

# ESTUDIO HISTOQUIMICO DEL EPITELIO VAGINAL EN CERDAS

Una contribución al diagnóstico de la preñez en cerdas por biopsia vaginal

BRANSCHIED, W.

Ing. Agr. PhD de la Universidad de Stuttgart - República Federal de Alemania. Prof. Adj. de la Cátedra de Anatomía y Fisiología Animal - Facultad de Agronomía Uruguay

RUSIÑOL, C.

Médico Veterinario. Asistente de la Cátedra de Anatomía y Fisiología Animal de la Facultad de Agronomía - Uruguay.

## RESUMEN

Se presenta un estudio histoquímico del epitelio vaginal en cerdas. Este epitelio contiene sialo y sulfomucinas en diferentes ubicaciones. En parte, las mucinas son resultado de una degeneración mucosa, en parte, el resultado probable de una actividad secretora verdadera.

Como aporte al diagnóstico de preñez, se demuestra una diferencia discriminada

entre los fibrocitos del corion (subepiteliales) de cerdas preñadas y de cerdas en la fase de maduración folicular. En base a esto se puede distinguir con más seguridad, animales preñados de no preñados, ya con anterioridad suficiente a un supuesto próximo celo después de un servicio.

Veterinaria 76 : 63 - 71, 1981

## INTRODUCCION

Sobre los cambios cíclicos del epitelio vaginal, existe, con respecto a su aspecto morfológico una amplia bibliografía (2,3,4,5,12,14,17,18,25,26,27 y 28). Contrariamente a esto hay un sólo ensayo que suministra también datos histoquímicos (22; y publicaciones resumidas de este trabajo 23 y 24).

Este trabajo se refiere a la proporción de polisacáridos neutrales (PAS<sup>1</sup>), Glucógeno (Carmín según Best) y la actividad de la fosfatasa básica.

Los resultados obtenidos indican, que bajo la influencia de la progesterona se aumenta la reacción PAS, se disminuye la cantidad de glucógeno y decrece levemente y en un período muy corto la actividad de la fosfatasa. En cuanto a la reacción PAS, estos resultados son algo contradictorios. Esa reacción demuestra también la presencia de glucógeno junto con otros polisacáridos neutrales. Su aumento categórico, bajo la influencia de la progesterona, no coincide entonces del todo con la disminución de la coloración según BEST, que se considera electiva para glucógeno.

Para aclarar este aspecto y para obtener información más completa sobre la histoquímica del epitelio vaginal en cerdas es que se realizó este estudio al respecto.

## MATERIAL Y METODOS

Se recolectó material de cerdas faenadas rutinariamente en un matadero (1), de las cuales no se determinaron datos de procedencia, raza, edad, y otros antecedentes.

Se comprobó en base al estado uterino una eventual preñez y se excluyeron con anterioridad estados patológicos en base al aspecto de todo el tracto genital. De esta manera se eligieron 42 cerdas (33 vacías y 9 preñadas) y se retiró de ellas la vagina, vulva y cuello uterino y adicionalmente los ovarios. Luego de cuatro horas post mortem, a más tardar, se recortaron las muestras de tejido de la vagina cerca del cuello uterino de un tamaño aproximado a 1 x 0.4 x 0.2 cm que se procesaron de la siguiente manera:

- 1) Fijación en "formol 40 % : ácido acético glacial : alcohol absoluto" (15 ml : 15 ml : 270 ml) (13, pág. 34) durante 24 horas, lavando con agua corriente 1 h, deshidratación en los alcoholes, benzeno hasta que los preparados quedan transparentes, parafina a 60°C un día e inclusión en parafina (punto de fusión 59°C).
- 2) Cortes de 5 micras con micrótopo de deslizamiento (LEITZ), montados en portaobjetos previamente gelatinados.
- 3) Coloraciones:
  - a) Hematoxilina-Eosina/Orange G (15)
  - b) PAS (13) con y sin digestión por ptialina (saliva filtrada).
  - c) Reacción de Polisacáridos-Hierro (10, modif. de 9)
  - d) Feulgen-Methylene Blue (8).
  - e) Azul de Toluidina pH 4,5 (buffer fosfato-citrato de Mc Ilvain), post-tratamiento con molibdato de amonio al 5 % y deshidratación.
  - f) Alcian Blue 8 GX pH 1.0 y pH 2.5 (20), coloración de los núcleos con 0.1 % de Safranin 0 pH 4.0 (buffer fosfato-citrato de Mc Ilvain) 15 min.

1) PAS - Peryodic acid Schiff (secuencia ácido peryódico-reactivo de Schiff)

Fotos con película Kodak Panatomic X 32 ASA-FX 135. Cámara utilizada, la propia del microscopio Leitz Dialux 20, marca Wild MPS 11.

En base del ovario se determinó para cada cerda no preñada el respectivo momento del ciclo, tal cual describe la literatura (7). En una corta recopilación se describirá el modo de determinación de las fases ováricas según este trabajo (usando la terminología según 16):

- Fase de maduración del folículo (incluye el comienzo del celo clínico, corresponde a los días 19 al 21 del ciclo anterior y 1o. del nuevo ciclo): crecimiento rápido de los folículos (7-10 mm), color del licor amarillento marrón, paredes finas y transparentes; cuerpos amarillos decreciendo (5 mm) y de color blanco.
- Fase de ovulación (parte principal del celo, corresponde a los días 2 a 3): desde la rotura del primer folículo hasta la aparición del último cuerpo hemorrágico.
- Fase del cuerpo lúteo (corresponde a los días 4 a 13): desde la rotura del primer folículo hasta la aparición del último cuerpo hemorrágico.
- Fase del cuerpo lúteo (corresponde a los días 4 a 13): cuerpos lúteos en formación con hemorragias más o menos grandes hasta cuerpos lúteos en floración de tamaño máximo (8-10 mm), de color carne-rosa algo amarillento y sin ningún resto de hemorragia.
- Fase de recuperación (corresponde a los días 14 a 18): cuerpos lúteos en descenso, folículos en crecimiento (hasta 4-5 mm).

Este método se presentó en nuestras manos algo dudoso; la incertidumbre estaba en la diferenciación de la fase tardía del cuerpo lúteo y de la fase de recuperación, mientras las otras fases se reconocían sin dificultades. Nuestro material se distribuye en dichas fases de la siguiente manera:

- Fase de maduración: 7 animales
- Fase de ovulación: 8 animales
- Fase de cuerpo lúteo, temprana (I): 9 animales
- Fase de cuerpo lúteo, tardía (II): 5 animales
- Fase de recuperación: 4 animales

Para las cerdas preñadas se estimaron las siguientes duraciones de gravidez:

- 1,5 - 2 meses: 6 animales
- 2 - 2,5 meses: 1 animal
- 2,5 a término: 2 animales

Para la evaluación de los cortes histológicos se dividió el epitelio vaginal en 4 estratos (según 12 modificado):

- |                                 |                      |
|---------------------------------|----------------------|
| 1- Estrato germinativo          | Faltan en la fase    |
| 2- Estrato espinoso profundo    | luteal tardía y en   |
| 3- Estrato espinoso superficial | la recuperación, así |
| 4- Estrato superficial          | como en la preñez.   |

El grado y la extensión de las coloraciones histoquímicas se estimaron en forma subjetiva expresando el resultado en una escala de 5 puntos: 0 (ninguna coloración), ± (dudoso), + hasta +++ (intensidad creciente de la coloración desde el mínimo al máximo).

## RESULTADOS

### 1. Reacción PAS

Se pueden distinguir tres fracciones (fig. 1).

- 1.1 No susceptible a la digestión con ptialina, con ubicación superficial (fig. 2a.). Esta fracción, permanece después de la digestión con ptialina y está ubicada en la capa superficial. Tiende a ocupar la parte apical de las células superficiales. Entre los preparados que contienen esta sustancia, hay una amplia escala de intensidades que oscilan entre la coloración fuerte

de todas las células superficiales y una coloración con grandes distancias incoloras de algunas células singulares. La sustancia es de apariencia granular.



Fig. 1: Epitelio vaginal, fase ovulatoria, cortado oblicuamente. PAS, obj 40 x. Se ven las tres ubicaciones de la reacción PAS en el epitelio vaginal de la cerda: (1) células superficiales levemente positivas; (2) en el estrato espinoso existe en su parte superficial una formación que recuerda a una especie de red; (3) en el estrato espinoso profundo se encuentra glucógeno en cantidad mediana que muestra la característica fuga por acción del fijador; (4) las células basales son PAS negativas.

- 1.2 No susceptible a la digestión con ptialina, ubicada en el estrato espinoso. Esta fracción permanece después de la digestión con ptialina, y es mejor visible en el estrato espinoso. Nunca aparece en el estrato basal y no alcanza a la superficie incluso en preparados con un marcado estrato superficial (fase de maduración folicular). La sustancia en cuestión se concentra especialmente en la región de las paredes y prolongaciones ("espinas") celulares sin preferencia de dirección, formando así, en el corte histológico una especie de "red celular". No se puede entonces, señalar ningún efecto fijador parecido a este, descrito en el punto 1.3. La sustancia es de apariencia lisa.

- 1.3 Susceptible a la digestión con ptialina. Esta fracción desaparece después de la digestión con ptialina por lo cual se puede suponer, que se trata probablemente de glucógeno. En los preparados que la contienen, esta sustancia se encuentra generalmente en el estrato espinoso. Pero también (especialmente en la maduración) aparece en la capa superficial, sólo en el fin de la fase luteal y en animales preñados se la encuentra en las células basales. En estos últimos casos, es decir cuando el epitelio alcanza su mínimo espesor, se trata siempre de cantidades más

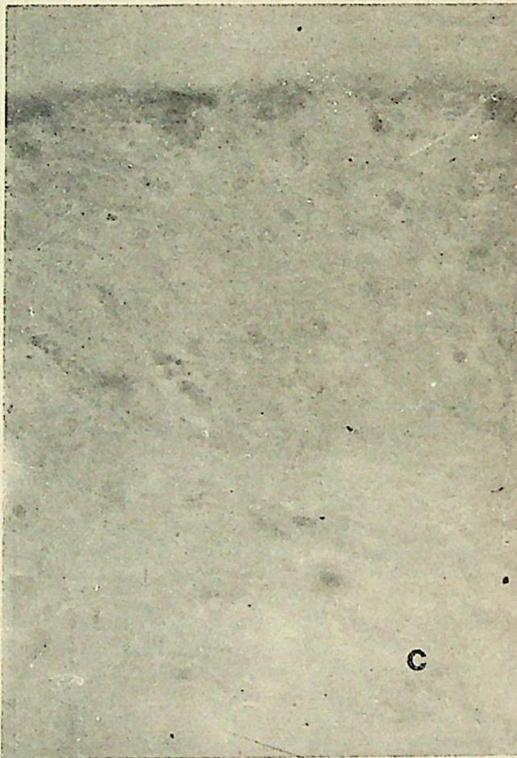
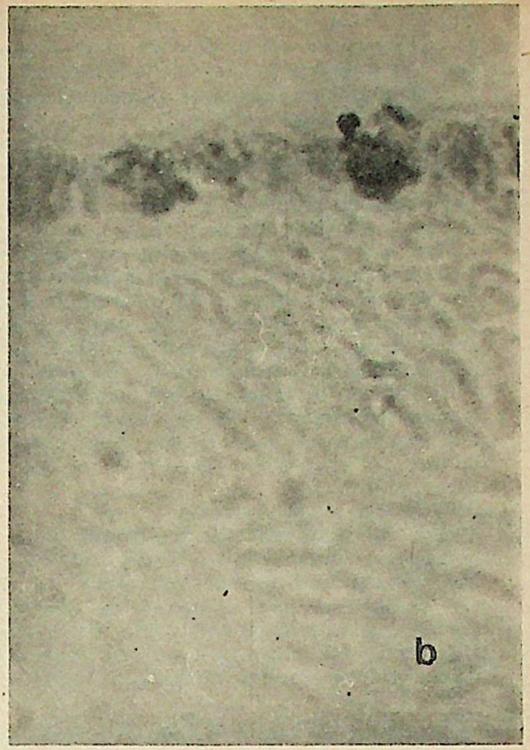


Fig. 2: Epitelio vaginal, fase ovulatoria; a) PAS; b) reacción Polisacáridos-Hierro; c) Alcian Blue pH 2,5; d) Alcian Blue pH 1,0; Obj 100 x (aceite de inmersión). Las células superficiales se tiñen fuerte-

mente con PAS, más débilmente, pero en la misma proporción con la reacción de Hierro, más débilmente aún y en proporción más baja con las dos modificaciones de Alcian Blue.

pequeñas. Siempre tiene forma granular y en el estrato espinoso se ve bien la conocida "fuga de glucógeno" en la misma dirección de la entrada del fijador. En las células superficiales mantiene un carácter homogéneo granular.

## 2. Reacción de Polisacáridos—Hierro

Se pueden distinguir dos ubicaciones.

### 2.1 Ubicación superficial (fig. 2b)

Esta parte está ubicada en la capa superficial y tiende a ocupar la zona apical de las células. La coloración coincide parcial o totalmente (según el preparado con la descrita bajo 1.1). En este caso, coincidencia parcial, quiere decir que, la reacción PAS predomina sobre la reacción del Hierro. De esto se puede concluir que la reacción del Hierro probablemente siempre está combinada con una reacción PAS positiva, mientras que la reacción PAS a su vez, puede ser positiva, sin estar combinada con una reacción de Hierro positiva.

### 2.2 Ubicación en el estrato espinoso.

Esta coloración corresponde, obviamente, en su distribución a la reacción descrita bajo 1.2, y forma igual que ella una especie de "red celular". La reacción de Hierro también en este caso está combinada siempre con una reacción PAS positiva. Sin embargo, la reacción PAS positiva en la mayoría de los casos no coincide con la reacción Hierro positiva (ver 2.1).

## 3. Coloración con Alcian Blue pH 2,5

Se pueden distinguir las mismas ubicaciones que en el punto 2.

### 3.1 Ubicación superficial (fig 2c),

La coloración aparece de la misma manera como la descrita bajo 1.1 y 2.1 y muestra igualmente coincidencia con la reacción PAS. Sin embargo las células positivas son en esta coloración todavía más escasas. Se puede concluir entonces como anteriormente, que la coloración Alcian Blue pH 2,5 siempre está combinada con una reacción PAS positiva y quizá también con una reacción de Hierro positiva, mientras que hay casos en los cuales falta la reacción Alcian Blue pH 2,5, pero están presentes las reacciones de Hierro y PAS.

### 3.2 Ubicación en el estrato espinoso.

Solamente en dos preparados de la fase luteal se encuentra una sustancia que corresponde a lo descrito en 1.2 y 2.2. La comparación de los cortes indican una reacción positiva al Alcian Blue pH 2,5, Hierro y PAS al mismo tiempo.

## 4. Coloración con Alcian Blue pH 1.0 (fig. 2d)

Esta coloración coincide, respecto a la distribución general y por completo con la reacción anterior. De acuerdo a la intensidad de la reacción, a veces parece ser menor.

Entonces se puede concluir que las sustancias positivas con Alcian Blue pH 2.5, generalmente están combinadas con sustancias positivas con Alcian Blue pH 1.0, y más aún, que con alta probabilidad la mayoría de las sustancias demostradas con Alcian Blue pH 2,5, corresponde a sustancias positivas con A.B. pH 1.0. Valen entonces las mismas conclusiones que para el punto 3.

## 5. Coloración con Toluidine Blue pH 4.5

En esta coloración se evalúa solamente la presencia y ubicación de metacromasia. Con respecto a ésta, existe una coincidencia completa con las dos coloraciones anteriores.

Se puede concluir entonces, que la presencia de metacromasia se debe muy probablemente en su totalidad a las sustancias positivas con Alcian Blue pH 2,5 y pH 1.0.

## 6. Secuencia Feulgen—Methylene Blue (F—MB)

Para la reacción de Feulgen no se realizó la estimación cuantitativa. La coloración con MB siempre aparece en forma homogénea, es decir, que si una capa celular tiene reacción positiva, todas las células de esa capa presentan la misma reacción. Única excepción de esto, son las células en mitosis que se encuentran en las capas más profundas y muestran reacción negativa.

La coloración siempre se limita al citoplasma y al nucleolo. Las diferencias son considerables y especialmente bien visibles, entre los fibrocitos del corion según los distintos estados ováricos (ver 7).

Una correlación directa de ésta, con las otras coloraciones realizadas, no se puede verificar. Sin embargo, hay que mencionar que predomina la coloración de la capa basal con respecto a la coloración de los otros estratos, mientras en todas las reacciones anteriores hay una preferencia sobre los estratos superiores dejando negativa a la capa basal.

## 7. Relación del grado de coloración con el estadio sexual.

En la tabla 1. están relacionados los resultados de la estimación cuantitativa de las coloraciones, con los diferentes estadios sexuales.

La tabla indica las tendencias principales de los grados de coloración y entre paréntesis debajo de ellos la dispersión de estos grados. Especialmente por estas dispersiones, en general amplias, se ve que en el propio epitelio, ninguno de estos datos (1) recogidos, tiene exclusividad para un cierto estadio sexual. Es decir, ninguna de las coloraciones aplicadas se limita en forma específica a uno o más estadios sexuales y queda específicamente negativa en otros. Estos métodos entonces no permiten la determinación de manera disyuntiva ni de las fases estrales ni de la preñez. Pero contrariamente, un resultado en este sentido exitoso, se presenta en los fibrocitos del corion. Estas células toman exclusivamente en la fase de la maduración folicular y raras veces en la ovulación, el colorante azul en la secuencia Feulgen—Methylene Blue (fig. 3a), y hay que hacer notar que en nuestro material todos los preparados de la fase de maduración (de 7 animales) muestran sin excepción esa particularidad, mientras los preparados de las cerdas preñadas y de las fases estrales, a pesar de la ovulación, quedaron absolutamente negativos en la coloración con Methylene Blue (fig. 3b).

De las tendencias se puede señalar lo siguiente:

1. El glucógeno así como las sustancias ubicadas en el estrato superficial y PAS positivas, Alcian Blue y/o Polisacáridos—Hierro aparecen en forma más pronunciada en la maduración. Lo mismo vale para la coloración de las capas profundas (III y IV de la tabla) con Methylene Blue.
2. En la preñez, el epitelio muestra siempre una baja proporción de glucógeno, pero relativamente alta proporción de las sustancias superficiales (1.1, 2.1 y 3.1) positiva con PAS, Alcian Blue y/o Polisacáridos—Hierro así como con Methylene Blue.
3. Las sustancias ubicadas en el estrato espinoso y PAS positivas, Polisacáridos—Hierro y Alcian Blue se distinguen más en las fases Luteales. Las sustancias Alcian Blue positivas se encuentran exclusivamente en la fase luteal I, si bien sólo se ve en los preparados de 2 cerdas.
4. En la preñez faltan dichas sustancias en todos los preparados.

## 8. Formaciones quísticas

Para la evaluación de las coloraciones hasta ahora descritas, no se tomó en cuenta, los fenómenos que en muchos casos son responsables de una reacción positiva que se adiciona a los demás resultados. Estos fenómenos aparecen como formaciones quísticas.

Coloración	P A S				Poliacáridos-Hierro				Alcian Blue Ph1.0			Methylene Blue				
	Glucógeno				Superficie	Estrato espinoso				Superficie	Estrato espinoso			Epitelio		Corion (fibrocitos)
	I	II	III	IV	I	I	II	III	IV	I	I/II	III/IV	I/II	III/IV		
Estado sex.																
Maduración follicular	+	+	±	0	**	±	+	0	0	**	0	0	0	0	**	**
	(0-2)	(0-2)	(0-1)		(0-3)	(0-1)	(0-1)	(0-1)		(0-3)					(0-1)	(0-2)
Fase ovulatoria	0	0	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	±	0	0	0
	(0-2)	(0-1)	(0-1)		(0-2)	(1-2)	(1-2)	(0-1)		(0-2)	(0-2)	(0-2)	(0-1)		(0-±)	0
Fase Cuerpo Lúteo I	0	0	0	0	0	**	**	+	0	0	**	+	±	0	0	0
	(0-2)				(0-1)	(1-3)	(1-3)	(0-2)		(0-1)	(0-2)	(0-2)	(0-1)		(0-±)	(0-2)
Fase C.L. II y recuperación	0	0 <sup>(**)</sup>	0 <sup>(**)</sup>	0	0	±	+	±	0	0	0	0 <sup>(**)</sup>	0 <sup>(**)</sup>	0	0	0
	(0-2)	(0-1)	(0-1)		(0-3)	(0-2)	(0-2)	(0-1)		(0-1)					(0-1)	(0-2)
Preñez	0	/	/	0	+	0	/	/	0	+	0	/	/	0	+	0
	(0-1)			(0-1)	(1-3)					(0-3)					(0-2)	(0-2)

(\*) Capas epiteliales: I Capa superficial  
 II Capa espinosa superficial  
 III Capa espinosa profunda  
 IV Capa basal

(\*\*) Esta capa falta en varios preparados del grupo.

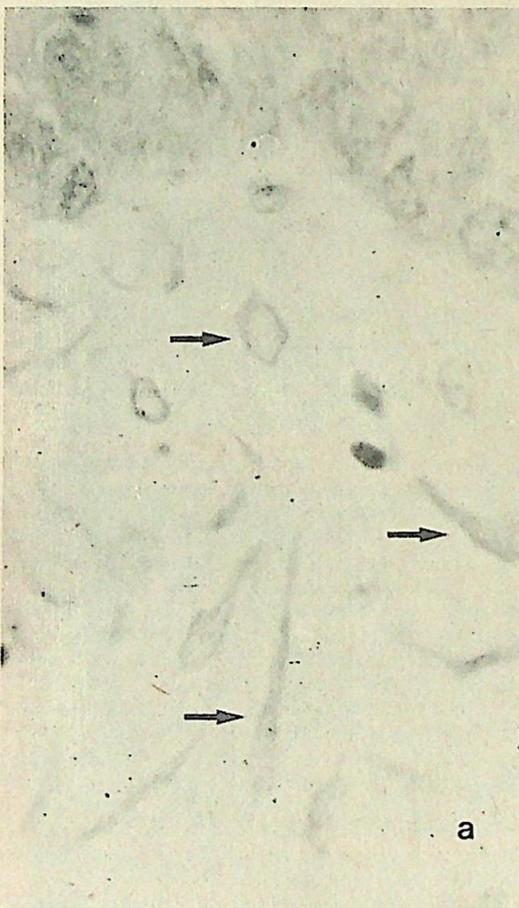


Fig. 3: Epitelio vaginal y corion; a) fase de maduración follicular; b) cerda preñada. Feulgen Methylene Blue, Obj 100 x (aceite de inmersión). Los fibrocitos del corion en la fase de maduración tienen

un citoplasma bien teñible con azul de metileno (flechas), mientras que en el animal preñado son negativos y sólo se tiñen los núcleos (reacción de Feulgen).

Como siempre contienen células en degeneración o restos de células, hay que considerarlos como signos de una destrucción epitelial. Sin embargo aparecen en la mayoría de los preparados en todas las fases estrales, faltando sólo en los epitelios de cerdas preñadas(\*).

Se pueden señalar los siguientes estadios de estas formaciones:

- Degeneración de células singulares del estrato superficial y espinoso superficial, expresada especialmente, por picnosis del núcleo, reacción PAS negativa, Hierro y Alcian Blue también negativa y falta de metacromasia (típico para la fase de recuperación y maduración).
- Más avanzado el proceso, aparecen sustancias positivas al PAS y Alcian Blue y metacromasia; el proceso queda limitado a ciertas células en particular, pero ya pueden aparecer granulocitos neutrófilos acompañándolas (típico de la fase de maduración y ovulación) y en un grado menor también para la recuperación (fig. 4).



Fig. 4: Epitelio vaginal, estrato espinoso, fase ovulatoria. Feulgen-reacción Polisacáridos-Hierro; Obj 100 x (aceite de inmersión). Tres células (flechas) con núcleo picnótico y reacción positiva de Hierro en sus paredes. Eso bien puede ser el comienzo de formaciones quísticas. En estos casos parece lógico que las mucinas demostradas se deben al proceso degenerativo que obviamente tiene lugar.

- El proceso desciende hasta el estrato espinoso profundo y al mismo tiempo se aumenta la tendencia de las formaciones quísticas a confluir; la reacción en las coloraciones mencionadas es pronunciada y la infiltración por granulocitos es considerable (típico para la fase de ovulación hacia cuerpo lúteo I).
- La mayoría de las formaciones llegan a tamaños considerables y están llenos de granulocitos neutrófilos y eosinófilos, restos de núcleos y a veces plasmocitos; entre los que son positivos, hasta fuertemente positivos para el PAS, Hierro y Alcian Blue; hay otras formaciones que son absolutamente negativas (cuerpo lúteo I y II) (fig. 5).

Generalmente se pueden distinguir las siguientes combinaciones de reacciones:

- Sólo positivo con PAS (no digestible con ptialina).
- Positivo con PAS, Hierro y Alcian Blue pH 2,5.
- Positivo con PAS, Hierro, Alcian Blue pH 2,5 y 1.0 y metacromasia.
- Negativos con todas las reacciones.

Esquemáticamente se puede decir que las formaciones pequeñas se tiñen intensamente con todas las reacciones y su basofilia se debe entonces más que nada a las sustancias PAS positivas metacromáticas y Alcian Blue pH 1.0 positivas. Estos quistes, cuanto más grandes son, mayor tendencia muestran a colorearse débilmente, causa en parte, del efecto de "difusión" de la gran cantidad de células libres, en parte también por falta absoluta de sustancias, especialmente de sustancias positivas al PAS, Alcian Blue pH 1.0 y con metacromasia (fig. 5).

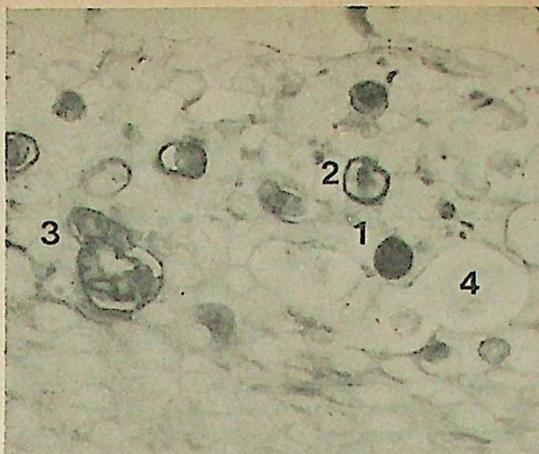


Fig. 5: Epitelio vaginal, fase de cuerpo amarillo temprana. PAS, Obj. 40 x. Este epitelio muestra los diferentes estadios de las formaciones quísticas; (1) estadio temprano, fuertemente y por completo teñida; (2) la formación es más grande a posteriori pero menos teñida; (3) se nota la confluencia de varias formaciones quísticas; (4) las formaciones más grandes son PAS negativas.

## DISCUSION

De los resultados obtenidos, resumimos el siguiente catálogo de sustancias demostrables en el epitelio vaginal de la cerda:

- El Glucógeno, como sustancia positiva en la reacción PAS y digerible con ptialina (ver también 22, 23 y 24).  
Tuvimos la impresión que el glucógeno en el epitelio de la cerda aparece en forma menos masiva de lo que se describe para epitelios humanos (se comparan 6, 11).
- Un grupo de sustancias positivas en la reacción PAS, no digeribles por ptialina y no acompañadas por sustancias ácidas. Bajo nuestras condiciones de preparación o procesado (deshidratación en los alcoholes, infiltración con benceno) y con la localización (epitelio), esas sustancias deben ser glucoproteínas (13, cap. 14).
- Un grupo de sustancias positivas con la reacción Polisacáridos-hierro, parcialmente negativas con Alcian Blue pH 2,5, negativas a pH 1.0 y sin metacromasia. Lo que demostramos entonces, deben ser sustancias con grupos carboxilos (9).

Esto, y el hecho que la sustancia en cuestión está siempre acompañada por otra con reacción PAS positiva, son fuertes indicios de la presencia de ácido siálico (13, cap. 14). El conjunto, del cálcido siálico con las glucoproteínas (PAS positivas) podemos clasificarlo como sialomucinas (21).

- Un grupo de sustancias por lo menos parcialmente positivas a la reacción de Hierro y positivas con las coloraciones Alcian Blue pH 2.5 y 1.0 y con metacromasia. En este caso, se trata de sustancias con grupos sulfatos, posiblemente acompañadas por sustancias con grupos carboxilos (13). Como también siempre están acompañadas por glucoproteínas, las podemos clasificar como sulfomucinas (21).

Estas sustancias (a pesar del glucógeno) las encontramos en tres ubicaciones y según éstas, se distinguen tres diferentes comportamientos:

- Con ubicación superficial (estrato superficial del epitelio) encontramos las glucoproteínas que están en su mayoría acompañadas por grupos sulfatos, representando además sulfomucinas.
- En los quistes y formaciones quísticas, predominan obviamente los grupos sulfatos como acompañantes

de las glucoproteínas, que con ifrecuencia también aparecen solas. En éstos, entonces, encontramos prin principalmente sulfomucinas, sin poder excluir del todo la presencia de sialomucinas.

3. En el estrato espinoso del epitelio, concentradas en la región de las paredes celulares, encontramos casi exclusivamente glucoproteínas, que sólo en la fase luteal forman sialomucinas y muy raras veces sulfomucinas.

Estos son comportamientos gradualmente tan diferentes que podrían indicar que se trata, en las tres ubicaciones, de sustratos bioquímicamente distintos. Si por histoquímica fuera posible caracterizarlos más exactamente o no, será cuestión de un examen histoquímico más sofisticado.

Además de las reacciones para la identificación de las mucinas, realizamos la técnica Feulgen-Methylene Blue, que demuestra en una forma bastante electiva DNA y RNA (8).

Nos interesó en esta secuencia, especialmente la demostración del RNA, porque este ácido se relaciona directamente con la síntesis de proteínas (8, 13). Se encontró que el RNA en cierta forma, muestra un comportamiento contrario al de las otras sustancias. Con gran constancia aparece en la capa basal del epitelio, mientras que las mucinas se localizan exclusivamente en los estratos más superficiales. En forma más acentuada se ve esto en la fase de maduración, en la cual normalmente una coloración fuerte con Methylene Blue en el estrato basal coincide con una reacción fuerte para las sialo y sulfomucinas en el estrato superficial.

De acuerdo a esto, se podría suponer que la base pro-

teica de las mucinas va a ser preformada ya en las primeras etapas del desarrollo de la célula epitelial, mientras que más tarde se agrega la porción glucídica y con más demora todavía en último instante la parte ácida.

Cabe destacar que se encontró (1) en trabajos sobre células del tejido conjuntivo, aspectos que pueden soportar esta teoría. Según ellos la multiplicación celular (como sucede también en la capa basal del epitelio vaginal) impide la formación de ciertas macrocélulas carboxiladas y sulfatadas y sólo la célula especializada, que no se divide más, es capaz de tal síntesis. Sin embargo faltan aún más confirmaciones para poder aplicar estos datos al tejido aquí tratado.

Otro punto de ser discutido se nos presenta, cuando queremos relacionar las sustancias demostradas con el estadio sexual. Algunas de ellas acompañan obviamente, signos de la destrucción epitelial como las formaciones quísticas. Otras aparecen en cantidades más grandes justamente en la fase de la construcción epitelial, es decir en la maduración folicular. Las primeras, que son las mucinas en las formaciones quísticas, consideramos que se trata de la expresión de una degeneración mucosa. Esta forma de degeneración es común en epitelios (19), y nosotros vimos las mucinas en estas formaciones siempre acompañadas por signos de degeneración celular (picnosis, cariorexix) (ver fig. 4).

Por otro lado, teóricamente, las mucinas en las células superficiales bien podrían ser resultado de un proceso degenerativo similar. En favor de esto habla que éstas son las células que próximamente serán descamadas (14).

Sin embargo, regularmente se trata de células que tienen un núcleo no alterado y que a menudo recuerdan células de tipo secretoras, con núcleo grande, nucleolo bien visible y una red fina de cromatina (fig. 6).



Fig. 6: Epitelio vaginal, fase de maduración folicular. H.E.; Obj. 100 x (aceite de inmersión). Las células superficiales son de tipo cilíndrico alto (flechas) y tienen un núcleo con nucleolo muy prominente

así como con una fina red de cromatina. Estas células se parecen más a células secretoras que a células involucradas en procesos degenerativos.

Además, la mucina nunca aparece limitada a la periferia de la célula, como en el caso de las células de las formaciones quísticas, sino que aparece siempre en el interior de la parte apical (fig. 2).

Un comportamiento algo ambiguo muestra el tercer tipo de sustancias que aparece principalmente en el estrato espinoso y recuerda en el corte a una especie de red celular.

Como es demostrable en casi todas las fases del ciclo en su forma PAS positiva, no debe ser muy probable que se trate de un indicio de degeneración.

Pero llama la atención que a la glucoproteína neutral se le agrega justamente en el momento de la degeneración epitelial más fuerte, un componente carboxilado y/o sulfatado. Hay que hacer notar que esas sustancias también se limitan a la periferia celular, por lo cual transmiten un aspecto bastante parecido a los estadios tempranos de las formaciones quísticas. La diferencia aparece en el hecho que los últimos, afectan a una célula en particular mientras que los primeros afectan a la capa entera. Hipotéticamente concluimos, que las otras sustancias (en el estrato espinoso) son signo de una degeneración más masiva y rápida, pero sin duda también del tipo mucoso.

Con respecto al método del diagnóstico de las fases estrales y particularmente de la preñez, añadimos que los métodos aplicados en este trabajo no son aptos para una clara diferenciación de estos estadios sexuales. La única expresión de ello, no la encontramos curiosamente en el propio epitelio, sino en el tejido conjuntivo del corion. Nos referimos a la proporción de RNA de los fibrocitos de la fase de maduración folicular. Este signo nos parece bastante valedero, y significa un importante aporte para una diferenciación más segura entre cerdas preñadas y no preñadas después de un servicio. Destacamos los siguientes puntos:

1. La diferencia demostrada entre animales preñados y no preñados después de un servicio, aparece en la

fase anterior a una supuesta próxima ovulación. Con eso se cumple la condición fundamental para cada diagnóstico precoz.

2. La diferencia entre animales preñados y no preñados aparece en la secuencia Feulgen-Methylene Blue, en forma fácil, discriminada y segura de reconocer.
3. La técnica es relativamente sencilla si se toma en cuenta que será posible realizar la misma sin reacción previa de Feulgen. Sin embargo para ello sería necesario adaptarla.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De los resultados presentados, concluimos en primer lugar, que en futuros trabajos sobre el epitelio vaginal en cerdas habrá que prestar más atención al comportamiento de la capa subepitelial. Esta capa parece ser bastante sensible, con respecto a su actividad proteosintética, demostrada por intermedio del RNA. Este aspecto debería ser profundizado por estudios de las proteínas con métodos histoquímicos y bioquímicos. Especialmente la parte fibrosa debería merecer un destacado interés.

En segundo lugar podemos decir que la mucosa, si bien es ciertamente influida por el estado sexual del animal, obedece obviamente también a otros factores.

Sobre esto, nuestro material no nos puede informar por carecer de datos detallados sobre los respectivos animales. Creemos que en particular la edad de las cerdas debe ser examinada con más atención. Para averiguar hasta qué grado alcanza realmente la influencia del ciclo estral, será menester extraer seguidamente biopsias de cerdas en ciclo normal. Así se excluye la desviación causada por factores individuales y se obtiene una serie de muestras cuyas oscilaciones son provocadas, con alta probabilidad, únicamente por el estado cíclico del animal.

## SUMMARY

This paper is about an histochemical study on the vaginal epithelium of the sow. This epithelium contains sialic and sulfo mucins in different locations. Partly these mucins are resultant of mucous degeneration and also a result of a true mucous secretion. As an aid to pregnancy diagnosis a consistent difference is demonstrated

between subepithelial corion fibrocites of pregnant sows and sows in follicular maturation phase. Based on this difference we can distinguish between pregnant and not pregnant animals, well in advance to the next heat after breeding.

Veterinaria 76 : 63 - 71, 1981

## REFERENCIAS

1. ABBOT, J.; y HOLTZER, H.: The loss of phenotypic traits by differentiated cells. III. The reversible behaviour of chondrocytes in primary cultures. *J. Cell Biol.* 28, 473-487, 1966.
2. BABA, A. I.: Le cytodagnostic de gestation chez la truie par reclage vaginal. *Zbl. Vet. Med. A* 21, 225-230, 1974.
3. BAL, H. S.; y GETTY, R.: Vaginal histology of the domestic pig: histomorphology from birth to 8 years with some clinical aspects. *J. Reprod. Fert.* 28, 1-7, 1972.
4. BUSCH, W.: Die periodischen Veränderungen des Vaginalepithels beim Schwein und die Möglichkeit ihrer Heranziehung zur Graviditätsdiagnose. *Wiss. Z. Humboldt-Univ., Berlin, Math.-Nat.R.* 15, 833-865, 1966.
5. DIEHL, J.R.; y DAY, B.N.: Utilization of frozen sections with the vaginal biopsy technique for early pregnancy diagnosis in swine. *J. Anim. Sci.* 37, 114-115, 1973.
6. DI FIORI, M.S.H.: Diagnóstico histológico. Tomo II: Atlas. Séptima ed.; El Ateneo, Buenos Aires, 1974.
7. FABIAN, G.: Zum zyklischen Verhalten vornehmlich der Höhe des Endometriums beim Schwein. *Zbl. Vet. Med.* 8, 214-251, 1961.
8. GARVIN, A. J.; HALL, B. J.; BRISSIE, R. M.; y SPICER, S. S.: Cytochemical differentiation of nucleic acids with Schiff-methylene blue sequence. *Histochem. Cytochem.* 24, 587-590, 1976.
9. GRAUMANN, W.; y CLAUSS, W.: Weitere Untersuchungen zur Spezifität der histochemischen Polysaccharid-Eisenreaktion. *Acta histochem.* 6, 1-7, 1958.
10. HALE, C. W.: The histochemical demonstration of acid polysaccharides in animal tissue. *Nature (London)* 157, 802, 1946.
11. HAM, A. W.: Tratado de histología. Séptima ed.; Ed. Interamericana, México, 1975.

- 12 HEMKEMEYER, W.: Trächtigkeitsdiagnose beim Schwein anhand von Ausstrichen der Vaginalschleimhaut. Tesis Dr. med. vet., Hannover, Alemania (RF). 1976.
- 13 LILLIE, R. D.; y FULLMER, H. M.: Histopathologic technic and practical histochemistry. Quarta ed.; Mc Graw-Hill Inc., New York etc. 1976.
- 14 MORTON, D. B.; y RANKIN, J. E. F.: The histology of the vaginal epithelium of the sow in oestrus and its use in pregnancy diagnosis. Vet. Rec. 84, 658-662, 1969.
- 15 POLICARD, A.; BESSIS, M.; y LOCQUIN, M.: Traité de microscopie. Masson, Ed.; Paris. 1957.
- 16 PREUSS, F.: Zur vergleichenden Terminologie der Sexualzyklen. Berl.Münch. tierärztl.Wschr. 72, 303-306, 1959.
- 17 RÖVER, H. F.: Biotechnische Möglichkeiten zur Brunst und Trächtigkeitsdiagnose beim Schwein. Tesis Dr.agr., Göttingen, Alemania (RF). 1972.
- 18 RÖVER, H. F.: Untersuchungen zur Trächtigkeitsdiagnose beim Schwein mittels Vaginalbiopsie. Tierzüchter 26, 108-109, 1974.
- 19 RUNNELS, R.A.; MONLUX, W.S.; y MONLUX, A.W.: Principios de patología veterinaria. Ed. Continental, México etc. 1968.
- 20 SPICER, S.S.; HORN, R.G.; y LEPPi, T.J.: Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides. En: WAGNER, B.M.; y SMITH, D.E.: The connective tissue. p. 251-303. Baltimore. 1967.
- 21 SPICER, S.S.; LEPPi, T.J.; y STOWARD, P.J.: Suggestion for an histochemical terminology of carbohydrate-rich tissue components. J. Histochem. Cytochem. 13, 599-603, 1965.
- 22 STEINBACH, J.: Funktionale und morphologische Untersuchungen zur Brunstsynchonisierung Weiblicher Schweine mit gestagenen steroiden. Tesis Dr. agr., Göttingen, Alemania (RF). 1966.
- 23 STEINBACH, J.; y SMIDT, D.: Untersuchungen über die Wirkungen von zwei gestagenen Substanzen auf die Fortpflanzungsfunktionen und auf die Struktur der Genitalorgane junger Sauen. Zb.Vet.Med. R.A 17, 42-61, 1970.
- 24 STEINBACH, F.; y SMIDT, D.: Cyclical phenomena in the female genital tract of swine - histological observations. J.anim. Sci. 30, 573-577, 1970.
- 25 WALKER, D.: Diagnosis of pregnancy in pigs by examination of vaginal mucosae. Vet.Rec. 81, 648-652, 1967.
- 26 WILLIAMSON, P.; y HENNESSY, D.: An assesment of the vaginal biopsy technique of pregnancy diagnosis in sows. Australian Vet.J. 51, 91-93, 1975.
- 27 WILSON, K.: Histological changes in the vaginal mucosa of the sow in relation to the oestrus cycle. Amer.J.Anat. 37, 417, 1926.
- 28 WRATHALL, A.E.: Histology of the vaginal epithelium of the sow during oral administration of Methalibure (ICI 33828). J.Reprod.Fert. 21, 127-132, 1970.

Recibido para publicar: 4 - octubre - 1980