

Caracterización del perfil citológico de la mucosa vaginal durante el ciclo estral en ovejas Santa Inês

Arbues, R.¹; Flores, Q.C.¹; Fernández, J.A.³; Yáñez, E.²

¹Cátedra Histología y Embriología, ²Cátedra Nutrición y Alimentación.
Fac. Cs. Vet. Univ. Nac. Nordeste, ³Cátedra de Nutrición. Fac. Cs Agr. Univ. Nac., UNNE.
Corrientes 3400.
E-mail: carofloresq@gmail.com

Resumen

Arbues, R.; Flores, Q.C.; Fernández, J.A.; Yáñez, E.: Caracterización del perfil citológico de la mucosa vaginal durante el ciclo estral en ovejas Santa Inês. *Rev. Vet. 33: 2, 202-207, 2022.* El objetivo de trabajo fue caracterizar el ciclo del epitelio vaginal de ovejas de raza Santa Inês, mediante estudio citológico. Se tomaron muestras de la mucosa vaginal a 10 borregas sexualmente maduras, desde el primer día de celo y por 18 días. Las muestras se colorearon con Papanicolaou y se observaron en microscopio óptico. Se reconocieron células parabasales, intermedias profundas, intermedias superficiales y superficiales. Las células parabasales presentaron forma redondeada, citoplasma escaso y núcleo grande, fueron escasas. Las intermedias profundas de bordes redondeados, citoplasma más abundante y núcleo menor. Se observaron en mayor cantidad que las parabasales. Las intermedias superficiales fueron las más abundantes en todo el estudio y las de mayor diámetro. Presentaron forma poligonal y núcleo más pequeño. La identificación de dos tipos de célula intermedia, coincide con trabajos en perras, vacas y alpacas, en tanto otros trabajos describen un solo tipo. Las células superficiales se dividieron en dos subtipos, el A, con forma poligonal y núcleo picnótico y el B, con citoplasma más pequeño e intensamente acidófilo y núcleo picnótico. Este último no se encontró hasta el momento en otros trabajos con ovejas. Las modificaciones de los tipos celulares no reflejaron de manera precisa la fase del ciclo estral.

Palabras clave: citología, hormonas, razas tropicales.

Abstract

Arbues, R.; Flores, Q.C.; Fernández, J.A.; Yáñez, E.: Characterization of the cytological profile of the vaginal mucous during the estral cycle in the Santa Inês sheep. *Rev. Vet. 33: 2, 202-207, 2022.* The objective of the work was to characterize the cycle of the vaginal epithelium of sheep of the Santa Inês breed, through a cytological study. Vaginal mucosal samples were taken from 10 sexually mature ewes, from the first day of estrus and for 18 days. The samples were stained with Papanicolaou and observed under an optical microscope. Parabasal, deep intermediate, superficial intermediate, and superficial cells were recognized. The parabasal cells presented a rounded shape, little cytoplasm, and a large nucleus, they were scarce. The deep intermediate ones with rounded edges, more abundant cytoplasm, and smaller nuclei. They were observed in greater quantity than the parabasal ones. The superficial intermediate ones were the most abundant through out the study and the one with the largest diameter. They presented a polygonal shape and a smaller nucleus. The identification of two types of intermediate cells coincides with works on dogs, cows, and alpacas, while other works describe a single type. Superficial cells were divided into two subtypes, A, with a polygonal shape and piknotic nucleus, and B, with a smaller and intensely acidophilic cytoplasm and pyknotic nucleus. The latter has not been found so far in other works with sheep. Changes in cell types did not accurately reflect the phase of the estrous cycle.

Key words: cytology, hormones, tropical race.

INTRODUCCIÓN

La citología vaginal es un método de estudio simple y económico que permite la observación de varios tipos celulares de la mucosa vaginal¹³. Su importancia surge por la extrema sensibilidad del epitelio vaginal a las hormonas ováricas que inducen, a lo largo del ciclo, a un cambio de espesor de los estratos celulares que lo componen^{18,7}.

El estrógeno tiene un efecto directo sobre el epitelio vaginal de hembras mamíferas, estimulando el incremento en el número de capas celulares en la vagina, lo que moviliza glucógeno en las células y causa cornificación de las capas superficiales¹⁶.

Por otra parte, la disminución de la concentración de estrógenos provoca una gran descamación de las capas superficiales y el epitelio se mantiene de esta forma hasta la regresión del CL, cuando el desarrollo folicular nuevamente ejerce su influencia².

La técnica es empleada frecuentemente en medicina humana como parte de los planes de salud reproductiva de la mujer. En veterinaria el estudio de la citología vaginal se utiliza para evaluar el estado reproductivo de las hembras y seguir de forma precisa el progreso de las distintas etapas del ciclo estral. El mayor uso se hace en hembras caninas para poder estimar el momento de la ovulación^{17,9} y hacer el manejo correspondiente del servicio.

En hembras de interés productivo, especialmente en la vaca, la oveja y la cabra, la técnica se empleó en momentos muy diversos del ciclo. En algunos trabajos se realizó sincronización de celo mientras que en otros no, la utilización de diferentes coloraciones y tiempos de permanencia de la muestra en los mismos también es variable^{1,7,8,11}.

La disparidad que hay en los procedimientos dificulta las comparaciones y esto hace que los resultados sean menos aprovechados. Sin embargo, hay grandes avances en la biotecnología de la reproducción y es ahí donde la citología vaginal podría presentarse como una herramienta para auxiliar en la identificación del estado reproductivo, posibilitando el control del estro para favorecer la fecundación y permitiendo la detección temprana de la gestación, maximizando así los resultados en los programas de reproducción.

Es la alternativa al uso de retajos antes de colocar los carneros o realizar la inseminación artificial. Puede ser también utilizada para diagnosticar precozmente patologías del tracto genital femenino^{13,20}.

En ovinos existe muy poca información sobre citología vaginal exfoliativa que describa el comportamiento de las células epiteliales durante el ciclo estral completo. Además, la mayoría de los

trabajos se realizaron en razas originarias de latitudes altas y climas templados^{16,11}.

Por este motivo, la caracterización de las modificaciones que ocurren en el epitelio vaginal durante el ciclo estral en ovejas Santa Inês es importante al aportar conocimientos que ayudarán a afianzar el uso de la técnica en pequeños rumiantes.

Bajo la hipótesis que en ovejas tropicales es posible determinar la fase del ciclo estral mediante el estudio de las células del epitelio vaginal, este trabajo tuvo como objetivo caracterizar el ciclo del epitelio vaginal de ovejas de raza Santa Inês, mediante el estudio citológico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar de trabajo

El trabajo se desarrolló desde el 20 de marzo hasta el 10 de abril del mismo año en el establecimiento agropecuario Don Donato, Colonia Mota, departamento de Monte Caseros, Corrientes. Su localización es 30° 30' S y 58° 02' O, con clima subtropical húmedo y precipitaciones anuales promedio de 1100 mm.

Animales y manejo de la majada

Se utilizaron 10 borregas Santa Inês, sexualmente maduras no gestantes, de 18 meses de edad y peso promedio 36 Kg. Todas fueron mantenidas bajo las mismas condiciones de alimentación, la que consistió en pastizal natural y agua ad libitum. Además, recibieron suplementación alimentaria, la misma estuvo compuesta por maíz picado y heno de alfalfa. El manejo para llevar a cabo la suplementación fue el siguiente, las borregas permanecían en potreros durante todo el día y al anochecer eran llevadas a un corral para pasar la noche. La suplementación se administraba en comederos, cada noche al momento de traer los animales al corral. La sanidad de las hembras consistió en desparasitación y calendario sanitario acorde a la edad.

El PV se determinó a todas las hembras en estudio al iniciar el ensayo. El registro se realizó con balanza digital. La misma constó de una plataforma para colocar al animal y una jaula de metal adaptada para ovinos que se colocó arriba para minimizar la movilidad del mismo.

Se tomaron muestras de mucosa vaginal a todas las hembras desde el día que presentaron celo y de allí en adelante todos los días, alrededor de las 7 y 30 horas de la mañana, durante 18 días. Para la detección de celo se introdujeron machos detectores en la majada a los que se les colocó pintura alrededor del prepucio para que marquen a las hembras al saltarlas. Una vez identificada la hembra en celo se inició la toma de muestras.

La técnica utilizada para el muestreo fue la recomendada por ⁹. Apartando los labios vulvares de la oveja se introdujo un hisopo estéril previamente humedecido con solución fisiológica, en la comisura dorsal de la vulva, hasta una profundidad de unos 5 o 6 cm. Con el hisopo ubicado allí se realizaron suaves movimientos rotatorios por las paredes de la vagina.

Una vez obtenida la muestra, se hizo rodar el hisopo sobre un portaobjeto debidamente identificado. Se fijó el material en alcohol 96° por no menos de 5 minutos y se dejó secar al aire libre. Una vez en el laboratorio, las muestras se colorearon con Papanicolaou y se observaron en el microscopio óptico.

Se obtuvieron 18 muestras por oveja (una por cada día), en total 180 extendidos. En cada uno se contaron 100 células, clasificándolas por su morfología

vagina de borregas Santa Inês.

en parabasales, intermedias profundas, intermedias superficiales y superficiales. Los extendidos se fotografiaron y las células se midieron considerando su diámetro total y el diámetro de su núcleo. Para esto se utilizó el programa Image Pro Plus. El análisis estadístico consistió en el uso de tablas de frecuencia, cálculo de promedio y desvío estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis de los frotis vaginales del presente estudio se reconocieron los siguientes tipos celulares: parabasales, intermedias profundas, intermedias superficiales y superficiales. Los valores morfométricos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Diámetro promedio y desvío estándar en μm de los diferentes tipos de células epiteliales de la

tipo de células	n	citoplasma (μm)	núcleo (μm)
parabasales	189	20 (3,6)	11,9 (1,89)
intermedias profundas	1.793	25,42 (2,82)	10,75 (1,75)
intermedia superficial	6.318	43,24 (8,24)	10,2 (1,57)
superficial A	4.412	38,71 (6,58)	6,53 (1,01)
superficial B	1.475	24,16 (3,36)	6,24 (1,16)

La Figura 1 presenta las frecuencias promedio de cada tipo celular a lo largo del ciclo. Las células parabasales, presentaron forma redondeada, con citoplasma escaso y núcleo grande (Figura 2 A y B). Este tipo celular fue escaso en todas las fases del ciclo, no superando el 20%.

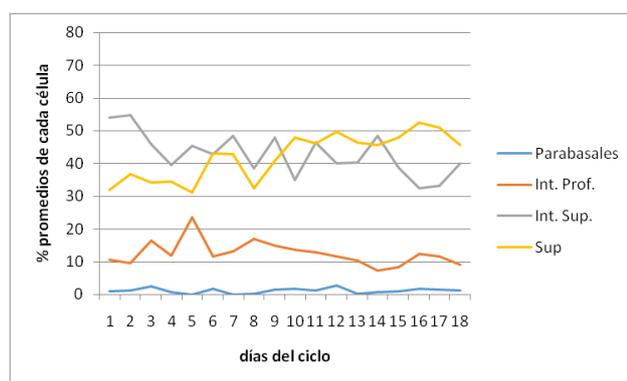


Figura 1. Frecuencias promedio de cada tipo celular del epitelio de la vagina a lo largo del ciclo estral en borregas Santa Inês..

Las células intermedias profundas presentaron bordes redondeados, citoplasma más abundante y núcleo menor que en el estadio anterior. Se la pudo identificar en mayor cantidad que las parabasales, sin embargo la frecuencia promedio no superó el 25% (Figura 2 B, C y D).

Las intermedias superficiales fueron las más abundantes en todo el periodo estudiado y las que alcanzaron mayor diámetro de citoplasma. Presentaron forma poligonal y núcleo más pequeño que en el estadio anterior (Figura 2 C, E y F).

Predominaron sobre los otros tipos celulares los dos primeros días del ciclo, con una frecuencia promedio de 55% y descendieron hasta el día 4 cuando alcanzaron un valor promedio de 40%. A partir de allí se mantuvieron en valores entre 35 y 45% aproximadamente hasta el final del ciclo.

La identificación de dos tipos de célula intermedia, profundas y superficiales coincide con los trabajos de ¹⁵ en perras, quienes las llaman profundas y superficiales, ¹⁴ en vacas, quien las describe como células jóvenes y viejas y ¹² en alpacas, las llama células chicas y grandes. La descripción morfológica de estos tipos celulares por los diferentes autores indica que, aunque se denominaron de forma distinta, se trata de dos estadios de la célula intermedia. Por otra parte, ^{8, 3, 11, 22} describen un solo tipo de célula intermedia.

Las células superficiales se dividieron en dos subtipos de acuerdo a su morfometría. El primero, denominado A, presentó forma poligonal y núcleo picnótico (Figura 3 A y C). El subtipo B, presentó citoplasma más pequeño que el A, e intensamente acidófilo y núcleo picnótico (Figura 3 B, C y D).

Al calcular las frecuencias de los dos subtipos juntos, en los dos primeros días del ciclo tuvieron menor proporción promedio que las células intermedias superficiales, con un valor de 36 % y a partir de allí fueron incrementándose hasta superar el 50 % al finalizar el ciclo.

En el presente estudio no se observaron células anucleadas, al igual que en los trabajos de ⁸ con ovejas Santa Inês, ¹¹ también en ovejas de pelo y ¹² en alpacas. La presencia de un subtipo celular B no se encontró hasta el momento en otros trabajos con ovejas. Sin embargo, en la vizcacha de llanura, se describió recientemente un tipo celular denominado "mucoso" cuyo diámetro del citoplasma y del núcleo coincide con aquellos de la célula superficial B, aunque las características morfológicas y tintoriales son diferentes ⁶.

La morfología de las células superficiales B podría deberse a la pérdida de volumen y retracción de los filamentos de queratina, eventos que ocurren cuando la célula epitelial sufre apoptosis, que además le confieren al citoplasma un tinte intensamente eosinófilo⁵.

Otra explicación de este hallazgo sería que las células superficiales se fragmentan perdiendo parte de su citoplasma, por lo que parecen ser más chicas. Sin embargo, en el análisis de muchas células se observa un citoplasma de bordes nítidos, bien delineados que no parece haber sufrido fragmentación. Además, esta segunda opción explica únicamente el menor tamaño pero no la intensa acidofilia observada en el citoplasma.

Las células intermedias superficiales predominaron los dos primeros días del ensayo, durante el estro. Las superficiales por su parte tuvieron una proporción menor en esta fase pero se incrementaron hacia el siguiente estro.

En ovejas Santa Inês, ⁸ citaron que en el proestro y estro predominan las células superficiales. En tanto que en el metaestro y diestro lo hacen las basales, superando el 80% aunque las parabasales e intermedias fueron abundantes, alcanzando una frecuencia de 70%. Esto difiere con el presente estudio, ya que aquí las células parabasales no superaron el 10% y las intermedias profundas tuvieron una frecuencia promedio máxima de 23%.

Resultados similares se observaron en ovejas autóctonas de Asia, en las cuales las células parabasales e intermedias no superaron el 28% en ninguna fase del ciclo ²². En ovejas de pelo, ¹¹ observaron que las células superficiales predominaron en el estro y que las intermedias lo hicieron en el diestro, pero como éstas no se discriminaron entre intermedias superficiales y profundas, la comparación con los resultados del presente trabajo se dificulta.

En algunas ovejas del presente trabajo las células superficiales se presentaron en pequeña cantidad en

todas las fases del ciclo, similar a lo observado por ³ en cabras. Los mismos también observaron que, las células intermedias fueron significativamente superiores a los demás tipos celulares en todas las fases del ciclo. Los autores mencionan la dificultad en la interpretación de los resultados de la citología vaginal en cabras.

El predominio de las células intermedias superficiales y superficiales en el presente trabajo coincide con el realizado por ²¹ en cabras, donde la composición de la citología vaginal exfoliativa no mostró cambios específicos en las hembras evaluadas, existiendo predominio de células intermedias y superficiales (> al 60%) durante todos los estadios del ciclo estral.

Esto podría estar relacionado con las características del ciclo estral de las ovejas y cabras, en las que existen dos o tres folículos dominantes en cada ciclo. El estradiol proveniente de estos folículos podría explicar el predominio de estos dos tipos celulares, tal como se sugirió en vacas ¹⁴.

Los neutrófilos se observaron en 9 de las 10 ovejas analizadas (Figura 3 C y D). En 4 animales el momento en el que éstos fueron abundantes coincidió con el predominio de células intermedias profundas y superficiales. En los demás animales, los neutrófilos fueron moderados a abundantes en diferentes días del ciclo, y esto fue indistinto al predominio celular. En algunos casos sucedió con abundancia de células intermedias superficiales y en otros casos con abundancia de superficiales.

En cuanto a la morfometría de las células analizadas, los resultados coinciden parcialmente con el trabajo de ¹⁵ con la excepción que en el presente ensayo el diámetro del citoplasma de las células intermedias superficiales fue mayor que el de las superficiales A. En las ovejas Santa Inês de este estudio se observó mayor diámetro de citoplasma en las células intermedias que el observado por ¹¹ aunque esto puede deberse a que los autores no clasificaron a las células intermediarias en dos tipos.

El núcleo de las células superficiales fue de menor diámetro que aquellos de las células superficiales descriptas por ¹¹. Los diámetros de citoplasma y núcleo de todos los tipos celulares observados en el presente trabajo fueron mayores que los descriptos por ¹² en alpacas.

Las modificaciones que sufrieron las células del epitelio vaginal no permitieron identificar de manera precisa la fase del ciclo estral en el que se encontraban las hembras. Sin embargo, al considerar las frecuencias, se pudo observar con claridad que existieron 2 grupos de células, las superficiales e intermedias superficiales, que predominaron durante todo el estudio, superando siempre el 30%, sobre aquellas que se mantuvieron debajo del 25%, (intermedias profundas y parabasales).

Si bien la utilidad del estudio de citología vaginal en reproducción de animales de compañía es indiscutible, a partir de los resultados del presente estudio se evidencia la necesidad de considerar las diferencias que existen en la fisiología del ciclo estral entre hembras de especies monoestricas (perras y gatas) y especies poliestricas (ovejas, cabras, vacas), debido a que los resultados no siempre son extrapolables.

Por ejemplo, en la perra, la duración del estro tiene un promedio de 9 días, periodo en el cual ocurren las ovulaciones de forma asincrónica. En consecuencia el metaestro se superpone con el estro, porque los eventos fisiológicos característicos de esta fase ocurren mientras la perra sigue en estro. Por lo tanto solo debe referirse al diestro como la etapa de influencia progestacional¹⁹.

Por el contrario, en la vaca y en la oveja el estro dura en promedio 12 y 24 horas respectivamente^{10, 4}, sumado a la existencia de ondas de desarrollo folicular en el periodo inter-estro hace que las modificaciones que ocurren en la citología vaginal de estas especies no sean fácilmente comparables con las de la perra. De manera que es imprescindible considerar realizar trabajos futuros que analicen en conjunto las modificaciones de los niveles hormonales así como el desarrollo de ondas foliculares a través de ultrasonografía para poder interpretar las modificaciones celulares que ocurren durante el ciclo estral de la oveja.

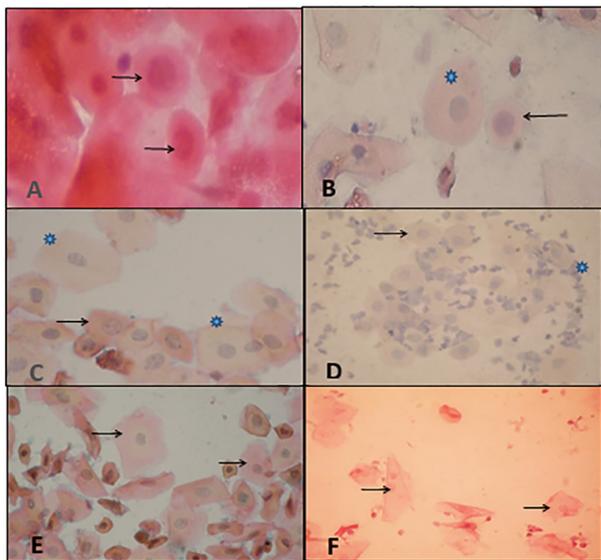


Figura 2. Citología vaginal de ovejas Santa Inês. A: Células parabasales (flechas). B: Célula parabasal (flecha) e intermedia profunda (asterisco). C: Célula intermedia profunda (flecha) e intermedias superficiales (asteriscos) D: Células intermedias profundas (flecha) y abundantes neutrófilos (asterisco). E y F: Células intermedias superficiales (flechas). Papanicolaou. 40 X.

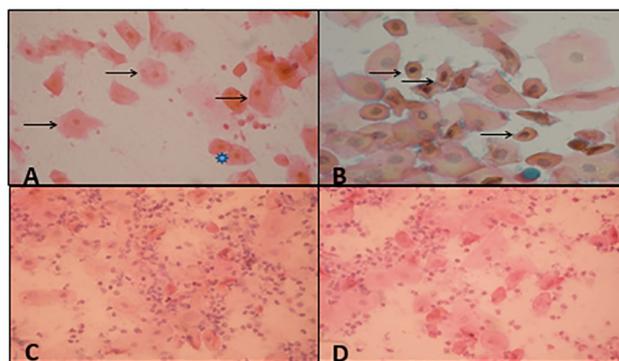


Figura 3. Citología Vaginal de ovejas Santa Inês. A: Célula superficial subtipo A (flechas) y subtipo B (asterisco). B: Células superficiales subtipo B (flechas) C y D: Se observa predominio de neutrófilos y diferentes tipos celulares.

CONCLUSIONES

En el análisis de la citología vaginal de ovejas Santa Inês en el subtrópico argentino, fue posible reconocer cuatro tipos celulares diferentes con 2 subtipos de células superficiales. Las modificaciones de los tipos celulares no reflejaron de manera precisa la fase del ciclo estral en el que se encontraban las hembras.

Agradecimientos

A Doña Mabel de Yáñez, propietaria del establecimiento Don Donato, por su valioso apoyo y colaboración en el desarrollo de los trabajos de campo. A Gesgan, por haber puesto a disposición los animales y los insumos necesarios para el desarrollo de los trabajos de campo. Al Ingeniero Agrónomo, Magíster Juan Alfredo Fernández, por su valiosa colaboración en las labores de campo y en el análisis estadístico de los resultados. A los veterinarios Gabriela Abson y José Casuso por su valiosa colaboración en el desarrollo de los trabajos de campo.

REFERENCIAS

1. **Ahmadi M, Nazifi S.** 2006. Evaluation of reproductive status with cervical and uterine cytology in fat-tailed sheep. *Comp Clin Pathol* 15: 161-164.
2. **Brown P.** 1944. Physiological and histological changes in the vagina of the cow during the estrual cycle. *AJVR* 5: 15, 99-112.
3. **Correia F. et al.** 2010. Identificação da ciclicidade em cabras leiteiras da Raça Saane através da citologia vaginal no Município de Venturosa. X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, Recife, Brasil.

4. **DeCastro T, Menchaca A, Rubianes E.** 2015. Fisiología reproductiva y control del desarrollo folicular en ovejas y cabras. En: *Fisiología y tecnologías reproductivas en pequeños rumiantes, Fund. URAU e Instit. Reprod. Anim.*, Uruguay, 90 p.
5. **Fernández FM, Puig I.** 2002. Claves para el diagnóstico dermo-patológico. Toxicodermias. *Piel* 17: 2, 73-80.
6. **Flamini M, Barbeito G, Portianski E.** 2016. Características de la citología exfoliativa en hembras gestantes y no gestantes de *Lagostomus maximus*. *Cs Morfol* 18: 1, 10-19.
7. **Hussin A.** 2006. The vaginal exfoliative cytology of *Awassi* ewes during post-parturient period. *Iraqi Journal Vet. Med.* 30: 2, 130-137.
8. **Macedo PR, Vasconcelos T, Ferreira F, Moreira J, Torres J.** 2007. Perfil citológico vaginal de ovelhas da raça Santa Inês no acompanhamento do ciclo estral. *Ciencia Animal Brasileira* 8: 3, 521-527.
9. **Ola S, Sanni A, Egbunike G.** 2006. Exfoliative vaginal cytology during the oestrus cycle of West African Dwarf goats. *Reprod Nutr Dev* 46: 87-95.
10. **Olhagaray HR.** 2004. Comparación de cuatro protocolos de sincronización de celo en vacas Holstein Ovsynch. *Tesis de Grado, Universidad Autónoma G.R. Moreno, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia*, 44 p.
11. **Ovando N, Orihuela A, Flores F, Aguirre V.** 2013. Citología y análisis morfométrico de las células del epitelio vaginal durante el ciclo estral en ovejas de pelo (Ovisaries). *Int J Morphol* 31: 3, 888-893.
12. **Pacheco J.** 2017. Caracterización de la citología exfoliativa vaginal en alpacas (*Vicugna pacos*). *Rev Investig Perú* 28: 4, 886-893.
13. **Raposo R, Silva L.** 1999. Comparação qualitativa de diferentes técnicas de coloração para citología vaginal de cabras da raça Saanen. *Rev Ciên* 9: 2, 81-85.
14. **Rezende L.** 2006. Perfil citológico vaginal e dinámica folicular durante o ciclo estral em novhila Nelore. *Tesis de Maestría, Univ. Federal Goiás, Brasil*, 47 p.
15. **Rosciani A, Merlo W, Macció O.** 2006. Citodiagnóstico en pequeños animales. *Edit. Univ., Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina*, 66 p.
16. **Sanger V, Engle P, Bell D.** 1958. The vaginal cytology of the ewe during the estrous cycle. *AJVR* 19: 283-287.
17. **Schutte A.** 1967. Canine vaginal cytology-I. Technique and cytological morphology. *JSAP* 18: 301-306.
18. **Schutte A.** 1967. Canine vaginal cytology II. Cycly changes. *JSAP* 8: 307-311.
19. **Tamalatzí C, Ahuantzi M.** 2013. La citología aplicada para la determinación de fases del ciclo reproductivo en perras. Trabajo Final de Graduación. *Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Torreón, México*, 43 p.
20. **Toniollo G, Monreal A, Laura I, Salazar W, Delfini A.** 2005. Citología vaginal em cabras alpinas com CIDR® e eCG. *Archivos de Zootecnia* 54 : 208, 634-637.
21. **Widiyono I, Putri P, Sarmin A, Airin C.** 2011. Serum estradiol and progesterone concentration, vulva appearance, and exfoliative vaginal cytology during estrous cycle in Biglon goats. *Journal Veteriner* 12: 4, 263-268.
22. **Zohara B, Azizunnesa IF, Alam G, Bari F.** 2014. Exfoliative vaginal cytology and serum progesterone during the estrous cycle of Indigenous ewes in Bangladesh. *Journal of Embryo Transfer* 29: 2, 183-188.