



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL OVARIO DE LA CERDA EN LAS
DIFERENTES ETAPAS DEL CICLO ESTRAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

MARIANA CALLES GARCÍA

ASESORES:

DRA. MARIA ELENA TRUJILLO ORTEGA

DR. MIGUEL GONZÁLEZ LOZANO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A mis padres Sagrario García Orozco y Pablo M. Calles Caballero ya que jamás existirá forma de agradecer un vida de lucha y sacrificios constantes, este logro es inspirado en ustedes pues son mi ejemplo a seguir, los amo.

A mi hermano Manuel Calles García, porque siempre has creído en mí y me das la fuerza para salir a delante, jamás tendré un mejor compañero de vida que tú.

A Valina, Negrita, Bolillo, Nacho y sobre todo Juanin que fueron el motivo e inspiración para iniciar este sueño y me han acompañado en todo este proceso.

A Fernando Barrera ya que no solo formaste parte de mi proceso académico, si no que eres una parte muy bella de mi vida.

A Liliana Soto pues has estado conmigo a pesar de que nuestros caminos se han separado jamás me he sentido sola.

A Angélica López y Luis Martínez por todas las aventuras que vivimos en la carrera, y por que estuvieron conmigo en momento cada.

A mi familia (tíos, primos, abuelos) pues gracias a ustedes he podido lograr ser la persona que soy ahora

No tengo palabras para expresar cuanto los amo a todos.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de México por brindare educación en todos los sentidos.

A la Faculta de Medicina Veterinaria y Zootecnia por la oportunidad de estudiar esta maravillosa carrera y prepararme para el futuro.

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina por darme las facilidades para realizar la parte experimental de este trabajo, por todo el aprendizaje que me dio tanto académico como personal.

A la Doctora María Elena Trujillo Ortega y el Doctor Miguel González Lozano por todo el apoyo recibido durante el proyecto, por compartirme sus conocimientos y por toda la paciencia.

Al departamento de rumiantes donde se me permitió trabajar la parte final de mi proyecto

A UNAM-PAPIIT-205617 responsable: David Alejandro Contreras Caro del Castillo
Asociación IPVS México 2014 donativo otorgado a DACCC y UNAM-PAPIIT-208516 responsable: Griselda Valdez Magaña.

Al departamento de Patología por brindarme las herramientas necesarias para realizar la parte microscópica pero sobre todo a la Doctora Laura Romero, al Técnico académico Jaime Eugenio Córdoba Córdoba y al Técnico A. Virgilio.

A mis profesores del CEIEPP que se esforzaron mucho por trasmitirme sus conocimientos: Dr. Oscar Gutiérrez Pérez, MVZ. Alejandro Vargas Sánchez, MVZ Jesús M. Cortez Sánchez y sobre todo al Doctor Víctor Martínez Torres que me recibió con los brazos abiertos y me aconsejo cada vez que fue necesario.

Al laboratorio de Fisiología que me permitió realizar una parte de mi experimento.

A mis compañeros Edith Victores, Rodrigo Gonzales, Paulo Barajas y Adrian Sosa, por compartir sus conocimientos y por toda la ayuda que me brindaron.

A mis amigos de CEIEPP: Nancy, Luisa, Itzcoatl, Sergio, Luis, José Luis, Javier y Rafa pues hicieron mis días ahí muy felices y muchos de ustedes me ayudaron mucho a lo largo del proyecto.

Gracias a todos pues sin ustedes esto no sería posible.

Contenido

II. Introducción	10
III. Revisión de literatura	12
1. Morfología del aparato reproductor de la cerda.....	12
1.1 Vulva	13
1.2 Vagina.....	14
1.3 Vestíbulo vaginal.....	14
1.4 Modificaciones cíclicas del epitelio vaginal.....	15
1.5 Cérvix	16
1.6 Útero.....	17
1.7 Tubas uterinas.....	18
2. Ovogénesis.....	23
3. Estructuras Ováricas.....	25
3.1 Estructuras foliculares:	26
3.1.1 Folículo primario	27
3.1.2 Folículo secundario	28
3.1.3 Folículo terciario	29
3.2 Estructuras no Foliculares.....	30
3.2.1 Cuerpo hemorrágico	30
3.2.2 Cuerpo lúteo	31
3.3 Atresia folicular	32
3.4 Luteólisis	33
4. Dinámica folicular	34
4.1 Foliculogénesis inicial	34
4.2 Foliculogénesis dependiente de gonadotropinas.....	35
4.3 Reclutamiento	35
4.4 Selección y dominancia.....	35
5. Pubertad	36

5.1. Fisiología de la pubertad.....	37
6. Ciclo estral.....	39
6.1 Proestro.....	40
6.2 Estro.....	41
6.3 Ovulación.....	42
6.4 Metaestro.....	42
6.5 Diestro.....	42
7. Hormonas que participan en el ciclo estral.....	43
7.1 GnRH.....	43
7.2 Gonadotropinas.....	44
7.3 Estrógenos.....	45
7.4 Progesterona.....	45
7.5 Andrógenos.....	46
7.6 Inhibina.....	46
7.7 Prostaglandinas.....	46
8. Citología vaginal exfoliativa.....	46
8.1 Basales.....	48
8.2 Células intermedias.....	48
8.3 Células superficiales.....	48
8.4 Escamas.....	48
9. Histología.....	49
9.1 Histología del aparato reproductor.....	50
IV. Justificación.....	52
V. Hipótesis.....	53
VI. Objetivos.....	53
VII. Material y métodos.....	54
VIII. Resultados.....	67
IX. Discusión.....	78
X. Conclusiones.....	82
XI. Perspectiva de investigación.....	83

XI. Bibliografía	83
------------------------	----

Índice de figuras

Figura 1 a y b. Esquema del aparato reproductor de la cerda	12
Figura 2. Vulva de cerda nulípara, se muestra el tamaño de la misma.....	13
Figura 3 . Útero, de una cerda primeriza	17
Figura 4. Tubas uterinas de una cerda primeriza	18
Figura 5. Oviducto (infundíbulo, ámpula, unión istmo ampular e istmo).....	20
Figura 6. Ovario de una cerda primeriza, donde se observa folículos maduros....	21
Figura 7. Anatomía del aparato reproductor de la cerda	23
Figura 8. Ovogénesis	24
Figura 9. Ovario de una cerda en proestro.....	24
Figura 10. Estructuras ováricas.....	25
Figura 11. Microfotografía de folículos primordiales 10x, teñidas con HE.....	27
Figura 12. Microfotografía de folículo primario multilaminar 10x, teñidas con HE .	28
Figura 13. Microfotografía de folículo secundario 10x, teñidas con HE.....	29
Figura 14. Microfotografía de folículo terciario 10x, teñidas con HE	30
Figura 15. Microfotografía de cuerpo Hemorrágico 10x, teñidas con HE	31
Figura 16. Microfotografía de cuerpo lúteo 10x, teñidas con HE.....	32
Figura 17. Microfotografía de folículo atrésico 400x, teñidas con HE.....	33
Figura 18. Planeación del uso de animales.....	55
Figura 19. Organización de eventos.....	56
Figura 20. Peso (Kg) de la cerdas (12) al presentar la pubertad.....	68
Figura 21. Grasa Dorsal (mm) de las cerdas en la pubertad.....	68

Figura 22. Edad (semanas) que presentaron la pubertad las 12 cerdas.....	69
Figura 23. Duración del ciclo estral de las 12 cerdas.....	69
Figura 24. Caracterización por etapa del ciclo estral.....	73

I. Resumen

Uno de los principales desafíos de los sistemas de producción porcina en la actualidad es mantener los niveles de productividad elevados. La correcta determinación de los motivos de desecho y monitoreo de las hembras reproductoras, posibilita maximizar el potencial de la unidad de producción.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar los cambios macroscópicos y microscópicos ocurridos en el ovario durante las diferentes etapas del ciclo estral de la cerda prepuber.

El trabajo se realizó en las instalaciones del Departamento de Fisiología y en las del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP), ambas instancias de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM de la FMVZ. Se incluyeron 12 hembras, a las cuales se les realizó la detección del primer estro y se programó el segundo. Se tomaron frotis vaginales para la realización de citología vaginal exfoliativa teñidas por el método de papanicolaou y tinción de hematoxilina-eosina y se realizó la matanza de las hembras con el fin de obtener muestras de ovarios que se procesaron mediante la técnica histología para ser analizados.

Se determinó el diámetro de los diferentes folículos mediante el uso del programa Image J[®] 1.52^a(1). El diámetro folicular en promedio fue de Folículo primordial 0.545 mm \pm 0.370, Folículo primario 0.983 mm \pm 0.553, Folículo secundario 3.954 mm \pm 0.666, Folículo terciario 5.172 \pm 2.111, Ovocito 0.386 mm \pm 0.058. Al analizar los datos diámetro folicular se encontró una distribución normal ($P > 0.05$) para los folículos terciario y secundario además de los oocitos en la prueba de

normalidad Shapiro wilk, además se realizó la prueba Kruskal - wallis para muestras independientes donde se encontró que no hay una diferencia estadística entre grupos con una significancia de ($P > 0.05$).

En conclusión los resultados indicaron que durante la maduración, los folículos ováricos aumentan el promedio de sus diámetros en las diferentes etapas.

II. Introducción

La porcicultura es la actividad ganadera de mayor producción en el ámbito mundial, el rápido avance alcanzado en mejoramiento genético, nutrición y reproducción permiten el continuo incremento de esta actividad (2). En los últimos años la producción anual de carne de cerdo a incrementado en promedio 1.6%. Actualmente, el principal productor de carne de cerdo es China, con 47.9 % de la producción mundial, seguido por Estados Unidos y Brasil con 10.4 y 3.4 respectivamente. México por su parte, ocupa la novena posición, con una participación del 1.3 % en la producción mundial de este tipo de carne, lo que representa 1.4 millones de toneladas (3).

La reproducción es un factor clave en la producción porcina, ya que uno de sus principales objetivos es mejorar el potencial de la cerda como reproductora, la cual puede reproducirse más de dos veces por año y tener camadas de más 12 lechones al destete (2,4–6) para lograr lo anterior es fundamental conocer el potencial de reproducción de estos animales, las principales características genéticas y las necesidades fisiológicas, y con ello planificar el manejo al que esta será sometida (2).

La cerda es poliéstrica continua no estacional, sus ciclos estrales se presentan ininterrumpidamente durante toda su vida reproductiva sin influencia de factores ambientales como ocurre en otras especies. Su ciclo estral tiene una duración promedio de 21 días con un rango de 18 a 23 días; se divide en términos endocrinológicos en dos fases: fase lútea y la fase folicular, y de acuerdo con los cambios morfológicos y de comportamiento se subdivide en cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro (2,4,6,7).

Durante el ciclo estral suceden cambios morfológicos, histológicos y hormonales en los órganos reproductores cuyo fin es preparar las condiciones para los eventos reproductivos. Cuando las cerdas han alcanzado la pubertad, el ciclo estral da inicio de manera regular, todos estos procesos son regulados por el sistema hipotálamo -hipófisis – ovárico (2,4,8,9). Por lo anterior el presente trabajo es una recomendación práctica de cómo vincular la anatomía y fisiología de la cerda con la identificación y descripción realizada a través de técnicas histológicas de las estructuras ováricas en momentos específicos del ciclo estral. Esto puede llegar a aplicarse como una herramienta para inferir y controlar el período periovulatorio, verificar la actividad ovárica, en caso de fallas reproductivas, hacer una buena selección genética y/o implementar el manejo reproductivo más adecuado en una situación determinada (10).

III. Revisión de literatura

1. Morfología del aparato reproductor de la cerda

Como se observa en las figuras 1a y 1b y 7 el aparato reproductor de la cerda se encuentra conformado por: Vulva, vagina, cérvix, útero, tuba uterina y ovarios, a continuación se presentarán las principales características de la morfología de cada estructura antes mencionada: (11,12).

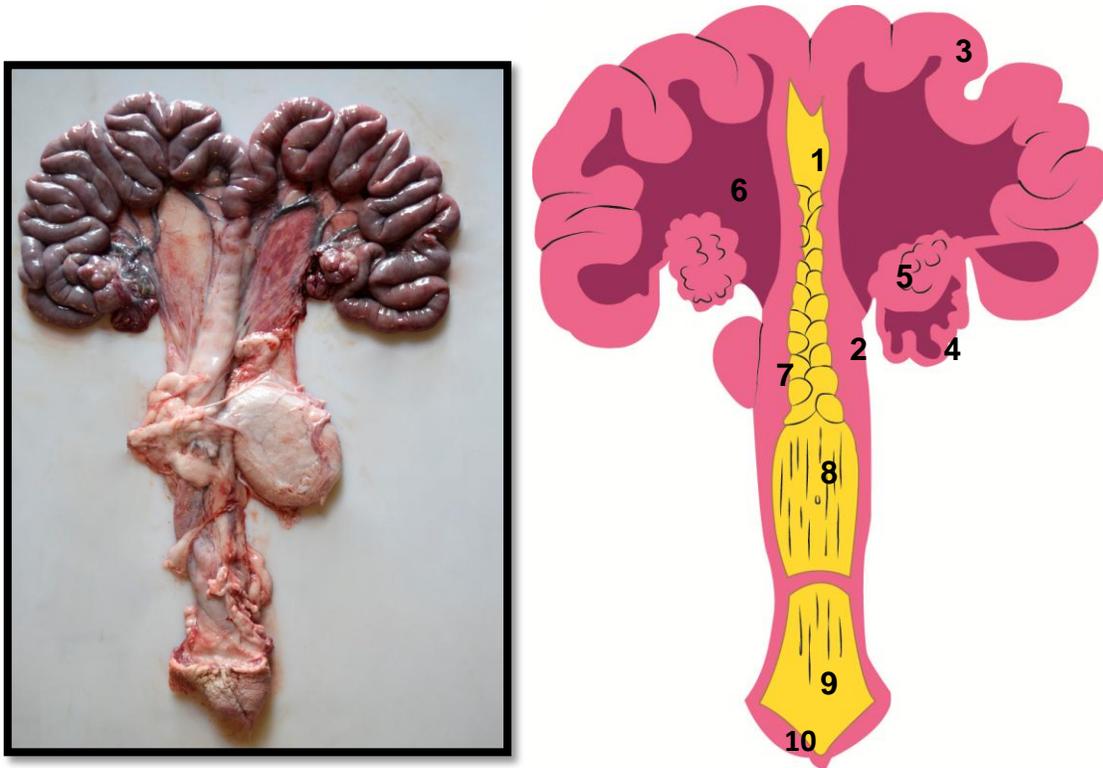


Figura 1a. Fotografía del aparato reproductor de la cerda (Calles M., 2019).

Figura 1b. Esquema del aparato reproductor de la cerda (Calles M., 2019).

1. Cuerpo del útero, 2. Cérvix, 3. Cuernos uterinos, 4. Oviducto, 5. Ovario, 6. Mesometrio, 7. Vejiga, 8. Vagina, 9. Vestíbulo vaginal, 10. Vulva.

1.1 Vulva

Es la entrada del aparato reproductor, tiene forma ligeramente cónica, su abertura está dirigida dorso-caudalmente. (13) La conforman dos labios vulvares, izquierdo y derecho, unidos de forma longitudinal por dos comisuras, una dorsal y otra ventral.(4) Los labios se encuentran formados por gran cantidad de glándulas sebáceas y tubulares, junto con depósitos de grasa, tejido elástico, una delgada capa de músculo liso y la parte más externa presenta la misma estructura de la piel, además de vasos sanguíneos encargados de irrigar esta zona que son altamente sensibles a los estrógenos, lo cual provoca, durante el periodo de estro, la edematización de la vulva por dilatación de estos vasos, que se observa como aumento de tamaño y la coloración roja característica de esta etapa como se observa en la figura 2 (4,8,13).



Figura 2. Vulva de cerda nulípara, se muestra el tamaño de la misma. (Calles M., 2019).

1.2 Vagina

Es una estructura localizada en el canal pélvico (14), tiene como límite craneal al cérvix y caudal a la vulva (4), mide de 10 a 15 cm de longitud; está constituida por dos partes: la vagina y el vestíbulo vaginal.

La principal función de la vagina es fungir como el órgano copulador femenino (8,13). Los pliegues musculares son los que permiten la distensión de la vagina durante el coito y, sobre todo, durante el parto. Además, a través de la vagina también se excretan las secreciones del cuello uterino, el endometrio y las tubas (13).

1.3 Vestíbulo vaginal

Está localizado en su mayoría en posición caudal respecto al arco isquiático y se halla inclinado en dirección ventral hacia los labios de la vulva (14), es la porción comprendida entre la vagina y los genitales externos, mide de 6 a 8 cm (13). En el vestíbulo se localizan las glándulas de Bartholin que secretan un líquido viscoso. Estas glándulas presentan estructura tuboalveolar semejante a las glándulas bulbouretrales del macho, la secreción tiene como finalidad lubricar la vagina para facilitar la cópula durante la etapa de estro, en esta etapa aumenta tal secreción y el olor de la hembra estimula sexualmente al macho (4,8,15).

A su vez, la vagina se compone de tres capas: serosa, muscular y mucosa; esta última capa está compuesta por epitelio escamoso estratificado, el que tiene la capacidad de cambiar de grosor y su tipo celular, dependiendo de la etapa del ciclo estral en que se encuentre la cerda, debido a la alta sensibilidad a las

hormonas esteroideas que presentan estas células (4). Esto permite determinar la etapa del ciclo que cursa la cerda, a través de la observación microscópica de las células del epitelio vaginal, mediante una sencilla citología vaginal que puede realizarse con un hisopo o una pequeña espátula. La porción muscular de la vagina se compone de una capa de músculo liso grueso circular y otra capa de músculo delgado longitudinal; esta última rica en vasos sanguíneos, paquetes nerviosos, grupos de células nerviosas y tejido conectivo laxo y denso (13).

1.4 Modificaciones cíclicas del epitelio vaginal

Las modificaciones celulares que se presentan en el epitelio vaginal son de utilidad zootécnica y su importancia radica en la estimación del momento del estro y el diagnóstico de gestación.

Las modificaciones celulares se presentan principalmente en relación al estado endocrino y fisiológico de la cerda. Durante el ciclo estral es posible distinguir las cuatro etapas o fases del mismo ya sea por biopsia vaginal o citología exfoliativa.

Estos cambios obedecen a la presencia o ausencia de progesterona o estrógenos, principalmente. En presencia de progesterona el epitelio se reduce, siendo este de no más de seis capas celulares lo contrario sucede durante la presencia de altos niveles de estrógenos observándose más de 12 estratos celulares.

El recubrimiento epitelial de la vagina es delgado en el anestro, con tan solo 2 o 3 capas de células; prolifera durante el proestro y puede tener de 12 a 20 al principio del estro (16).

1.5 Cérvix

También conocido como cuello del útero (8), se divide al útero de la vagina dada su ubicación anatómica entre ambos. Se trata de un esfínter formado principalmente por tejido conectivo y por pequeñas cantidades de músculo liso, la mayor parte del tiempo permanece cerrado, excepto durante el estro y al momento del parto, esto con la finalidad de proteger al útero de la entrada de algún agente patógeno (4). Las paredes del cérvix poseen diferentes prominencias llamadas anillos cervicales, estos últimos varían, de acuerdo a la especie (17); en la cerda están dispuestos en forma de rosca o de tirabuzón, lo que permite el acoplamiento perfecto con el pene del macho, cuyo glande tiene forma similar (15). Una característica importante del cérvix consiste en la producción de moco cervical, compuesto de macromoléculas de mucina de origen epitelial constituidas principalmente de glicoproteínas (8,13).

Galina (4), menciona que el moco cervical provee características muy particulares como son: elasticidad, tixotropismo, viscosidad, adhesividad y arborización; que consiste en la cristalización de sus elementos y se observa al dejar cristalizar una gota de moco cervical en un portaobjetos, lo que provoca la aparición de un patrón microscópico en forma de helecho, promovida por los niveles estrogénicos. Este mismo patrón se observa en otros fluidos como, por ejemplo, la saliva, por lo que se puede considerar como método complementario en la detección de estro.

1.6 Útero

Es la porción del tracto reproductor de la hembra, en la cual tiene lugar el desarrollo embrionario y fetal (8,14); donde los productos fetales reciben nutrición y protección del mundo exterior, desde que sucede la implantación hasta el momento del parto, esto es posible a través del intercambio sanguíneo entre los lechones y la madre por medio de la placenta. El útero de la cerda se clasifica como bicornual de fusión baja (17), esto quiere decir que se compone de un cuerpo muy corto y de dos tubas uterinas muy grandes, como se puede observar en la figura 3 ; lo anterior se debe a una adaptación evolutiva que le permite soportar, a través de su vida reproductiva, gestaciones de muchos productos (13).

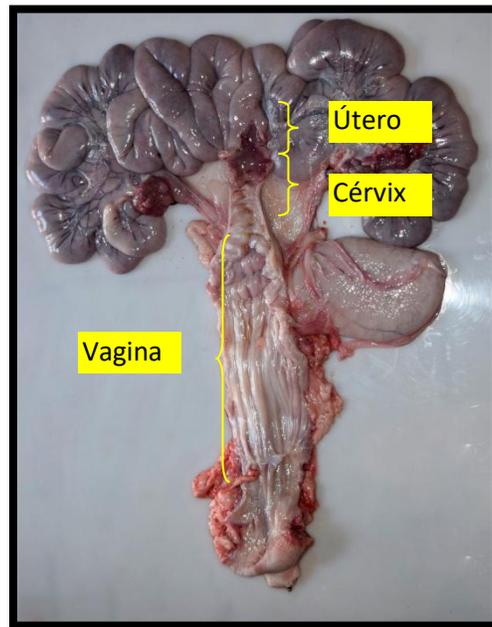


Figura 3 . Útero, de una cerda primeriza. (Calles M., 2019).

1.7 Tubas uterinas

Las tubas uterinas son proyecciones del útero, una de sus características es su forma de pliegues que le da una apariencia semejante a los intestinos, representado en la figura 4 (14). Las tubas uterinas pueden medir de 120 a 150 cm. Sus características histológicas son idénticas a las del útero (13).



Figura 4. Tubas uterinas de una cerda primeriza. (Calles M., 2019).

Oviductos

Los oviductos son un par órganos tubulares pequeños de tipo muscular, que conectan el útero con los ovarios, encargados de recolectar al óvulo una vez que es expulsado del ovario (12). El oviducto se compone de tres estructuras fundamentales (4) como se muestra en la figura 5.

- infundíbulo
- ampolla
- istmo

El infundíbulo es una estructura en forma de embudo encargado de captar al ovocito ovulado (14,19); tiene pliegues en su mucosa que, a su vez, se encuentran en el borde del infundíbulo, formando las fimbrias. La ampolla es la porción más larga del oviducto y es donde sucede la fecundación del ovocito, para que posteriormente continúe su recorrido hacia el útero, a través del istmo (13,19).

El oviducto está conformado por tres capas histológicas: serosa, muscular y mucosa, esta última compuesta de una serie de pliegues (primarios, secundarios y terciarios), los cuales ocupan casi la totalidad de la luz, esto hace que el contacto con el ovocito sea estrecho (4,12). Esta capa está formada de células epiteliales cilíndricas, células ciliadas y células no ciliadas, que facilitan el paso del ovocito por su trayecto hasta el encuentro del óvulo con el espermatozoide. Las células ciliadas de los oviductos se mueven dependiendo de la actividad hormonal existente, su mayor movimiento sucede durante la ovulación. Otra función de estas células es impedir la implantación de los óvulos fecundados en esta zona. Por otro lado, en el oviducto existen células secretoras no ciliadas, encargadas de producir el líquido capaz de capacitar e hiperactivar al espermatozoide (18). La musculatura del oviducto comprende dos capas de fibras musculares lisas circulares internas y fibras musculares lisas longitudinales externas (4,12), las cuales provocan contracciones en el oviducto, ayudando a desnudar al óvulo para la fecundación y su transporte(18).

La serosa es una capa delgada de tejido conectivo cubierta por una capa simple de epitelio plano, se encuentra altamente vascularizada (4).

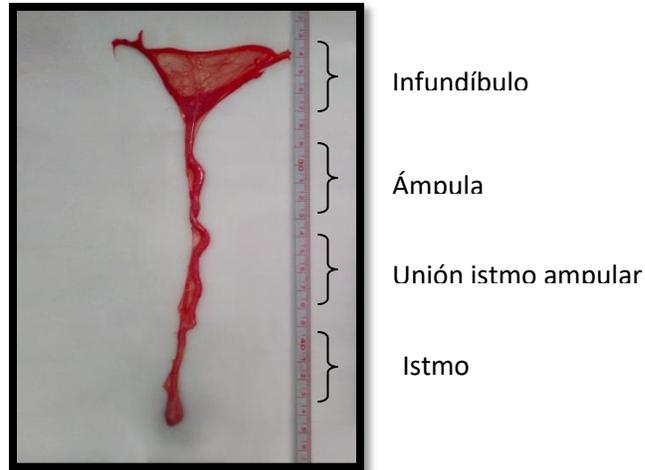


Figura 5. Oviducto (infundíbulo, ámpoula, unión istmo ampouar e istmo) (Calles M., 2019).

Ovarios

Son las gónadas femeninas encargadas de la producción de los gametos (óvulos), y de hormonas importantes (andrógenos, estrógenos e inhibina) del ciclo reproductivo de la cerda.

La primera manifestación de las gónadas se aprecia en el embrión en forma de una par de eminencias longitudinales llamadas crestas gonadales (4). El ovario se origina bilateralmente a partir de la cresta gonadal en la región lumbar, medial al riñón embrionario. Aquí migran desde el endodermo del intestino y el epitelio del saco vitelino las células germinales primordiales que luego que luego formarán las denominadas eminencias ováricas. A partir de ellas se desarrollan los diferentes estadios de la maduración del ovocito (14). Durante el desarrollo del feto se producen los oogonios, que se multiplican por división mitótica para una posterior división meiótica, lo que da por resultado varios millones de oocitos hasta que esta

división se detiene en la etapa de profase. Después de este proceso, ocurre atrofia de los oocitos al momento del nacimiento y, posteriormente, en la pubertad (13).

El ovario tiene una disposición par (8,14), presenta forma elipsoidal, con bordes sumamente irregulares (7,13) debido a la elevada formación de folículos y cuerpos lúteos, consecuencia de la gran cantidad de óvulos que la cerda es capaz de producir en un solo ciclo estral, lo que confiere al ovario una forma similar a la de una mora o uva (13) como se observa en la figura 6.

A diferencia de los testículos, los ovarios se encuentran dentro de la cavidad abdominal (4,7,8) en su parte dorsal, cerca de la punta del útero caudalmente a los riñones (7,8).



Figura 6. Ovario de una cerda primeriza, donde se observa folículos maduros.

(Calles M., 2019).

El ovario está cubierto por un epitelio de superficie, en los primeros estadios de su desarrollo el epitelio es cuboidal. Con el tiempo este cambia a escamoso (18,20,21). En la mayoría de las especies los ovarios se componen,

principalmente, de dos tipos de tejido: el más profundo, la médula es la porción vascular del ovario y está constituida por tejido conjuntivo laxo areolar (20,22), mientras que la corteza que protege y cubre a la médula, se compone a su vez de tres zonas: la primera es propiamente la corteza la porción parenquimatosa del ovario (7,12,20), en ésta suceden el desarrollo folicular y la formación de los demás elementos que caracterizan al ovario: el cuerpo hemorrágico, el cuerpo lúteo y el cuerpo albicans (4) además se puede observar tejido conjuntivo laxo (12,20). Por otra parte, bajo el epitelio de revestimiento se observa la túnica albugínea (12,21), una capa densa de tejido conectivo que se ve interrumpida cuando se lleva a cabo el crecimiento folicular y la ovulación (2,20,21). Por último, se tiene al tejido epitelial, conocido también como epitelio germinal (13).

Es una glándula mixta con función:

- Endocrina: secreción de hormonas que regulan los caracteres sexuales y la actividad reproductiva en la cerda
- Exocrina: producción y liberación de gametos femeninos (6,8,21,22).

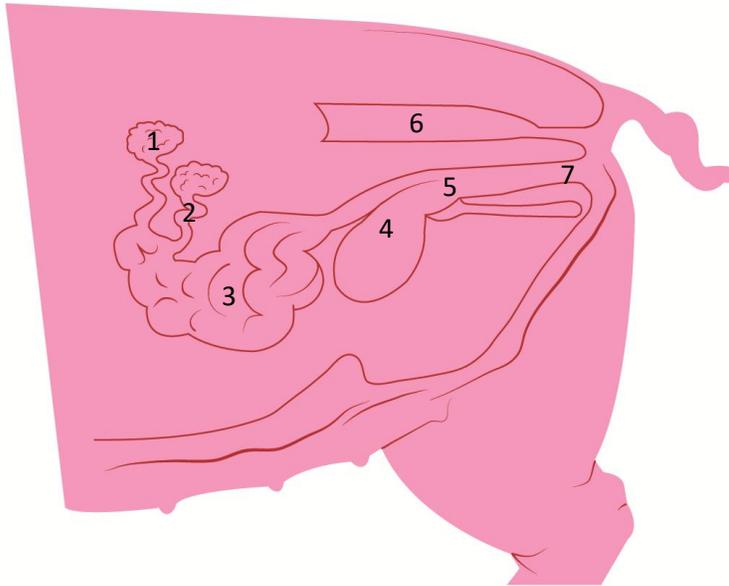


Figura 7. Anatomía del aparato reproductor de la cerda. (Calles M., 2019).

1. Ovarios 2. Oviductos 3. Cuernos uterinos 4. Vejiga 5. Cérvix 6. Ano 7.Vagina.

2. Ovogénesis

La ovogénesis es la formación y desarrollo del óvulo (8,23,24), representado en las figuras 8 y 9. Durante la mitosis o multiplicación, la ovogonia prolifera a partir de las células primordiales que han migrado a los cordones germinales desde el saco vitelino (11). La ovogonia se divide dando origen a varias generaciones de células idénticas. La ovogonia entra a la profase de la primera división meiótica (8,11,23,25) y se convierte en ovocito primario antes o poco antes del nacimiento en la mayoría de las especies. Los ovocitos primarios se detienen en diploteno de la profase hasta que se logre la madurez sexual (8,23–25) es decir, la cerda nace con estos ovocitos.



Figura 8. Ovogénesis. (Adaptado de Galina, 2008).

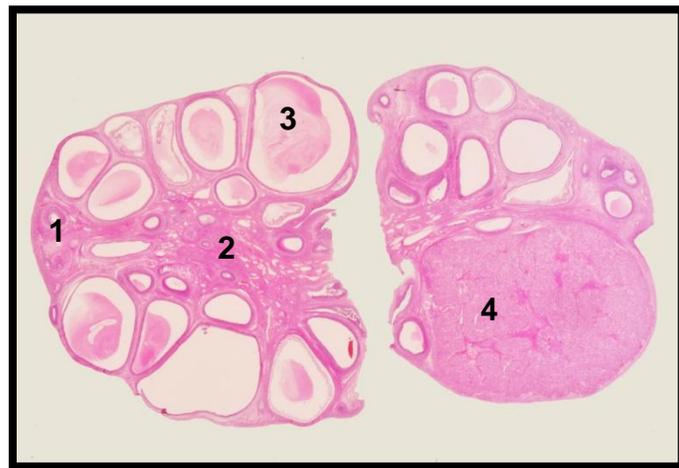


Figura 9. Ovario de una cerda en proestro. (Calles M., 2019).

1. Corteza, 2. Medula, 3. Folículos de diferentes tamaños y 4. Un cuerpo lúteo de lado derecho.

La primera división meiótica convierte al ovocito primario en ovocito secundario y aparece justo antes de la ovulación y se acompaña de la formación de un cuerpo polar. La segunda división meiótica se logra hasta que el espermatozoide penetra al ovocito (8,18).

3. Estructuras Ováricas

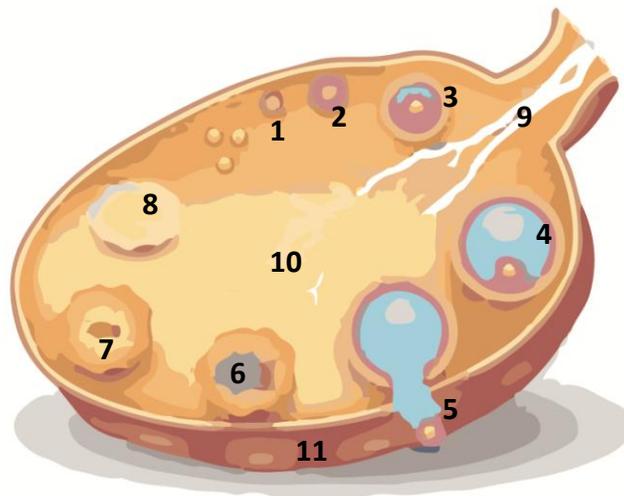


Figura 10. Estructuras ováricas. (Calles M., 2019).

1. Folículo primordial 2. Folículo primario 3. Folículo secundario 4. Folículo terciario 5. Óvulo liberado 6. Cuerpo hemorrágico 7. Cuerpo lúteo 8. Cuerpo albicans 9. Vasos sanguíneos 10. Medula 11. Corteza.

El folículo es el elemento funcional del ovario, tiene como finalidad el desarrollo y maduración de un óvulo viable para ser fecundado; además, otra función importante es la producción de estrógenos, por parte de las células de la granulosa.(26) Como se muestra en la figura 10 el ovario se pueden encontrar estructuras foliculares y no foliculares:

3.1 Estructuras foliculares:

El crecimiento y maduración folicular es un proceso endocrino fisiológico que tiene lugar en el ovario (18). Estos eventos presentan varios periodos el primero ocurre durante el desarrollo embrionario, en su etapa temprana, aquí las células primordiales dan origen a las ovogonias (26), las cuales se convertirán en ovocitos primarios (están detenidos en la etapa profase de la meiosis I, hasta la presentación de la pubertad) (18,26,27), morfológicamente están cubiertos por una capa de células mesodérmicas simples o aplanadas - células foliculares- , las cuales rodean al ovocito primario (27), lo cual se conoce como folículo primordial (18) representado en la figura 11 y es la estructura que se observa al momento de nacimiento.

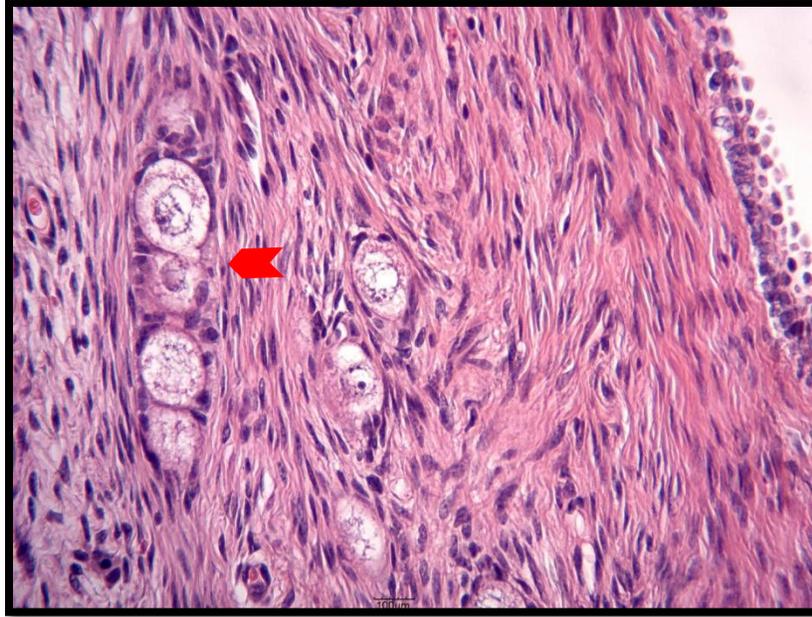


Figura 11. Microfotografía de folículos primordiales 10x, teñidas con HE. (Calles M., 2019).

El siguiente paso en el desarrollo folicular, es la formación de:

3.1.1 Folículo primario

Folículos primarios y se caracterizan por la formación de más capas de células foliculares, alrededor de la ovogonia (8,12,22,26). Estas cambian su forma y se vuelven cuboides (18,25). Desde este momento se les conoce como células de la granulosa (8,27), mientras tanto el ovocito comienza a rodearse de material extracelular que será la zona pelúcida que separa al ovocito de las células foliculares circundantes (8,22,27) como se muestra en la figura 12.

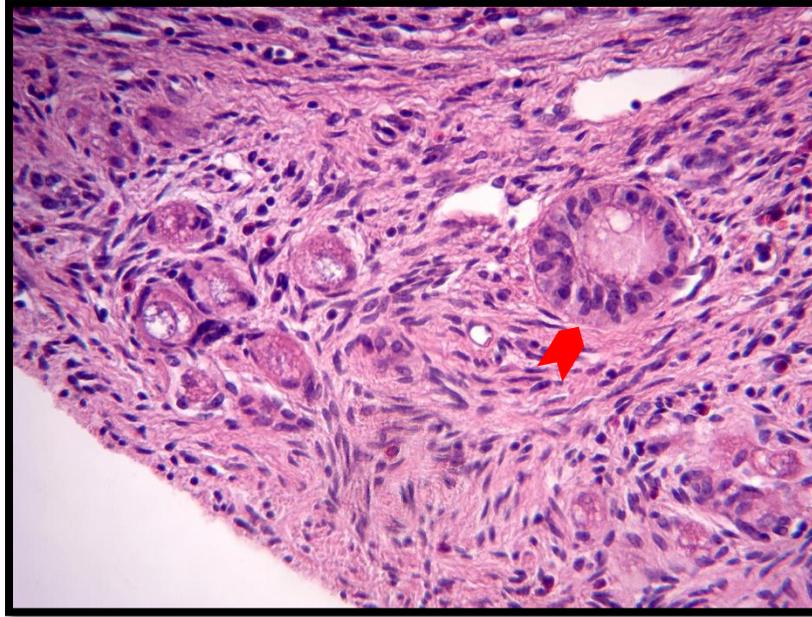


Figura 12. Microfotografía de folículo primario multilaminar 10x, teñidas con HE.

(Calles M., 2019).

3.1.2 Folículo secundario

El folículo secundario se identifica por aumento en la población de células foliculares y el completo desarrollo de la zona pelúcida entre el ovocito primario y las células foliculares como se observa en la figura 13. Las células foliculares son mitóticamente activadas y se vuelve una membrana granulosa (11,25,27). Las células del estroma se diferencian en dos capas, la teca interna y la teca externa (21). La teca interna consiste de células epitelioideas grandes y una red vascular. La teca externa es una capa de células fibroelásticas (8,11,26). Se desarrollan fisuras intracelulares para formar el antro folicular, el cual se llena de líquido folicular (8,22). No obstante, el ovocito primario aún se encuentra rodeado por una capa de células de la granulosa desplazándose a la periferia, este conjunto de

células se conoce como *cumulus oophorus* (cúmulo ovífero). Las células de este cúmulo adyacentes al ovocito reciben el nombre de corona radiada (26,27).



Figura 13. Microfotografía de folículo secundario 10x, teñidas con HE. (Calles M., 2019).

3.1.3 Folículo terciario

Folículo terciario, también conocido como folículo de Graaf contiene las mismas estructuras que el folículo secundario, la única diferencia es que el antro folicular se encuentra aumentado de tamaño debido a la acumulación de líquido en su interior (2,8,12,25) como se muestra en la figura 14; es una estructura grande que se extiende desde una protrusión en la superficie hasta la profundidad de la corteza (11,18).



Figura 14. Microfotografía de folículo terciario 10x, teñidas con HE. (Calles M., 2019).

3.2 Estructuras no Foliculares

3.2.1 Cuerpo hemorrágico

La formación del cuerpo hemorrágico es previa a la formación del cuerpo lúteo, se desarrolla por el llenado de sangre en la cavidad en donde alguna vez estuviera el folículo (2,6) como se representa en la figura 15.



Figura 15. Microfotografía de cuerpo Hemorrágico 10x, teñidas con HE. (Calles M., 2019).

3.2.2 Cuerpo lúteo

Después del rompimiento de la pared ovárica, las porciones restantes no se degeneran si no que sufren cambios (18). Las células que correspondían a las células de la granulosa y la teca interna comienzan a luteinizarse lo cual consiste en una hipertrofia y hiperplasia, además de sufrir modificaciones bioquímicas y morfológicas (7) como se puede observar en la figura 16, estas células son las responsables de la producción de progesterona (28).

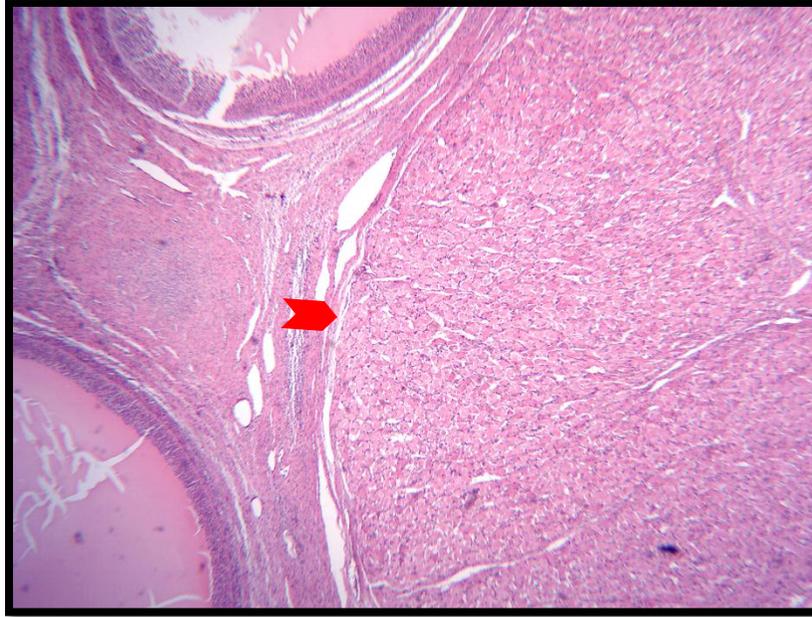


Figura 16. Microfotografía de cuerpo lúteo 10x, teñidas con HE. (Calles M., 2019).

3.3 Atresia folicular

En la figura 17 se muestra el proceso de regresión de los folículos, el cual le ocurre a la mayoría de los folículos presentes en el ovario, con excepción de aquéllos que son ovulados (4,11).



Figura 17. Microfotografía de folículo atrésico 400x, teñidas con HE. (Calles M., 2019).

3.4 Luteólisis

El cuerpo lúteo está presente durante el diestro y la gestación (4,5). Durante el diestro, la progesterona bloquea la acción de los estrógenos y oxitocina. Eventualmente la progesterona termina agotando sus propios receptores de modo que al final del diestro esta inhibición cesa lo que permite al estradiol inducir la formación de receptores para sí mismo y para oxitocina. La actividad de ambos provoca la formación de prostaglandina iniciándose la luteólisis (29). La acción luteolítica de la prostaglandina esta medida por la presencia de receptores en las células del cuerpo lúteo (29,30).

Por otro lado, durante el proceso de luteólisis los cuerpos lúteos son invadidos por macrófagos que producen factor de necrosis tumoral alfa (TFN) inhibiendo la

producción de estradiol e impidiendo su efecto luteotropico. Actuando de forma sinérgica con la prostaglandina (28,30).

4. Dinámica folicular

El desarrollo folicular es un proceso continuo (8,29) que culmina ya sea con la ovulación del folículo maduro o con la regresión del mismo (29).

La cerda no presenta oleadas de crecimiento folicular, si no un desarrollo continuo de los folículos antrales hasta la ovulación. Los folículos que no ovulan son atrésicos (6,30).

4.1 Foliculogénesis inicial

El desarrollo folicular empieza desde la vida fetal, y dos semanas después del nacimiento pueden encontrarse folículos en todas las fases de desarrollo excepto preovulatorios. Los primeros signos morfológicos de crecimiento folicular son la proliferación de las células de la granulosa, las cuales cambian de forma plana a cubica, así como el crecimiento del ovocito (29). Durante las primeras fases del desarrollo folicular el ovario es aparentemente independiente a la secreción de gonadotropinas, a pesar de que el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal comienza ya a funcionar en la vida fetal. Esto se debe a que el desarrollo preantral del folículo está sometido a control intraovárico exclusivamente (28,30). Una vez que se ha iniciado el crecimiento los folículos continúan desarrollándose por estímulos de factores de crecimiento.

Los receptores para FSH se expresan en las células de la granulosa desde las primeras etapas foliculares (28).

4.2 Folliculogénesis dependiente de gonadotropinas

Conforme avanza el desarrollo folicular, los folículos se vuelven altamente sensibles a las gonadotropinas y requieren de ellas para continuar su crecimiento esta fase se divide en tres (29–32):

4.3 Reclutamiento

Se refieren a la población de folículos pequeños y medianos presentes en la superficie del ovario (31,33) que se desarrollan simultáneamente por estímulos de FSH. En esta fase los folículos inician la secreción de estradiol e inhibina, que paulatinamente suprimen la secreción de FSH (29), en cerdas nulíparas y en cerdas postdestete, hay un acumulo o grupo de aproximadamente de 50 folículos de 1 a 6 mm en la superficie del ovario (30–32).

4.4 Selección y dominancia

Los folículos ovulatorios son reclutados del total de folículos antrales, que se desarrollan durante la fase lútea del ciclo, en el cual se observan folículos de aproximadamente 5 mm (31,32). Algunos folículos se convierten en dominantes y continúan desarrollándose, estos bloquean el soporte hormonal para el resto de los folículos que comenzaron su crecimiento, induciendo su atresia y reprimiendo el reclutamiento de una nueva oleada. Esto es debido a que la secreción de FSH a nivel hipofisiario disminuye, inducido por la retroalimentación negativa provocada por estradiol e inhibina que secreta el folículo (4,31).

Los folículos dominantes logran sobrevivir en un ambiente bajo en FSH gracias al desarrollo de receptores para LH, en las células de la granulosa y su dependencia cambia hacia esta hormona (26).

Los folículos pequeños no reaccionan ante este reclutamiento por carecer de los suficientes receptores de LH y de FSH, y terminan en atresia (30,31). La magnitud de la dominancia generalmente se define por la diferencia de tamaño entre los folículos dominantes y los subordinados, siendo esta diferencia para la cerda de apenas 3 a 4 mm entre los dominantes y los subordinados (31).

Una vez que las concentraciones de progesterona disminuyen, el aumento en la frecuencia de la secreción de LH es suficiente para que concluya la maduración folicular y se lleve a cabo la ovulación (28,33).

5. Pubertad

La pubertad se alcanza cuando el individuo es capaz de liberar gametos viables (3). En la cerda esto ocurre cuando se ha alcanzado un cierto estado de madurez fisiológico relacionado con la culminación de una serie de eventos en el sistema endocrino, lo cual resulta en la presentación del primer estro y de la primera ovulación (2,8,9). Se presenta entre los días 135 y 250 (7) entre los 5 y 7 meses (8,34) con un peso aproximado de 75 a 90 kg que varía dependiendo de diversos factores como; el tipo racial, la condición corporal, la temperatura ambiental y las interacciones sociales (8,9,34,35).

La pubertad se define como la fase que une la inmadurez con la madurez y se reconoce como la aparición de los primeros signos de estro, crecimiento de folículos ováricos y la liberación del óvulo para ser fecundado (26). Es un proceso gradual y está relacionado con la tasa de crecimiento y el metabolismo energético (35) es importante reconocer el inicio de la pubertad para implementar el

adecuado manejo reproductivo de nuestros animales antes de dar la primera monta, evitando así un inadecuado desarrollo de las hembras (1).

5.1. Fisiología de la pubertad

En términos neuroendocrinos, la pubertad es la reactivación en la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH); el control de la secreción de esta hormona resulta fundamental para alcanzar la maduración reproductiva y conductual (26,29). La GnRH es un decapeptido producido por neuronas hipotalámicas especializadas que secretan de manera intermitente pulsos de GnRH en la eminencia media, y que posteriormente llega a la hipófisis, en donde estimulan la secreción de hormonas gonadotrópicas como son la hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) (8,29,34).

Posterior a su secreción, la LH y FSH son transportadas por la sangre hasta los testículos y ovarios, actuando directamente sobre la producción de gametos, así como sobre la secreción de hormonas esteroides (andrógenos y estrógenos), estas últimas vitales para la función gonadal y el comportamiento reproductivo. Las hembras y los machos a menudo comienzan la pubertad en diferentes períodos, se conoce poco respecto a los mecanismos que originan estas diferencias, pero se ha sugerido que el proceso podría programarse prenatalmente por esteroides sexuales (8,29).

Desde un punto de vista práctico es importante que la cerda joven presente la pubertad a una edad temprana y que ésta se relacione con el final de su fase de

engorda, ya que es conveniente para programar su entrada a un grupo de cerdas de reemplazo.

Se han propuesto dos hipótesis para explicar los mecanismos que dan inicio a la pubertad (26).

La primera de ellas, comúnmente llamada hipótesis del gonadostato, sostiene que los mecanismos dependientes de esteroides que regulan la liberación de GnRH involucran cambios en la sensibilidad a los esteroides gonadales (EG). Durante el periodo prepuberal, las neuronas productoras de GnRH son altamente sensibles a la retroalimentación negativa de los EG, permitiendo que exista solo una baja frecuencia de pulso de GnRH, de tal forma que las gónadas permanecen inmaduras. Posteriormente, al inicio de la pubertad la sensibilidad a la retroalimentación negativa de los EG disminuye, permitiendo la expresión e incremento de los pulsos de GnRH. En consecuencia, se produce el incremento de la secreción de gonadotropinas que resultará en la maduración gonadal (4,8).

La segunda hipótesis propone que, si la quiescencia sexual se presenta antes del inicio de la pubertad (26), se debe a una inhibición central de GnRH podría provenir de elementos independientes a los esteroides gonadales, y que el incremento en los pulsos de liberación de GnRH desencadena la pubertad. Sin embargo, la liberación de GnRH eventualmente estará sujeta a la influencia moduladora de los esteroides (29).

En el caso específico de la cerda se ha sugerido que el aumento transitorio del incremento de LH al final de la etapa prepuber se debe a la maduración del centro

de control responsable de la secreción de gonadotropinas, causado por un incremento en la producción de GnRH, lo que estimula la secreción de LH y FSH.

Independientemente de la propuesta fisiológica ambos mecanismos, dependiente e independiente de esteroides, forman parte de un sistema integrador de control que regula la supresión de la secreción de GnRH durante el periodo prepuberal e intensifica su secreción durante la pubertad, pero que no controla el momento del inicio de la pubertad (26).

En este sentido, se ha propuesto que podrían ser varios elementos y no solo uno los que podrán estar implicados en el proceso, entre ellos la melatonina, la grasa corporal, la leptina, el ácido gamma- aminobutírico (GABA), el glutamato, el neuropéptido y más recientemente el gen GPR54 (29).

6. Ciclo estral

El ciclo estral de la cerda dura en promedio 21, con un rango de 18 a 24 días (5,28,30,36). Debido a que la cerda es poliéstrica continua (30,37), los ciclos se pueden repetir siempre que no exista gestación, lactación, o el efecto de alguna entidad patológica. El ciclo estral se ha dividido para su estudio en fase folicular de 5-7 días (proestro y estro) (30,34), durante esta etapa ocurre la maduración folicular por lo que el esteroide gonadal dominante es el estradiol (36) y una fase lútea de 13- 15 días (metaestro y diestro)(28,34), en ella la hormona dominante es la progesterona. A su vez, estas dos etapas son subdivididas en cuatro: proestro, estro, metaestro, diestro (36).

6.1 Proestro

En esta fase, la creciente producción de estrógeno folicular inicia la preparación del aparato reproductivo para el apareamiento (36).

Dura de 2 a 3 días; sin embargo su duración se puede reducir hasta un día en cerdas primerizas (37). Esta fase comienza con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior, por lo que las concentraciones de progesterona disminuyen. Aquí aumenta la concentración de estradiol e inhibina secretados por los folículos que comenzaron su desarrollo durante el diestro (36).

Se lleva a cabo el proceso de crecimiento y maduración folicular (2,8,30). Durante la proliferación folicular, existe un continuo crecimiento y atresia dentro de un grupo de folículos, sin embargo, es más grande el número de folículos involucionan que el de los destinados a la ovulación (8,28). En esta fase, los folículos en desarrollo comienzan a producir cantidades crecientes de estrógenos (8,28,30,36).

Esta etapa se caracteriza por enrojecimiento y tumefacción de los labios vulvares, así como por la alteración en el comportamiento de la cerda, que se observa inquieta y deseosa de montar otras cerdas (28,30,36). Los ovarios se encuentran grandes, con hiperemia presentan de 10 a 25 folículos de 8mm acompañados de cuerpos albicans de 3 a 5 mm de color crema amarillento (37).

6.2 Estro

Es la etapa de receptividad sexual o calor donde la hembra busca activamente al macho, acepta la monta y el apareamiento (27,36).

Las cerdas en celo se manifiestan nerviosas e inquietas, existiendo una notable reducción del apetito, suele observarse salivación y vocalización, una vez avanzado el celo es común que monten al resto de las hembras del corral. La vulva y vestíbulo vaginal se tornan tumefactos y enrojecidos. De todos los síntomas de celo en las cerdas el más importante es el denominado reflejo de inmovilidad o lordosis (1, 3, 7, 8,22).

Durante esta etapa ocurre la maduración final de los folículos (5,6,28,36), los cuales alcanzan un máximo nivel esteroideogénico y estimulan al hipotálamo para que produzca un pico de secreción de GnRH, que a su vez provoca una descarga hipofisaria de LH, hormona responsable del desencadenamiento de la ovulación y de la formación del cuerpo lúteo (8,36).

La duración de esta etapa es de 2 a 3 días. En la cerda primeriza el estro tiende a ser más corto y existen diferencias entre razas y épocas del año (38).

Existen ovarios con folículos de 8 a 12 mm prominentes turgentes que presentan reticulado vascular fino en la superficie, su pared es transparente y deja ver un líquido color pajizo (6,37).

6.3 Ovulación

En la cerda la ovulación ocurre de forma espontánea, se produce entre las 36 a 40 horas después de comenzado el estro (28,36). La cerda puede producir de 10 a 30 óvulos durante un mismo estro, la ovulación no ocurre de forma repentina, si no de manera gradual (9). La vida de los óvulos es de 6 a 8 horas después del momento de la ovulación y alcanzan el sitio de fertilización en dos horas (36).

6.4 Metaestro

Esta etapa comienza cuando ha terminado la receptividad sexual. Corresponde al periodo de transición entre la predominancia esteroidogénica y el incremento en las concentraciones de progesterona (27,36). El estradiol y la inhibina disminuyen súbitamente después de la ovulación, por lo que incrementa FSH y causa el reclutamiento folicular (36). Dura dos días aproximadamente y se caracteriza por la presencia de cuerpos hemorrágicos, a partir de los cuales se comienzan a formar los cuerpos lúteos (38).

Al inicio del metaestro en el ovario se pueden encontrar folículos a punto de ovular y cuerpos hemorrágicos recién formados, presentan un aspecto colapsado, forma cónica y color rojo oscuro. Al finalizar esta etapa podemos observar cuerpos hemorrágicos voluminosos, color semejante al hígado (6,37).

6.5 Diestro

La duración de esta fase es aproximadamente de 14 días (36). En este lapso bajo el estímulo de la hormona LH, el cuerpo lúteo se reorganiza hasta alcanzar su máximo desarrollo. Simultáneamente, las concentraciones de progesterona

comienzan aumentar hasta alcanzar su máximo nivel y permanecen funcionales hasta el final de la gestación (38).

Si no ha ocurrido la concepción, el cuerpo lúteo es destruido al final del diestro por acción de prostaglandina f2alfa de origen uterino (36).

Al inicio de esta etapa se puede observar cuerpos hemorrágicos de aspecto carnosos color púrpura brillante, con superficie vascularizada, sin punto de ovulación, coágulo pequeño y escaso líquido amarillento al centro. Posteriormente se observan cuerpos lúteos de color rosa pálido y sin vascularización, durante esta fase el ovario presenta su tamaño mínimo, y finalmente habrá cuerpos albicans de color crema (6,37).

7. Hormonas que participan en el ciclo estral

7.1 GnRH

Es una hormona liberada por el hipotálamo cuyo centro de acción es la hipófisis (8,9,11). EL factor liberador de gonadotropinas como su nombre lo dice controla la liberación de FSH y LH (8,9,11,24), en la hembra es secretado en forma en pulsos, cuya frecuencia puede variar (36,39,40). Dependiendo de la frecuencia de esta secreción se produce un mayor o menor desarrollo folicular (6), adicionalmente se produce la secreción de un pico preovulatorio de GnRH, el cual es inducido por los estrógenos provenientes de los folículos maduros resultando en la secreción de un pico preovulatorio de LH (1, 3, 5,26).

Esta hormona actúa principalmente a nivel adenohipofisario (36).

7.2 Gonadotropinas

Estas hormonas tienen la función principal de estimular el funcionamiento de las gónadas y son hormonas hipofisarias reguladas por los factores hipotalámicos (40,41). En la hembra las gonadotropinas producen de manera secuencial, el crecimiento folicular, la maduración de los ovocitos, la secreción de estrógenos, la ovulación, el desarrollo del cuerpo lúteo y la secreción de progesterona. Durante la mayor parte del ciclo las gonadotropinas son secretada en forma tónica, en esta fase la LH actúa exclusivamente sobre las células de la teca interna de folículo ovárico, en las que estimula la producción de andrógenos (4,8), mientras que FSH es usada en las células de la granulosa para transformar andrógenos a estrógenos (1, 3, 10,27).

Los estrógenos producidos por el folículo, actuando en conjunto con FSH, promueven el desarrollo del propio folículo (8,36,40), estimulando la mitosis de las células de la granulosa y la secreción de líquido folicular. Además FSH estimula en el folículo la secreción de inhibina, esta retroalimenta negativamente a hipófisis por lo que inhibe la secreción de FSH. Sin embargo el desarrollo puede continuar pues han aparecido receptores para LH en las células de la granulosa, la cual se encargará de estimular la maduración final del folículo (28,36,40).

Conforme los estrógenos son producidos en cantidades mayores, provocan un pico de GnRH, que a su vez induce la formación de un pico preovulatorio de LH y como consecuencia ocurre la ovulación (5,36,41), adicionalmente comienza un proceso de luteinización en las células foliculares. Después de la ovulación se

mantiene una secreción tónica de pequeños pulsos de LH que estimulan la formación del cuerpo lúteo (5,8,36).

7.3 Estrógenos

Los estrógenos son producidos por las células de la granulosa del folículo ovárico (5) a partir de andrógenos producidos previamente por las células de la teca interna (28,36).

Gran parte de los efectos de los estrógenos están encaminados a lograr la concepción ya que tienen efectos físicos y conductuales destinados a atraer al macho. También promueven la conducta de receptividad sexual necesaria para permitir la cópula. Además preparan a los genitales para la cópula y el transporte exitoso de espermatozoides (8,28,36). Los estrógenos inducen el engrosamiento del epitelio vaginal, aumenta las defensas a nivel genital, producción de moco cervical, la apertura del cérvix e incrementan las contracciones uterinas (8,36). Por otro lado también estimulan la foliculogénesis y son esenciales para desencadenar el pico preovulatorio de LH (5,8,36).

7.4 Progesterona

La progesterona es producida principalmente por las células del cuerpo lúteo, aunque puede ser producida por la placenta de algunas especies. Esta hormona actúa de forma sinérgica con los estrógenos en algunas funciones, como el crecimiento del epitelio glandular, útero y glándula mamaria (6,11,36). La progesterona es un factor de primera necesidad para el mantenimiento de la gestación (13) ya que inhibe la conducta sexual, inhibe las contracciones uterinas,

provoca el cierre del cérvix, estimula a las glándulas endometriales a secretar leche uterina o histotrofo y retroalimenta negativamente la secreción de GnRH y gonadotropinas causan una inhibición en el desarrollo folicular y la ovulación (3, 5,7).

7.5 Andrógenos

Los andrógenos son hormonas sexuales masculinas y corresponden a la testosterona, la androsterona y la androstendiona (8). Los andrógenos son producidos por las células de la teca interna, precursores de los estrógenos (36).

7.6 Inhibina

Es una hormona de naturaleza glicoproteica no esteroidea (8) producida por las células de la granulosa, la secreción de esta hormona es estimulada por la FSH (27,36). Tiene como principal efecto inhibir la secreción de FSH a nivel hipofisiario (8,15,27,36). De esta forma constituye un mecanismo de retroalimentación negativa específica sobre la acción de FSH (27,36).

7.7 Prostaglandinas

La prostaglandina es de origen uterino y tiene como principal función la regresión del cuerpo lúteo (5,6,36).

8. Citología vaginal exfoliativa

La citología estudia las células sin importar los patrones arquitectónicos de los tejidos originarios de las células que se examinan. Los aparatos y sistemas anatómicos frecuentemente evaluados por la citología son: el nervioso, hemolinfático, tegumento, digestivo, urogenital, respiratorio y piel. Las técnicas

citológicas son útiles para la evaluación del aparato reproductor del macho y la hembra. Su utilidad no solo se limita al diagnóstico de enfermedades ya que tiene valor significativo en la determinación de potencial reproductor del macho (evaluación de semen) y estadio del ciclo estral en perros y gatos (11,19).

La mucosa vaginal participa en las variaciones cíclicas del tracto genital. Se expresan fenómenos de reconstrucción morfológica a nivel del epitelio, y con base en las características morfológicas celulares es posible identificar fácilmente cambios en un frotis vaginal (5,42,43).

La citología vaginal se utiliza en la mayoría de las especies como un método de diagnóstico en enfermedades vaginales, uterinas o bien para determinar etapas del ciclo estral o gestación (42–44).

El examen citológico para determinar el estado reproductivo en ciertos animales se basa en el estado de maduración que las células del epitelio vaginal presentan a través del proceso exfoliativo (5). También tiene efecto la influencia de hormonas ováricas sobre el epitelio vaginal ya que ocasiona cambios citológicos característicos que permiten, en la mayoría de los casos determinar la etapa del ciclo en la que se encuentra la hembra (44).

Las células que forman el epitelio vaginal estratificado plano sin queratina de la membrana basal hacia la superficie son las siguientes:

8.1 Basales

Son las más pequeñas que se observan en el epitelio vaginal (45). Son de forma esférica u oval de tamaño uniforme (43), mide de 5 a 12 micras de diámetro, su núcleo es relativamente grande ocupando casi todo el citoplasma, es redondo central, hipercromático con cromatina vesicular basofílico en grumos y eventualmente se observan nucléolos (5).

8.2 Células intermedias

Tienen forma ovalada o poligonal (45). Su tamaño depende del grado de maduración y miden de 20 a 40 micras de diámetro, son redondas o poligonales, tienen contornos bien definidos, su citoplasma es grande y núcleo vesiculoso, redondo u oval con una definida envoltura nuclear (5,43).

8.3 Células superficiales

Son grandes, planas de forma poligonal, (45) miden de 40 a 80 micras de diámetro, poseen un citoplasma transparente y un núcleo picnótico pequeño, con la técnica de Papanicolaou el citoplasma se colorea en rosa. El núcleo presenta cromatina condensada y un diámetro no mayor a 6 micras. Este tipo de células representa la última fase de maduración del epitelio escamoso (38).

8.4 Escamas

Son enucleadas, estas se observan en gran cantidad durante el estro debido a la maduración del epitelio vaginal (5,43).

De acuerdo a la etapa de ciclo estral en que se encuentren las hembras la agrupación, el número, la forma y la coloración de las células varían, por lo que es posible determinar en qué etapa se encuentran (5).

9. Histología

La anatomía suele considerarse una rama de la ciencia biomédica, relacionada con el estudio de las estructuras internas y externas de un organismo. No obstante que se considera exclusivamente descriptiva, sus objetivos son múltiples. En ella son fundamentales las descripciones de la morfología estructural básica, así como la comprensión de los mecanismos y las relaciones funcionales. Con fines didácticos, se acostumbra definir a la anatomía macroscópica que incluye datos estructurales que se estudian por visualización directa, por palpación o disección, en tanto a la histología o anatomía microscópica, estudia las estructuras que no se observan a simple vista (10, 11,15).

Las células y los tejidos son difíciles de examinar al microscopio porque son relativamente gruesas y transparentes, por su naturaleza los constituyentes celulares son difíciles de identificarse y diferenciarse en forma adecuada, estos problemas disminuyen cuando se hacen cortes delgados de los tejidos, se tiñen y se observan. Para lograrlo se necesita realizar un proceso extenso en los tejidos (11,46).

Para el examen microscópico los tejidos y las células se someten al proceso de fijación para con ello reducir las alteraciones de la morfología in vivo. El procesamiento del tejido termina con su inclusión en un material que facilite su

corte, aunque existen varias técnicas de inclusión, la más usada es la parafina (11).

9.1 Histología del aparato reproductor

El ovario está cubierto por un epitelio de superficie, en los primeros estadios de su desarrollo el epitelio es cuboidal. Con el tiempo este cambia a escamoso (11,20). En la mayoría de las especies los ovarios se componen, principalmente, de dos tipos de tejido: el más profundo, la médula es la porción vascular del ovario y está constituida por tejido conjuntivo laxo areolar (20,21), mientras que la corteza que protege y cubre a la médula, se compone a su vez de tres zonas: la primera es propiamente la corteza la porción parenquimatosa del ovario (7,20), en ésta suceden el desarrollo folicular y la formación de los demás elementos que caracterizan al ovario: el cuerpo hemorrágico, el cuerpo lúteo y el cuerpo albicans (4) además se puede observar tejido conjuntivo laxo (20). Por otra parte, bajo el epitelio de revestimiento se observa la túnica albugínea, una capa densa de tejido conectivo que se ve interrumpida cuando se lleva a cabo el crecimiento folicular y la ovulación (13,20). Por último, se tiene al tejido epitelial, conocido también como epitelio germinal (13).

El oviducto está conformado por tres capas histológicas: serosa, muscular y mucosa, esta última compuesta de una serie de pliegues (primarios, secundarios y terciarios), los cuales ocupan casi la totalidad de la luz, esto hace que el contacto con el ovocito sea muy estrecho (4). Esta capa está formada de células epiteliales cilíndricas, células ciliadas y células no ciliadas, que facilitan el paso del ovocito

por su trayecto hasta el encuentro del óvulo con el espermatozoide. Las células ciliadas de los oviductos se mueven dependiendo de la actividad hormonal existente, su mayor movimiento sucede durante la ovulación. Otra función de estas células es impedir la implantación de los óvulos fecundados en esta zona. Por otro lado, en el oviducto existen células secretoras no ciliadas, encargadas de producir el líquido capaz de capacitar e hiperactivar al espermatozoide (11). La musculatura del oviducto comprende dos capas de fibras musculares lisas circulares internas y fibras musculares lisas longitudinales externas (4), las cuales provocan contracciones en el oviducto, ayudando a desnudar al óvulo para la fecundación y su transporte (11).

La serosa es una capa delgada de tejido conectivo cubierta por una capa simple de epitelio plano, se encuentra altamente vascularizada (4).

A nivel tisular el útero se compone de tres capas distintas: serosa (perimetrio) que puede presentar gran número de vasos linfáticos, muscular (miometrio) y mucosa (endometrio); esta última se compone de un epitelio columnar simple parcialmente ciliado (11), además de una lámina propia que contiene glándulas tubulares simples rodeadas de epitelio columnar estratificado. Las glándulas del endometrio se encargan de producir la llamada leche uterina, que tiene como función principal nutrir a los embriones hasta el momento de la implantación. El miometrio se compone de tres capas musculares: una externa longitudinal débil, otra interna circular más gruesa y, finalmente, una transversal. El útero tiene su origen embrionario a partir de los conductos paramesonéfricos, que se fusionan entre sí

en su parte caudal dando lugar al cuerpo, que, a su vez, se une al seno urogenital, lo que origina el cuello del útero (cérvix) (13).

A su vez, la vagina se compone de tres capas: serosa, muscular y mucosa; esta última capa está compuesta por epitelio escamoso estratificado, el que tiene la capacidad de cambiar de grosor y su tipo celular, dependiendo de la etapa del ciclo estral en que se encuentre la cerda, debido a la alta sensibilidad a las hormonas esteroideas que presentan estas células (4). Esto permite determinar la etapa del ciclo que cursa la cerda, a través de la observación microscópica de las células del epitelio vaginal, mediante una sencilla citología vaginal que puede realizarse con un hisopo o una pequeña espátula. La porción muscular de la vagina se compone de una capa de músculo liso grueso circular y otra capa de músculo delgado longitudinal; esta última rica en vasos sanguíneos, paquetes nerviosos, grupos de células nerviosas y tejido conectivo laxo y denso (13).

IV. Justificación

Uno de los principales desafíos de los sistemas de producción porcina en la actualidad, es mantener los niveles de productividad en forma constante, lo cual recae en el desempeño reproductivo de los animales (47). La correcta determinación de los posibles motivos de descarte y monitoreo de las hembras reproductoras, posibilita maximizar el potencial de la unidad de producción.

Dentro de los motivos de descarte, las fallas reproductivas constituyen la razón más importante y son debidas, principalmente, a problemas de origen infeccioso, mal manejo, nutricionales o factores ambientales (48).

En las cerdas, la disminución de la fertilidad, fecundidad y prolificidad se debe principalmente a fallos en el ciclo estral, producidos por una disfunción ovárica o del eje hipófisis/hipotálamo, que afecta la ovulación y producción hormonal (33).

A partir de la exploración de sistema reproductor de las cerdas, más específicamente del ovario, es posible determinar la de actividad cíclica así como problemas reproductivos que puedan ser motivo de descarte. Por ello es indispensable conocer la anatomía y particularmente la histología del aparato reproductor de la cerda para así lograr la identificación de estructuras en cualquier momento del ciclo estral (49).

La evaluación del tracto reproductor de las cerdas es una fuente importante de información para el médico veterinario y el productor (47).

V. Hipótesis

El ovario presentará cambios macroscópicos e histológicos significativos en las diferentes etapas además las características morfométricas serán diferentes a medida que avanza el ciclo estral.

VI. Objetivos

Objetivo General

Conocer las características morfométricas de los ovarios en las diferentes etapas del ciclo estral.

Objetivos específicos

Describir los cambios macroscópicos que ocurren en el ovario durante las diferentes etapas del ciclo estral en cerdas nulíparas de segundo celo.

Determinar cuáles son los cambios histológicos que ocurren en el ovario durante las diferentes etapas del ciclo estral en cerdas nulíparas de segundo celo.

VII. Material y métodos

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) ubicado en el Km. 2 de la carretera Jilotepec-Corrales en el Municipio de Jilotepec, Estado de México, el cual se encuentra en los 99° 31' 45" de longitud oeste del meridiano de Greenwich, su latitud norte es de 19° 57' 13", y a una altura de 2.250 metros sobre el nivel del mar.

Se utilizaron 12 cerdas comerciales (híbridas) prepúberes, con un peso promedio de 70 Kg y una edad aproximada de 120 días, de línea terminal, se mantuvieron en corrales con un máximo de cinco animales, con piso de cemento y bebedero de chupón, según la norma: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, (NOM-062-ZOO-1999) (50), se les realizó la detección del primer celo por la mañana y por la tarde.

Número de protocolo autorizado por CICUA: 598

Se registró el primer estro de las hembras para así poder programar la fecha de su siguiente estro, el diseño experimental se muestra en la imagen 18.

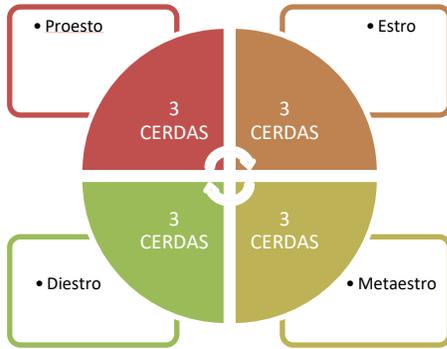


Figura 18. Planeación del uso de animales. (Calles M., 2019)

El proyecto incluyó las siguientes etapas:

- 1) Obtención de los parámetros de reproductivos desde el momento que las cerdas se seleccionan, hasta el momento de su matanza, los cuales fueron: Edad (semanas), Peso (kg), Grasa Dorsal (mm), días a la presentación de cada del ciclo estral, los cuales se presentan la estadística descriptiva.
- 2) Para determinar la etapa del ciclo estral en la que se encuentran las cerdas, se procedió a dar seguimiento a partir de que presentaron la pubertad, por los días establecidos por la literatura (2,6), y para confirmarlo se realizaron dos citologías vaginal por cerda, durante dos días anteriores a la esperada bajo la técnica establecida (44,51) como se muestra en la figura 19, estos frotis se fijaron en alcohol al 96% para realizar la tinción de papanicolaou y al aire para realizar tinción de HE.



Figura 19. Organización de eventos. (Calles M., 2019).

3) Caracterización macroscópica y microscópica del ciclo estral de la cerda en su primer ciclo estral.

Para realizar esta fase fue necesario realizar la matanza por el método de electroinsensibilización y desangrado por corte de vena cava anterior según la norma: Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres (NOM-033-ZOO-2014),(52),de las cerdas previamente caracterizadas por cada etapa del ciclo estral (3 por cada etapa). En el momento de la matanza se procedió al estudio morfométrico de los 12 cerdas, (24 ovarios (12 derechos, 12 izquierdos)) 3 por etapa del ciclo estral, en la cual se realizó y se procedió a realizar un análisis descriptivo de las estructuras encontradas, área del ovario (cm), número de folículos presentes y tamaño de los mismos y posteriormente se tomó evidencia fotográfica.

Para la evaluación microscópica se tomaron muestras de 12 de los ovarios, estos fueron procesados de acuerdo a la técnica histológica de Gartner L (,1992):

obtención del tejido, fijación, inclusión, corte, tinción, montaje y observación, para lo cual fueron fijados en paraformaldehído al 4%, después fueron procesados en parafina y teñidos mediante la tinción de hematoxilina-eosina, para posteriormente observar al microscopio e identificar las estructuras histológicas.

Se realizó un análisis descriptivo de los cortes de los ovarios en las diferentes etapas.

Detección de celo

Para el proyecto se realizó la detección de estros como referencia del inicio de la pubertad y la determinación de la etapa estral en la que se realizó la toma de muestras. Dicho procedimiento se llevó a cabo de manera convencional.

Los signos de estro en la cerda son: inquietud, búsqueda del macho, hiperemia, edema vulvar, y puede o no montar a sus compañeras de corral;(34) pero el signo más importante que una cerda está en estro es que acepte la monta por el macho, o bien que muestre la reacción de inmovilización o lordosis positiva a la prueba de cabalgue (38). Es más efectivo cuando se tiene la presencia de un macho en caso contrario solamente el 50% de las cerdas responden positivamente.

Como es recomendable la detección de estro se realizó dos veces por día, una por la mañana y otra por la tarde (4), para determinar el momento adecuado en la toma de muestras.

Análisis citológico

Para la determinación de la etapa del ciclo estral y su posterior interpretación y relación con la etapa del ciclo estral se utilizó citología vaginal exfoliativa en las cerdas del experimento.

Toma de muestra

Con un hisopo se tomó un raspado de la mucosa vaginal formando un ángulo de 360°, en sentido de las manecillas del reloj (43,45).

El material obtenido se colocó sobre un portaobjetos y se diseminó formando una película delgada para producir una monocapa celular (44).

Fijación

Este proceso se realizó de forma inmediata (45), ya que de esto depende la buena conservación de las células, lo que evitará una mala interpretación de las mismas y permitirá un diagnóstico acertado, el objetivo de este es conservar las características citomorfológicas esenciales. Una vez tomada la muestra se esperó a que esta se hubiera secado y se procedió a fijarla inmediatamente en etanol al 95% (16).

Tinción

Se usaron las tinciones comúnmente usadas en citología que son la tinción de papanicolaou y tinción de Diff-Quik, el primer método de tinción consta de una tinción nuclear y un contraste citoplasmático. Se aplica para el diagnóstico de cambios malignos y tipificación celular.

La tinción de papanicolaou tiene cuatro pasos principales:

- Fijación (realizada al momento de tomar la muestra)
- Tinción del núcleo con la hematoxilina
- Tinción del citoplasma con Orange G y Eosina A
- Aclaramiento

Los pasos de la tinción están entremezclados con soluciones que hidratan, deshidratan y enjuagan las células (51).

La técnica de Diff-Quik, es una técnica de tinción rápida, consiste en tres soluciones: un fijador alcohol metilo, una solución de eosina y una solución de hematoxilina. Las muestras, previamente secadas al aire, se fijan y tiñen por inmersión en las soluciones del kit y se tiñen en 15 segundos.

Variando el número de inmersiones en las soluciones de tinción, se pueden conseguir diferentes grados de sombreado e intensidad (53).

Interpretación de resultados

La explicación fisiológica de los patrones celulares observados se debe a la acción de estradiol y progesterona sobre el epitelio vaginal ya que los primeros causan proliferación, estratificación y cornificación del epitelio vaginal (44). Sin embargo, estos efectos varían dependiendo del estrato celular, por ejemplo en estratos basales causa proliferación celular, y sobre estratos intermedios y lumbinales provoca la queratinización y exfoliación de estas células (11,43).

Por otra parte, la disminución en el tamaño de las células observadas en los patrones de citología, está dada por la progesterona que tiene efectos opuestos a los inducidos por los estrógenos (11,18,43).

- Por lo tanto durante la fase del estro los niveles de estrógenos en sangre son máximos. El epitelio vaginal se cornifica, pudiendo identificarse predominantemente en los frotis vaginales, células cornificadas anucleadas o con núcleo picnótico y citoplasma acidófilo, aisladas o en agregados celulares, que representan los elementos más superficiales del epitelio estratificado plano.
- Luego de la ovulación, con la caída de los niveles de estrógenos en sangre y el aumento de los niveles de progesterona el epitelio vaginal prolifera quedando infiltrado por polimorfonucleares, observándose en la citología exfoliativa células córneas y polimorfonucleares correspondiente al estadio de metaestro y principios de diestro.
- La fase siguiente denominada diestro, es la de mayor duración en el ciclo estral y se encuentra caracterizada por una delgada mucosa vaginal. Los frotis correspondientes muestran una gran cantidad de leucocitos y células epiteliales de tipo basales esféricas, citoplasma basófilo y núcleo con cromatina densa.
- Durante el proestro, cuando el nivel de estrógeno en sangre comienza a elevarse nuevamente, se observa un aumento en el número de capas celulares del epitelio vaginal. La citología exfoliativa característica de este

estadio, presenta células basales e intermedias con núcleo condensado (no picnótico) solitarias o en capas.

Análisis histológico

Obtención de la muestra

Una vez identificada la muestra, se extrajo del organismo con el menor daño posible. Los tejidos vivos son muy frágiles y la morfología se altera cuando se hace un manejo inapropiado (11,46,53). La mayor parte de las células y los tejidos empiezan a degenerar tan pronto como son separados de su microambiente. Estos cambios autolíticos puede ser minimizados, al reducir el tiempo en que el tejido esté expuesto al ambiente (11).

Fijación

En la fijación química se aplican diferentes agentes con la función de detener la vida de las células e impedir las modificaciones postmortem que pueda sufrir la célula (procesos autolíticos), manteniendo la estructura morfológica de células y tejidos sin que ocurran cambios notables en ellos. Esta acción garantiza la integridad de las células y tejidos; se efectúa por mediante agentes químicos denominados fijadores. (12,18,46,54).El fijador usado en este caso fue el formaldehído (11,18).

Una sustancia fijadora para que ejerza de manera eficiente y adecuada sus funciones debe poseer las siguientes condiciones:

- Impedir la aparición de los procesos autolíticos.

- Producir cierta dureza a los tejidos sin que se provoque excesiva retracción o hacerlos quebradizos y friables.
- Debe de ser de fácil manipulación.
- No debe disolver componentes celulares
- Proteger la muestra de agentes bacterianos.
- Que sea fácil de conseguir y que sea barato (11,46,53,54).

Una vez recolectada la muestra de tejido, se colocó de inmediato en el fijador, y se cuidó el tamaño de la muestra para que se cubriera completamente. El tiempo requerido para la fijación completa con formaldehído suele realizarse en 24 horas (11,46,53).

Técnica de inclusión en parafina

Los tejidos fijados adquieren cierta consistencia y dureza, pero no la suficiente para que, de ellos, se obtengan secciones delgadas. Estas secciones, que deben medir milésimas de milímetro (3 a 10 μm), se conseguirán cuando los tejidos se infiltren con sustancias denominadas “de inclusión” y adquieran tal dureza que sometidos al filo de una navaja produzcan secciones, cortes o láminas sumamente delgados y transparentes. Las sustancias de inclusión tienen la propiedad de incorporarse e infiltrarse al interior de las células y tejidos con la finalidad de servirles de soporte. Así los tejidos y la sustancia de inclusión forman un bloque homogéneo en dureza y consistencia, a pesar que sus componentes tuvieron originalmente distinta dureza. Existen una serie de sustancias de inclusión que se han empleado o se utilizan actualmente. Unas son solubles en agua (gelatina,

carbowax, glicol metacrilato) y otras, solubles en solventes orgánicos (parafina, celoidina, resinas epóxicas) (46,54).

Cualquiera que sea el medio de inclusión a emplear es condición indispensable que la muestra a incluir se encuentre embebida en la sustancia que disuelve al medio de inclusión de las muestras (54), éstas se encuentran embebidas en agua o en alcohol, por lo que resulta imposible que se infiltren con parafina, medio de inclusión insoluble en agua y alcohol. Por lo tanto, para que los tejidos puedan ser incluidos en parafina se requiere deshidratarlos e infiltrarlos con el solvente de la sustancia de inclusión. Los pasos a seguir para la inclusión de las muestras en parafina fueron (46,53,54):

Deshidratación, Impregnación en el solvente (a este paso también se le denomina aclaración o diafanización), inclusión y formación del bloque de parafina (11,18,54).

Deshidratación

Significa extraer o remover el agua de los tejidos fijados. La deshidratación debe ser completa porque, de lo contrario, el solvente no actúa de forma adecuada y el bloque de inclusión no alcanza la dureza requerida. Para tal fin se utilizan líquidos deshidratadores en los cuales se sumergen los tejidos. Los deshidratadores más usados son el alcohol etílico, el alcohol isopropílico, el dioxano y el cloroformo (11, 15, 30,32).

Las muestras de ovarios incluidas en parafina, se deshidrataron en baños sucesivos en soluciones de concentración crecientes de alcohol etílico hasta la deshidratación total con alcohol etílico absoluto (11,46).

Diafanización.

Las muestras deshidratadas se encuentran totalmente embebidas en alcohol etílico absoluto; pero la parafina tampoco es soluble en alcohol por lo que es necesario reemplazarlo por sustancias que sean capaces, simultáneamente, de mezclarse con el alcohol y disolver la parafina. Estas se denominan líquidos diafanizadores o intermediarios. Ejemplos: xilol, tolueno, benceno, y el cloroformo. El líquido diafanizador de uso más frecuente es el xilol (54). La diafanización de los tejidos deshidratados se debe a que estas sustancias poseen un alto índice de refracción y al interactuar con los tejidos los vuelven transparentes (12,18,54).

Inclusión y formación del bloque de parafina.

Las parafinas son hidrocarburos saturados provenientes de la destilación del petróleo. Generalmente son sustancias sólidas a temperatura ambiente. Existen diferentes tipos de parafina que se caracterizan por sus puntos de fusión. Estos oscilan entre 40° y 60° C.

La penetración de la parafina al interior de los tejidos se efectúa cuando ésta se encuentre en estado líquido. La parafina reemplazará el xilol de las muestras y se infiltrará al interior de las mismas. Se contendrá a las muestras “bloques” de parafina. El tiempo que permanezcan las muestras dentro de los recipientes de parafina dependerá de la naturaleza del tejido y el tamaño de las muestras (12,18,54).

El bloque de parafina contenía la muestra correctamente orientada para facilitar la obtención de las secciones o “cortes”. El molde se llenó con parafina caliente pura; con una pinza calentada en un mechero se tomó una pieza de tejido y se sumergió al interior del molde, en el que la parafina se comenzaba a solidificar y se le aplicó una leve presión. Después se llenaron los moldes y se dejaron enfriar para que la parafina se solidificará de manera homogénea (11,46,53,54).

Microtomía

Cuando la parafina estaba dura, se sacaron los bloques del molde y se recortaron para exponer el tejido embebido. Se montaron en el micrótopo donde se obtuvieron rebanadas finas de la muestra; las bandas obtenidas se hicieron flotar en agua tibia, lo que ejercía un efecto de planchado para ser extendidos en un portaobjetos; estos se colocaron en una plancha tibia para que el corte se adhiriera mejor al cristal. Las secciones tenían 5 a 7 μm de espesor (10, 11, 15, 3-0,31).

Tinción

El procedimiento de coloración o tinción consiste en que una estructura celular o tisular adquiere específicamente un color bajo la acción de una sustancia colorante. Se considera que una estructura se ha coloreado o teñido cuando al ser lavada con el líquido que disuelve al colorante, no se decolora. El proporcionar color a las estructuras que constituyen un tejido o un órgano se hace con la finalidad de distinguirlas entre sí y facilitar su observación (18,46,54).

Tinción de Hematoxilina -Eosina (HE)

La coloración de hematoxilina - eosina se considera como la técnica de tinción de uso más frecuente en el estudio de células y tejidos, a través del microscopio fotónico. Consiste en la tinción de:

Los núcleos mediante una hematoxilina (básico), previamente oxidada se colorean de azul, azul morado, violeta, pardo oscuro o negro, dependiendo de los agentes oxidantes y mordientes que se utilizaron.

- El citoplasma y material extracelular utilizando la eosina (ácido) que les confiere diversos grados de color rosado (12,18,46,53,54).

Montaje

Concluido el proceso de la tinción de los cortes, éstos se colocaron en condiciones de protección y para poderlos utilizar infinidad de veces sin que se deterioren.

Este procedimiento consistió en colocar encima del corte coloreado y diafanizado una gota de una sustancia adherente, y encima de ellos, una laminilla cubreobjetos, cuidando que no quedaran burbujas de aire entre la resina (18,53,54).

Medición de estructuras

Se realizaron fotografías microscópicas a las diferentes estructuras con una regla la cual nos ayudó a estandarizar una medida, con el programa imageJ J[®]1.52^a(1), se igualó el tamaño de la regla y se procedió a medir las diferentes estructuras.

VIII. Resultados

Los resultados de los parámetros reproductivos Edad (semanas), Peso (kg), Grasa Dorsal (mm), días a la presentación de cada del Ciclo estral, se presentan en el cuadro 1 y las figuras 1, 2, 3, 4, respectivamente.

Cuadro 1. Parámetros reproductivos observados de las 12 cerdas en estudio en la pubertad y en el primer estro o momento de sacrificio.

Cuadro 1.

	Pubertad	Días del ciclo (media \pm DE)			
		Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
Edad (semanas)	24 \pm 2	26 \pm 1.52	28 \pm 3.51	24 \pm 0	26 \pm 2
Peso (kg)	105.5 \pm 8.3	121.2 \pm 12.80	108.6 \pm 10.96	114.6 \pm 11.21	115 \pm 8.48
Grasa Dorsal (mm)	11.8 \pm 1.8	11.5 \pm 1.7	13 \pm 0.5	12.5 \pm 1	10.6 \pm 1.04
Duración ciclo(días)	20.5 \pm 0.7	17-20 18.6 \pm 1.5	21-1 0.6 \pm 0.5	3-5 4 \pm 1	9-12 10 \pm 1.52

Después de analizar los datos para los parámetros edad, peso y grasa dorsal se encontró una distribución normal ($P > 0.05$) en la prueba de normalidad Shapiro wilk, excepto grasa dorsal en proestro, y una homogeneidad de varianzas ($P > 0.05$), además se realizó la prueba de comparaciones múltiples Tukey donde no se encontró diferencia entre grupos ($P > 0.05$) como se muestra en las siguientes figuras.

Figura 20. Peso (Kg) de la cerdas (12) al presentar la pubertad.

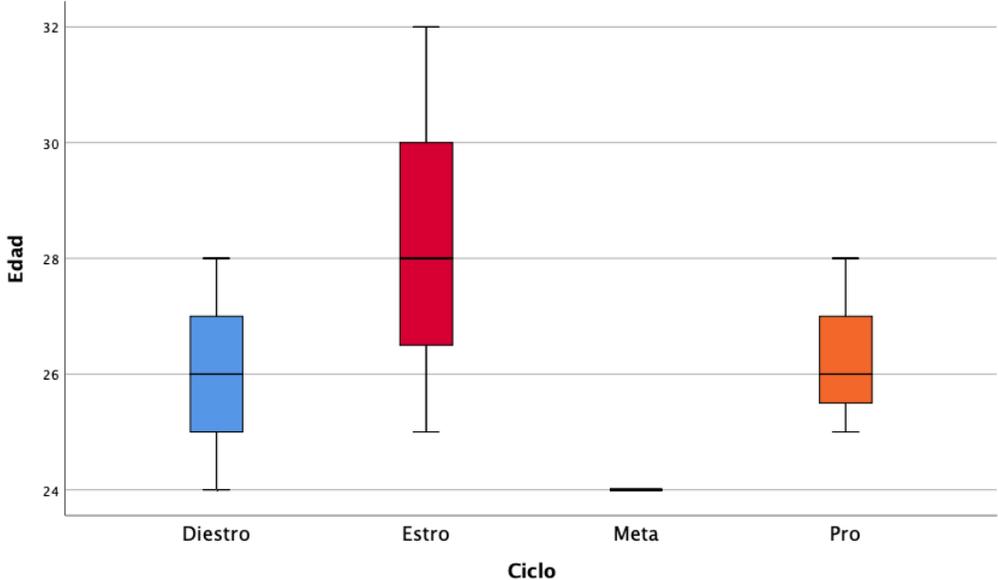


Figura 21. Grasa Dorsal (mm) de las cerdas en la pubertad

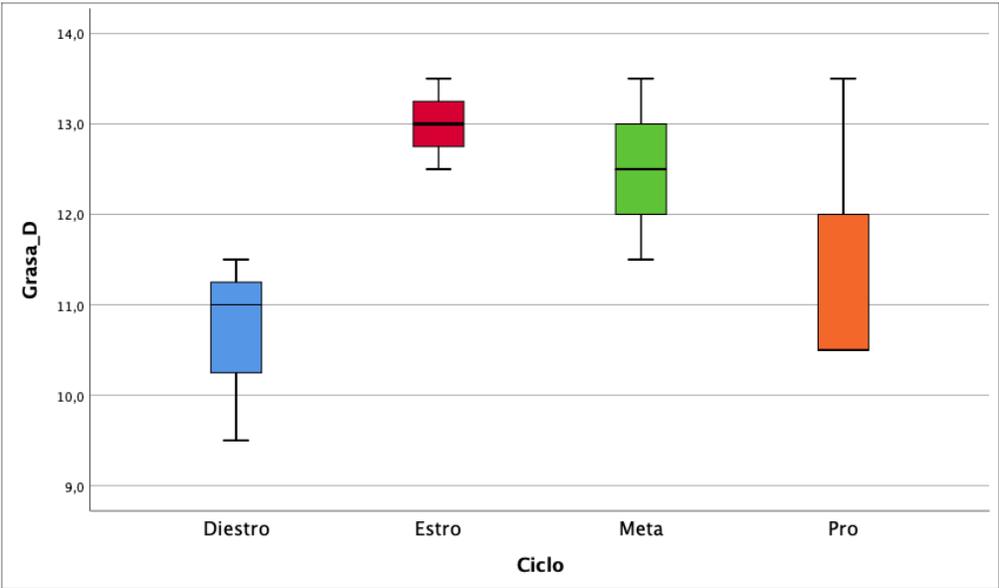


Figura 22. Edad (semanas) que presentaron la pubertad las 12 cerdas.

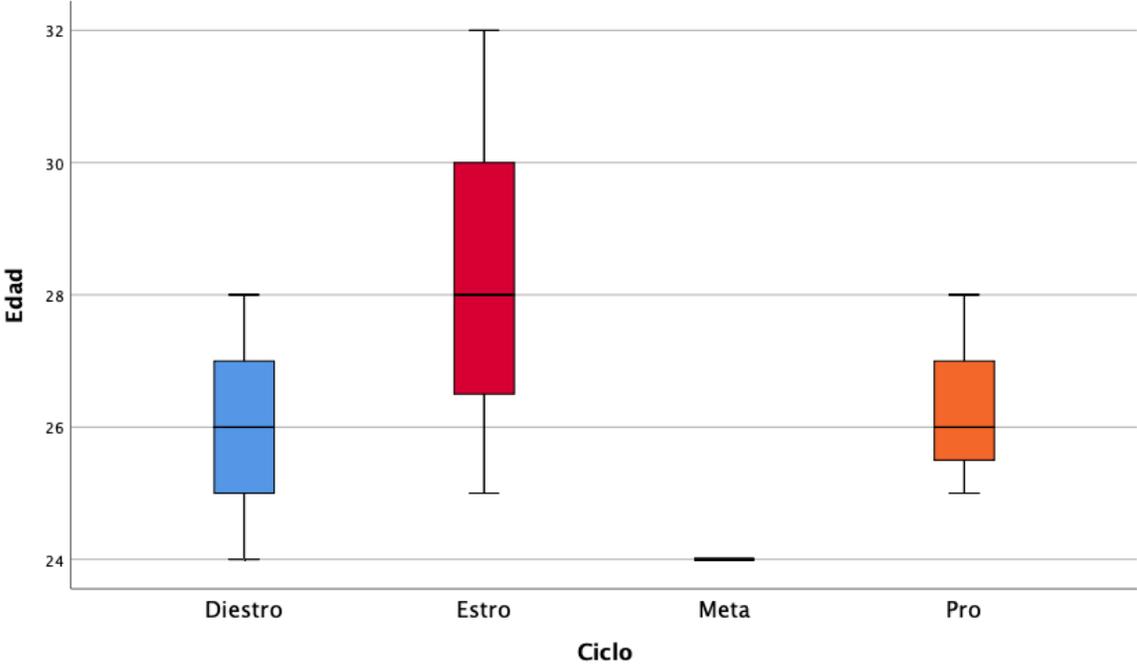
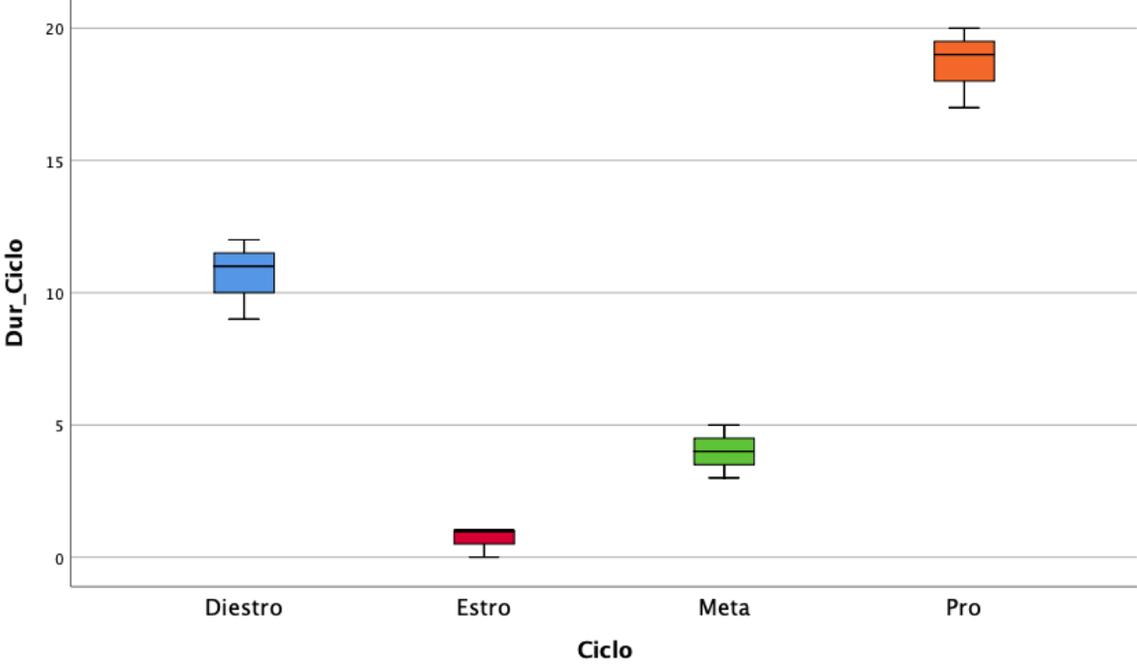


Figura 23. Duración del ciclo estral de las 12 cerdas.



En el Cuadro 2, se puede ver la frecuencia celular en cada etapa del ciclo estral.

Cuadro 2. Células observadas por etapa de ciclo estral, (n=3 por etapa) de cerdas en su primer ciclo estral.

Cuadro 2.

	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
C. basales	+-	-	++	+++
C. intermedias	-	+-	+++	++
C. superficiales	+++	++	+-	-
C. Escamosas	+-	+++	-	--
Neutrófilos	+-	-	++	+++

+++ Tipo de células que predominan.

++ Tipo de células encontradas en gran cantidad.

+- Tipo de células encontradas de forma regular.

-- Tipo de células encontradas en poca cantidad.

--- Tipo de células no encontradas.

Estudio morfométrico

Como se puede observar en el cuadro 3, el tamaño de los ovarios por etapa de ciclo estral, mientras que en el cuadro 4, se observan las estructuras foliculares encontradas.

Cuadro 3. Dimensión de los ovarios (3 por etapa del ciclo estral de la cerda del primer ciclo estral post pubertad).

Cuadro 3.

Etapa del ciclo Estral	Ovario Derecho (cm ²)			Ovario Izquierdo (cm ²)		
	Min	Max	Media± DE	Min	Max	Media ±DE
Metaestro	11.2	15.4	13.06 ± 2.13	9.8	13.7	11.63 ±11.51
Diestro	10.9	16.4	13.76 ± 2.75	8.7	18.4	14.43 ± 5.08
Proestro	8.5	14.1	11.16 ± 2.80	8.4	11.7	10.3 ± 1.70
Estro	10.9	13.3	11.76 ± 1.33	8.4	12.4	10.96 ± 2.22

Después de analizar los datos del área ovárica derecha e izquierda se encontró una distribución normal ($P > 0.05$) en la prueba de normalidad Shapiro wilk y una homogeneidad de varianzas ($P > 0.05$), además se realizó la prueba de comparaciones múltiples Tukey donde no se encontró diferencia entre grupos ($P > 0.05$).

Cuadro 4. Estructuras foliculares encontradas, (3 por etapa del ciclo estral de la cerda del primer ciclo estral post pubertad).

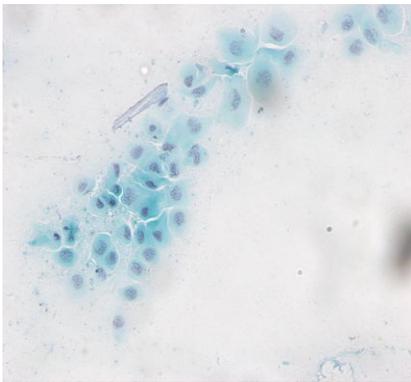
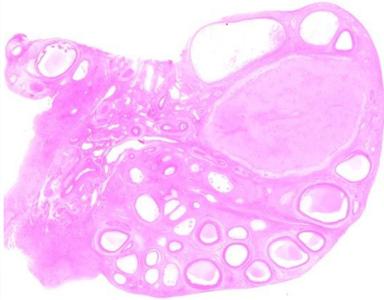
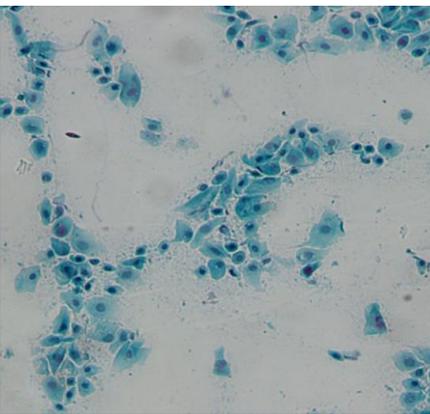
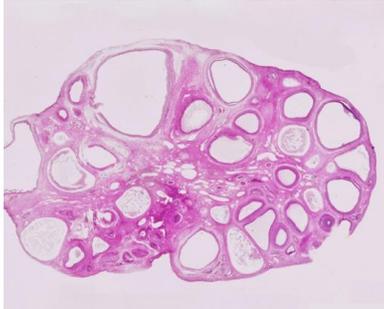
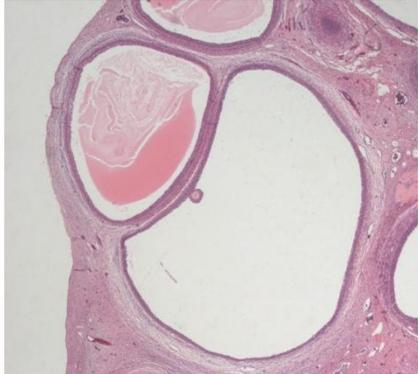
Cuadro 4.

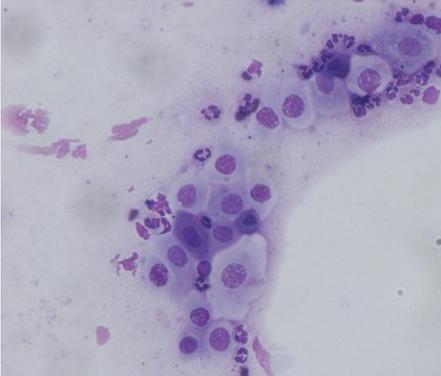
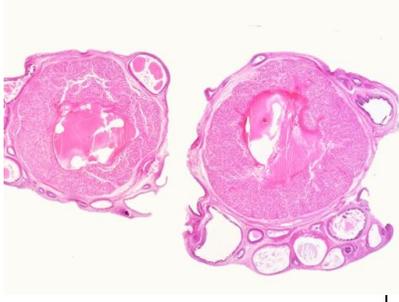
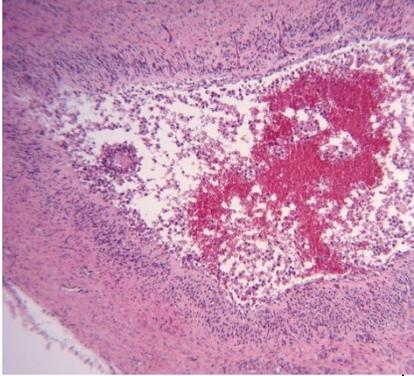
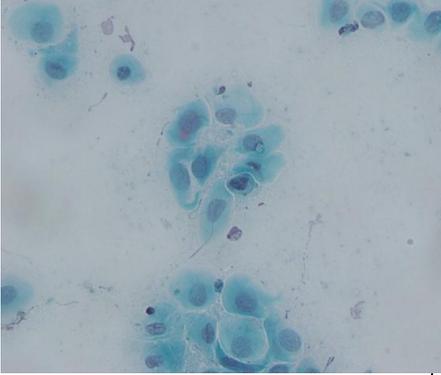
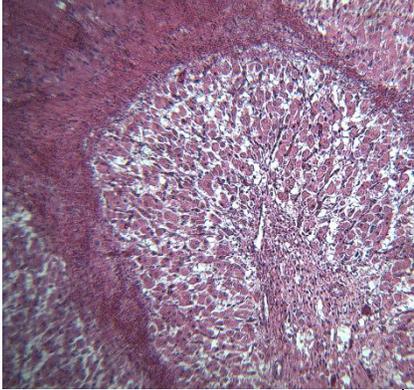
	Diámetro medio \pm DE (mm)	Días del ciclo			
		Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
Folículo primordial	0.545 \pm 0.37				
Folículos primarios	0.983 \pm 0.553	9	14	5	4
Folículos Secundarios	3.954 \pm 0.666	4	10	3	5
Folículos terciarios	5.172 \pm 2.111	33	40	8	16
Cuerpo hemorrágico	-	0.2	0	3	1
Cuerpo lúteo	-	1	2	1	3
Oocitos	0.386 \pm 0.058	-	-	-	-

Al analizar los datos diámetro folicular se encontró una distribución normal ($P > 0.05$) para los folículos terciario y secundario además de los oocitos en la prueba de normalidad Shapiro wilk, además se realizó la prueba Kruskal - wallis para

muestras independientes donde se encontró que no hay una diferencia estadística entre grupos con una significancia de ($P > 0.05$).

Figura 24. Caracterización por etapa del ciclo estral.

	Citología	Macro	Micro panorámico	Micro estructuras
Proestro				
	a.	b.	c.	d.
Estro				
	e.	f.	g.	h.

Metaestro				
	i.	j.	k.	l.
Diestro				
	m.	n.	ñ.	o.

Como se muestra en la figura 24, se pueden observar las imágenes macro y micro de cada una de las etapas del ciclo estral de la cerda.

Proestro:

En la figura 24-a se muestra una citología de una cerda en proestro y se observa como el grosor del epitelio comienza a aumentar por lo que hay mayor cantidad de células superficiales y comienzan a aparecer las células escamosas y algunos neutrófilos.

En la figura 24-b se observan los ovarios macroscópicamente en donde las hembras presentaban folículos terciarios con un rango de 8 a 10 mm de diámetro, además de algunos folículos secundarios y primarios, atrésicos y presencia de cuerpos albicans de color crema amarillento o blanco de aproximadamente 4 a 6 mm.

En las figuras 24-c y d se muestra una vista microscópica del ovario de una hembra en proestro donde las estructuras predominantes son folículos terciarios, además se puede observar la corteza y la médula.

Estro:

En la figura 24-e se muestra una citología de una cerda en estro y se observa que el grosor de las capas del epitelio alcanza su nivel máximo, encontrando principalmente células escamosas y algunas células superficiales.

En la figura 24-f se observan los ovarios macroscópicamente con presencia de folículos terciarios prominentes y turgentes de pared transparente que deja ver un fluido pajizo, su tamaño oscila entre los 7 y 15 mm y cuerpos albicans del ciclo

pasado de aproximadamente 3 a 5 mm, además de algunos folículos secundarios, primarios y atrésicos.

En las figuras 24-g y h se muestra una vista microscópica del ovario de una hembra en estro donde las estructuras predominantes son folículos maduros, además se puede observar la corteza y la médula.

Metaestro:

En la figura 24-i se muestra una citología de una cerda en metaestro donde se observa que el grosor de las capas comienza a disminuir siendo más común encontrar células intermedias y algunas superficiales, además se comienzan a encontrar algunos neutrófilos.

En la figura 24-j se observan los ovarios macroscópicamente, las hembras presentaron gran cantidad folículos primarios o atrésicos menores a 4 mm y folículos secundarios, además de cuerpos hemorrágicos en diferentes estadios como los recién ovulados que están organizando el coágulo que ha quedado tras la ruptura de los folículos, con aspecto voluminoso y de color semejante al hígado o color rojo oscuro de aproximadamente 8 a 14 mm.

En las figuras 24-k y l se muestra una vista microscópica del ovario de una hembra en metaestro donde las estructuras predominantes son cuerpos hemorrágicos y algunos folículos terciarios.

Diestro:

En la figura 24-m se muestra una citología de una cerda en metaestro donde se observa como el número de capas epiteliales declina encontrando células basales y algunas células intermedias además es común encontrar la presencia de cistos, y gran cantidad de neutrófilos que disminuyen a medida que el diestro avanza.

En la figura 24-n se observan los ovarios macroscópicamente con presencia de múltiples cuerpos lúteos de 8 a 15 mm color rosa, vascularizados o rosa pálido casi sin vascularización, folículos secundarios y algunos primarios.

En las figuras 24-ñ y o se muestra una vista microscópica del ovario de una hembra en diestro donde las estructuras predominantes son cuerpos lúteos y algunos folículos pequeños.

IX. Discusión

Si bien en muchas granjas no se considera importante la presentación de la pubertad y se prefiere dar énfasis a la edad a primer servicio, la primera es un indicador de futuro éxito reproductivo. Se dice que en promedio las hembras alcanzan la pubertad entre los 6 y 7 meses de vida, pero este es un rango muy amplio y poco preciso, y en muchos casos individuales no corresponde con la realidad (55). De acuerdo al estudio realizado por Tummaruk (56) y Tummaruk (47) las características de la mayoría de las hembras al alcanzar la pubertad son; a las 27 semanas de edad con un rango de peso de entre 100 a 109 kg y un espesor de grasa dorsal de 13 a 15 mm, contrario a esto nuestro estudio reveló que la edad al primer celo en la mayoría de las hembras fue de 22 a 23 semanas, pero concuerda en el rango de peso y los mm grasa dorsal que fueron de 13 a 14 mm.

Autores como Hirano y Kimura (57) han reportado que las medidas ováricas han variado entre 5 y 8 cm, dependiendo de la fase del ciclo estral en que se encuentre la yegua. En el caso de la cerda, no se pudo hacer un seguimiento del tamaño del ovario en cada una de las etapas de un mismo individuo ya que para el trabajo fue necesario su sacrificio. Sin embargo, haciendo una comparación entre las áreas de los ovarios, de las diferentes cerdas en cada etapa, no se encontró que el tamaño del ovario fuera más grande o más pequeño en algún momento específico del ciclo ya que esto dependía de cada individuo.

Autores como Fuentes (38) afirman que la duración del ciclo estral es de un rango de 18 a 24 días, en donde la duración de cada etapa es de: proestro 2 a 3

días, estro de 2 a 3 días, metaestro 7 días y diestro 9 días, contrario a esto nuestro estudio arroja resultados ligeramente distintos donde el rango de duración del ciclo fue de 19 a 22 días y la duración de cada etapa fue de: proestro 2 a 4 días, estro de 2 a 3 días, metaestro 1 a 3 días y diestro 13 a 14 días, estos resultados guardan mayor relación con lo que sostienen Martínez (2) y Falceto (27) quienes dicen que la duración del ciclo es de 18 a 24 días y las diferentes etapas: proestro 2 a 3 días, estro de 2 a 3 días, metaestro 1 a 2 días y diestro 13 días.

Signoret (58) afirma que solo el 48% de las hembras en estro manifiestan el reflejo de la inmovilidad en ausencia del verraco, pero si el estímulo es provocado por el macho, el 100% de las cerdas en celo manifiestan este signo, es muy aconsejable la utilización de machos ya que juegan un importante papel en la conducta sexual de la hembras, en cuanto a las cerdas utilizadas para este estudio pudimos observar que la presencia del macho era esencial para la correcta detección de los celos.

Descripción macroscópica

McDonald (38) señala que el primer día del celo en los ovarios de las cerdas pueden ser observados numerosos folículos, sobre todo en el izquierdo. En el estudio se observaron resultados similares ya que aumentó el número de folículos grandes previo a la ovulación, sin embargo no en todos los casos se observó una diferencia en el tamaño de los ovarios izquierdo y derecho.

En este trabajo también se estudió la dinámica folicular en cerdas nulíparas, a través de la observación macroscópica de los folículos, después de la ovulación y hacia finales de la fase lútea fueron encontrados folículos pequeños y medianos en su mayoría de 3 a 6 mm. Estos datos coinciden con lo reportado por Clark *et al* (59) y por Yen *et al* (60), quienes describieron que los folículos de tamaño pequeño y mediano (< 6.5 mm) rápidamente aparecen luego de la ovulación e incrementan el número durante la fase lútea, mientras que, los folículos grandes están ausentes.

Descripción microscópica

De acuerdo a Dellmann (16) el ovario está rodeado por epitelio de superficie simple de células cúbicas o planas además la túnica albugínea es una gruesa capa de tejido conjuntivo denso y la médula del ovario consta de tejido conjuntivo laxo.

Por otra parte Williams afirma que los folículos primordiales se localizan por debajo de la túnica albugínea y está rodeado por células planas, el folículo primario está rodeado por una capa de células cúbicas, en el folículo secundario se comienza a formar la capa granulosa además de que se comienzan a diferenciar las tecas, y el antro folicular empieza su formación, los folículos maduros se caracterizan por la corona radiada, el antro folicular bien definido y el cúmulo oophorus. De acuerdo al análisis descriptivo realizado a los cortes del ovario podemos concluir que nuestros resultados se apegan ampliamente a los datos de estos autores.

Citología

Rodgers et al (1993) (60) realizaron un estudio en cerdos miniatura en Yucatán, en el cual llevaron a cabo citologías vaginales donde se clasificaron células: superficiales, intermedias grandes, intermedias pequeñas y parabasales de las cuales las células superficiales e intermedias alcanzaron mayor frecuencia de aparición durante el estro, disminuyeron notablemente durante el diestro y aumentando nuevamente durante el proestro. De acuerdo con esto, los resultados resaltan patrones celulares en cada etapa del ciclo estral, logrando confirmar el estado reproductivo de la cerda.

Márquez (5) reporta que la presencia de leucocitos en los frotis vaginales se observaron en la fase folicular y en el caso del estro se identificaron células superficiales y escamas en mayor cantidad, en contraste a esto la mayor presencia de leucocitos encontrados fue en la fase lútea, pero se hallaban presentes en ambas fases, sin embargo las células identificadas durante el estro fueron similares a las encontradas por Márquez.

X. Conclusiones

- Las diferentes técnicas utilizadas para la fijación y tinción de las células no representaron diferencia a la hora de la observación e interpretación de los resultados, siendo la más rápida y económica la fijación al aire con tinción de HE.
- Se recomienda la citología vaginal como método complementario a los registros de las cerdas ya que es una herramienta útil y fácil para obtener información sobre el estado reproductivo de la cerda, sin causar daño en el animal ya que no es un método traumático y su diagnóstico puede ser dentro de las primeras 24 horas.
- Las células epiteliales estaban en su punto máximo durante el estro, disminuyendo notablemente durante el diestro y aumentando nuevamente durante el proestro.
- Los resultados indicaron que durante la maduración, los folículos ováricos aumentan el promedio de sus diámetros en las diferentes etapas; Folículo primordial $0.545 \text{ mm} \pm 0.370$, Folículo primario $0.983 \text{ mm} \pm 0.553$, Folículo secundario $3.954 \text{ mm} \pm 0.666$, Folículo terciario 5.172 ± 2.111 , Ovocito $0.386 \text{ mm} \pm 0.058$. A> AQ

- El uso de material didáctico específico referente al ciclo estral como el realizado en este estudio, podrá ayudar a la comprensión de la dinámica folicular y sus interacciones, para alumnos interesados en la reproducción porcina.

XI. Perspectiva de investigación.

- Resulta de utilidad que un futuro podamos conocer los cambios morfológicos e histológicos ocurridos en cerdas gestantes, cerdas inducidas con hormonas o con patologías, para poder realizar una comparación entre ellas.

XI. Bibliografía

1. Wayne Rasband. ImageJ [Internet]. USA: National Institutes of Health. 2011; Disponible en: <http://imagej.nih.gov/ij>
2. Gamba R. Introducción a la reproducción porcina. Trujillo M., Mota D., Robles M., La cerda reproductora. México: 2015,11-22.
3. FIRA, Panorama agroalimentario, Dirección de investigación y evaluación económica y sectorial, Carne de cerdo, [Internet] 2017 [consultado 2018]; 2-5 Disponible en: <http://www.ugrpg.org.mx/pdfs/Panorama%20Agroalimentario%20Carne%20de%20cerdo%202017.pdf>
4. Parámo M. Morfofisiología de los órganos genitales del macho y de la hembra. Reproducción de los animales domésticos. 3ª, México, Limusa, 2012. 27-41.

5. Márquez E. Comparación del método de citología vaginal Exfoliativa y biopsia vaginal para la determinación de las etapas del ciclo estral en cerdas de reemplazo [licenciatura] México, UNAM, FMVZ, 2007. 17-42.
6. Falceto M. Ciclo sexual. Fisiopatología ovárica en la cerda, universidad de Zaragoza, España; Servet, 2015. 4-47.
7. Trujillo ME, Martínez G., Herradora L., Aspectos básicos de la morfología de la cerda. La piara reproductora. México, Mundi-Prensa, 2002,71-80,113, 245 p.
8. Pascual I., Reproducción animal, [citado el 9 de julio de 2019], Argentina 2002.
9. Anderson LL. Reproductive Biology of Pigs [Internet]. Ames: Iowa State University, Digital Repository; 2009 [citado el 9 de julio de 2019] p. 3390315. Report No.: 3390315. Disponible en: https://lib.dr.iastate.edu/ans_air/vol655/iss1/66/
10. Sogbe E., Hernández M., Díaz C, Ascanio E., Puche S., Caracterización histológica del tracto reproductivo de cerdas como indicador de pubertad y madurez sexual. FCV-LUZ (internet) 2001[septiembre]; Vol XI, 219-229.
11. Banks W., Histología reproductiva. Histología veterinaria aplicada, primera edición, México, editorial el manual moderno, S.A. de C.V. 1986 pp 5-10,28, 629-656.
12. Montero Z. Desarrollo de un atlas interactivo de la histología del cerdo, como soporte en el aprendizaje de la morfología animal [Maestría] Ecuador,

Universidad católica del ecuador, [Internet]. 2015. Disponible en:
<http://repositorio.pucesa.edu.ec/bitstream/123456789/1369/1/75757.pdf>

13. Contreras A., Trujillo ME., Hernández E., Morfofisiología del aparato reproductor. Trujillo M., Mota D., Robles M., La cerda reproductora. México: 2015,23-33.
14. H. E. König, H. Liebich. Órganos genitales femeninos. Anatomía de los Animales Domésticos, 2da edición, Madrid, médica panamericana,2011, 135-151.
15. Senger PL. Reproductive cyclicity. Pathways to pregnancy and parturition. Pullman, WA: Current Conceptions; 2003 143-166.
16. Dellmann D., Sistema reproductivo femenino. Histología Veterinaria, 2da edición, Zaragoza España, Acribia, S.A., 1994,267-284.
17. Rangel L., Anatomía reproductiva. Fisiología reproductiva de los animales domésticos, FMVZ, UNAM, México, 2018, 11-22.
18. Gartner L., Hiatt J., Introducción a la histología y las técnicas histológicas básicas. Histología texto y atlas, 3ª. Edición, México, McGraw Interamericana, 2002, 407-417.
19. Junqueira L., Carneiro J., Sistema genital femenino. Histología básica, 6ta edición, México, Médica Panamericana, 2006,72-109.

20. Caballero H. Características morfológicas de folículos de cerdas prepúberes [licenciatura] México, FMVZ, UNAM, 1995.
21. Facultad de Veterinaria, El ovario la estructura histológica, Universidad complutense [Internet]. [Citado el 1 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://veterinaria.ucm.es/el-ovario>.
22. Bruce M., Carlson, MD., Técnica histológica. Embriología básica de Patten, México 5ª, 1990,71-98.
23. Mota D., Orozco H., Roldan P., Bolaños D., Morales L, Yáñez A., Pubertad. Trujillo M., Mota D., Robles M., La cerda reproductora. México: 2015,33-41.
24. Zarco L., Gametogénesis. Fisiología reproductiva de los animales domésticos, FMVZ, UNAM, México, 2018, 11-22.
25. Gigli, I.; Russo, A.; Agüero, A. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. InVet. Vol 8, diciembre de 2006; 183–203.
26. Gutiérrez C., Rangel L., Lassala A., Pubertad, ciclo estral, estacionalidad. Reproducción de los animales domésticos. 3ª, México, Limusa, 2012. 85-116.
27. Falceto, C. Duque, J. Alfonso, M.J. Ciudad, E. Espinosa, Variaciones fisiológicas de la funcionalidad ovárica de la cerda, [Internet] 2001, [consultado 2019]; Facultad de Veterinaria Zaragoza. Disponible en: <https://www.avparagon.com/docs/reproduccion/r-041230-4.pdf>

28. Mota D., Lozano M., Fisiología y endocrinología del ciclo estral. Trujillo M., Mota D., Robles M., La cerda reproductora. México: 2015,67- 87.
29. Valencia J., Pubertad y estacionalidad reproductiva. Fisiología reproductiva de los animales domésticos, FMVZ, UNAM, México, 2018, 93-101.
30. Williams SI, Fernandez VC, Sota RLDL. Dinámica folicular y momento de la ovulación en cerdas púberes y pluríparas posdestete. InVet. 2010; 12(1):33–42.
31. Santiago B., Sánchez., Alvarado E., De Loera O., Mendoza M., Romero., Características morfométricas de ovarios de cerdas prepúberes, AMVEC, Acapulco Guerrero, XLV, 2010.
32. Williams SI, de la Sota RL. Follicular dynamics and ovulation time in gilts and post-weaning sows. Can Vet J. enero de 2017; 58(1):65–9.
33. Jiménez C., Fisiología del ciclo estral de la cerda [Internet] 2011, [consultado 2019]; Universidad Nacional de Colombia. Disponible en: <http://www.ciap.org.ar/Sitio/Archivos/Fisiologia%20del%20ciclo%20estral%20de%20la%20cerda.pdf>34.
34. Trujillo M. Doporto J.M. Sincronización de estros en cerdas nulíparas y primíparas. Vet. Mex. 28 FMVZ, UNAM, México 1996, 325-331 .

35. Zarco L., Endocrinología de la reproducción. Fisiología reproductiva de los animales domésticos, FMVZ, UNAM, México, 2018, 93-101.
36. Zarco L., Endocrinología de la reproducción. Reproducción de los animales domésticos. 3ª, México, Limusa, 2012. 59-84.
37. Utilidad del estudio del aparato genital de las cerdas y verracos eliminados en granjas y centros de inseminación | Portal Veterinaria [Internet]. [Citado el 28 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.portalveterinaria.com//porcino/articulos/12642/utilidad-del-estudio-del-aparato-genital-de-las-cerdas-y-verracos-eliminados-en-granjas-y-centros-de-inseminacion.html>
38. Fuentes M., Pérez L., Suárez Y., Soca M., Características reproductivas de la cerda. Influencia de algunos factores ambientales y nutricionales, [Internet] 2006, [consultado 2019]; REDVET Vol.VII Cuba. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63612648012.pdf>
39. Prieto B., Velázquez M., Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotropinas. Rev Fac Med, Diciembre de 2002; vi 45 Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2002/un026e.pdf>.
40. Trujillo ME. Uso de hormonas exógenas en la producción porcina [Internet]. 2004. (Agosto 2019) Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/fe9e/07a185bcee68cd4065e5afc60e4a724098bd.pdf>.

41. Potau V., Carreño A. Gonadotropinas (LH y FSH) y corticotropina (ACTH) Endocrinología y Nutrición 2007[Internet]. p. 109-117 [citado el 10 de julio de 2019]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-nutricion-12-articulo-gonadotropinas-lh-fsh-corticotropina-acth--S1575092207714158>.
42. Citología del aparato reproductor de la hembra | Portal Veterinaria [Internet]. [citado el 4 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.portalveterinaria.com/articoli/articulos/26562/citologia-del-aparato-reproductor-de-la-hembra.html>.
43. Stornelli, M.A.; Savignone, C.A.; Tittarelli, C.M.; Stornelli, M.C. (2006). Citología vaginal en caninos: metodología y aplicaciones clínicas. Revista Veterinaria Cuyana 15-21.
44. Buen día N., Citología. Citología diagnóstica veterinaria, México, El manual moderno, 2001,1-25.
45. Dumon C., Frotis vaginales e inseminación artificial en la perra, Francia, 2009 [Internet]. Disponible en: <https://ddd.uab.cat/pub/clivetpeqani/11307064v9n3/11307064v9n3p119.pdf>
46. Megías M., Pacheco Pilar., Molist García M., Pombal D., Atlas digital de fisiología, Universidad, España. Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/>

47. Tummaruk P, Tantasuparuk W, Techakumphu M, Kunavongkrit A. (2009) The association between growth rate, bodyweight back fat thickness and age at first observed oestrus in crossbreed Landrace x Yorkshire gilts. *Animal Reproduction Science* 110: 108-122. 48.
48. Feldens,t.,Groehs M.,Nunes I., Wentz F. Estrategias para minimizar o descarte de fêmeas suínas. *Suinocultura em Foco*; 2007.
49. Jiménez E. Relación del estado fisiológico de ovarios de cerdas con la causa de descarte en dos granjas de Costa Rica. [Licenciatura] Costa Rica, Universidad Nacional de Costa Rica, 2011 9-38.
50. Sagarpa. 2001. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca, Alimentación. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación*, miércoles 22 de agosto de 2001.
51. Mares C.E. Conocimientos básicos para la tinción de citología cérvico-vaginal. *Manual de tinción*. Argentina, 2008, 2-29.
52. Sagarpa. 2014. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca, Alimentación. Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. *Diario Oficial de la Federación* 26 de junio de 2015.
53. Azaldúa S., Ocádiz R., Hernández J., Principios de la técnica histológica. *Manual de laboratorio de Biología Tisular*, México, FMVZ UNAM, 2008,15-26.

54. Montalvo A., Técnica histológica. 2010, pp2, Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/3_tecnica_histologica.pdf
55. Gamba R. Importancia de la pubertad en las cerdas, porcicultura.com, [Internet] 2018 [citado el 28 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.porcicultura.com/destacado/Importancia-de-la-pubertad-en-las-cerdas>.
56. Tummaruk P, Tantasuparuk W, Techakumphu M, Kunavongkrit A. (2007) Age, body weight and backfat thickness at first observed oestrus in crossbreed Landrace x Yorkshire gilts, seasonal variations and their influence on subsequent reproductive performance. *Animal Reproduction Science* 99: 167-181. [Internet]. [Citado el 28 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16765000>
57. Kimura J., Tsukise A., Yokota H., Nambo Y., Higuchi T., The Application of Three-Dimensional Internal Structure Microscopy in the Observation of Mare Ovary. *Wiley Online Library*, 2008 [Internet]. [citado el 28 de septiembre de 2019]. Vol.30 Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1439-0264.2001.00335>.
58. Signoret, R.B. Reproducción. El cerdo, cría, engorde, enfermedad y aprovechamiento. Argentina. 1971; Argentina. Editorial Molino. 565.

59. Clark, JR; Brazier, SG; Wiginton, LM; Stevenson, GR; Tribble, LM. Time of ovarian follicle selection during the porcine estrous cycle. *Theriogenology*. 1982. 18:697–708. [Internet]. [citado el 28 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X82900358>
60. Yen, H., Christian, S., Zimmerman, D., Elevation of Plasma FSH with a Low Level of FSH-P During the Early to Mid Follicular Phase Blocks the Loss of Greater Numbers of Medium Follicles in Control Line Gilts Compared to Gilts Selected for High Ovulation Rate, 1995 . [Internet]. [citado el 28 de septiembre de 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/282232072_Elevation_of_Plasma_FSH_with_a_Low_Level_of_FSHP_During_the_Early_to_Mid_Follicular_Phase_Blocks_the_Loss_of_Greater_Numbers_of_Medium_Follicles_in_Control_Line_Gilts_Compared_to_Gilts_Selected_for_H.
61. Rodgers JB, Sherwood LC, Fink BF, Sadove RC, Estrus detection by using vaginal cytologic examination in miniature swine. *PubMed – NCBI*, 1994 [Internet]. [Citado el 28 de septiembre de 2019]. Vol 43 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8158987>