

13



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CUANTIFICACION DE CELULAS PLASMATICAS EN LA MUCOSA DEL CUELLO UTERINO DE PERRA EN FASE ESTROGENICA Y PROGESTACIONAL DEL CICLO ESTRAL

TESIS PRESENTADA ANTE LA DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DE LA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

POR

MA. MAGDALENA CELALLOS VAZQUEZ

- ASESORES: M.V.Z. ROSA EMILIA LAVIELLE
M.V.Z. MARIO PEREZ MARTINEZ
M.V.Z. OSCAR OLIVEROS BELMONT



MEXICO, D.F.

2001

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 Dios.

A mis padres: Rosa Ma. Vázquez y Fabián Celallos por su amor y apoyo.

A mis hermanos: Araceli y Fabián.

A Oscar: por su ayuda, apoyo y cariño.

A mis hijos: Yanei y Oscar por su paciencia y amor.

A mis amigos que de alguna manera colaboraron en este trabajo: Ma. Del Carmen Sprowls, Ivonne Aubert, Abigail Gutierrez, Ivonne Méndez, Alejandro Villaseñor, Graciela Saiz, Judith Barrientos y muy especialmente a la Dra. Helia Navarro por su amistad y ayuda.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores de tesis por su ayuda y paciencia.

A los miembros del jurado: MVZ Nuria de Buen, MVZ Rosa Emilia Lavielle, MVZ Socorro Lara, MVZ Carlos Esquivel por la revisión de la tesis y sus consejos.

Al MVZ Alfonso Baños Crespo: por su comprensión.

Al MVZ Fernando Viniestra, MVZ Katuska Olmos y MVZ Alejandro Vázquez Del Hospital Regional "20 de Noviembre": por su ayuda en la obtención de el material biológico

Al MVZ Jesús Paredes.

A Francisco López por su cooperación en la realización de técnicas histológicas.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	5
HIPOTESIS	6
MATERIAL Y METODOS	7
RESULTADOS	11
DISCUSION	12
CONCLUSIONES	15
LITERATURA CITADA	16
FIGURAS	20-24

RESUMEN

CELALLOS VAZQUEZ MA. MAGDALENA. Cuantificación de células plasmáticas en la mucosa del cuello uterino de perra en fase estrogénica y progestacional del ciclo estral. (Bajo la asesoría de la M.V.Z. Rosa Emilia Lavielle; M.V.Z. Mario Pérez Martínez y M.V.Z. Oscar Oliveros Belmont).

El objetivo del presente estudio fue determinar el patrón de distribución de las células plasmáticas (CP) en el segmento craneal y caudal del cuello uterino de la perra en fase estrogénica y progestacional del ciclo estral. Mediante laparotomía se obtuvieron los cuellos uterinos de 10 perras criollas clínicamente sanas, previa estimación de la etapa del ciclo estral en que se encontraban por medio de citología vaginal exfoliativa. Se obtuvieron fragmentos del segmento craneal y caudal del cuello uterino los que se fijaron, procesaron e incluyeron en parafina. Posteriormente se efectuaron cortes histológicos que se tiñeron con hematoxilina-eosina y con verde metil-pironina para evidenciar a las células plasmáticas. Con el objetivo 40X de un microscopio fotónico y un ocular con retícula micrométrica se contaron las CP en 16 campos microscópicos para conocer su población por mm^2 . Durante la fase estrogénica del ciclo estral de la perra la población de CP del cuello uterino registró variaciones de tipo cuantitativo entre los dos segmentos anatómicos estudiados ($P < 0.05$), siendo su número significativamente menor en el segmento craneal con respecto al segmento caudal. A diferencia de lo anterior, durante la fase luteínica no hubo diferencia significativa entre los dos segmentos anatómicos estudiados ($P > 0.05$). Los datos obtenidos en el estudio indican que la distribución de las células plasmáticas de la mucosa del cuello uterino de la perra adulta, presenta diferencias en sus respectivas porciones anatómicas, lo que apoya el concepto de la existencia de una distribución regionalizada de las células inmunitarias presentes en la mucosa del tracto genital femenino. Por otro lado, esta distribución celular también es influenciada por los cambios que ocurren durante el ciclo estral en la concentración de las hormonas ováricas.

Descriptores: Células plasmáticas, cuello uterino, perra, ciclo estral.

INTRODUCCION

En la actualidad se acepta que la respuesta inmunológica es un proceso complejo que involucra interacciones con los sistemas nervioso y endocrino. La influencia de las hormonas sexuales en los procesos infecciosos se ha puesto en evidencia ante el hecho de que la susceptibilidad a infecciones bacterianas y parasitarias es influenciada por el sexo del huésped, lo que es apoyado por estudios en los que se ha visto el impacto que tiene sobre la respuesta inmunológica la castración en machos y hembras (1,2).

La influencia del sistema endocrino sobre el inmunológico también se ha estudiado a nivel de las mucosas del organismo (3). Debido a que la mucosa del aparato reproductor femenino normalmente esta expuesta a la acción de microorganismos potencialmente patógenos, la primer función del sistema inmunológico asociado a mucosas es la de evitar la penetración de antígenos microbianos del medio externo (4,5).

La mucosa del aparato reproductor femenino presenta células inmunológicamente relevantes para actuar en contra de posibles infecciones. Entre las células que estan involucradas en esta función se encuentran: linfocitos (B y T), macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y células cebadas (6)

El linfocito es la célula central del sistema inmunocompetente, cuando un linfocito B es estimulado por un antígeno determinado, este responde diferenciándose en célula plasmática (CP). Las CP aumentan su tamaño debido al desarrollo del retículo endoplásmico rugoso y porque contienen un mayor número de mitocondrias. La función principal de las CP es sintetizar y liberar al exterior moléculas de anticuerpos, los que están dirigidos específicamente contra el epítipo que estimuló el linfocito B del que ellas derivan. Por lo anterior, los anticuerpos son considerados como las moléculas efectoras de la respuesta inmune humoral (4).

Los anticuerpos son glicoproteínas que se pueden encontrar en diferentes sitios: a) asociadas a la membrana de los linfocitos B, funcionando como receptores para antígenos; b) circulando en el plasma sanguíneo; c) en los líquidos que bañan los tejidos y d) en las secreciones seromucosas (7).

Las CP se encuentran en el tejido conjuntivo de cualquier parte del organismo, sin embargo son más numerosas en las regiones corporales expuestas continuamente a la posible acción de agentes infecciosos, como es el caso de la mucosa del cuello uterino (CU) y de la vagina, debido a su cercanía anatómica con la región perineal (donde residen permanentemente microorganismos) (8).

Morfológicamente las CP se caracterizan por ser voluminosas y ovoides, presentan un núcleo excéntrico y abundante retículo endoplásmico rugoso. Debido a que tienen abundante cantidad de ácido ribonucleico (ARN), se consideran pironinófilas. La pironina es un colorante básico tetraetildiaminoxanteno con afinidad especial por el ARN (4, 9).

El CU de la perra, como en otras especies domésticas, desempeña un papel fundamental en el proceso reproductivo debido a que funciona como una válvula con capacidad de contraerse o relajarse dependiendo de la situación hormonal de la hembra; posee células que normalmente secretan un fluido de color claro y aspecto mucoso durante el estro con efecto antibacteriano; y constituye un sistema inmunosecretor (3,10). En la rata, la secreción de IgG e IgA aumenta durante el proestro, cuando la concentración plasmática de estrógenos es elevada (11). Por otro lado, en la yegua el número de células plasmáticas (CP) endometriales tiende a ser mayor durante la fase progestacional (12).

En diversos estudios histoquímicos y de determinación de la concentración de inmunoglobulinas, efectuados en útero de diferentes especies domésticas, se ha observado que la población de CP localizadas bajo el epitelio parecen estar bajo control endocrino (8, 13, 14,15, 16,17,18, 19, 20).

OBJETIVOS

Considerando: i) que la morfofisiología del útero es regulada en gran medida por la secreción ovárica de estrógenos y progesterona (10, 21, 22); ii) que en algunas especies (rata, ratón, yegua) se ha demostrado que la etapa del ciclo estral es un factor determinante en la resistencia de útero a las infecciones en virtud de que la síntesis y secreción uterina de anticuerpos experimenta variaciones paralelas al ciclo reproductivo (11,12) y iii) que no existen estudios en la perra respecto a la dinámica que presenta la población total de células plasmáticas a nivel de la mucosa uterina durante la fase estrogénica y progestacional del ciclo estral.

Se plantearon los siguientes objetivos de estudio:

- 1.- Cuantificar y conocer el patrón de distribución de las CP en el segmento craneal y caudal del cuello uterino de la perra en fase estrogénica y en fase progestacional del ciclo estral.
- 2.- Determinar si existen diferencias cuantitativas entre el número de CP presentes en el cuello uterino, bajo los dos estadios fisiológicos estudiados.

HIPOTESIS

La población de células plasmáticas del cuello uterino de la perra registra cambios en su número de acuerdo a la condición hormonal, estrogénica o progestacional predominante durante el ciclo estral, por lo que existen diferencias cuantitativas de estas células entre ambas fases del ciclo estral.

MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Histofisiología de la Reproducción del Departamento de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. El material biológico se obtuvo en el Bioterio del Hospital Regional "20 de noviembre" del ISSSTE, a partir de los perros que se destinan para efectuar los cursos de entrenamiento de Cirugía Experimental que se imparten a los médicos residentes del Hospital que cursan la especialidad en Cirugía. De acuerdo al reglamento de Bioterio los animales utilizados para investigación son sacrificados por medio de la administración de tiopental sódico o pentobarbital por vía intravenosa, previa tranquilización.

OBTENCION DEL MATERIAL BIOLOGICO

Se utilizaron 10 perras (5 en fase estrogénica y 5 en fase progesterónica del ciclo estral), clínicamente sanas, de diferentes razas, con edades entre dos y cinco años. A cada uno de los animales se les efectuó citología vaginal exfoliativa durante una semana obteniéndose tres muestras de cada una con el fin de estimar la fase del ciclo estral en que se encontraban. Para ello se utilizó un hisopo estéril, el que previa limpieza de la región perineal, se introdujo cuidadosamente hasta llegar a la porción craneal del vestíbulo vaginal en donde se efectuó un movimiento rotatorio logrando de esta manera obtener el material. Posteriormente se efectuó un frotis sobre un portaobjetos y se fijaron las células por inmersión en etanol al 96% durante 5 minutos. Todos los frotis se tincieron con la tinción de Papanicolao (9, 21, 23).

Una vez determinada la fase de ciclo estral por citología vaginal, se procedió a tranquilizar y anestesiarse a los animales para practicarles una laparotomía y así poder obtener las muestras de cuello uterino requeridas. Se obtuvieron 10 cuellos uterinos a partir de los cuales se tomaron fragmentos de 2 cm². de su porción craneal y de la porción caudal. Los fragmentos se fijaron en una solución de formol salino durante un período 24 a 72 horas (Figura 1).

CRITERIO SEGUIDO PARA EVALUAR LOS FROTIS VAGINALES

La citología vaginal exfoliativa (CVE) se basa en determinar el tipo y cantidad de células exfoliadas de la mucosa vaginal durante las distintas etapas del ciclo estral. La dinámica de exfoliación celular es un proceso fisiológico regulado por los cambios que se presentan en la concentración de las hormonas sexuales durante el ciclo estral. Dichos cambios hormonales influyen sobre la morfología de las células epiteliales. Durante la fase folicular o proliferativa del ciclo estral, caracterizada por concentraciones crecientes de estrógenos, el epitelio vaginal madura, lo que origina que las células más superficiales del epitelio queden distantes del aporte sanguíneo por lo que se inicia un proceso gradual de descamación celular (24, 25, 26).

Las células del epitelio vaginal se clasifican en basales, parabasales, intermedias y superficiales. El predominio de alguna de estas células indican distintas etapas de maduración fisiológica denominadas: etapa de proliferación, diferenciación y exfoliación, respectivamente (27, 28, 29).

Se consideraron como células parabasales aquellas que presentaban forma oval o redonda con núcleo prominente y escaso citoplasma, frecuentemente se encuentran formando cúmulos. Estas células predominan durante el periodo de anestro y principios del proestro. Las células intermedias presentan bordes irregulares, abundante citoplasma y su núcleo vesicular central (Figura 2). Las células superficiales se caracterizan por presentar bordes angulosos y presentan un núcleo pequeño. Estas son las células características de la fase estrogénica, por lo que se observan durante el proestro tardío y el estro (24, 27, 28, 30) (Figura 3).

PROCESAMIENTO Y TINCION DE LOS TEJIDOS

Los fragmentos obtenidos previamente fijados se procesaron en un histoquinete automático, se incluyeron en parafina y se efectuaron cortes de 6 μm de grosor con un micrótopo convencional. Posteriormente los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina para evaluar las características del endometrio, para este fin se tomó en cuenta el tamaño y forma de las glándulas endometriales, así como su nivel de secreción.

Con el fin de evidenciar las células plasmáticas, los cortes se tiñeron siguiendo la técnica de verde metil pironina. La pironina es un colorante básico tetraetildiaminoxanteno con afinidad especial por el ARN (9, 23).

CONTEO CELULAR

Se efectuó el conteo de CP en la lámina propia de tejido conjuntivo de la mucosa del CU, mediante el uso de un ocular con retícula micrométrica (Zeiss) y el objetivo 40X. Para este fin se contaron las CP presentes en 16 campos microscópicos tomados al azar para conocer su población por mm^2 .

ANALISIS ESTADISTICO

Se emplearon pruebas no paramétricas para efectuar el análisis de los resultados obtenidos. En la fase estrogénica, para comparar el número de CP por mm^2 de la región craneal con respecto a la región caudal se empleó la prueba de rangos con signo para un experimento pareado. Esta misma prueba fue utilizada para comparar ambas regiones en la fase progestacional.

Para comparar la región craneal en ambas fases del ciclo se empleó la prueba de Wilcoxon de rangos, también se utilizó esta prueba para comparar la región caudal en las mismas fases, considerando para esto que las muestras son independientes (31, 32).

RESULTADOS

Los valores promedio y desviación estándar obtenidos del conteo celular por mm^2 para el segmento craneal y caudal del cuello uterino en fase estrogénica fueron: 13.0 ± 8.1 y 28.6 ± 12.5 , respectivamente y para la fase progestacional los valores fueron: 32.0 ± 10.1 y 33.2 ± 30 , respectivamente. De acuerdo a estos resultados durante la fase estrogénica del ciclo estral de la perra la población de células plasmáticas del cuello uterino registra variaciones de tipo cuantitativo entre los dos segmentos anatómicos considerados .

Así en el segmento craneal se encontró una población de células significativamente menor a la obtenida para el segmento caudal ($P < 0.05$). Contrariamente, durante la fase lútea, no se encontró diferencia significativa entre los dos segmentos anatómicos estudiados ($P > 0.05$).

Al comparar los datos obtenidos para el segmento craneal en fase estrogénica con los de la fase progestacional hubo diferencia significativa entre ambas fases ($P < 0.05$), siendo mayor la población de células en la fase progestacional. Por otro lado, no se encontró diferencia significativa al comparar los valores de ambas fases en el segmento caudal ($P > 0.05$) (Figura 4 y 5).

DISCUSION

La respuesta inmunológica involucra interacciones con el sistema endócrino. La participación de las hormonas sexuales en los procesos infecciosos se ha puesto en evidencia ante el hecho que la susceptibilidad a infecciones bacterianas y parasitarias es influenciada por el sexo del hùésped (13). Los estrógenos son responsables de la proliferación del epitelio, glándulas, estroma y vasos sanguíneos del endometrio, así como de la síntesis de los receptores a estradiol y progesterona (10). Existen evidencias experimentales que advierten de la importancia que tienen las variaciones fisiológicas en la concentración de las hormonas sexuales durante el ciclo estral sobre el nivel de resistencia uterina a las infecciones (8,13, 17). Asimismo, se ha informado de la existencia de células linfoides positivas al receptor de estrógenos en los agregados linfoides del endometrio de la mujer (17).

En el presente estudio se encontraron diferencias cuantitativas y de distribución de las células plasmáticas dependiendo de la etapa del ciclo estral en que se encontraban los animales. El hecho de que la población de células plasmáticas sea menor en el segmento craneal del cuello uterino en fase estrogénica con respecto al número existente de estas células en la fase progestacional, muestra que la microanatomía del sistema inmune de la mucosa del cuello uterino de la perra varía a lo largo de sus respectivos segmentos. Esta diferencia de distribución puede tener implicaciones funcionales importantes ya que debido a la proximidad anatómica que existe entre el segmento craneal del cuello uterino con los cuernos uterinos, es posible

que durante la fase folicular en este sitio disminuya de manera fisiológica su reactividad inmunológica, lo que facilitaría la sobrevivencia del gameto masculino durante su paso hacia el sitio de fecundación.

El hecho que en la fase progestacional la población de células plasmáticas no registre diferencias significativas entre los dos sitios anatómicos estudiados, hace suponer que en esta fase del ciclo es necesario mantener constante dicha población celular en todo el cuello uterino. Tomando en cuenta que durante la fase progestacional del ciclo tienen lugar los eventos preparativos necesarios para que el óvulo recién fertilizado pueda implantarse e iniciarse el desarrollo embrionario, el cuello uterino cumple una función muy importante durante dicha etapa porque además de ser una barrera física y química, se constituye en una importante barrera inmunológica al evitar la acción nociva de cualquier agente infeccioso mediante las inmunoglobulinas de tipo A que secretan las CP presentes en la mucosa del cuello uterino.

Debido a que el endometrio está considerado en la lista de los tejidos en los que tiene lugar la respuesta inmunológica de manera local, en la actualidad existe mucho interés en diversos grupos de investigación en el estudio de la distribución espacio temporal de las células inmunitarias de la mucosa del aparato reproductor femenino y masculino (14, 15). Dentro de las causas frecuentes de infertilidad en la perra se citan las enfermedades infecciosas a nivel uterino (10). El estudio de la dinámica de las células plasmáticas durante diversas condiciones fisiológicas permite comprender mejor la patogenia de las enfermedades que afectan su potencial reproductivo.

Hoy en día gracias al desarrollo de anticuerpos monoclonales, existe evidencia inmunohistoquímica respecto a la existencia de una organización compartimentalizada

de las células inmunitarias, distribuidas en la lámina propia del tejido conjuntivo de diversas mucosas (19, 20, 33). Este nivel de organización permite que las células inmunitarias cumplan su función primaria de protección, así como de entidades moduladoras de otros eventos fisiológicos que ocurren en las mucosas a través de diversas moléculas de naturaleza peptídica (citocinas) que permiten la interacción entre los diferentes componentes celulares del tejido conjuntivo (4).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que la población de células plasmáticas totales presentes en la mucosa del cuello uterino de la perra durante la fase estrogénica del ciclo estral disminuye significativamente en su porción craneal a diferencia de lo que ocurre en la población de células plasmáticas de las dos porciones anatómicas estudiadas durante la fase progestacional del ciclo, en donde no se observan cambios significativos en su número. En conjunto, los datos obtenidos en el presente estudio constituyen una evidencia a favor de que la distribución de las células plasmáticas de la mucosa del cuello uterino de la perra presenta diferencias en sus respectivas porciones anatómicas. Esto hace necesario efectuar más estudios para valorar las implicaciones fisiológicas que pudieran tener en el proceso reproductivo dichos hallazgos.

LITERATURA CITADA

1. Ansar Ahmed S, Penhale W J and Talal N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. *Am. J. Pathol.* 1985; 121: 531-551.
2. García T F y Ocampo L A. Interacciones entre los sistemas inmunitario y gonadal. *Ciencia* 1991; 42: 155-169.
3. Brandtzaeg P. Basic mechanisms of mucosal immunity: A major adaptive defense system. *The immunologist.* 1995; 3: 89-96.
4. Abbas AK, Lichtman AH y Pober I S. *Inmunología celular y molecular.* Madrid (España): Nueva Editorial Interamericana McGraw-Hill, 1995.
5. Del Rey Pineda Guillermo. Importancia inmunitaria de las mucosas en la producción humana. *Inmunología de las mucosas.* México D.F. Editorial Atelier Producciones, 1992.
6. Pérez M M y Romano P M. Interacción Inmunoendócrina en el útero. Papel de las hormonas esteroides sexuales. *Ciencia Veterinaria* 1996; 7: 191-212.
7. Zapata A G and Cooper E L. *The Immune System: Comparative Histophysiology.* England, John Wiley and Sons. 1990.
8. Lander Chacin M F, Jansen P J and Drost M. Effects of stage of the oestrus cycle and steroid treatment of uterine immunoglobulin content and polymorphonuclear leukocytes in cattle. *Theriogenology* 1990; 34: 1169-1184.
9. Estrada F E, Peralta Z L y Rivas M P. *Manual de técnicas histológicas.* México (D F): A G T. Editor, 1982.
10. Hafez E S. *Reproducción e inseminación artificial en animales* 5a ed. México (D F): Nueva Editorial Interamericana, 1987.

- 11- Wira C R and Sandoe C P. Sex steroid hormone regulation of IgA and IgG in rat uterine secretions . *Nature* 1977; 268: 534-536.
- 12- Watson E D and Stokes C R. Plasma cell numbers in uteri of mares with ovarian steroids. *Equine Vet J.* 1988; 20: 424-425.
- 13- Hussain A M. Bovine uterine defense mechanisms. A review. *J.Vet. Med.*1989; B36: 641-651.
14. Mitchel G, Liu I , Perryman I , Stanbenfeldt G and Hudhes J P. Preferential production and secretion of immunoglobulins by the endometrium a mucosal immune system. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1982; 32:161-168.
15. Murdoch A , Buckey C H and Fox H. Hormonal control of the secretory immune system of te human uterine cervix. *J. Reprod. Immunol.*1982; 4: 23-30.
16. Vander Wielen A L and King G J. Intraepitelial lymphocytes in the bovine uterus during the oestrus cycle and early gestation. *J. Reprod. Fert.* 1998; 70: 457-462.
17. Tabibzadeh S and Satyaswaroop P. Sex steroid receptors in lymphoid cells of human endometrium . *Am J. Clin. Pathol.* 1989; 91: 656-663.
18. Lavielle R E , Pérez M M, Hernández G R, Martínez M J J. Cuantificación de células plasmáticas en cuello uterino de cerda, en fase folicular y lútea del ciclo estral. 1994; *Vet. Méx.* 25 (1)
19. Pérez M M, Mendoza G M, Mena LR y Romano P M. Lymphocytes of the uterus in adult goat. Histological and Immuno histochemical study with confocal microscopy. *Memorias de la XI Reunión Nacional de la Asociación Mexicana de la Reproducción Caprina, A C.*1996 octubre 16-18; Chapingo Edo de México.

20. Vega-López M. Sistema inmune intestinal porcino. *Ciencia Veterinaria* 1994; 6: 145-172.
21. Banks J W. *Histología Veterinaria Aplicada*. México (D.F): Manual Moderno, 1986.
22. Feldman E C and Nelson R W. *Canine and Feline endocrinology and reproduction*. W.B. Saunders, Philadelphia, 1987.
23. Lynch J M , Raphael S , Mellor L , Sparte D and Inwood M. *Métodos de Laboratorio*. México D F : Interamericana, 1977.
24. Esquivel Lacroix, Carlos Fernando. *Inseminación Artificial en Caninos*. Tesis de Licenciatura. México D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM 1990.
25. de Buen Nuria. *Citología Vaginal, ciclo estral : Memorias del curso de actualización Temas selectos de Laboratorio Clínico*. 1986. México (D.F.) 118-124. Fac. Med. Vet y Zoot. UNAM. México D.F.
26. Christie D W, Bailey J B and Bell A T. Classification of cell types in vaginal smears during the canine oestrous cycle. *Br. Vet. J.* 1989; 128: 301-310.
27. Schutte A P. *Canine Vaginal Cytology-1 Technique and Cytological Morphology*. *J Small Anim. Pract.* 1963; 8 : 301-306.
28. Jeffie F R. Normal canine vaginal citology. *Vet. Clin. Nort. Am.* 1977; 7: 667-691.
29. Fowler E H, Feldman M K, Loeb W F. Comparison of histologic features of ovarian and uterine tissues with vaginal smears of the bitch. *Am J. Vet. Res.* 1971; 32 (2): 327-334
30. Roszel J F. *Genital Cytology of the Bitch*. *Scope XIX.* 1975: 3-15

31. Conover. Practical Nonparametric Statistics. John Willey & Sons. Universidad de Texas (USA) 1980.
32. Steel S R y Torrie H J. Bioestadística, Principios y procedimientos. Estadística no Paramétrica. 2a ed. México, D.F. Mc Graw-Hill, 1988.
33. Brandtzaeg, P., Baekkevold, E., Farstad, I., Jahnsen, F., Johansen, F., Nilsen, E., Yamanaka, T. Regional specialization in the mucosal immune system: What happens in the microcompartments?. Immunology today. 1999; 20: 141-151.
34. Hill's Inc. Atlas of Veterinary Clinical Anatomy. Veterinary Medicine Publishing Company, Inc. USA. 1989.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

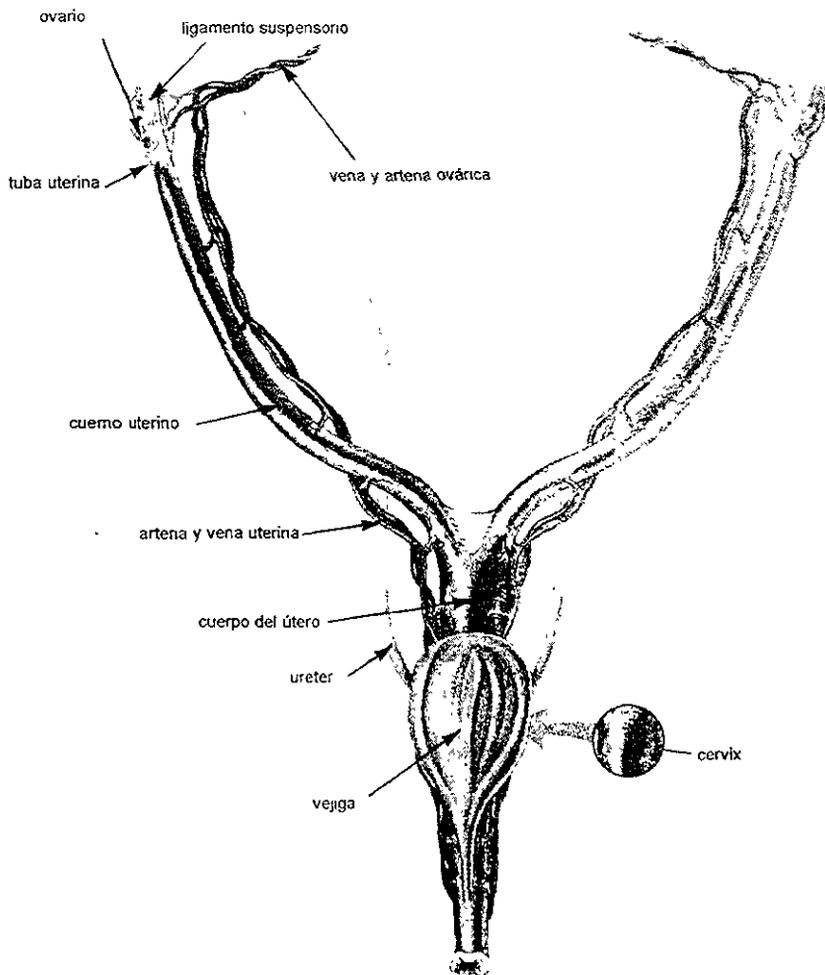


Figura 1. Aparato reproductor femenino de perra en donde se observan ovarios, tubas uterinas, cuernos uterinos, cuerpo uterino y cervix. (Tomado de Hills's Atlas of Veterinary Clinical Anatomy)



Figura 2 Célula Intermedia (a) y superficial (b) en frotis vaginal de perra. Las células intermedias presentan abundante citoplasma y núcleo vesicular central. Las células superficiales presentan bordes angulosos y núcleo pequeño. Tinción de Papanicolaou. 32X

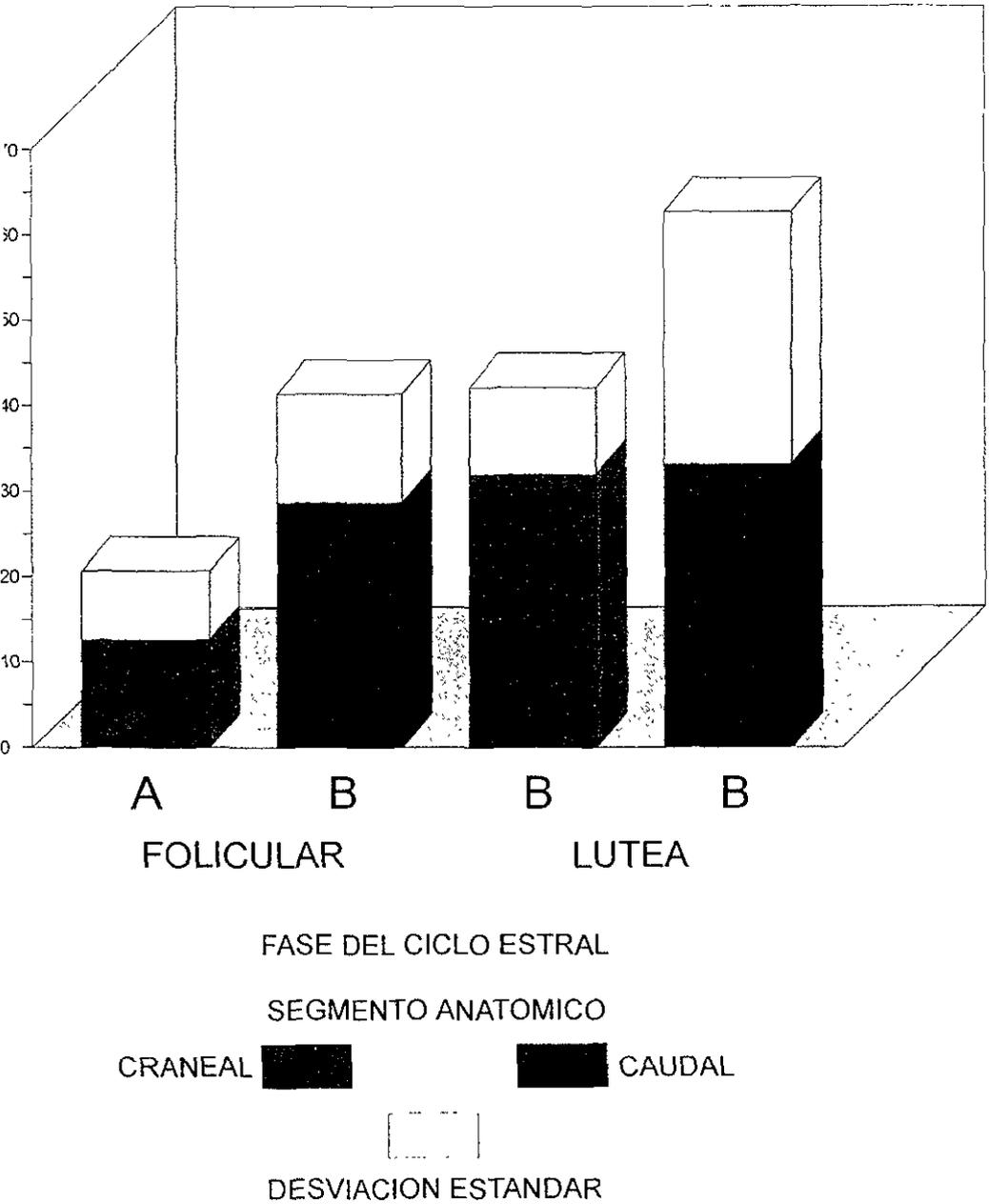


Figura 4 Promedio de células plasmáticas por mm² en la porción craneal y caudal del cuello uterino de perra en fase folicular y lútea del ciclo estral.

**Siglas distintas indican diferencia estadística (p<0.05)



Figura 4. Corte histológico de cuello uterino de perra en su porción craneal. Se observan células plasmáticas a nivel de la lámina propia (flechas). Tinción de verde metil pironina. Aumento 25X

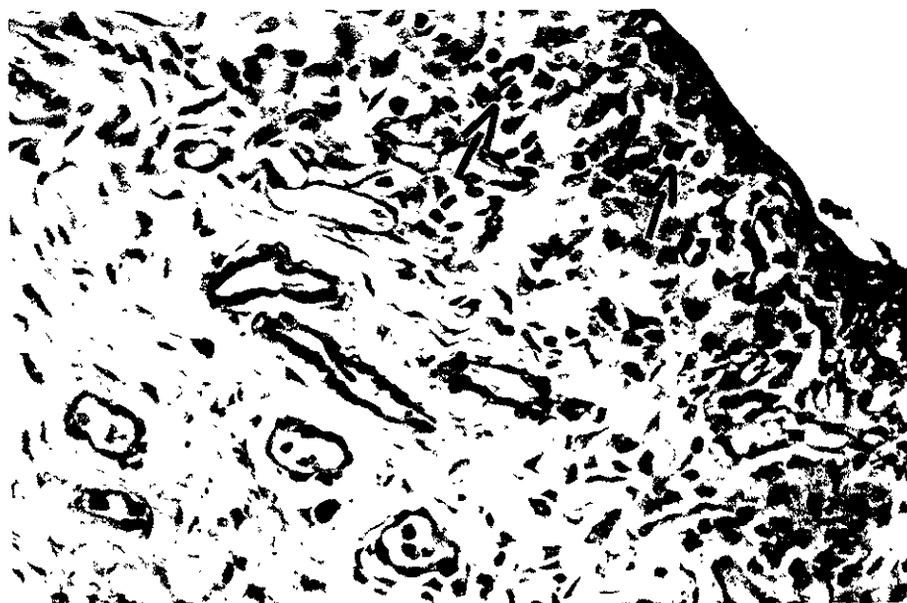


Figura 5. Microfotografía de corte histológico de cuello uterino de perra en su porción caudal, en fase lútea del ciclo. Se observan células plasmáticas a nivel de tejido conjuntivo adyacente al epitelio. Tinción de verde metil pirronina. Aumento 25X