment of retained placenta in cows with neomyun D metronidazole*. *Vet Rec* ; *130*:349. .

- Wang, B., & Goff, A. (2003). Interferon- δ stimulates secretion of macrophage migration inhibitory factor from bovine endometrial epithelial cell. *Biol Reprod*, *LXIX*, 1690-1696.
- Wang, C., Robinson, R., Flint, A., & Mann, G. (2007). Quantitative analysis of changes in endometrial gland morphology during bovine oestrus cycle and their association with progesterone levels. *Reproduction*, *CXXXIV*, 365-371.
- Wehrend, A., Träsch, K., Failing, K., & Bostedt, H. (2003). The regional differences of the pH-value in the vagina, cervix and uterus of cows during interestrus. *Dtsch tierärztl wechenschr*, *C*, 65-68.
- Willet, T. (1951). *Copyright by Orad. W.D y Sons Company Fort Atkinson*. Sn. Wisconsin.
- Williams, D. (1965). *Ganado vacuno para carne: cría y explotación*. Limusa-Wiley.
- Youngquist, R., & Shore, M. (1997). *Post partum uterine infections*. En: *Youngquist RS*. Philadelphia. PA: WB Saunders Co.: Current Therapy in Large Animal Theriogenology.

ANEXOS.

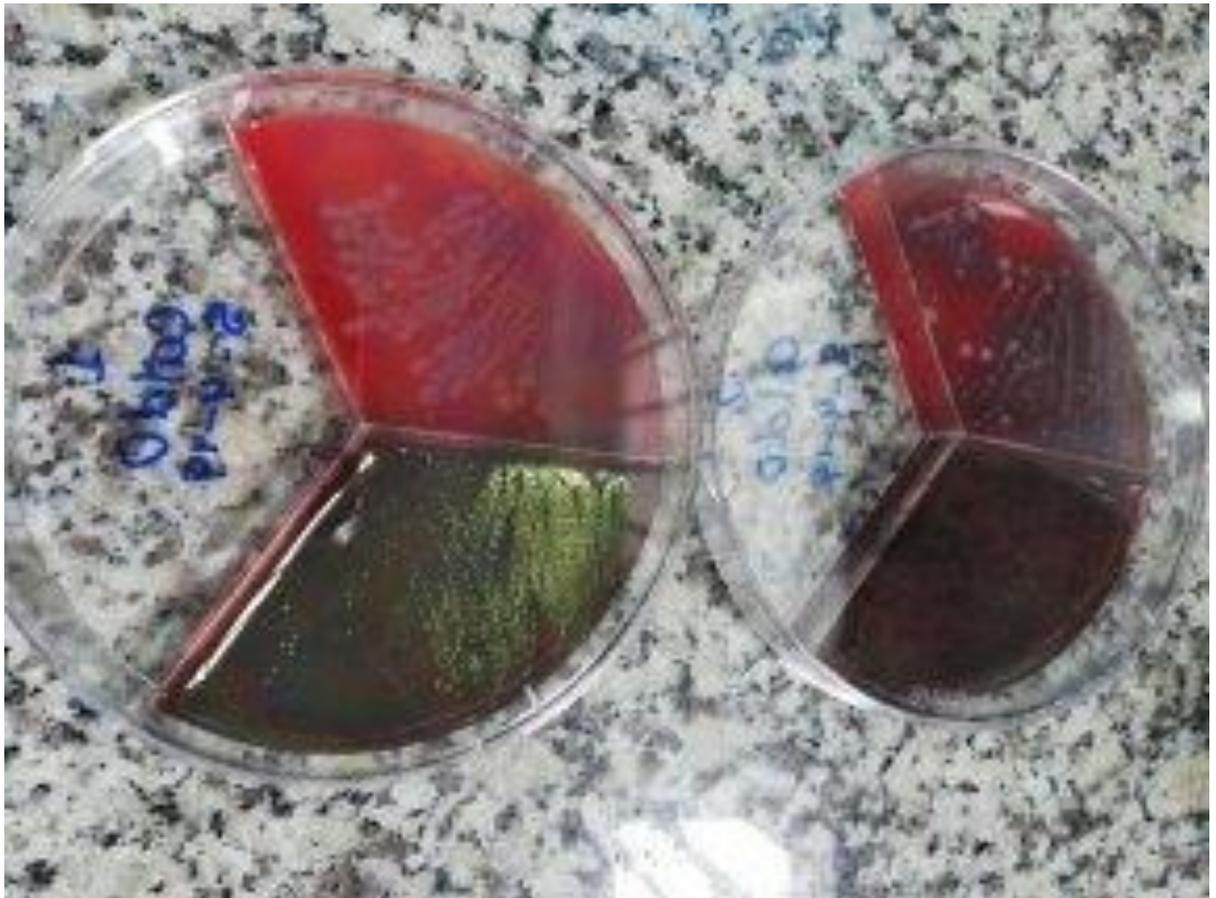
Anexo A. Cepillo (CITOBRUS)



Anexo B. Cultivo de bacterias



Anexo C. Cultivo de bacterias



Anexo D. Chequeo ginecológico



Anexo E. Toma de muestra para cultivo de bacterias



Anexo F. Toma de muestra de sangre



Anexo G. Toma de muestra de secreción vaginal.



Anexo H. Técnica Citobrush (cepillado vaginal).



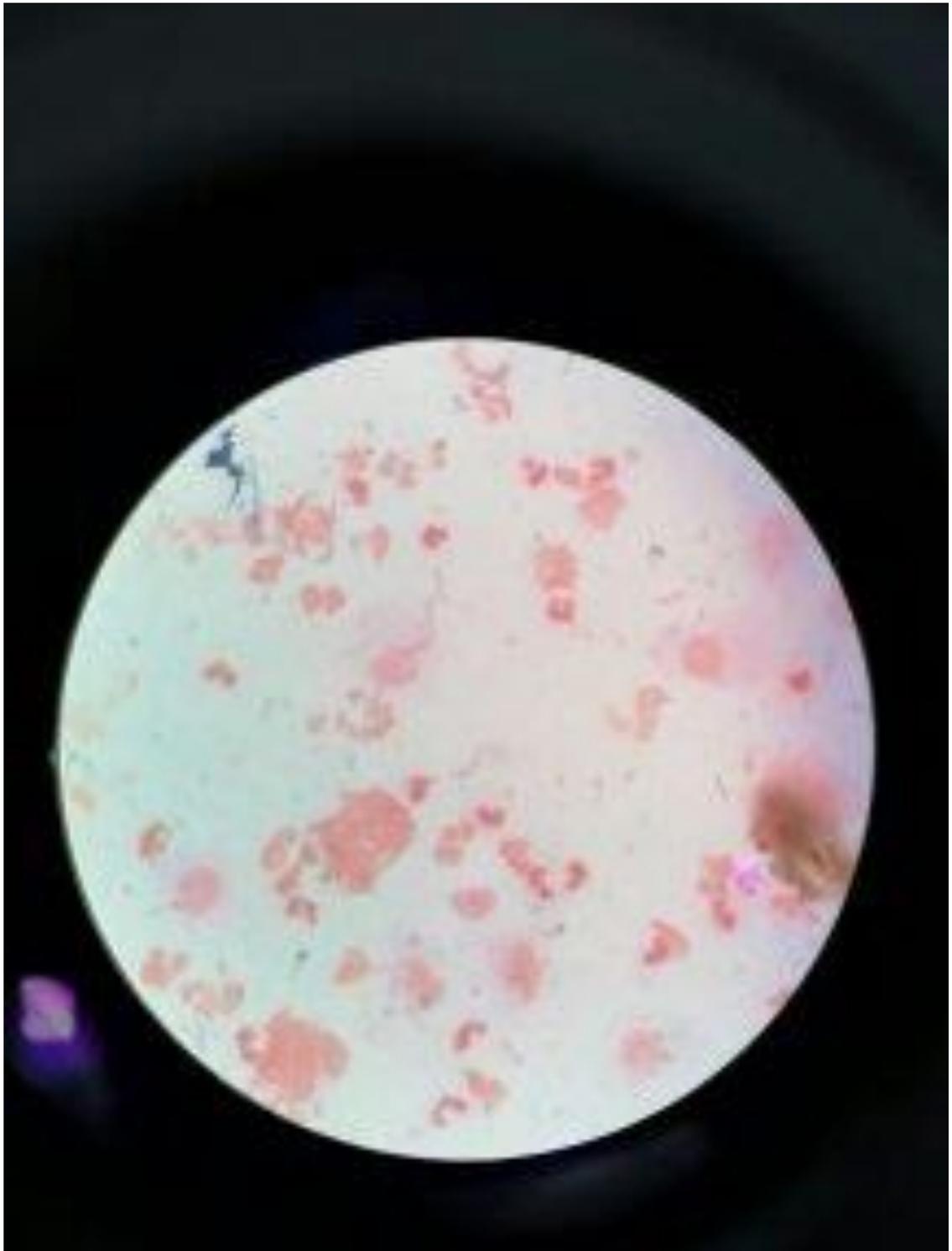
Anexo I. Aplicación de la secreción en la placa para conteo de células (PMN).



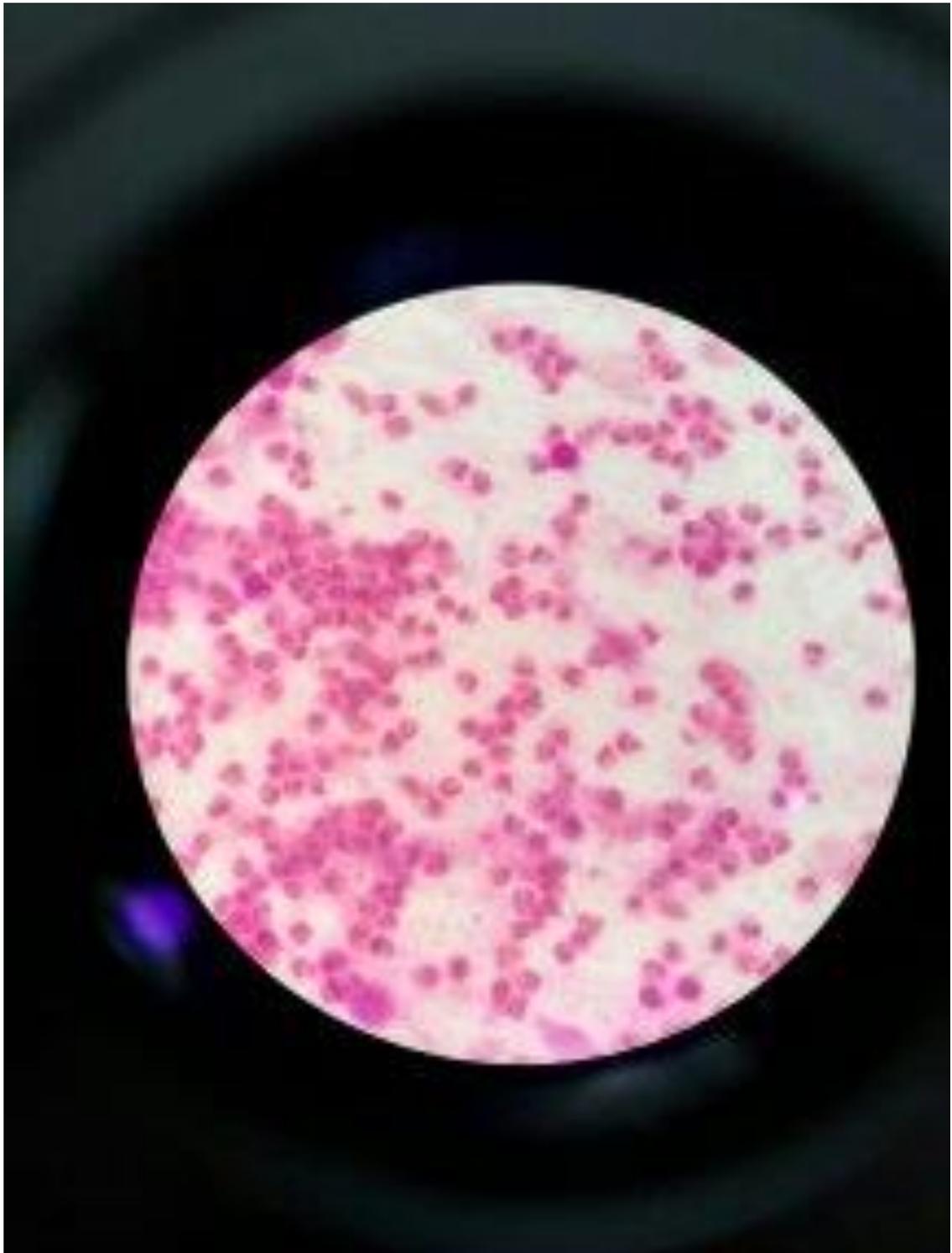
Anexo J. Toma de muestra para el cultivo de bacterias.



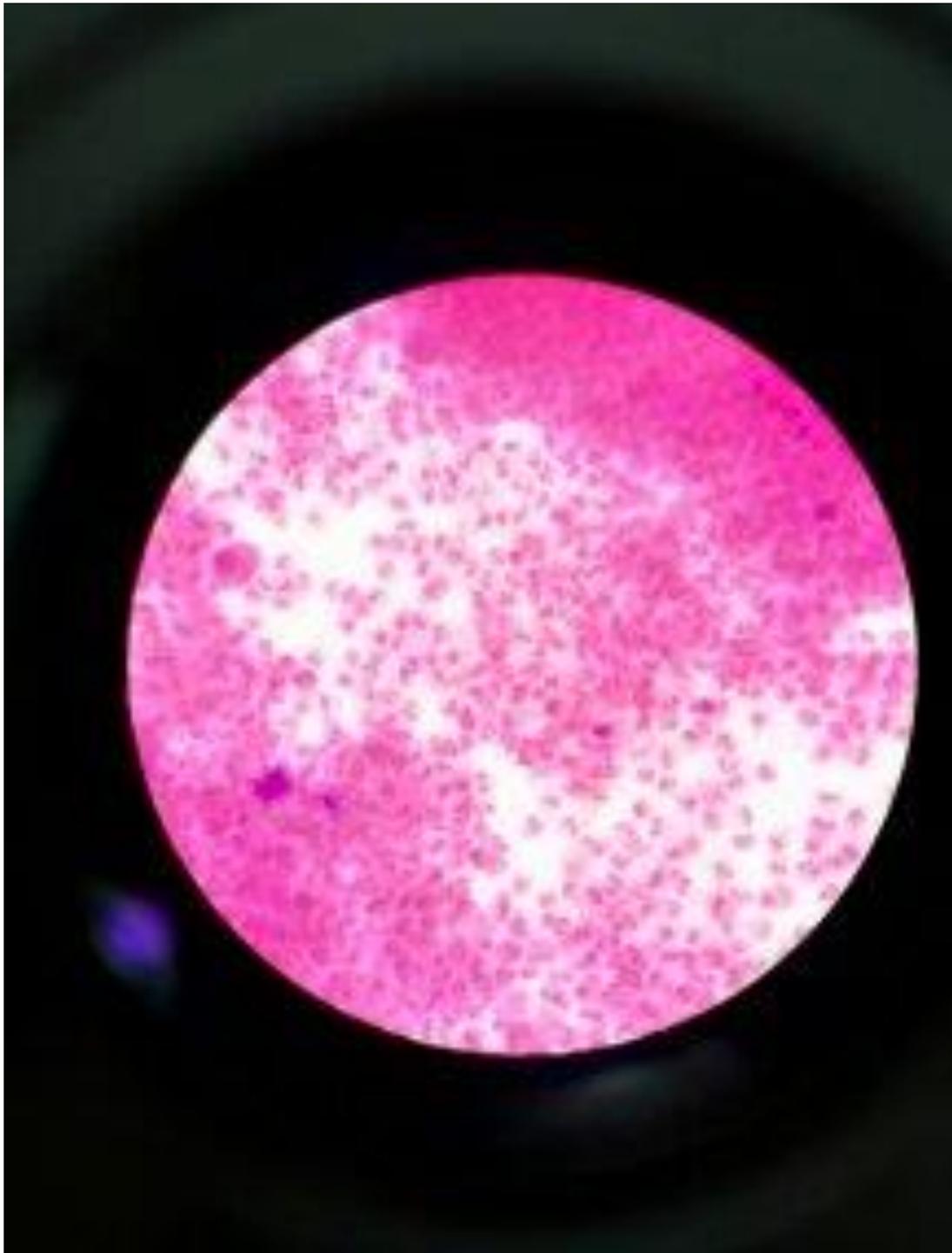
Anexo K. Células (PMN) visto desde el microscopio.



Anexo L. Células (PMN) visto desde el microscopio.



Anexo M. Células (PMN) visto desde el microscopio





Nombre: BOVINO 1868	CI: 0028247		
Edad : 3 años,0 meses,0 días	Sexo : F	No. Muestra: 046	Código: 0028247
Referido por: ANA MALDONADO	Fecha y hora de ingreso: 11/04/2019 21:00:40		

Análisis	Resultado	Valores de referencia
----------	-----------	-----------------------

ESTUDIOS HORMONALES SANGUINEOS

ESTRADIOL

Método: Electroquimioluminiscencia
Estradiol:

33.40 pg/mL

MUJER: Fase Folicular: 25.0 - 160.0

Fase ovulatoria: 34.0 - 400.0

Fase luteal: 27.0 - 246.0

Menopausia : < 30.0

Gestación: 1er. trimestre: 215 -> 4300

PROGESTERONA

Método: Electroquimioluminiscencia
Progesterona:

0.192 ng/mL

Mujeres: Fase Folicular: 0.2 - 1.5

Fase Ovulatoria: 0.8 - 3.0

Fase Lútea: 1.7 - 27

Posmenopausia: 0.1 - 0.8

Embarazo: 1er trim: 9.0 - 35.0

2do trim: 29.0 - 80.0

3er trim: 83.0 - 160.0

MICROBIOLOGIA

CULTIVO DE SECRECION

*MUESTRA: Cepillado endocervical
Desarrollo de Escherichia coli*

INVESTIGACION DE POLIMORFONUCLEARES

*MUESTRA: Cepillado endocervical
POLIMORFONUCLEARES: abundantes cel/campo*