

## HISTOLOGIA Y MORFOMETRIA DEL EPITELIO VAGINAL OVINO EN EL DIAGNOSTICO DE LA GESTACION\*

Miguel Angel Tovar Muñoz y  
Aureliano Hernández Vásquez\*\*

### RESUMEN

Con el fin de establecer posibles diferencias morfométricas e histológicas entre el epitelio vaginal de ovejas en los días 3, 12 y 16 del ciclo estral con el de hembras en los días 20 y 30 de la gestación, se realizaron estudios en 15 animales de las razas Romney Marsh y criollas.

Los promedios de la altura del epitelio vaginal y sus desviaciones estándar fueron así:

Ciclo estral:      día 3: 176,93  $\pm$ 20,99; día 12: 67,02  $\pm$ 7,65; día 16: 197,91  $\pm$ 12,96 micrómetros.

Gestación:        día 20: 49,79  $\pm$ 13,70; día 30: 41,06  $\pm$ 8,85 micrómetros.

---

\* Tomado del trabajo de grado del primer autor, dirigido por el segundo, presentado en la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.

\*\* Respectivamente, M.V. y DMVZ, M.Sc., Ph.D. Profesor Titular, Departamento de Ciencias Fisiológicas FMVZ. Universidad Nacional. A.A. 58442, Bogotá-Colombia.

Hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los resultados obtenidos durante el ciclo estral, frente a los hallados en los 2 estados de gestación. El epitelio vaginal (estratificado plano) durante el ciclo estral mostró grados variables de vacuolización, separación intercelular, infiltración de linfocitos y presencia de glóbulos rojos. También se observó edema en el tejido conectivo.

En el día 20 de la gestación pudo apreciarse un epitelio estratificado plano más delgado y en mayor grado que en el día 30, pues era típico o con tendencia a ser cúbico. Así mismo, disminución del grado de vacuolización, infiltración y edematización.

Si bien el método morfométrico aparece como dispendioso e inexacto, el histológico se presenta como confiable y relativamente simple, cuando carezca de otros medios modernos más precisos.

## INTRODUCCION

El diagnóstico temprano de la gestación en ovinos, especie promisoría en Colombia, reviste gran importancia económica si se tiene en cuenta la alta incidencia de mortalidad embrionaria reportada en varios países<sup>(4-8-15)</sup>.

Los métodos modernos para el diagnóstico de preñez, comúnmente no están disponibles en nuestro medio rural y por lo tanto, se creyó importante contribuir con el presente estudio para analizar la factibilidad de realizar diagnóstico de la gestación en ovinos antes de los 45 días, usando biopsias vaginales.

Es sabido que los estrógenos tienen una influencia directa sobre la anatomía tisular de la vagina y con base en ello, se han realizado estudios citológicos e histológicos en varias especies, como medios para efectuar diagnósticos acerca del estadio del ciclo reproductivo o de la gestación<sup>(3-5-7-9-12-15-19)</sup>.

En la oveja, varios reportes relativos al tema, dejan vislumbrar la importancia que pueden tener la citología e histología vaginal al respecto. Se relata que el epitelio vaginal, después del segundo mes es cúbico simple, mientras que en ovejas no gestantes es estratificado escamoso. Así mismo, que en hembras gestantes el número de capas celulares es menor que en las ovejas no gestantes y que las células tienden a ser cúbicas durante la preñez, en contraste con las poligonales propias del epitelio escamoso de las hembras ovinas al algún período del ciclo estral<sup>(6-13-14-15)</sup>.

Sin embargo, no se encontraron estudios morfométricos del epitelio vaginal destinados a establecer patrones de variación durante el ciclo estral en comparación con la gestación, ni reportes atinentes al diagnóstico temprano de ésta.

El objeto del presente trabajo fue determinar las posibles diferencias morfométricas y/o histológicas en el epitelio vaginal de ovejas en los días 3, 12 y 16 del ciclo estral, para compararlos con los datos obtenidos en los días 20 y 30 de la gestación.

## MATERIALES Y METODOS

El trabajo de campo se realizó en la Granja Experimental San Jorge del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, localizada en el municipio de Soacha, en el Departamento de Cundinamarca.

Se tomaron 20 hembras adultas entre los dos y los seis años de edad de las razas Romney Marsh y criollas, clínicamente sanas y con historia de partos normales. La selección se realizó al azar.

La escogencia del macho para la monta se hizo al azar, entre los utilizados para la reproducción de la Granja.

Las 20 hembras seleccionadas fueron confinadas en un mismo potrero con un macho vasectomizado, para la detección del celo en las hembras. A este macho se le puso un chaleco que portaba una pasta colorante con el fin de marcar a las hembras con las cuales había copulado.

Los animales fueron revisados diariamente para observar cuáles hembras habían sido servidas y además verificar que la pasta colorante estuviese en el chaleco que portaba el macho.

El día cero (0) del ciclo estral se tomó como la víspera de la detección de la marca en la hembra. A cada una de las 20 ovejas se les hizo una biopsia vaginal, a los 3, 12 y 16 días después de iniciar el ciclo.

Después de 40 días de permanencia con el macho vasectomizado, las mismas 20 hembras fueron confinadas con un macho entero al cual también le fue acondicionado un chaleco colorante a fin de que fuera marcando las hembras que montaba. Para verificar la fecha exacta de la monta, se realizó un chequeo diario al lote de animales.

La fecha de la monta y comienzo de la gestación, se tomó como el día anterior al de la fecha de la detección de la marca para cada oveja. A cada animal le fue tomada una biopsia vaginal a los 20 y 30 días post servicio.

De las 20 ovejas, resultaron 15 gestantes y ellas constituyeron la base para el estudio comparativo.

Todas las muestras fueron tomadas en el campo. El animal se colocó en posición de decúbito dorsal, sostenido por un ayudante. El espéculo fue lubricado con oxitetraciclina e introducido en la vagina. El vestíbulo dorsal de la vagina se insensibilizó con xilocaína al 2%.

Se introdujo una pinza hemostática aproximadamente a cuatro centímetros de la vulva y se tomó una porción del epitelio de unos cinco milímetros en la pared dorsal de la vagina. La porción del epitelio tomada con las pinzas hemostáticas se cortó entonces con unas tijeras. Después de la toma de la muestra se observó que no se presentó hemorragia abundante, como tampoco ningún traumatismo evidente en el animal.

Después de tomada la muestra, se instilaron en la vagina cinco centímetros de oxitetraciclina. La muestra vaginal se depositó en formalina en solución al 10 por ciento de pH neutro.

Los tejidos fueron procesados para ser incluidos en parafina, se hicieron cortes de cinco micrómetros de grosor, procediéndose luego a su coloración mediante una técnica estándar de hematoxilina y eosina.

Para la observación de los micropreparados y la medición del epitelio vaginal, se utilizó un microscopio de luz al cual, se le adaptó un ocular micrométrico (10X). Para calcular el área del campo micrométrico el cual se puede desplazar mediante un tornillo dispuesto en el mis-

mo ocular. El ocular micrométrico tiene a su vez una escala, cada una de cuyas divisiones equivale a nueve micras. Esta escala permite medir las estructuras microscópicas.

La medición de la altura del epitelio vaginal se realizó en 10 sitios diferentes, que fueron tomados donde el epitelio se mostraba más engrosado y estuviese intacto; con esto se obtuvo un promedio de la altura del epitelio por cada muestra, el cual fue analizado estadísticamente.

El conteo de las capas celulares en los mismos sitios de la medición, se efectuó con un objetivo 40X, al igual que la observación histológica subjetiva. Esta consistió en la observación de la forma de las células, disposición de las capas celulares y de los cambios presentados en el epitelio.

Para efectos del estudio estadístico comparativo en cuanto a altura epitelial en micrómetros entre los tres grupos del ciclo estral (A, B y C correspondientes a los días 3, 12 y 16 respectivamente) y los dos grupos de hembras gestantes (Grupo D y E correspondientes a los días 20 y 30 de gestación respectivamente), se realizó un análisis de varianza y una prueba de Duncan<sup>18</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los promedios de las alturas del epitelio y las desviaciones estándar de los tres días del ciclo estral y de los dos de la gestación se presentan en la Tabla No. 1.

La comparación de la altura del epitelio vaginal en el ciclo estral (3, 12 y 16 días) tomado como un grupo, frente a la altura del epitelio vaginal del período de gestación (20 ó 30 días de preñez), como otro grupo, mostró la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los dos.

**TABLA No. 1**

**Promedios y desviación estándar de la altura epitelial vaginal (en micrómetros) y durante las fases del ciclo estral y a los 20 y 30 días de gestación en 15 animales.**

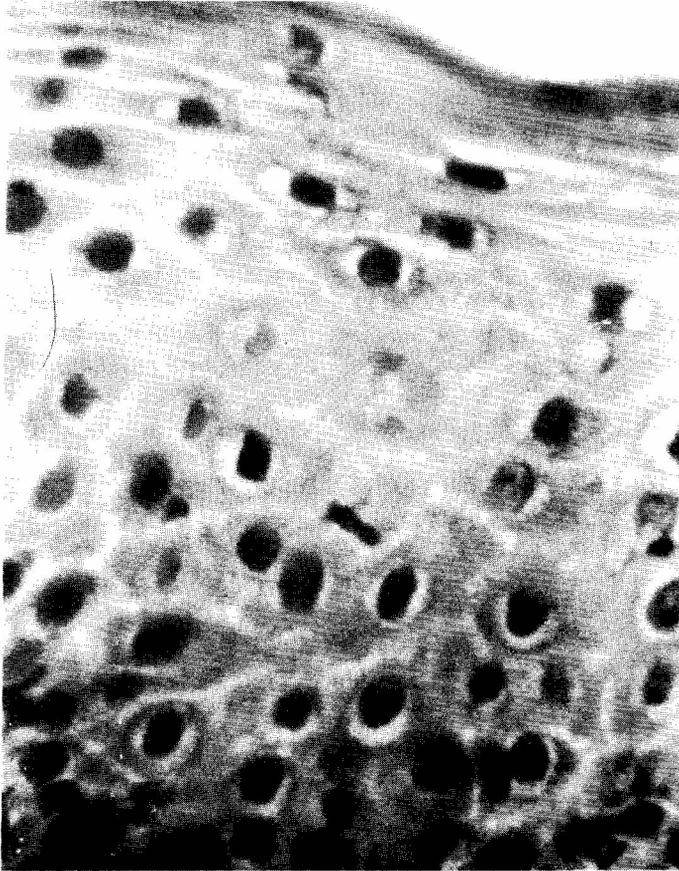
GRUPO	$\bar{X}$	$\pm$	DE
A	176.93		20.993
B	67.025		7.659
C	197.79		12.960
D	49.79		13.700
E	41.06		8.85

A = Día 3 del ciclo estral; B = Día 12 del ciclo estral;

C = Día 16 del ciclo estral; D = Día 20 de gestación;

E = Día 30 de la gestación;  $\bar{X}$  = Promedio; DE = Desviación estándar.

En el día tres del ciclo estral, el epitelio es estratificado plano; varía entre 13 y 19 capas celulares y se caracteriza por una vacuolización, separación intercelular (Figura No. 1), hemorragia subepitelial y presencia de glóbulos rojos en el epitelio e infiltración linfocitaria, todos ellos en grados variables entre uno y otro caso.



**FIGURA 1:** Fotomicrografía del Epitelio Vaginal de la Oveja a los tres días del Ciclo Estral. Epitelio estratificado plano con vacuolización y ruptura de las uniones celulares. Epitelio de aproximadamente 16 capas celulares. Hematoxilina y Eosina. 1.000 aumentos.

En el día 12 del ciclo estral, el epitelio es estratificado plano, y se presenta más delgado que el correspondiente al día tres. Las capas más superficiales presentan células planas. Las células de las capas intermedias son de tipo poligonal. En las zonas más profundas las células son cilíndricas. El número de capas celulares oscila entre 6 y 10. El epitelio vaginal sigue presentando vacuolización, separación intercelular, congestión hemorrágica, infiltración linfocitaria, pero todo en menor grado que lo observado en los casos correspondientes al día tres del ciclo estral. Hay edema moderado en el tejido conectivo, más no en todos los casos (Figura No. 2).

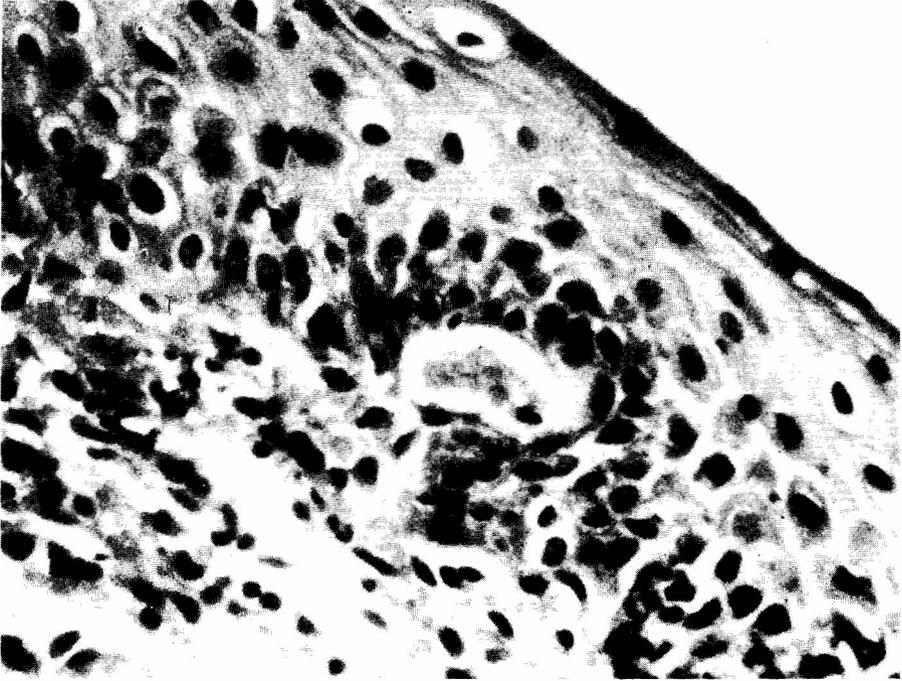


FIGURA 2: Fotomicrografía del epitelio vaginal de un corte de vagina de la oveja, a los 12 días del ciclo estral con vacuolización y ruptura de las uniones celulares. Epitelio de aproximadamente 10 capas. Hematoxilina y Eosina. 600 aumentos.

En el día 16, el epitelio es estratificado plano; las células de las capas superficiales son planas. Las células son más altas en las capas intermedias. Las capas más profundas están formadas por células cilíndricas. El número de capas celulares de este epitelio oscila entre 12 y 22.

La vacuolización epitelial y la separación intercelular son abundantes, mayor que la presentada en el día 12, pero muy similar con relación al día tres del ciclo estral. La infiltración linfocitaria y la presencia de glóbulos rojos en el epitelio son menores con relación a los casos correspondientes al día tres del ciclo estral y mayores con respecto al día 12. En esta etapa del ciclo estral hay presencia, en algunos casos, de edema en el tejido conectivo.

En el día 20 de la gestación, el epitelio es estratificado plano y más bajo que el presentado durante los días 3, 12 y 16 del ciclo estral. Las capas superficiales del epitelio muestran células planas. Las células de las capas intermedias son de tipo poligonal, algo redondeadas. La capa basal está compuesta por células redondeadas. El número de capas celulares oscila entre 3 y 8. En el epitelio vaginal se observa escasa vacuolización, en comparación con los estadios del ciclo estral que se estudiaron. Infiltración linfocitaria escasa presencia de glóbulos rojos en cantidad variable, aunque poca en los diferentes casos, al igual que dema moderado en el tejido conectivo.

En el día 30 de la gestación, en algunos sitios el epitelio es cúbico estratificado, en otros sitios es plano estratificado, aunque atípico, porque la capa basal está constituida por células cúbicas, en lugar de cilíndricas. Así mismo, por su poco grosor. El número de capas celulares varía entre 3 y 7. (Figuras Nos. 3 y 4).

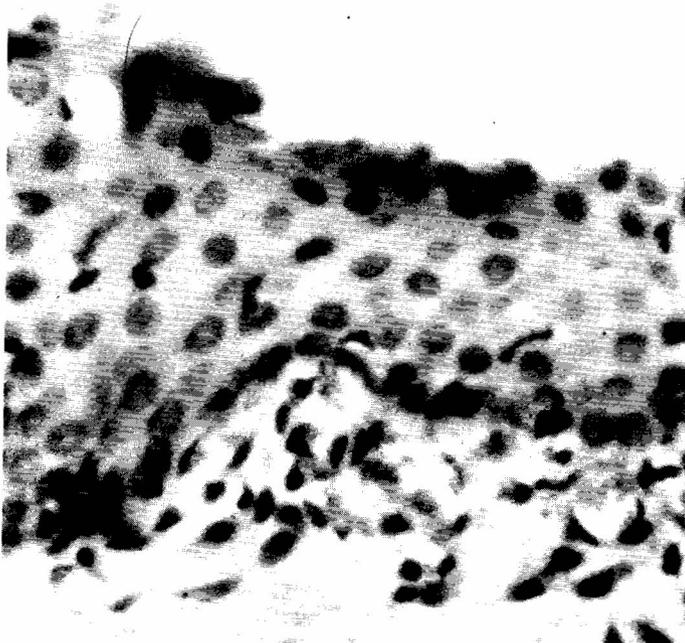


FIGURA 3: Microfotografía de un corte de vagina de la oveja a los 30 días de la gestación. Epitelio cúbico estratificado, con infiltración linfocitaria, glóbulos rojos en la capa basal. Epitelio de aproximadamente siete capas. Hematoxilina y Eosina. 600 aumentos.



**FIGURA 4:** Microfotografía de un corte de vagina de la oveja a los 30 días de la gestación, con epitelio plano estratificado atípico por su capa basal con células cúbicas y el grosor del epitelio de aproximadamente cuatro capas. Hematoxilina y Eosina. 600 aumentos.

En esta fase de la gestación, en los dos tipos de epitelio se presenta vacuolización, aunque en muy escasa proporción y no en todos los casos. Hay infiltración linfocitaria moderada y la ocurrencia de glóbulos rojos es escasa. El edema del tejido conectivo es mínimo.

Las alteraciones en la estructura del epitelio vaginal son un reflejo de la actividad de los estrógenos. La concentración del 17 beta estradiol sufre un incremento en sus niveles desde el día 15 del ciclo estral ovino y bajo su influencia hay cambios celulares del epitelio vaginal.

Durante las diferentes fases del ciclo estral aquí estudiadas (3, 12 y 16 días), hay diferencias tanto en la altura del epitelio, como en el número de sus capas. Las fases correspondientes a los días 3 y 16 del ciclo estral, presentan un epitelio alto, en contraposición a la del día 12, cuando es más bajo.

Los resultados obtenidos indican la presencia de una mayor altura del epitelio vaginal, en todo el ciclo estral en conjunto, respecto a los días 20 y 30 de la gestación.

Al realizar una evaluación subjetiva y comparativa del epitelio vaginal presente durante el ciclo estral, frente al observado el día 20 de la gestación, no hay criterios suficientes, según este estudio, para hacer un diagnóstico diferencial. Sin embargo, cabe recordar que hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la altura promedio (o grosor) del epitelio en el día 20 de gestación, cuando se comparó con cada uno de los tres estadios del ciclo estral (días 3, 12 y 16).

Al analizar los hallazgos anatómicos el día 30 de la gestación, para compararlos con los observados a los días 3, 12 y 16 del ciclo estral, es evidente que es fácil diferenciar los dos tipos de epitelio (comparar figuras 1, 3 y 6).

En los días 20 y 30 de gestación, los resultados indican que el epitelio es más bajo, tanto en número de capas como en su altura, y aunque estadísticamente no hay diferencias morfo-métricas para lograr identificarlos, sus promedios indican que es relativamente más bajo el correspondiente al día 30 de preñez. La evaluación subjetiva y comparativa del epitelio vaginal presente durante el día 20 de preñez, frente al observado en el día 30 de la preñez indica que es imposible la diferenciación entre los dos tipos de epitelio.

Era de esperarse que las mayores alturas del epitelio fueran vistas durante los días 3 y 16 del ciclo estral debido a que los niveles de estrógenos se mantienen altos durante estos días del ciclo, como efectivamente resultó en este trabajo.

En el día 12 del ciclo estral, el epitelio disminuye su altura promedio, ya que la acción de la progesterona ha inhibido la aparición de los estrógenos de origen ovárico y consecuentemente la acción de estos sobre el epitelio estaría disminuida.

Al relacionar los cambios en la altura del epitelio vaginal en el presente estudio, con los niveles de progesterona normales durante el ciclo estral, reportados por Lewis et. al. (1981)<sup>11</sup>, se encontró que en los días 3 y 16 del ciclo estral el nivel de progesterona es bajo, siendo mayor en el del día 16.

Esto concuerda con los resultados obtenidos aquí. La mayor altura del epitelio vaginal corresponde a las muestras obtenidas en el día 16 del ciclo estral y una altura algo menor a las muestras del día 3 del ciclo estral (Figura No. 1), etapas éstas en las que los niveles de estrógenos se encuentran altos.

En los días 12 y 13 del ciclo estral, la progesterona se encuentra en sus máximos niveles y la altura más baja del epitelio vaginal durante el ciclo estral se obtuvo en el día 12. En estos días los niveles de estrógenos son bajos.

El análisis de los resultados estadísticos obtenidos indica que se puede diferenciar el epitelio vaginal que se presenta durante el ciclo estral con respecto al epitelio presentado en los días 20 y 30 de preñez. Sin embargo, la desviación estándar de los datos aportados en el

día 20 de la gestación, exhibe una gran dispersión, conduciendo esto a que se tenga alguna incertidumbre entre aquel estado de gestación (20 días) y el correspondiente al día 12 del ciclo estral.

Para el día 30 de gestación, no se presentaron dudas en el diagnóstico morfométrico diferencial con respecto a los días 3, 12 y 16 del ciclo estral.;

Cabe aquí considerar que, siendo la mayoría de los epitelios vaginales tomados a los animales con 20 días de gestación, de una altura menor a los presentados en el día 12 del ciclo estral, se podría aducir la posible existencia de una variedad hormonal individual, que crea la incertidumbre para diferenciar el estado del animal citado.

Se debe tener en cuenta que la muestra tomada para este experimento es relativamente pequeña. Algunos factores que pudieran afectar aún más el tamaño de la muestra, fueron una posible mortalidad, bien sea embrionaria o fetal, o un posible anestro. De las 20 hembras servidas, solamente 15 dieron cría, realizándose con estas 15 una comparación estadística frente al ciclo estral.

De las muestras correspondientes a las dos ovejas que se encontraban dentro de los parámetros morfométricos de una posible preñez en el día 30 y que finalmente no dieron cría, se podría aducir que en estos animales hubo mortalidad embrionaria o fetal posterior a los 30 días, pues los promedios para la altura del epitelio vaginal en los días 20 y 30 son similares a las hembras que dieron cría.

En rebaños en los que no se ejerce ningún control de monta, existe aquella posibilidad, y es un período en el que se produce una disminución notable en la altura del epitelio<sup>(14)</sup>.

Son evidentes los cambios morfométricos que se producen en el epitelio vaginal de las ovejas sexualmente maduras, a lo largo del ciclo de 17 días y durante la preñez. Durante el ciclo estral, se puede diferenciar morfométricamente el epitelio observado en el día 12, del presentado en los días 3 y 16 del ciclo, siendo difícil diferenciar morfométricamente el epitelio vaginal en los días 3 y 16 del ciclo, entre sí. La identificación de hembras gestantes también se puede realizar mediante esta técnica, pero para mayor confiabilidad, además de ella, debe tenerse en cuenta el tipo celular presente.

Es notable encontrar entre los hallazgos histológicos, la vacuolización, la separación intercelular en el epitelio, así como las infiltraciones linfocitarias, la presencia de glóbulos rojos dentro del epitelio y las hemorragias subepiteliales. Estos hallazgos fueron constantes.

La vacuolización que se encuentra en grados variables durante el ciclo estral (3, 12 y 16 días) podría explicarse como respuesta a los niveles de estrógenos, especialmente durante los días 3 y 16 del ciclo estral, cuando los niveles de estrógenos son altos. Sin embargo, también hay vacuolización aunque en menor grado en el día 12 del ciclo estral, y en el 20 de la gestación, aunque no es constante para este último. Posiblemente el epitelio aún está bajo algún efecto de los estrógenos o no ha recobrado su integridad, ya que en los casos correspondientes al día 30 de preñez esta vacuolización casi ha desaparecido.

Las hemorragias subepiteliales y las infiltraciones linfocitarias, pueden ser causadas por los estrógenos que producen hiperemia y edema<sup>(1-2)</sup>.

Sin embargo, la irrigación sanguínea del tracto reproductivo sufre variaciones por diversos factores: por ejemplo, el incremento de sangre que fluye hacia el tracto reproductivo está relacionado con la baja en la temperatura, formándose una diferencia entre el tejido vaginal y la sangre arterial<sup>(1-2)</sup>.

Abrans y Thatcher<sup>(2)</sup>, reportan que el mayor incremento en la conductividad térmica en la vagina y por consiguiente del fluido sanguíneo que la irriga, puede suceder un día antes o un día después de iniciado el ciclo estral.

Los resultados de este trabajo no están de acuerdo con los hallazgos de Ghannam<sup>(6)</sup> y Mitchell<sup>(14)</sup> que descartan que los cambios en el epitelio vaginal durante la preñez (primeros 30 días), sean lo suficientemente marcados para diferenciarlos de aquellos observados en el diestro.

Por otra parte, los resultados del presente estudio concuerdan en su mayor parte con los de Richardson<sup>(17)</sup> aunque éste basa su diagnóstico más en el tipo celular presente que en el número de capas. Hay que tener en cuenta que su estudio es histológico y no morfométrico.

Puede concluirse que el análisis histológico aparece como un método adecuado para el diagnóstico de la gestación al día 30, así como el morfométrico propuesto, aunque este es menos práctico y confiable.

## **HISTOLOGY AND MORPHOMETRY OF THE OVINE VAGINAL EPITHELIUM IN THE DIAGNOSIS OF PREGNANCY**

### **SUMMARY**

In order to establish possible morphometric and histological differences in the vaginal epithelium of cycling and 20 and 30 day pregnant ewes, a pertinent study was undertaken in 15 Romney Marsh and adapted crossbred females.

The mean and standard deviations obtained for the height of the epithelium were:

Cycling ewes: day 3 - 176.93  $\pm$ 20.00; day 12 - 67.02  $\pm$ 7.65; day 16 - 197.91  $\pm$ 12.96 micrometers. Pregnant animals: day 20 - 49.79  $\pm$ 13.70; day 30 - 41.06  $\pm$ 8.85 micrometers. There were significant differences between the non pregnant versus the pregnant animals epithelial height ( $P < 0.05$ ).

The epithelium (stratified squamous) in the cycling animals showed various degrees of vacuolization, intercellular separation, presence of red blood cells and lymphocytic infiltration. There was also edema in the connective tissue.

At 20 days of gestation, the epithelium appeared to be thinner and even more so at 30 days when it was anatomically atypical with a tendency to be cubical. The edema and infiltration diminished during these stages.

The morphometric approach seemed to be somewhat impractical and inexact, but the histological method is presented as reliable and relatively simple, when more precise modern techniques can not be used.

## AGRADECIMIENTOS

- A los doctores HUMBERTO VASQUEZ y ALFONSO NARANJO, del ICA, por su colaboración en la Granja San Jorge.
- A la Señora ISABEL V. DE FAJARDO y al Señor JORGE BUSTOS, por el trabajo de histotecnia.
- A la señorita LUZ MARY CUBIDES, por la excelente labor mecanográfica.

## REFERENCIAS

1. ABRANS, R.M. Vaginal thermal conductance: Changes during pregnancy in sheep. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 120 (6): 847-848. 1970.
2. ABRANS, R.M.; W.W. THATCHER. Bovine vaginal circulation: Changes during estrous cycle. *J. Dairy Sci.* (58): 1.528-1.529. 1975.
3. BARATTA, L. et. al. Changes of vaginal epithelium during pregnancy. (Ultrastructural and histochemical studies in the rat). *Arch. Ital. Anat. Embriol.* (76): 243-257, 1971.
4. CLUNIE, J. A. Detection of early pregnancy and embryo mortality in sheep by the rosette inhibition test. *Theriogenology.* (8): 157-163, 1977.
5. DONE, J.T. and T.W. HEARD' Early pregnancy diagnosis in the sow by vaginal biopsy. *Vet. Rec.* 82; 64-68, 1968.
6. GHANNAM, S.A.M. and F.J. BOSO. Examination of vaginal epithelium of the sheep and its use in pregnancy diagnosis. *Amer. J. Vet. Res.* 33 (6): 1.175 a 1.185, 1972.
7. GREEN, J.A. Effects of steroid hormones on the epithelium, túnica propia and their junction in the mouse vagina. *Anat. Rec.* (135): 247 a 259, 1959.
8. GUNN, R.G. and J.M. DONEY. Fertility in cheviot ewes. The effects of body condition at mating on ovulation rate and early embryo mortality in North and South Country cheviot ewes. *Anim. Prod.* (29): 11 a 16, 1979.
9. HAM, A.W. *Tratado de Histología* 7a.ed. Traducido al español, Folch Pi, A. y Sapiña, S. Nueva Editorial Interamericana: México. p. 823 a 828, 1982.
10. JUILLARD, M.T. Epithelial cell proliferation in the mouse vagina during the estrous cycle, pregnancy and lactation. *Anat. Rec.* 170: 457 a 469, 1971.
11. LEWIS, G.S. and A.W., LISHMAN and TUTCHER, R.L. Factors affecting function of induced corpora lutea in post partum anestrous ewes. *J. Anim. Sci.* 52 5: 1.122 a 1.129 1981.
12. MATHER, E.C. et. al. Pregnancy diagnosis in swine utilizing the vaginal biopsy technique. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* (157): 1.522 a 1.527, 1970.

13. MEMON, M.A. Methods of pregnancy diagnosis in sheep and goats. *Cornell.Vet.* 70, 3: 226 a 231, 1980.
14. MITCHELL, D. Vaginal Biopsy as a method for diagnosing pregnancy in the ewe. *The Vet. Rec.* 91: 161 a 165, 1972.
15. PUTT, et. al. Histological and histochemical modifications on the uterine and vaginal mucosa of the mouse during the oestrus cycle. *Basic. Appl. Histochem.* (23) 1: 25 a 37 1979.
16. QUINLIVAN, T. D. et. al. Estimates of pre and perinatal mortality in the new Zeland Romney Marsh ewe. *J. Reprod. Fert.* (2): 379 a 387, 1969.
17. RICHARDSON, C. Diagnosis of pregnancy in the ewe by vaginal biopsy. *Br. Vet. J.* (128): 316 a 330, 1972.
18. SNEDECOR, G. W. *Métodos estadísticos* 6 ed. Editorial Continental: México, p. 626. 1964.
19. VILLIAMSON, P. et. al. An Assessment of the vaginal biopsy, technique of pregnancy diagnosis in sows. *Aust. Vet. J.* (51) 2: 91 a 93, 1975.