

## Ciclo estral del ratón hembra intacto y ovariectomizado

María Teresa Sepúlveda Angulo\*, Myrna Sabanero López\*\*, Eduardo Durán Castro\*\*\*, Lérica Liss Flores Villavicencio\*\*, Joel Ramírez Emiliano\*, Martha Silvia Solís Ortíz\*

### RESUMEN

Los cambios del epitelio vaginal documenta los ciclos reproductivos, el estado funcional del eje hipotálamo-hipófisis-ovario asociados con cambios en la conducta. Sin embargo, es necesario conocer más sobre la relación citológica vaginal. En este trabajo se estudiaron las diferencias del epitelio vaginal de ratones hembra intactas y ovariectomizadas. Se analizó la citología vaginal de ratones hembra jóvenes, maduras y ancianas, y se comparó con un grupo ovariectomizado. Los resultados muestran que los ratones hembra intactas jóvenes presentaron las cuatro etapas del ciclo estral: estro, metaestro, diestro y proestro. En contraste, las hembras maduras y ancianas presentaron la fase de diestro persistente. Los ratones ovariectomizados presentaron una citología similar a la de los ratones intactos maduros y ancianos. En conclusión, la citología vaginal evalúa la integridad del eje reproductivo y refleja la acción y/o modificación de los niveles de las hormonas sexuales circulantes (los cuales pueden afectar la conducta del organismo).

### ABSTRACT

The vaginal epithelial changes document reproductive cycles and provide an index of the functional status of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. However, it is necessary to understand the vaginal cytology relationship. In our work we study the vaginal epithelium of intact and ovariectomized female mice. We analyzed young, middle aged and aged vaginal cytology and compared them with an ovariectomized group. The results show that female young intact mice manifest a four days estrous cycle phases: estrous, metaestrous, diestrous and proestrous. In contrast, female middle aged and aged mice showed the persistence of diestrous phase. Ovariectomized mice showed a similar cytology than the middle aged and aged intact ones. In conclusion, the vaginal cytology evaluates the reproductive axis integrity and reflects the circulating sexual hormones levels action and/or modification, which could produce transient changes in behavior.

Recibido: 14 de mayo de 2011  
 Aceptado: 29 de noviembre de 2011  
 Artículo basado en las instrucciones para  
 autores vigentes hasta septiembre 2011

### INTRODUCCIÓN

La evaluación de los cambios en la estructura de las células epiteliales de la vagina ha sido utilizada como un método no invasivo para detectar los ciclos reproductivos en mamíferos. Además, la citología vaginal proporciona un índice del estado funcional del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Scandroglio y Spitali, 1968; Caligiorni, 2009). La ciclicidad ovárica tiene un profundo efecto sobre la mayoría de los sistemas del organismo, y el sistema nervioso no es la excepción. Estos cambios producen efectos temporales en la conducta, por ejemplo, la conducta reproductiva, el consumo de alimentos y fluidos; del mismo modo, la actividad locomotora y la cognición varían marcadamente con el estado del ciclo estral.

#### Palabras clave:

Citología vaginal; senescencia; estropausia; ovariectomía.

#### Keywords:

Vaginal cytology; estropause; senescence; ovariectomy.

Después del descubrimiento de Stockard y Papanicolau sobre los cambios periódicos en la morfología de las células epiteliales vaginales (Stockard y Papanicolau, 1917), se publicó la descripción citológica del ciclo estral de la rata (Long y Evans, 1922). Posteriormente, se evaluó la respuesta vaginal frente a hormonas estrogénicas en ratones ovariectomizadas (Allen y Doisy, 1923). Además de ello, respecto a la citología vaginal se reportó la irregularidad en el ciclo estral en ratones de 10 a 12

\*Departamento de Ciencias Médicas, Campus León, Universidad de Guanajuato. León, Gto., México. C. P. 37320. Correo electrónico: etualmer@yahoo.com

\*\*Departamento de Biología, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. Guanajuato, Gto., México. C. P. 36000. Correo electrónico: myrna@ugto.mx

\*\*\*Departamento de Farmacia, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. Guanajuato, Gto., México. C. P. 36000.

meses de edad, caracterizada ésta por extensos períodos leucocitarios (Nelson, Felicio y Finch, 1986). Así, la evaluación de tales cambios en la morfología del epitelio vaginal, en animales de laboratorio que ovulan espontáneamente se utiliza para determinar la ciclicidad reproductiva (Goldman *et al.*, 2007).

La progresión del ciclo estral involucra la recurrencia de tipos celulares distintivos generalmente en combinación. El fenotipo celular se correlaciona con el estado de la mucosa vaginal, el útero y los ovarios; de la misma manera, se asocia con alteraciones en los esteroides sexuales y las gonadotropinas (Goldman *et al.*, 2007). Por otro lado, un ciclo estral de 4 días presenta cuatro fases: proestro, estro, metaestro y diestro. Cada una de estas fases tiene una duración y características citológicas que hacen evidente el estadio de referencia (Goldman *et al.*, 2007).

La estropausia es el proceso de la senescencia reproductiva en los roedores definido como un estado acíclico anestro (Conn, 2006). Dicho proceso inicia a los nueve-doce meses de edad, y luego las hembras entran en un periodo de estro o diestro persistente. Los niveles de estrógenos no necesariamente van a diferenciar el estado de estropausia, por lo que la citología vaginal es utilizada para conocer el estado de la senescencia del ratón con una confiabilidad muy alta (Felicio *et al.*, 1984). En la ovariectomía, destacan los cambios morfológicos en el epitelio vaginal: atrofia del revestimiento vaginal (caracterizado por adelgazamiento del epitelio), cornificación, mucosidad e invasión con leucocitos (Fekete *et al.*, 1941; Ng *et al.*, 2010).

El ciclo estral del roedor es un modelo ideal para la investigación cognitiva y reproductiva; la mayoría de los datos citológicos han sido obtenidos de ratas. Sin embargo, no es posible generalizar los cambios en el ciclo estral de una especie a otra, por lo que es necesario estudiarlo particularmente en ratones para llevar a cabo ciertas investigaciones en las que el ciclo estral influye en la conducta (Caliglioni, 2009; Greising *et al.*, 2011).

El presente trabajo analizó en el ratón hembra íntegro y ovariectomizado el ciclo estral, identificando en el epitelio vaginal los fenotipos celulares en diversas etapas de su vida. Los resultados muestran las diferencias en las citologías vaginales de los ratones hembra en relación a la edad y la castración, indicando así la atrofia del epitelio vaginal (debido a la adaptación de los niveles circulantes de hormonas sexuales por la senescencia o la ovariectomía).

## METODOLOGÍA

**Sujetos.** Ratones hembra vírgenes de la cepa C57BL/6 de diferentes edades: jóvenes (3 m,  $n=8$ , 4 m,  $n=8$ , 5 m,  $n=8$ , 8 m,  $n=4$  y 9 m,  $n=4$ ), de mediana edad (15 m,  $n=6$ , 16 m,  $n=4$ , y 17 m,  $n=4$ ), de edad avanzada (21 m,  $n=2$ , 22 m,  $n=4$  y 24 m,  $n=4$ ) y ovariectomizadas (6 m,  $n=5$ ). Los animales fueron obtenidos del bioterio de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato, y fueron mantenidas en condiciones de confinamiento estándares y a 21 °C, con períodos de luz-obscuridad de 12 h (las luces se encienden a las 6 a. m.). Las hembras fueron alimentadas con Nutricubos<sup>MR</sup> y agua *ad libitum*.

**Obtención de la muestra vaginal.** La toma de muestra se realizó cada 24 h por cuatro días consecutivos (Goldman, 2007), a las 8:00 a. m., con jeringa de punta roma en solución salina estéril. Se colocaron sobre portaobjetos y fueron fijadas (Cyto-Spray<sup>MR</sup>). Posteriormente, fueron procesadas por Papanicolau (Stockard y Papanicolau, 1917) y observadas al microscopio de luz (Leica DMLS). Se registraron las fotografías con una cámara digital Coolpix 4300 (Nikon). Las muestras vaginales fueron caracterizadas de acuerdo al tipo celular dominante en cada etapa del ciclo estral: estro, metaestro, diestro y proestro.

**Ovariectomía.** Los animales fueron anestesiados con zoletil (130 mg/kg) intramuscular, colocados en bandeja de disección y rasurados del abdomen. Se realizó una pequeña incisión ventral en la línea media y cada ovario fue retirado con su cápsula y parte del oviducto. La incisión fue cerrada con tres puntos de sutura. Los ratones sobrevivieron bien a la cirugía, y fueron tratados con antibiótico (enrofloxacin, 5 mg/kg) y anti-inflamatorio (meloxicam, 0,0025 mg/kg) en el agua de beber por 8 días. Al término de su recuperación, se tomaron las muestras vaginales de acuerdo con el protocolo antes descrito.

## RESULTADOS

Los resultados muestran de manera representativa la citología vaginal obtenida para cada uno de los grupos de ratones evaluados. La figura 1 muestra el ciclo estral (A-D) de una ratón hembra joven (8 meses de edad). Se observa la progresión de las diferentes fases: en el primer día (figura 1, panel A), que corresponde al estro, se observan abundantes células epiteliales queratinizadas y algunas células nucleadas. En el segundo día (figura 1, panel B), que corresponde al metaestro, se manifiesta el deterioro del epitelio

vaginal con la presencia de leucocitos y algunas células epiteliales queratinizadas. Finalmente, al tercer y cuarto día (figura 1, paneles C-D), que corresponden al diestro, se observan abundantes leucocitos y algunas células queratinizadas.

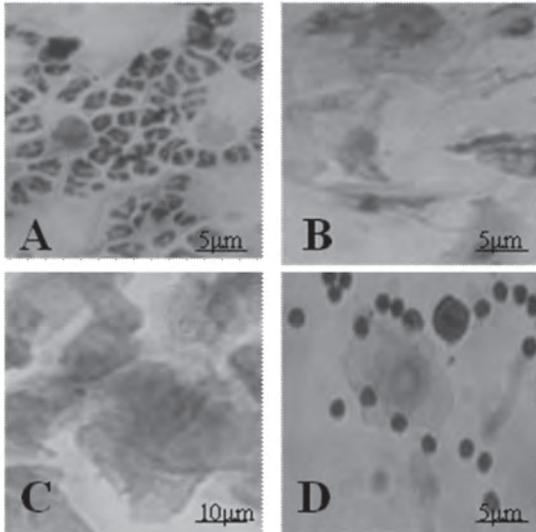


Figura 1. Ciclo estral de un ratón hembra joven (8 m de edad). A) día 1: estró, B) día 2: metaestro, C) día 3 y D) día 4: diestro.

La citología vaginal de un ratón hembra de mediana edad (15 meses de edad) (figura 2, A-D) muestra una población mayoritaria de leucocitos (ello representa una marca de aciclicidad o también denominada *fase estropáusica*).

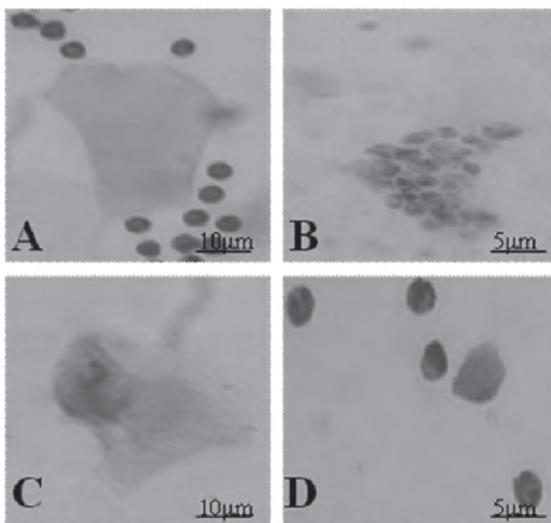


Figura 2. Citología vaginal de un ratón hembra de mediana edad (15 m de edad). A) día 1, B) día 2, C) día 3 y D) día 4: diestro.

La figura 3 (paneles A-D) presenta la citología vaginal de un ratón hembra de edad avanzada (22 meses de edad), en la cual se observa un patrón similar a la citología del de mediana edad. Se aprecia una población en su mayoría de leucocitos, lo cual es una marca de aciclicidad o estropausia.

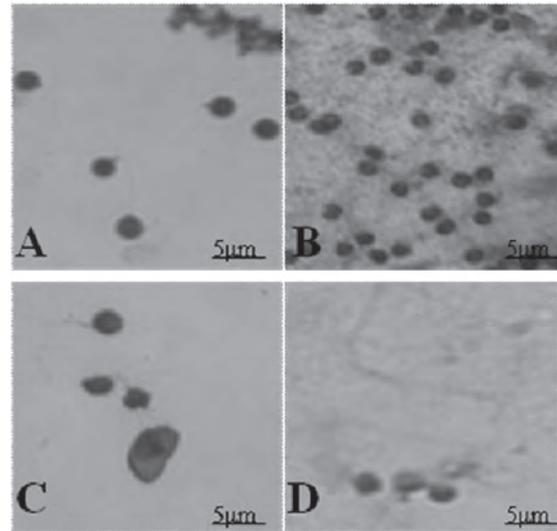


Figura 3. Citología vaginal de un ratón hembra de edad avanzada (22 meses) de 15 m de edad. A) día 1, B) día 2, C) día 3 y D) día 4: diestro.

La citología vaginal del ratón ovariectomizado (figura 4, paneles A-D) muestra una población dominante de leucocitos, mucosidad y escasas células epiteliales.

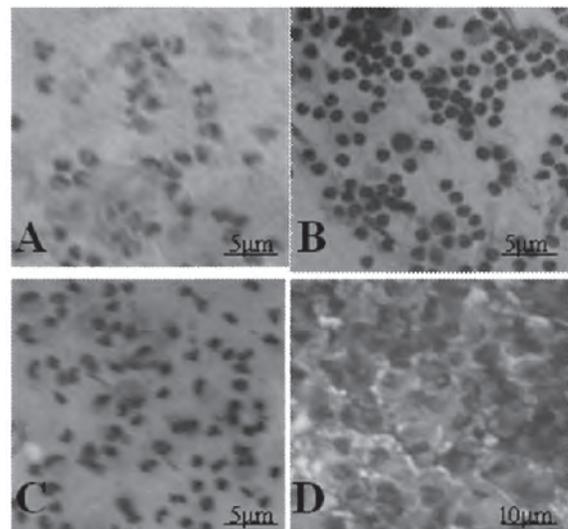


Figura 4. Citología vaginal de un ratón ovariectomizado (6 m). A) día 1, B) día 2, C) día 3 y D) día 4: diestro.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo evaluó en el ratón hembra de la cepa C57BL/6, íntegro y ovariectomizado, el ciclo estral, identificando en el epitelio vaginal los fenotipos celulares en diversas etapas de la vida (lo cual aún no se encontraba documentado). Nuestros resultados muestran que la citología vaginal de los ratones jóvenes de la cepa C57BL/6 es similar a lo que ha sido reportado por Nelson y colaboradores (1986), en cuanto a las fases de estro, metaestro, diestro y proestro, así como a su duración.

Por otra parte, consistente con la literatura (Conn, 2006), los ratones del presente estudio manifestaron irregularidades en el ciclo a partir de la edad de los nueve meses, fase a la cual se le ha llamado *estropausia* (Chakraborty y Gore, 2004), caracterizada por la aciclicidad. Además, en los ratones de la cepa C57BL/6 de nuestro estudio, se observaron cambios histológicos compatibles con la estropausia desde los nueve y hasta los veinticuatro meses de edad.

En el epitelio vaginal de ratones DBA ovariectomizados al nacimiento se encontró adelgazamiento y atrofia, cornificación, mucosidad e invasión leucocitaria a los 6-7 meses posteriores a la castración (Fekete *et al.*, 1941). En contraste, nuestros animales de la cepa C57BL/6 fueron ovariectomizados después de alcanzar la madurez sexual (6 meses), sin embargo, mostraron características similares a las descritas por Fekete, esto es, invasión leucocitaria, mucosidad y escasas células epiteliales, compatibles con el estado atrófico del epitelio vaginal. Los datos descritos indican que los ratones C57BL/6 son un excelente modelo experimental, además presentaron una efectiva respuesta a los estrógenos y mostraron habilidades de memoria y aprendizaje contextual y espacial (Frick y Gresak, 2003).

En general, nuestros resultados indican que la citología vaginal es un modelo útil para la investigación reproductiva y cognitiva. Por ello, el estudio de los efectos del ciclo estral representa una oportunidad para evaluar la plasticidad neuronal y sus consecuencias fisiológicas y conductuales. Finalmente, los datos obtenidos de la presente investigación permitirán contar con el antecedente del estado hormonal de los animales de estudio para la posterior evaluación del aprendizaje y la memoria en estos grupos, así como con datos acerca del modo en que influye éste en la ejecución de tareas espaciales.

## AGRADECIMIENTOS

El estudio fue apoyado parcialmente por la Universidad de Guanajuato. Los autores desean manifestar su agradecimiento a los M. V. Z. María Eugenia Herrera Alberú y Miguel Ochoa por la realización de la ovariectomía, así como al Hospital General de Guanajuato por las facilidades otorgadas para el procesamiento de las muestras vaginales.

## REFERENCIAS

- Allen E., Doisy E. A., (1923). An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. *J Am Med Assoc*, 81: pp. 819-821.
- Caligioni C. S., (2009). Assessing Reproductive Status/Stage in Mice. *Current Protocols in Neuroscience*, appendix 4: appendix 4I.
- Chakraborty T. R., Gore, A. C., (2004). Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. *Experimental Biology Medicine*, 229: pp. 977-987.
- Conn P. M., (2006). *Handbook of models for human aging*. Elsevier Academic Press: p. 537.
- Felicio, L. S., Nelson, J. F., Finch, C. E., (1984). Longitudinal studies of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: II. Cessation of cyclicity and the duration of persistent vaginal cornification. *Biol. Reprod*, 31: pp. 446-453.
- Fekete, E., Wooley, G., Little, C. C., (1941). Histological changes following ovariectomy in mice. *J Exp Med*, 74: pp. 1-8.
- Frick, K. M., Gresack, J. E., (2003). Sex differences in the behavioral response to spatial and object novelty in adult C57BL/6 mice. *Behavioral Neuroscience*, 117: pp. 1283-1291.
- Goldman, J. M, Murr, A. S., Cooper R. L., (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Research (part B)*, 80: pp. 84-97.
- Greising, S. M, Carey, R. S., Blackford, J. E., Dalton, L. E., Kosir, A. M., Lowe, D. A., (2011). Estradiol treatment, physical activity, and muscle function in ovarian-senescent mice. *Experimental Gerontology*, 46 (8): pp. 685-693.
- Long, J. A., Evans, H. M., (1922). Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance. *PNAS*. 8, 3: pp. 38-39.
- Nelson, J. F, Felicio, L. S., Finch, C. E., (1986). Prolongation and cessation of estrous cycles in aging C57BL/6J mice are differentially regulated events. *Biol Reprod* 34: pp. 849-858.
- Ng, K. Y., Yong, J., Chakraborty, T. R., (2010). Estrous cycle in ob/ob and ovariectomized female mice and its relation with estrogen and leptin. *Physiol Behav.*, 12, 99: pp. 125-30.
- Scandroglio, R., Spitali, R., (1968). Histochemical aspects of the vaginal epithelium of the mouse during the estral cycle. *Minerva Ginecol.* 30, 20: pp. 1766-1767.
- Stockard, C. R., Papanicolau, G. N., (1917). A rhythmical "heat period" in the guinea-pig. *Nature* 13, 46: pp. 42-44.