

Evaluación citológica del infiltrado de neutrófilos en distintas regiones uterinas de cerdas destinadas a frigorífico: implicancias para el diagnóstico reproductivo

Cytological evaluation of neutrophil infiltration in different uterine regions of sows destined for slaughter: implications for reproductive diagnosis

Sofía Magalí Fages¹; Sara Inés Williams¹ 

¹Cátedra de Producción porcina. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata, calle 60 y 118 (1900), La Plata, Argentina.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar el infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos y la asociación entre la porción del útero y la fase ovárica. Se utilizaron 87 aparatos genitales de cerdas destinadas a frigorífico. Se tomaron muestras para citología con un cepillo endocervical, en el cuerpo, cuerno distal, cuerno medio y cuerno proximal. Las muestras se colorearon con tinción tipo Romanovsky. Se contaron hasta 200 células, considerando células endometriales y neutrófilos. El análisis estadístico se realizó con un modelo de Poisson, y determinó mayor conteo de polimorfonucleares neutrófilos en el cuerpo con respecto a los cuernos ($P \leq 0.01$), pero no se asoció con la fase ovárica ($P = 0.29$). Para determinar la relación entre el conteo de neutrófilos y la fase ovárica se utilizó un modelo de regresión de Poisson mixto. El conteo de polimorfonucleares neutrófilos es mayor en fase folicular que en luteal ($P = 0.11$), y solo fue significativo en el cuerno distal ($P < 0.01$). Podemos concluir que existe una variación en la cantidad de neutrófilos entre las porciones del útero, independiente al ciclo estral. La citología del cuerpo uterino es una posible herramienta en hembras vivas para el diagnóstico de endometritis y su implicancia en el desempeño reproductivo.

Palabras clave: (Polimorfonucleares-neutrófilos), (endometrio), (cerdas), (citología)

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the neutrophilic polymorphonuclear infiltrate and the association between the portion of the uterus and the ovarian phase. Eighty-seven genital tracts were used from slaughtered sows. Samples were taken for cytology with an endocervical brush, on the body, distal horn, middle horn and proximal horn. The samples were stained with Romanovsky stain. Up to 200 cells were counted, considering endometrial cells and neutrophils. The statistical analysis was performed with a Poisson model and determined a higher count of neutrophilic polymorphonuclear in the body with respect to the horns ($P \leq 0.01$), but it was not associated with the ovarian phase ($P = 0.29$). To determine the relationship between neutrophil count and ovarian phase, a mixed Poisson regression model was used. The neutrophilic polymorphonuclear count is higher in the follicular phase than in the luteal phase ($P = 0.11$) and was only significant in the distal horn ($P < 0.01$). It can be concluded that there is a variation in the number of neutrophils between portions of the uterus, independent of the estrous cycle. Cytology of the uterine body is a possible tool in live females for the diagnosis of endometritis and its implication in reproductive performance.

Keywords: (Polymorphonuclear-neutrophils), (endometrium), (sows), (cytology)

INTRODUCCIÓN

Un ambiente uterino subóptimo favorece las muertes embrionarias dando como signo clínico repeticiones cíclicas o acíclicas. En la actualidad, gran parte de los descartes de hembras dentro de las granjas de producción porcina tienen como causas “trastornos reproductivos”, los cuales son muy difíciles de comprobar⁴.

La endometritis es la inflamación del endometrio con la llegada de numerosas células inflamatorias y la liberación de mediadores inflamatorios. Puede o no manifestar signos clínicos, clasificándose en clínica o subclínica, respectivamente^{7, 5, 18}. La endometritis es una de las principales fallas reproductivas estudiadas en diferentes especies de producción. El diagnóstico se realiza mediante diversas técnicas como, por ejemplo, la vaginoscopia, la ultrasonografía, los lavajes uterinos, la biopsia uterina y la citología endometrial. Entre los métodos más fiables se encuentran la biopsia uterina (para evaluación histopatológica) y la citología endometrial⁹.

La citología es una herramienta sencilla y poco invasiva, que permite evaluar la presencia de las células que forman parte de la mucosa uterina. Estudios realizados en vacas y yeguas demostraron que la citología endometrial es una técnica fácil, de rápida realización, segura, efectiva y la menos invasiva que permitió identificar células inflamatorias y correlacionar estos hallazgos con procesos inflamatorios, que muchas veces eran subclínicos^{11, 1, 15, 3, 13}. Al evaluar la sensibilidad de diversos métodos para la toma de muestra y

posterior diagnóstico de endometritis, la citología presentó un 95% de sensibilidad, superando por mucho el resto de los métodos^{17, 1}.

Diversas investigaciones han estado abocadas al conocimiento de la infiltración celular uterina en hembras de producción como bovinos, equinos y cerdos. Trabajos realizados en la especie porcina han demostrado que las células que predominan en cada fase del ciclo estral están determinadas por la acción de la hormona predominante¹⁰. Estudios previos han demostrado una correlación directa entre los niveles de progesterona (P_4) y la respuesta, siendo la hembra más susceptible para presentar endometritis durante los períodos en que la P_4 se encuentra en concentraciones elevadas^{6, 8}.

La infiltración celular en hembras de reposición durante la pubertad y luego del primer servicio fue descrita por investigadores², mientras que otros equipos estudiaron la presencia de linfocitos y células plasmáticas en hembras postdestete, determinando su acción como un “equipo de regeneración” del endometrio durante el postparto⁵. La regeneración endometrial no culmina hasta el próximo celo, permitiendo esperar que los polimorfonucleares-neutrófilos (PMNn) sean fieles indicadores del estado inflamatorio del endometrio. Esta etapa es independiente de la recuperación normal del postparto, en la que intervienen otras células inflamatorias. En bovinos, se demostró que la variación en la cantidad de PMNn no tiene relación con el ciclo estral en hembras ciclando normalmente y negativas a endometritis clínica¹⁴. En yeguas, determinaron que

hay diferencia en la cantidad de células PMNn encontradas en citologías durante el estro y el diestro, con respecto al anestro¹².

Basados en los estudios mencionados anteriormente, la cuantificación de los PMNn es representativa del estado inflamatorio del útero, generando la necesidad de conocer el comportamiento del infiltrado de PMNn en las diversas porciones del útero. Una infiltración celular uniforme en todo el órgano permitiría el desarrollo de técnicas de muestreo *in vivo* en hembras en el cuerpo del útero, para la determinación del estado inflamatorio del órgano y posibles efectos adversos sobre la gestación y/o la eficiencia reproductiva de la hembra porcina.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el infiltrado de PMNn y su cantidad en las distintas porciones del útero, y su variación durante la fase ovárica de hembras de frigorífico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron aparatos genitales (AG) de hembras porcinas destinadas al frigorífico, en distintos estadios del ciclo estral, provenientes de establecimientos conocidos. En el momento de la faena, se registró la identificación individual de

cada hembra (número de caravana y/o tatuaje), y luego se identificó individualmente cada AG con números correlativos. Se recogieron 87 AG, que se transportaron con refrigerantes al Laboratorio de Reproducción Animal (FCV-UNLP). Se tomaron muestras para citología con un cepillo colector endocervical (CCE, Medibrush Plus®, Medical Engineering Corporation S.A.), en cuatro puntos a lo largo del órgano: en el cuerpo (CP), cuerno distal (CND), cuerno medio (CNM) y cuerno proximal (CNP), en relación con su proximidad con el ovario⁹. Se realizó un corte con bisturí en los cuatro puntos definidos anteriormente. Se realizaron de tres a cinco pasadas con el CCE por toda la superficie endometrial. El CCE se extendió sobre un portaobjetos previamente identificado con la caravana de la cerda y la sigla correspondiente al sitio de extracción de la muestra. Las muestras para citología se colorearon con tinción tipo Romanovsky (Tinción 15®, Biopur SRL) y se montaron con bálsamo de Canadá sintético (figura 1). Se realizó el conteo de 200 células totales, evaluando células endometriales y PMNn a un aumento de 1000x con aceite de inmersión y se obtuvo el porcentaje de células presentes en cada muestra citológica.

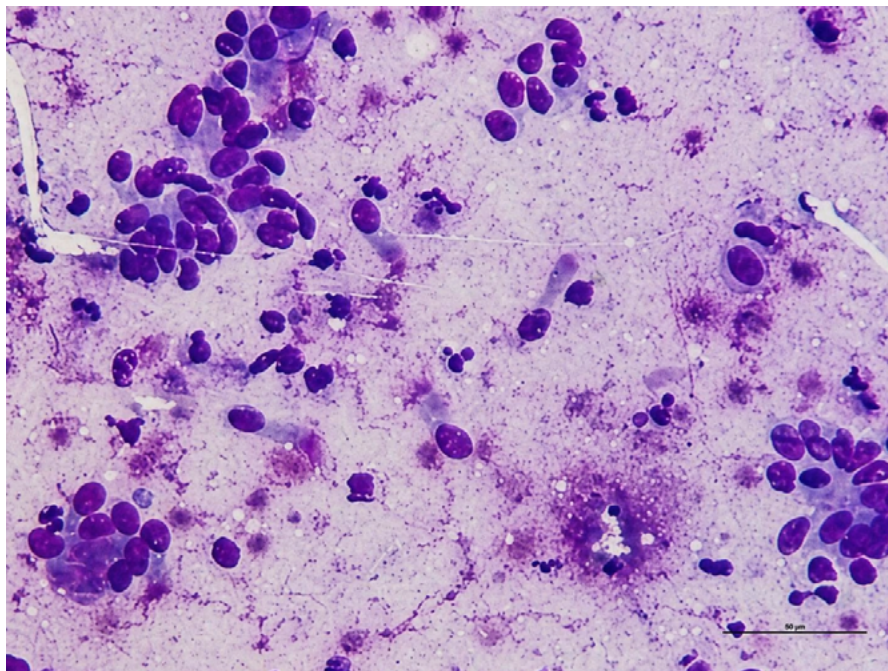


Figura 1. La microfotografía muestra células endometriales (A) y PMNn (B) obtenidas por citología del CP. Tinción 15 ®. 400x.

Las muestras fueron tomadas y evaluadas por la misma persona. Los conteos celulares obtenidos se expresaron en cantidad total de células y en porcentaje de células. Se obtuvieron los valores de media para cada porción uterina en cada fase ovárica.

La determinación de la fase ovárica en que se encontraba cada AG evaluado se realizó a través de la observación de las estructuras ováricas presentes, ya sean folículos o cuerpos lúteos.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el Software® On Demand for Academics

3.81 Enterprise Edition (SAS Institute Inc., 27513-2414 Cary, NC, USA).

Se utilizó un modelo de regresión de Poisson (modelo lineal generalizado) para evaluar la relación entre el conteo de PMNn presente en las distintas porciones uterinas y la fase ovárica (Luteal y Folicular). Los resultados de este modelo se expresaron como medias estimadas o ajustadas del modelo, obtenidas directamente del predictor lineal del modelo (logaritmo de la tasa media de conteo).

Se utilizó un Modelo Lineal Generalizado Mixto de Poisson. Se evaluó el efecto combinado de la porción uterina y la fase ovárica (folicular y luteal) como variables de efecto fijo y su interacción sobre el conteo de PMNn. Teniendo en cuenta la variabilidad entre individuos, se incluyó la identidad de la cerda como variable de efecto aleatorio para controlarla. La significancia se estableció con un valor de $P \leq 0.01$. Este modelo estadístico también permitió calcular las medias estimadas de PMNn sobre cada porción uterina.

RESULTADOS

Durante la evaluación de los 87 AG, se determinó que 63 estaban en fase lútea y 17 en fase folicular. Se determinó que 2 AG presentaban ovarios con quistes, y en 5 AG no fue posible determinar la fase del ciclo estral. Para el análisis de evaluación de la cantidad de PMNn encontrados a lo largo de las diferentes porciones del útero, se utilizaron todas las muestras ($n=87$).

El modelo de regresión lineal generalizado de Poisson demostró que la porción uterina influye

significativamente sobre el conteo de PMNn ($P \leq 0.01$). Las medias estimadas mostraron una mayor cantidad de PMNn en el CP en comparación con las porciones del cuerno uterino (Tabla 1) La fase ovárica no generó una variación estadísticamente significativa ($P = 0.29$) sobre el conteo de PMNn.

	Fase ovárica		Total PMNn
	Fase folicular	Total PMNn	
Porción uterina			
Cuerpo	1.74	1.46	365
Cuerno distal	0.73	0.25	85
Cuerno medio	0.38	0.17	51
Cuerno proximal	0.54	0.29	82

Tabla 1. Media estimada de PMNn de las porciones uterinas en las diferentes fases ováricas.

Sin embargo, el análisis del modelo lineal generalizado mixto de Poisson demostró particularidades anatómicas. Como se observa en la figura 2, no se hallaron diferencias significativas en

el conteo de PMNn durante la fase folicular en las porciones del CP, CNM y CNP ($P = 0.11$). Por el contrario, la fase folicular sí tuvo influencia significativa específicamente sobre el conteo de PMNn en el CND ($P < 0.01$).

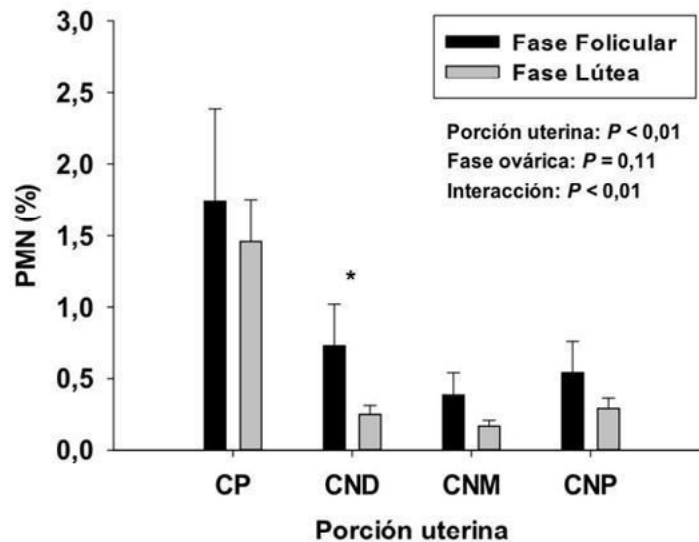


Figura 2. Evaluación del efecto de la porción uterina y la fase ovárica sobre la cantidad de PMNn, y su interacción con el aparato genital como efecto aleatorio.

DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que, la fase ovárica no modifica estadísticamente el recuento de PMNn en el CP, CNM y CNP. El efecto de la fase folicular sobre la infiltración de PMNn se restringe de manera significativa solamente al CND.

Los resultados obtenidos en la hembra porcina son similares a los hallados en bovinos. En esta especie no hay una variación significativa en la cantidad de PMNn en hembras cíclicas o negativas a endometritis clínica en las distintas fases del ciclo estral¹⁴.

En contra posición a los hallazgos de este trabajo, estudios realizados en yeguas, demostraron un efecto de la fase del ciclo estral en el conteo de PMNn durante el estro y el diestro, en comparación con los estudios citológicos durante el anestro¹².

Asimismo, estudios realizados en hembras caninas, determinaron que la citología uterina aún no es un método diagnóstico útil para la detección de cambios inflamatorios¹⁶.

La ausencia de significancia estadística en la variabilidad del conteo de PMNn observada en el CP de la hembra porcina durante las fases del ciclo estral permite, por tanto, considerar esta región uterina para la toma de muestras citológicas como posible método diagnóstico para la determinación de cambios inflamatorios a nivel uterino.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos permiten concluir que existe una mayor cantidad de PMNn en el cuerpo del útero en comparación con el cuerno uterino. Esta diferencia no se ve modificada por el momento del ciclo estral en el que se encuentre la hembra.

Basado en los hallazgos de esta investigación y los resultados de estudios en la especie bovina, se infiere que cualquier aumento en el conteo de PMNn en el cuerpo uterino detectados por citología reflejaría el cambio inflamatorio de origen patológico a nivel uterino.

El presente trabajo permite considerar a la citología del cuerpo uterino, como una posible herramienta diagnóstica en hembras vivas. Este método diagnóstico permitiría la determinación de endometritis en cerdas, permitiendo actuar en busca de un mejor desempeño reproductivo, teniendo un efecto directo sobre la productividad de las hembras en establecimientos porcinos.

1. Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology*. 2008;69:714-723.
2. Bischof RJ, Lee CS, Brandon MR, Meeusen E. Inflammatory response in the pig uterus induced by seminal plasma. *J Reprod Immunol*. 1994;26:131-146.
3. Cocchia N, Paciello O, et al. Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*. 2012;77(1):89-98.
4. D'Allaire S, Drolet R. Culling and mortality in breeding animals. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, editors. *Diseases of swine*. 8th ed. Ames (Iowa): Iowa State Press; 1999. p. 1003-1016.
5. Dalin AM, Kaeoket K, Persson E. Immune cell infiltration of normal and impaired sow endometrium. *Anim Reprod Sci*. 2004;82-83:401-413. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.012. PMID: 15271469
6. De Winter PJJ, Verdonck M, De Kruif A, Devriese LA, Haesebrouck F. Endometritis and vaginal discharge in the sow. *Anim Reprod Sci*. 1992;28:51-58.
7. De Winter PJJ, Verdonck M, De Kruif A, Devriese LA, Haesebrouck F. Influence of the estrus cycle on experimental intrauterine *E. coli* infection in the sow. *J Vet Med A*. 1994;41:640-644.
8. De Winter PJJ, Verdonck M, et al. The relationship between the blood progesterone concentration at early oestrus and uterine infection in the sow. *Anim Reprod Sci*. 1996;41:51-59.
9. Fages SM, Bonaura MC, Piñeiro P, Williams SI. Citología endometrial en úteros de cerda. IV Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias; 2019. En: <https://fcagr.unr.edu.ar/wp-content/uploads/2020/05/LibroResumenesJCyT2019.pdf>
10. Kaeoket K, Persson E, Dalin AM. The sow endometrium at different stages of the oestrous cycle: studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system. *Anim Reprod Sci*. 2001;65(1-2):95-114. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00211-6. Corrected and republished in: *Anim Reprod Sci*. 2002 Sep 16;73(1-2):89-107. doi: 10.1016/s0378-4320(02)00126-4. PMID: 11182512.
11. Kasimanickam R, Duffield TF, et al. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can Vet J*. 2005;46:255-259.
12. Kozdrowski R, Sikora M, Buczkowska J, Nowak M, Raś A, Dziecioł M. Effects of cycle stage and sampling procedure on interpretation of endometrial cytology in mares. *Anim Reprod Sci*. 2015;154:56-62. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.01.009
13. Madoz LV, Giuliadori MJ, Migliorisi AL, Jaureguiberry M, De la Sota RL. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J Dairy Sci*. 2014;97:195-201.
14. Madoz LV, Jaureguiberry M, Migliorisi AL, De la Sota RL. Cambios en la citología endometrial durante el ciclo estral en vacas de tambo. *Rev Cienc Morfol*. 2016;18(1). En: <https://revistas.unlp.edu.ar/morfol/article/view/2660>
15. Overbeck W, Witte TS, Heuwieser W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology*. 2011;75:1311-1318.
16. Praderio RG, García Mitacek MC, García MF, Coralli FL, Stornelli MA. Endometritis en perras clínicamente sanas: una nueva percepción sobre las afecciones uterinas. *Clin Vet Peq Anim*. 2021. En: <https://www.clinvetpeqanim.com/publications/196>
17. Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*. 2006;65:1516-1530.
18. Tummaruk P, Kesdangsakonwut S, Prapasarakul N. Endometritis in gilts: reproductive data, bacterial culture, histopathology, and infiltration of immune cells in the endometrium. *Comp Clin Path*. 2010;19:575-584. <https://doi.org/10.1007/s00580-009-0929-1>