

Involución uterina en yeguas Paso Fino Colombiano medida por ultrasonografía y citología endometrial

Germán Ramírez * / Gerardo López** / Edgar Cifuentes***

RESUMEN

Hoy en día existe controversia ante la alta incidencia de mortalidad embrionaria al aparear la yegua durante el primer celo posparto. El propósito del presente trabajo consiste en determinar el período de involución uterina en yeguas Paso Fino Colombiano mediante el uso de la ultrasonografía de tiempo real y citología endometrial, asimismo determinar la correlación entre el porcentaje de neutrófilos encontrados en la citología y la ecogenicidad del fluido intrauterino durante los primeros 30 días posparto. Para tal efecto, se utilizaron 20 yeguas gestantes (n=20), las cuales eran examinadas a partir del día 6 posparto, día de por medio hasta el día 30. Todas las yeguas se encontraban pastando Kikuyo (*Penisetum clandestinum*) en potreros de la Sabana de Bogotá a 2600 msnm, 4° de Latitud norte y a una temperatura ambiental promedio de 13°C. A partir del día 3 posparto cada yegua fue testada con uno de dos sementales para determinar los signos de celo, diez de ellas fueron inseminadas al azar durante el primer celo posparto y las otras diez se inseminaron durante el segundo celo. Los exámenes genitales fueron realizados por un técnico, el cual no tenía conocimiento de la historia reproductiva de cada animal. Dichos exámenes in-

cluyeron; palpación rectal, ultrasonografía transrectal (con un ecógrafo Pie Medical 480, arreglo lineal y 5 Mhz de frecuencia), examen vaginal y citología endometrial. Las dimensiones uterinas fueron tomadas por palpación rectal y ecografía de la base del cuerno uterino, mitad y extremo final del cuerno del útero previamente grávido versus el no grávido. La detección del fluido intrauterino fue realizada utilizando una escala de ecogenicidad y las estructuras ováricas (folículo preovulatorio y ovulación) fueron determinadas por ecografía. Los diagnósticos de gestación fueron realizados mediante ultrasonografía 15 días después de la ovulación (día de la ovulación = día 0), dicha gestación fue confirmada al día 40. Las muestras para la citología endometrial fueron tomadas del útero previa desinfección del área perineal utilizando la técnica de isopos no cubiertos mediante un espéculo tipo Pollanski. Estas muestras fueron fijadas con alcohol metílico por 15 minutos y teñidos con Giemsa por 20 minutos.

* Médico Veterinario Universidad de La Salle, MSc. en Reproducción Animal, Universidad Austral de Chile, docente de Andrología y Biotecnología Reproductiva. Correo electrónico: gramirezvet@hotmail.com

** Médico Veterinario Universidad de La Salle.

Fecha de recepción: 6 de diciembre de 2005.

Fecha de aprobación: 13 de febrero de 2006.

La involución uterina anatómica, es decir, la disminución del cuerno previamente grávido, se completó al día 24 posparto (12-30 días de rango). El fluido intrauterino se observó mediante ultrasonografía entre los días 6 y 18 posparto. Los neutrófilos y las células muertas constituyeron el 80% de la población celular analizada en las citologías endometriales. Los neutrófilos y las células necróticas disminuyeron en forma lineal a partir del día 9 posparto, en contraste con las células endometriales, que comenzaron a aumentar a partir de este momento. La población de linfocitos y eosinófilos permaneció baja y constante durante todo el estudio. Existió una correlación positiva y significativa ($r=0,83$ $P < 0.01$) entre el fluido intrauterino observado por ecografía y el porcentaje de neutrófilos analizado en la citologías endometriales. Por lo anterior, se asume que el componente celular del fluido uterino altera el patrón ecográfico de dicho fluido. Las yeguas que no mostraron fluido intrauterino y tuvieron un bajo porcentaje de neutrófilos (menor de 4%) al ser

inseminadas durante el primer celo posparto, tuvieron mejores tasas de concepción que las yeguas con porcentajes de neutrófilos altos. El celo del potro (primer celo posparto) se observó a los días $7 \pm 2,8$ (DE) después del parto, el segundo celo posparto se presentó a los 24 días $\pm 2,8$ (DE). Las tasas de concepción al inseminar las yeguas durante el primer celo y el segundo celo posparto fueron 30% y 50% respectivamente. Se concluye entonces que la ecografía y la citología endometrial son dos técnicas sencillas de realizar y se constituyen en herramientas diagnósticas valiosas durante el posparto de la yegua. Estas técnicas sirven para ayudar al clínico de la reproducción a establecer un criterio válido respecto a cuando servir la yegua con cría al pie.

Palabras clave: yegua involución uterina, ecogenidad, neutrófilos, células endometriales, necrosis celular.

UTERINE INVOLUTION IN COLOMBIAN FINE PACE MARES, MEASURED BY ULTRASONOGRAPHY AND ENDOMETRIAL CYTOLOGY

ABSTRACT

Today, there still exists a controversial issue, as to the high incidence of early embryonic death in mares, mated on the first post partum oestrus. The purpose of this study was first, to determine the post partum period of uterine involution in fine pace Colombian mares using endometrial cytology and ultra sonograph. Secondly, to determine the relation between the neutrophil percentages found in cytology and the echogenicity of accumulated intrauterine fluid during the first 30 post partum days. Twenty (n=20) mares were examined beginning on the 6th post partum day and on alternate days, up to the 30th day. All subjects were grazing Kikuyo grass (*Pennisetum clandestinum*) at la Sabana de Bogotá, 2.600 meters over sea level, 4 ° north latitude and with an average temperature of 13 ° C. From the 3rd postpartum day, all 20 mares were exposed to 2 healthy stallions, to establish their heat behaviour. Ten of them, following complete randomization, were inseminated on the first postpartum heat, while the others were inseminated on the second post partum heat. Genital examination was carried out by a technician, who did not know the reproductive history of any of the experimental mares. Examinations included rectal palpation, ultra sonograph (Pie Medical 480, linear array, 5 MHz), vaginal swabs and endometrial cytology. Uterine dimension was recorded by rectal palpation and

ultra sonograph, it was included the uterine horn dimensions (tip, middle, and corporo-cornual junction) of previously gravid and non gravid uterus. Intrauterine fluid detection was performed by the use of an echogenicity scale. Ovaric structures were recorded (preovulatory follicles and ovulation). Pregnancy diagnosis was performed on day 15 post ovulation and then confirmed on day 40. Endometrial cytology samples were taken from uterus after the perineal area was disinfected using non covered isopos with a Pollanski speculum. Smears specimens were fixed with metil alcohol for 15 minutes and stained with Giemsa for 20 minutes.

Anatomic uterine involution (means decreased size of pregravid horn) was completed on day 24 (range 12-30 days). Intrauterine fluid was seen by ultrasonography between day 6 and 18 post partum. Neutrophils and endometrial cells necrotic or not, constituted 80 % of the cell population. Neutrophils and cellular necrosis had a linear decrease beginning on day 9 post partum, in opposition, on this day the endometrial cell type pattern had a linear increase. The percentage of lymphocytes and eosinophils remained low and constant during the period of the study. A positive and significant correlation ($r=0.83$, $P<0,01$) was found between the accumulated uterine fluid observed by ultrasonograph and neutrophil cells analyzed in endometrial cytology. Based on this finding, it is suggested that the cellular component of the fluid encountered alters the echo pattern on uterine examination. Mares that did not show much intrauterine fluid accumulation and had low percentage of neutrophil counts (4 % or less) during first postpartum heat, had a better conception rate than mares with high neutrophils percentage. Foal

heat was observed on day 7 ± 2.8 (S.D.), second post partum heat was detected on day 24 ± 2.8 (S.D). Conception rate was 30 % and 50 % respectively, on first and second post partum heat. It is concluded that endometrial cytology and ultrasonograph are helpful diagnostic methods to study uterine involution in post partum mares. These techniques help the reproductive technician to establish a valid criterion regarding when to mate a mare that has a calf.

Key Words: mare, uterine involution, echogenicity, neutrophils, endometrial cells, cellular necrosis.

INTRODUCCIÓN

La involución histológica del endometrio equino se completa en forma bastante aparente al día 14 posparto (Gygax *et al.*, 1979), pero algunos científicos concluyen que ocurren cambios realmente dramáticos durante la primera semana del puerperio (Loy *et al.*, 1975).

Utilizando la citología endometrial se ha observado que existe un reducido porcentaje de polimorfonucleares durante el primer celo posparto (Crickman y Pugh, 1986) y existe una correlación positiva y significativa entre la apariencia ciliada de las células endometriales y la involución uterina (Saltiel *et al.*, 1987).

Desde el punto de vista anatómico, la involución del útero es bastante rápida en la yegua. Utilizando la palpación rectal y la ecografía se ha observado que el cuerno previamente grávido completa su involución al día 23 posparto (rango 13 a 29 días) (McKinnon *et al.*, 1988).

El propósito clínico del presente estudio fue el estudiar el puerperio de las yeguas criollas colombianas por ecografía y citología endometrial, ante la relativamente poca información que se tiene al respecto y proporcionar al clínico ayudas diagnósticas sencillas que permitan establecer el momento indicado para servir la yegua posparto.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Veinte yeguas posparto (n=20) de la raza Paso Fino Colombiano fueron examinadas a partir del día 6 (parto = día 0) y día por medio hasta el día 30. Todas las yeguas incluidas en este estudio se encontraban pastando (*Penisetum clandestinum*) en la Sabana de Bogotá a 2600 m sobre el nivel del mar,

4° de Latitud Norte a 13°C de temperatura ambiental promedio.

A partir del día 3 posparto cada yegua fue estimulada con uno de dos sementales receladores para observar signos externos de celo. Una vez la yegua mostraba signos de celo era escogida al azar en dos grupos; diez de ellas fueron inseminadas en el primer celo posparto y las otras diez en el segundo celo.

EXÁMENES GENITALES

Cada yegua fue examinada por un técnico que no tenía conocimiento del día del parto del animal; asimismo cada examen incluía: palpación rectal, ultrasonografía transrectal (Pie Medical, 5 Mhz), examen vaginal y citología endometrial.

- a. Palpación rectal y ecografía: mediante estos métodos se realizaron mediciones del útero (base del cuerno, mitad y extremo final del cuerno previamente grávido y el no grávido). La ecogenicidad del fluido intrauterino fue caracterizada de acuerdo a una escala propuesta por McKinnon *et al.* (1987). Al entrar la yegua en celo, se grababan sus estructuras ováricas, folículo preovulatorio, cada yegua fue inseminada cuando tenía un folículo mayor a 35 mm de diámetro. Una vez detectada la ovulación por ecografía (ovulación = día 0), la yegua era examinada al día 15 post-ovulación para realizar un diagnóstico de gestación por ecografía, dicha gestación se confirmó por este mismo medio al día 40.
- b. Examen vaginal y citología endometrial: posterior a la palpación rectal y a la ultrasonografía del tracto genital, la yegua fue preparada para el examen vaginal, primero se lavó y desinfectó el área perineal con soluciones yodadas débiles, se vendó la cola y se introdujo vía vaginal un espéculo tipo Polanski para observar el fondo

vaginal. Posteriormente, se tomó una muestra uterina utilizando un isopo estéril el cual se insertó en el cervix uterino del animal.

Cada muestra se extendió en una lámina portaobjeto, se fijó con metil alcohol por 15 minutos y se tiñó con una solución de Giemsa por 20 minutos, luego se analizó al microscopio con un aumento de 1000 X, se contó un total de cien células estimando los respectivos porcentajes.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La relación entre variables (hallazgos por palpación rectal y ultrasonografía) se analizó por regresión y correlación, los datos cuantitativos se analizaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). El test de Fisher no paramétrico y el análisis multivariable de componentes principales se utilizó para analizar los datos de la citología endometrial (SAS, 1985)

RESULTADOS

PALPACIÓN RECTAL Y ECOGRAFÍA

Existió una correlación positiva y significativa ($r=0,74$, $P<0,01$) entre la palpación rectal y las observaciones ecográficas durante todo el tiempo de estudio, se observó una correlación positiva y significativa ($r=0,74$, $P<0,01$) entre las dimensiones uterinas encontradas y los días posparto. Ambos cuernos uterinos (previamente grávido y no grávido) fueron similares en diámetro el día 24 posparto (rango 12-30 días).

Al día 6, el 100% de las yeguas incluidas en el estudio mostraron acumulaciones de fluido intrauterino, dichas acumulaciones disminuyeron en cantidad y calidad entre los días 12 y 30 posparto. Existió una correlación positiva y significativa ($r=0,83$, $P<0,01$) entre la calidad ecográfica del fluido in-

trauterino y el porcentaje de neutrófilos encontrados en las citologías endometriales. La calidad del fluido intrauterino se midió de acuerdo a la escala propuesta por McKinnon *et al.* (1987), quienes determinan 4 escalas de ecogenicidad así: grado 1 (ecóica), grado 2 (semiecóica), grado 3 (hipoecóica) y grado 4 (anecóica).

En este estudio se observó que la población celular preponderante fue; neutrófilos, necrosis celular, células endometriales, linfocitos y eosinófilos. De acuerdo a un análisis estadístico de componentes principales se determinó que el 80% de esta población la constituyeron los neutrófilos, la necrosis celular y las células endometriales.

De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) de los datos anteriores se encontró diferencia significativa entre los patrones celulares de las yeguas ($P<0,01$) incluidas durante todo el período de estudio.

Los neutrófilos y la necrosis celular comenzaron a disminuir al día 9 posparto, tiempo en el cual aumentó el patrón celular endometrial normal. Los linfocitos y los eosinófilos permanecieron bajos y constantes durante todo el período de estudio, los eosinófilos tendieron a aumentar durante los celos (día 8-12 posparto primer celo y días 21 a 30 segundo celo posparto). Otros parámetros descriptivos lo constituyeron; la flora bacteriana al principio del puerperio y la presencia de un material eosinofílico durante el celo (moco endometrial).

CONDUCTA SEXUAL Y TASAS DE CONCEPCIÓN

El primer celo posparto o celo del potro se presentó a los $7,1 \pm 2,8$ días el intervalo entre el parto y la primera ovulación fue de $12,1 \pm 3,12$ días, la duración del primer celo fue de $6,88 \pm 1,36$ días, el desarrollo del folículo preovulatorio fue de $3,5 \pm 0,49$ mm por día, y el tamaño ovulatorio fue de $44 \pm 6,6$ mm.

El segundo celo se presentó a los días $24,3 \pm 2,89$ después de la presentación del parto, la segunda ovulación posparto se observó a los $30,15 \pm 3,13$ días. La actividad folicular durante este celo, es decir crecimiento del folículo preovulatorio fue de $3,5 \pm 0,67$ mm y el tamaño de este folículo en el momento de la ovulación fue de $45,55 \pm 4,31$ mm, la duración de este celo fue de $7,38 \pm 1,32$ días. No existió diferencia significativa entre los parámetros estudiados en los dos celos. Dos de las yeguas incluidas en el estudio no presentaron conducta sexual después del parto y no se observaron estructuras ováricas de interés, lo cual representó el 10% de la población estudiada.

Las tasas de concepción fueron del 30% (3/10) y 50% (5/10) durante el primero y segundo celo posparto respectivamente, no se presentó mortalidad embrionaria temprana hasta el día 40 post-ovulación, fecha en que se realizó la última ecografía.

Dos de las 3 yeguas que quedaron preñadas en el primer celo no presentaron fluido intrauterino y se les observó un porcentaje de neutrófilos menor al 4%, de las yeguas preñadas durante el segundo celo posparto ninguna presentó fluido intrauterino y se les detectó un porcentaje de neutrófilos menor al 3%.

DISCUSIÓN

Usando estas dos técnicas (ultrasonografía y citología endometrial), se puede establecer que para este grupo de animales, la involución uterina ocurre después del celo del potro o primer celo posparto (promedio día 24); lo cual hace pensar que al servir la yegua durante este celo el útero no se encuentra en condiciones fisiológicas adecuadas para permitir un desarrollo embrionario a término.

La involución anatómica del útero, estudiada por ultrasonografía es muy similar a los datos obtenidos por otros investigadores (McKinnon *et al.*, 1988),

quienes sugieren que dicha involución se completa al día 23 (12- 29 días de rango) esto independiente de la raza, tamaño de los animales, alimentación y condiciones climáticas tropicales con las cuales se realizó el presente estudio.

La presencia de fluido intrauterino en el presente estudio decreció a partir del día 6-18 posparto, lo cual no difiere de los datos encontrados por McKinnon *et al.* (1998), quienes observan esta disminución entre el día 3-15 posparto. Existió una correlación positiva y significativa entre la apariencia ecográfica del fluido intrauterino y el porcentaje de neutrófilos encontrados en las citologías endometriales, lo cual sugiere que un patrón celular abundante produce más ecos que un patrón celular pobre, este hallazgo coincide con Ramírez (1993), quien encuentra una correlación significativa ($r=0,53$) entre estas variables durante el período.

Existió una diferencia significativa del patrón celular entre los diferentes sujetos incluidos del estudio, lo cual indica que cada yegua es individual y sus componentes celulares intrauterinos son muy específicos, esto es importante en el examen clínico de una yegua cuando el clínico tiene que decidir si sirve la yegua o no en forma temprana durante el primer celo.

La involución uterina estudiada mediante citología endometrial, muestra que a partir del día 9 posparto se observa una disminución notable de las células inflamatorias y la necrosis celular, lo cual contrasta con el aumento de las células endometriales que se relacionan con un proceso de involución uterina normal, estos resultados son similares a los obtenidos por Saltiel *et al.* (1987), quienes observan una correlación positiva y significativa entre las células inflamatorias y la necrosis celular y una correlación positiva y significativa entre la apariencia ciliada de las células endometriales normales y el endometrio involucionado.

En cuanto a los parámetros reproductivos; presentación del primer y segundo celo posparto fue similar a lo descrito por otros autores (Loy, 1980; Ginther, 1979; Díaz y Molinas, 1987; Ramírez y Del Campo, 1995), lo anterior teniendo en cuenta que los datos aquí obtenidos no están influenciados por los efectos estacionales de los trabajos citados.

Existió una mayor tasa de gestación en el grupo de yeguas servidas durante el segundo celo posparto, al ser comparada con la tasa obtenida en yeguas que fueron servidas durante el primer celo o celo del potrillo, esto es similar a los resultados obtenidos por otros investigadores Tolksdorff *et al.*, 1976; Kreidel *et al.*, 1979; Lowis y Hyland, 1991; Ramírez y Del Campo, 1995).

Algunos investigadores, encuentran menores tasas de reabsorción embrionaria en yeguas servidas en celos subsecuentes al primer celo posparto, en este trabajo no se observó mortalidad embrionaria en ninguna de las yeguas.

En resumen, se caracterizó la involución anatómica, citológica y ecográfica de yeguas paso fino colombiano durante el puerperio, se encontró una correlación positiva y significativa en los métodos de estudio empleados, lo cual hace que estas herramientas diagnósticas sean útiles y fáciles de realizar por los clínicos de la reproducción, que tienen algunas dudas al servir las yeguas en forma demasiado temprana durante el periodo posparto.

BIBLIOGRAFÍA

- Crickman, J., y Pugh, D. «Equine endometrial cytology: A review of techniques and interpretations». *Vet. Med.* 81 (1986): 650-656.
- Díaz O., y Molinas J. *Treinta años de estudio sobre reproducción equina en Chile* (Revisión). INCITEP, 1987.
- Ginther, O. *Reproductive Biology of the Mare: Basic and applied aspects*. Michigan: Ann Arbor, , McNaughton And Gunn, 1979.
- Gygax, A., Ganjam, V. y Kenney, R. «Clinical microbiological and histological changes associated with uterine involution in the mare». *J. Reprod. Fert. , Suppl;* 27 (1979): 571-578.
- Kreidel, J.; Murrell, V.; Longwell, L. y Godke, R. «Control of estrus in the lactating post partum mare with fluoprostenol (ICI-81,008)». *Theriogenology* 10 (1979):371-380.
- Loy R.G. Characteristics on post partum reproduction in mares. *Vet. Cl. of North Am.: Equine practice*, 2 (1980): 345-359.
- - -; Hughes, W.; Richards, P. y Swan, S. «Effects of progesterone on reproductive function in mares after parturition». *J. Reprod. Fert., suppl* 23 (1975): 291-295.
- Lowis, T. y Hyland J. «Analysis of post partum fertility in mares on a thoroughbred stud in southern Victoria». *Aust. Vet. J.* 68 (1991): 304-306.
- McKinnon, A. *et al.* «Diagnostic ultrasonography of uterine pathology in the mare In: Proceedings of the 33 rd annual convention of the American Association of equine Practitioners». *New Orleans, Louisiana, nov-dec* (1987): 605-622.

- - -. «Ultrasonographic studies on the reproductive of mares after parturition: Effect of involution and uterine fluid on pregnancy rates in mares with normal and delayed first post partum ovulatory cycles.» *JAVMA* 192 (1988): 350-353.
- Merkt, H. «Foal heat and fetal resorption». *Zuchthyg* 1 (1966):102-108.
- Ramírez, G. «Experiencias en el uso de PG F2 alfa para adelantar el segundo celo post parto en yeguas». Tesis de Magíster, Universidad Austral de Chile, Instituto de Reproducción Animal, Valdivia, Chile, (1993).
- Ramírez, G. y Del Campo, C. «Uso de prostaglandina F2 alfa para adelantar el segundo celo post parto en yeguas». *ACOVEZ* 20 (1995): 5-8.
- Saltiel, A. *et al.* «Cervico endometrial cytology and physiological aspects of the post partum mare». *J. Reprod. Fert., suppl* 35 (1987): 305-309.
- SAS. *Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary NC 27512-8000, USA.*
- Tolksdorff, E. *et al.* «Induction of ovulation during the post partum period in the thoroughbred mare with a prostaglandin analogue, Sychrocept». *Theriogenology* 6 (1976): 403-412.