

CARACTERÍSTICAS DE LA CITOLOGÍA EXFOLIATIVA EN HEMBRAS GESTANTES Y NO GESTANTES DE *Lagostomus maximus*

EXFOLIATIVE CYTOLOGY IN PREGNANT AND NON-PREGNANT FEMALES OF *Lagostomus maximus*

Mirta Alicia FLAMINI¹, Claudio Gustavo BARBEITO^{1,2}, Enrique Leo PORTIANSKY²

¹Laboratorio de Histología y Embriología Descriptiva, Experimental y Comparada, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. ²Laboratorio de Análisis de Imágenes, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN.

La citología exfoliativa o colpocitograma es un método de laboratorio de uso frecuente para reconocer cambios cíclicos en el epitelio vaginal. Se describen los tipos de células del epitelio vaginal de la vizcacha (*Lagostomus maximus*) y se establece un patrón de referencia de los cambios morfológicos que experimenta la vagina de estas hembras en sus diferentes estados fisiológicos. Los animales fueron divididos en cuatro grupos: no preñadas en anestro, no preñadas en fase folicular, preñadas con implantaciones múltiples y con preñez a término. Se observaron células basales, cianófilas intermedias y superficiales, eosinófilas superficiales, cornificadas o escamas, mucosas y leucocitos. Las hembras en anestro presentaron gran cantidad de leucocitos y células basales. Durante la fase folicular predominaron las células eosinófilas superficiales y descendió el número de leucocitos. En las hembras gestantes las células mucosas son abundantes. Las células cianófilas intermedias y basales están en mayor proporción en estas hembras que en las de fase folicular. El colpocitograma es una práctica que puede ser utilizada en la vizcacha para el diagnóstico de preñez por el alto porcentaje de células mucosas que se observan. Si bien los leucocitos estuvieron presentes en todos los extendidos, el porcentaje de células eosinófilas superficiales podría ser tomado como un indicador para la detección del inicio del estro.

Palabras claves: vagina, colpocitograma, *Hystricomorpha*, ciclo sexual.

ABSTRACT.

Exfoliative cytology or colpocytogram is a common laboratory method for recognizing cyclical changes in the vaginal epithelium. Different types of viscacha (*Lagostomus maximus*) vaginal epithelial cells are described. A reference pattern of morphological changes occurring in the vagina of these females in different physiological states is established. Animals were divided into four groups: anestrous, follicular phase, early pregnancy and pregnancy at term. Basal, intermediate and superficial cyanophilic, superficial eosinophilic, cornified and mucous cells as well as leukocytes were observed. Abundant leukocytes and basal cells were observed in females with anestrous. Superficial eosinophilic cells prevail during the follicular phase while the number of leukocytes decreased. In pregnant females mucous cells were abundant. Cyanophilic intermediate and basal cells were more abundant in these females than during the follicular phase. The colpocytogram is a technique that can be used in the viscacha for diagnosing pregnancy due to the high percentage of mucous cells observed. While leukocytes were present in all samples, the percentage of superficial eosinophilic cells could be taken as an indicator for the detection of estrus.

Keywords: vagina, colpocytogram, *Hystricomorpha*, sexual cycle.

Recibido junio 5, 2015 - Aceptado noviembre 24, 2015

* **Correspondencia de autor:** Mirta A. Flamini. Laboratorio de Histología y Embriología Descriptiva, Experimental y Comparada (LHYEDEC) Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Calle 60 y 118 s/n (CP 1900). La Plata, Buenos Aires, Argentina. Tel: 54-423-6663, Int. 414. e-mail: amflamini@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La vizcacha de llanura (*Lagostomus maximus*) es un roedor de hábitos nocturnos que habita en una amplia zona de la Argentina. Pertenece al orden Rodentia, Suborden Hystricognathi, familia Chinchillidae (1, 2). Esta especie presenta algunas características poco frecuentes en los mamíferos eutherios, tales como poliovulación (200-800 ovocitos por ciclo), presencia de una alta mortalidad embrionaria y una próstata femenina desarrollada (3, 4, 5, 6, 7, 8). Otro rasgo anatómico distintivo lo constituye la vagina, que presenta dos zonas anatómicamente diferentes: la más proximal al útero que se encuentra dividida por un septum en dos cavidades iguales, mientras que la caudal carece de este septum y forma una cavidad única, como la mayoría de las especies de mamíferos (4, 5, 9). Después del coito, las secreciones glandulares presentes en el semen forman un tapón que se adapta a la forma de Y de la vagina y permanece hasta el nacimiento de las crías. Como en otras especies del suborden, la vagina de la vizcacha permanece sellada por una membrana de clausura durante la mayor parte del ciclo reproductivo, excepto durante el estro (10, 11, 12, 13, 14). Esta estructura es de consistencia densa y cierra completamente el orificio vaginal.

Desde el punto de vista zootécnico, la vizcacha de llanura es una especie que ha sido utilizada para el consumo de carne y la obtención de su piel y su pelo (1). Dadas las características reproductivas de la especie, el control de su reproducción resulta dificultoso. Para obtener un conocimiento más certero de los nacimientos dentro de la colonia, y marcar un límite a la expansión de la misma, es necesario conocer cuáles son las características histológicas de su ciclo reproductivo. La citología exfoliativa o colpocitograma es un método

de laboratorio que se utiliza con mucha frecuencia en diversas especies de mamíferos para reconocer cambios cíclicos que ocurren en el epitelio vaginal, como consecuencia de los cambios hormonales (15, 16, 17). En las hembras de algunas especies como rata, ratón, canino y humano, las células presentes en los extendidos pueden indicar, con bastante precisión, el momento del estro (18, 19, 20, 21). Sin embargo, en otras hembras mamíferas como la gata, la yegua y el hámster, el diagnóstico se dificulta debido a la ausencia de un patrón cíclico definido (22, 23). Considerando que la vizcacha presenta particularidades anatómicas y reproductivas, nos propusimos realizar el presente trabajo con el objetivo de describir los tipos celulares hallados en los frotis vaginales y establecer un patrón de referencia acerca de los cambios colpocitológicos que experimentan las hembras de esta especie, en diferentes estados fisiológicos de su ciclo reproductivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y toma de muestras

Se utilizaron 30 hembras, sexualmente adultas (peso corporal entre 3 y 4,5 Kg), provenientes de la Estación de Cría de Animales Silvestres (ECAS), dependiente del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires, donde se encuentran en estado silvestre. Las capturas se realizaron en los periodos de: marzo-abril; julio-agosto y diciembre-enero. La elección de estos periodos se basó en los resultados del trabajo de Llanos y Crespo (1) y de Flamini *et al.* (9), que se corresponden con diferentes momentos de la vida reproductiva de la vizcacha. Los animales fueron capturados con jaulas/trampas colocadas en la boca de la vizcachera.

Los animales fueron divididos en 4 grupos de acuerdo a estado fisiológico registrado clínicamente por

el estado de preñez o no y a la presencia o no de la membrana de clausura vaginal que posee esta especie (8, 9). Grupo 1: hembras no preñadas en anestro (A) (n=4); Grupo 2: hembras no preñadas en fase folicular (FF) (n=6); Grupo 3: hembras con implantaciones múltiples (PT) (n=12) y Grupo 4: hembras con preñez a término (PAT) (n=8). De cada hembra sólo se obtuvo una única muestra vaginal, debido a que los animales fueron posteriormente sacrificados para estudios histológicos del aparato reproductor, por lo cual no hubo un seguimiento diario. Las vizcachas fueron anestesiadas mediante la administración de una dosis de xilacina (8 mg/Kg de peso corporal) seguido de ketamina (50 mg/kg de peso corporal) por vía intramuscular (*Ketanest*, Laboratorio *Scott Cassara*). Una vez que alcanzaron el plano profundo de anestesia, se practicó la perfusión por vía intracardíaca con solución salina fisiológica y a continuación con paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0.1 M. El método utilizado está de acuerdo con las recomendaciones internacionales para el uso de animales de experimentación (*Commission on Life Sciences National Research Council* 1996).

Para la obtención de estas muestras los animales fueron asidos de la cola, exponiendo así la vagina. La membrana de clausura presente en algunas hembras, fue retirada previo a la toma de la muestra mediante la humidificación de la zona y luego realizando un raspado suave con gasa, ya que no se trata de una verdadera membrana sino de depósitos de secreción. A continuación, se procedió a realizar el lavaje vaginal utilizando una pipeta Pasteur de bordes romos cargada con solución fisiológica. El contenido obtenido se instiló directamente sobre un portaobjetos limpio y desengrasado.

La mayoría de los extendidos analizados presentaban un aspecto "sucio" debido a la presencia de

leucocitos, detritos celulares y mucus.

Técnicas de coloración

Las muestras esparcidas sobre el portaobjetos fueron fijadas en alcohol 96° por triplicado. Inmediatamente después fueron colocadas sobre una gradilla y teñidas con la solución de Shorr (24) comercial (Biopur, SRL. Argentina) o de Papanicolau (24), dejándolas actuar durante 5 minutos. Luego, se lavaron con agua destilada, se deshidrataron con alcoholes de 96° y 100°, se sumergieron en un baño de xilol por espacio de 30 segundos. Finalmente, se montaron con bálsamo de Canadá. Los cortes histológicos de vagina fueron procesados mediante la técnica de rutina, cortados a 3 µm de espesor y coloreados con la técnica de Hematoxilina y Eosina (H-E).

Análisis de los extendidos

Para el estudio microscópico de los extendidos se utilizó un microscopio óptico (Olympus BX53, Japón) con objetivos de 10, 20 y 40X aumentos. Las imágenes fueron capturadas mediante una cámara digital (Olympus DP73, Japón) montada sobre el microscopio y conectada a una computadora. Las imágenes fueron almacenadas en formato TIF y analizadas morfométricamente mediante el mismo software (*Cell Sens Dimension* - Olympus Co, Japón).

Análisis estadístico

Los datos morfométricos fueron estadísticamente analizados mediante ANOVA de una vía. El test de Bonferroni fue utilizado para establecer la significación de las diferencias entre las medias. Se consideraron diferencias significativas aquellas con un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Citología

Para la clasificación de las células se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

- a) Procedencia y origen celular (células profundas, intermedias y superficiales)
- b) Afinidad tintorial del citoplasma (eosinófilas o basófilas)
- c) Tamaño celular

El recuento de los diferentes tipos celulares fue expresado en porcentaje respecto del total de células contabilizadas para cada tipo celular. Las características morfométricas de todas las células observadas fueron expresadas en μm lineales.

El promedio de células contabilizadas para cada grupo fue: anestro: 147, fase folicular: 85, preñadas con múltiples implantaciones: 155 y preñadas a término: 157.

Clasificación de los tipos celulares

Células basales: son redondas o sutilmente ovales. Su citoplasma se colorea de azul-verdoso intenso. El núcleo es voluminoso, redondo, generalmente central o ligeramente excéntrico. Su cromatina es dispersa pero forma gránulos periféricos (Fig. 1).

Células cianófilas intermedias: presentan una forma alargada o poliédrica. La coloración del citoplasma es azul-verdosa, menos intensa que la de las células basales. Su núcleo se encuentra en el centro, es redondo o ligeramente oval y su cromatina se dispone en gránulos finos (Fig. 1).

Una variedad de estas células intermedias lo constituyen las células naviculares, que aparecen con mayor frecuencia durante la gestación. Se caracterizan por ser más alargadas que las otras células intermedias.

Se las puede encontrar aisladas o unidas entre sí en número variable. La reacción citoplasmática es similar a la de las otras células intermedias. El núcleo tiene forma oval y, por lo general, es ligeramente excéntrico. La cromatina se dispone en forma de gránulos finos (Fig. 1).

Células cianófilas superficiales: son grandes, de contornos irregulares y poliédricos. Sus bordes pueden encontrarse plegados. La coloración del citoplasma es azul-verdosa y se aprecia con cierta transparencia. El núcleo es pequeño, redondeado y su cromatina es densa (Fig. 1).

Células eosinófilas superficiales: presentan contornos irregulares; son poliédricas y aplanadas. Su citoplasma es eosinófilo pálido. Muchas veces se agrupan y sus bordes se pliegan, por lo que las células adquieren un contorno más irregular. El núcleo es pequeño y, por lo general, se encuentra en posición central. En algunas células eosinófilas puede apreciarse un núcleo picnótico. Las células superficiales también pueden presentar granulaciones en el citoplasma (Fig. 1).

Células eosinófilas cornificadas o escamas: también denominadas células anucleadas, son una variedad de células eosinófilas superficiales (Fig. 1).

Células mucosas: son cilíndricas, aunque su morfología puede variar y se pueden observar con forma piramidal o redonda. Su núcleo es redondo o triangular y ocupa la zona basal de la célula. El citoplasma se observa azul-verdoso, de aspecto espumoso, no homogéneo. Por lo general, se las encuentra dispuestas en empalizada y en número variable. También pueden estar formando grupos muy irregulares o, con menor frecuencia, pueden observarse aisladas (Fig. 1).

Eritrocitos: son elementos redondeados, carentes de núcleo y de reacción acidófila.

Leucocitos: los más frecuentes son los linfocitos y

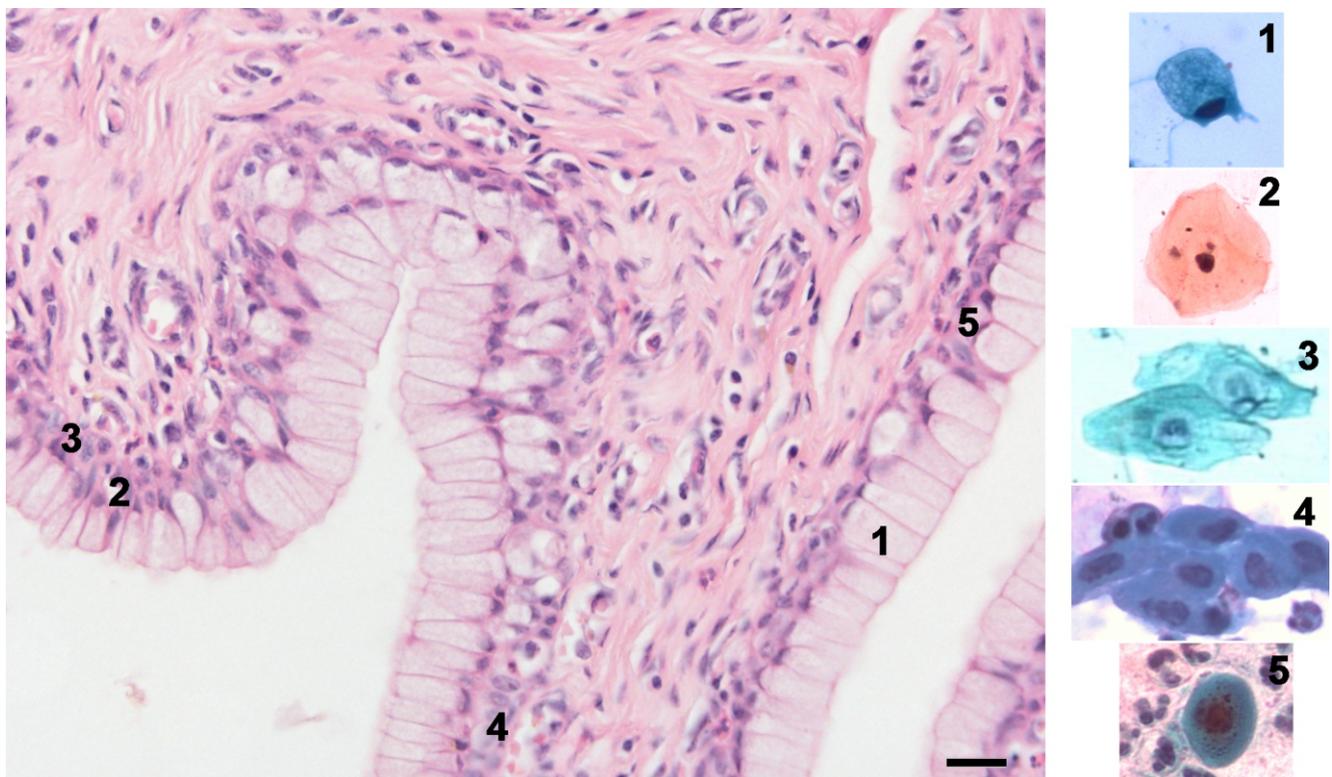


Figura 1. A la izquierda se observa un corte histológico de la vagina de una hembra preñada. Coloración H-E. Barra 20 μm . 1. Célula mucosa. 2. Célula eosinófila superficial. 3. Célula cianófila superficial. 4. Célula cianófila intermedia. 5. Célula basal.

neutrófilos. Los linfocitos se reconocen por su pequeño tamaño; son redondos y su núcleo ocupa casi la totalidad de la célula. Los neutrófilos son de forma redondeada y presentan un núcleo segmentado con varios lóbulos nucleares (Fig. 1).

Además de los tipos celulares descritos puede encontrarse mucus debido a la cantidad de células con características secretoras de mucinas, presentes en el epitelio vaginal en diferentes estadios del ciclo reproductivo.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la morfometría realizada sobre los diferentes tipos celulares hallados en el colpocitograma. Los resultados encontrados para cada tipo celular fueron similares, independientemente de la tinción utilizada. Las características del extendido exfoliativo variaron de acuerdo al estado fisiológico del ciclo reproductivo de la vizcacha.

Tipo celular	Citoplasma	Núcleo
Basales	15,79 \pm 0,53	7,79 \pm 0,48
Cianófilas intermedias	24,53 \pm 2,24	10,24 \pm 0,68
Naviculares	30,08 \pm 3,19	10,88 \pm 0,74
Cianófilas superficiales	45,30 \pm 3,31	7,31 \pm 0,26
Eosinófilas superficiales	46,49 \pm 1,71	9,25 \pm 0,64
Eosinófilas cornificadas	56,57 \pm 1,32	-
Células mucosas	22,37 \pm 0,91	6,37 \pm 0,09
Eritrocitos	6,03 \pm 0,20	-
Neutrófilos	7,40 \pm 0,18	5,75 \pm 0,31
Linfocitos	6,07 \pm 0,14	4,79 \pm 0,25

Tabla 1. Diámetro mayor de los diferentes tipos celulares hallados en los colpocitogramas. Todas las medidas están expresadas en $\mu\text{m} \pm \text{ES}$.

Hembras no preñadas en anestro

Lo más destacado en esta categoría de hembras fue la presencia de gran cantidad de leucocitos, en especial neutrófilos, y en menor cantidad linfocitos. En el extendido de las hembras que habían tenido un parto reciente se observó la presencia de eritrocitos. La pro-

porción observada entre las células cianófilas superficiales y las basales fue significativa, con predominancia de éstas últimas. Entre las células eosinófilas superficiales y cianófilas superficiales se registraron diferencias significativas, con una mayor cantidad de eosinófilas. Si bien en este estado fisiológico se observaron células

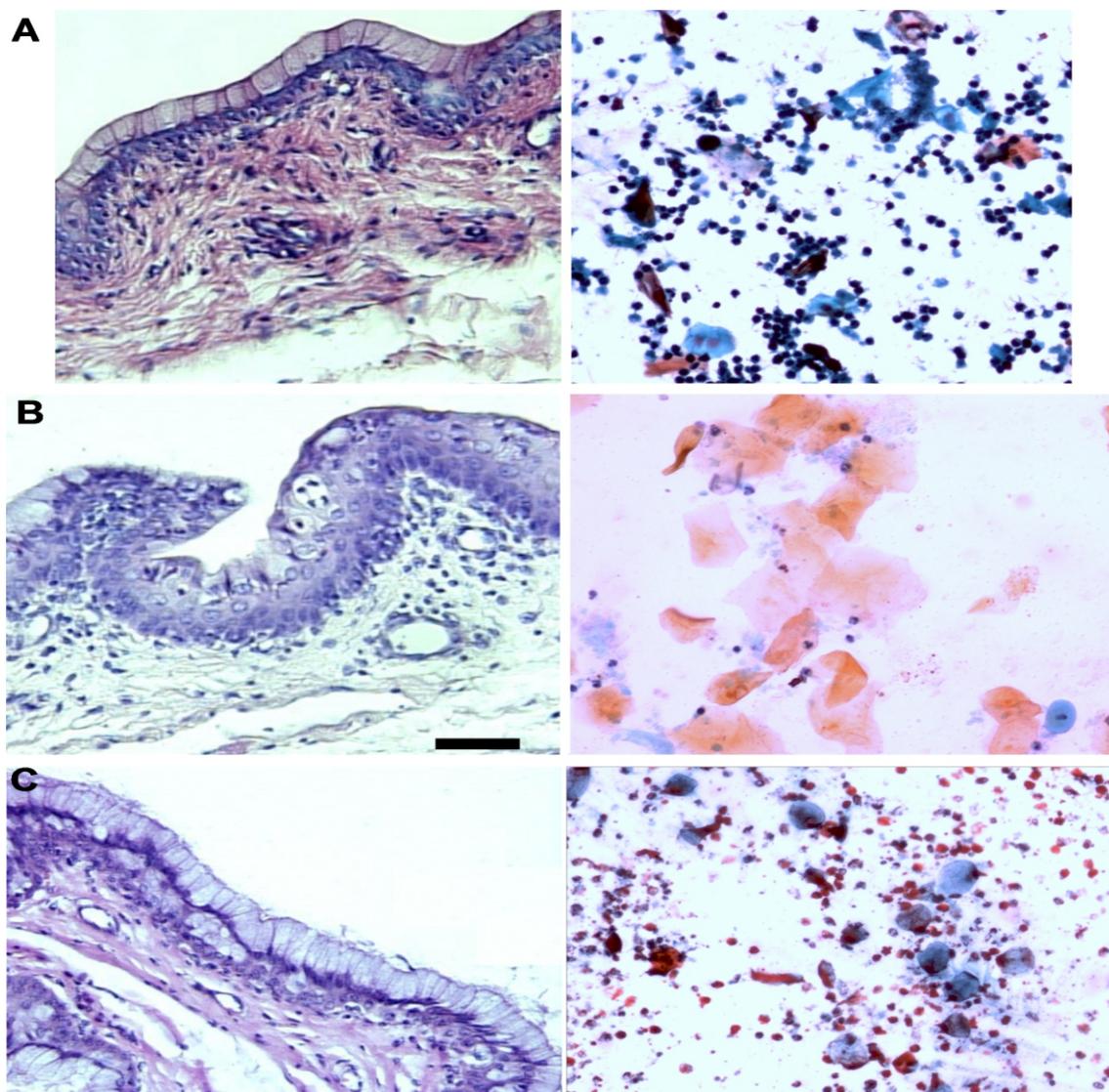


Figura 2. Aspecto histológico de la vagina en diferentes estados fisiológicos del ciclo estral. A. Corte histológico de la vagina de una hembra en anestro. Epitelio superficial con pocas capas celulares. En la capa más superficial se observan células mucosas en una sola hilera, coloración H-E. A la derecha extendido vaginal con predominio de leucocitos y células cianófilas basales e intermedias. Escasas células eosinófilas superficiales, coloración Papanicolau. B. Corte histológico de la vagina de una hembra en fase folicular, coloración H-E. A la derecha extendido vaginal con predominio de células eosinófilas superficiales, coloración Shorr. C. Corte histológico de la vagina de una hembra gestante, coloración H-E. Se observa una doble capa superficial de células mucosas. En el extendido vaginal se aprecian abundantes leucocitos y células mucosas con citoplasma coloreado de azul-verdoso, coloración Shorr. La barra corresponde a 200 μm para todos los cortes de vagina (columna izquierda). La misma barra corresponde a 100 μm para todos los extendidos (columna derecha).

mucosas en el extendido, el porcentaje de las mismas fue inferior al registrado en las hembras preñadas. Este resultado se comprobó posteriormente cuando se realizaron los estudios histológicos, en las cuales se encuentra más de una capa de este tipo celular (Fig. 2).

Hembras no preñadas en fase folicular

Esta fase se caracterizó por la predominancia de células eosinófilas superficiales, con un porcentaje significativamente superior al encontrado en los demás grupos. Por su parte, las células mucosas se hallaron en un bajo porcentaje. Cabe destacar que, en esta fase, se registró el menor porcentaje de células cianófilas profundas en comparación con el resto de los estados fisiológicos analizados. Por su parte, se detectó un número ínfimo de leucocitos en los extendidos.

Hembras Preñadas con implantaciones múltiples y con fetos avanzadas o a término

En los colpocitogramas de ambos grupos de hembras se observaron las mismas características y tipo celulares, donde el rasgo más destacable fue la

presencia de células mucosas. Las células cianófilas intermedias y basales estaban en mayor proporción en estas hembras que en aquellas en fase folicular. Si bien en menor cantidad que en las hembras en anestro, los leucocitos siempre estuvieron presentes en las hembras preñadas.

En la Tabla 2 se presentan los porcentajes de los distintos tipos celulares analizados en los extendidos vaginales de las hembras, en los diferentes estados fisiológicos del ciclo reproductivo.

DISCUSIÓN

Las hormonas femeninas tienen un rol fundamental en la regulación del ciclo sexual y en el mantenimiento de la gestación (15, 19, 25). Las mismas desencadenan los cambios que se producen sobre los diferentes epitelios de los órganos del aparato reproductor (17, 26). La citología exfoliativa es una herramienta fundamental para determinar las fases del ciclo estral en varias hembras de mamífero y son considerados un medio indirecto para conocer la función del ovario y el estado hormonal del individuo (27, 28, 29, 30, 31, 32). La

Estado fisiológico	Cianófilas basales	Cianófilas intermedias	Cianófilas superficiales	Eosinófilas superficiales	Células mucosas
Anestro (A)	37,39±6,88	21,07±2,85	6,62±1,59	31,79±7,83	3,11±0,60
Fase folicular (FF)	2,24±0,95	4,49±1,53	13,01±1,79	73,54±7,27	6,70±4,85
Preñadas múltiples (PM)	12,81±0,94	18,01±2,07	6,66±1,84	33,41±1,79	29,11±5,26
Preñadas avanzadas o a término (PAT)	15,02±3,00	17,79±8,27	4,94±0,96	33,67±3,73	28,58±5,48
Significación	A vs. FF, PM, PAT	FF vs. A, PM, PAT	NS	FF vs. A, PM, PAT	A, FF vs. PM, PAT

Tabla 2. Relación porcentual de los diferentes tipos celulares hallados en el colpocitograma de la vizcacha. Los valores están expresados en % ± ES. Valores de p <0,05 se consideran significativos. NS: no significativo.

caracterización de cada fase está determinada por la proporción de los distintos tipos celulares que se observan, tanto mediante microscopía óptica como con microscopía electrónica de barrido (33, 34, 35).

Los cambios en el epitelio de la vagina de la rata han sido ampliamente estudiados desde hace muchos años. Diversos autores (18, 23, 36, 37), demostraron que la colpocitología puede ser un excelente método para la identificación de los diferentes tipos celulares presentes en los extendidos vaginales. De esta manera, se puede establecer en qué momento del ciclo reproductivo se encuentra la hembra y el efecto que ejerce la estimulación estrogénica sobre el epitelio vaginal (18). En esta especie, la presencia de un 100% de células eosinófilas cornificadas es un indicio de un elevado estímulo estrogénico y de que la hembra se encuentra en estro (19, 38).

La duración del ciclo estral y las características citológicas de cada fase del mismo han sido estudiadas en hembras adultas y púberes de coipo, un roedor que pertenece al mismo suborden que la vizcacha (39). La evaluación de los extendidos vaginales permitió establecer algunas diferencias con los colpocitogramas de otras especies. En el coipo, las células eosinófilas superficiales nunca superan el 60% del total durante el estro. Otra característica relevante la constituyen los leucocitos, que no desaparecen por completo en las fases de proestro y estro como ocurre en la rata (39).

Felipe *et al.* (31) también caracterizaron el ciclo estral del coipo utilizando citología exfoliativa. Los datos aportados coinciden en algunos aspectos con las observaciones realizadas por Silva *et al.* (39). Sin embargo, el índice de la cornificación celular observado por el primer grupo fue más alto, llegando a un 94,2% en el estro. Asimismo, el índice eosinofílico también fue más elevado en la misma etapa del ciclo. Los autores

consideran que estos parámetros son buenos indicadores del estro. Sin embargo, el índice picnótico fue mayor durante el proestro y metaestro que en el estro, contrariamente a lo que sucede en otros roedores (31), por lo que no puede emplearse como indicador de este último período. En los extendidos vaginales de la vizcacha examinados durante la fase folicular, el porcentaje de células eosinófilas superficiales fue significativamente más elevado que en las otras etapas. Al igual que en el coipo, las células cornificadas de la vizcacha no alcanzan al 100% de las presentes durante el estro. No obstante, de acuerdo con Felipe *et al.* (31), un porcentaje cercano al 75% sería suficiente para determinar un estro cercano.

Bekyürek *et al.* (13), estudiaron extendidos vaginales en chinchillas (*Chinchilla lanígera*) en anestro, proestro, estro, metaestro y durante la gestación. Las chinchillas, al igual que la vizcacha pertenecen a la familia Chinchillidae. Durante el proestro notaron un incremento del número de células superficiales, mientras que el resto de los tipos celulares fueron disminuyendo, inclusive hasta su desaparición. Esto concuerda con lo observado en la vizcacha, ya que en éstos animales se contabilizó una mayor cantidad de células superficiales en la fase folicular. Sin embargo, en la chinchilla solamente se hallaron células mucosas durante el proestro y no se observaron en las hembras gestantes, a diferencia de lo que ocurre en la vizcacha.

En algunos hystricomorpha como en el cobayo (40) y la chinchilla (13), pero no en el coipo (41), se observaron células mucosas durante el anestro, la fase folicular y en mayor cantidad durante la gestación. Estos datos coinciden con lo hallado en las vizcachas en el presente trabajo. Estas células evidenciarían la transformación mucosa de los estratos superficiales del epitelio observada en los cortes histológicos de vagina (14). Las

células mucosas observadas en los colpocitogramas de la vizcacha podrían utilizarse como método para el diagnóstico de preñez, ya que su número se incrementa durante la gestación y son fácilmente reconocibles en los extendidos con las dos técnicas de coloración utilizadas.

En los colpocitogramas de la vizcacha se encontraron leucocitos en todos los estados fisiológicos, aunque fueron más abundantes durante el anestro y la preñez. Esta observación coincide con lo descrito para otros hystricomorpha como el coipo, en el que se hallaron leucocitos, no sólo durante la etapa luteal sino también durante la fase folicular (31, 33) y en el puercoespín de cola de pincel (*Atherurus africanus*) (26).

El presente estudio demuestra que el colpocitograma es una práctica sencilla y rápida que puede ser utilizada en la vizcacha para diagnóstico de preñez debido a la presencia de un alto porcentaje de células mucosas. Si bien los leucocitos estuvieron presentes en todos los extendidos, el porcentaje de células eosinófilas superficiales podría ser tomado como un indicador para la detección del inicio del estro.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Estación de Cría de Animales Silvestres (ECAS) dependiente del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires por proporcionar los animales para este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Llanos A, Crespo J (1952) Ecología de la vizcacha (*Lagostomus maximus maximus* Blainville) en el nordeste de la provincia de Entre Ríos. Revista de Investigaciones Agrícolas VI: 289-378.
2. Woods CHA (1998) Mammal species on the world: A taxonomic and geographic reference. 2th ed. Washington DC USA. Disponible en: <http://nmmhgoph.si.edu/msw/about.html>
3. Weir BJ (1971a) The plains viscacha as a laboratory animal. Proceedings of the Physiological Society. 2P-4P.
4. Weir BJ (1971b) The reproductive physiology of the plains viscacha, *Lagostomus maximus*. J Reprod Fertil 25: 355-363.
5. Weir BJ (1971c) The reproductive organs of the female plains viscacha, *Lagostomus maximus*. J Reprod Fertil 25: 365-373.
6. Weir BJ, Rowlands I (1974) The functional anatomy of the hystricomorph ovary. Sym Zool Soc Lond 34: 303-332.
7. Flamini MA, Barbeito CG, Gimeno EJ, Portiansky EL (2002) Morphological characterization of the female prostate (Skene's gland or paraurethral gland) of *Lagostomus maximus maximus*. Ann Anat 184: 341-345.
8. Flamini MA, Barbeito CG, Gimeno EJ, Portiansky EL (2009) Histology, histochemistry and morphometry of the ovary of the adult plains viscacha (*Lagostomus maximus*) in different reproductive stages. Acta Zool (Stockholm) 90: 390-400.
9. Flamini MA (2005) Estudio anatómico e histológico del aparato reproductor de la vizcacha de llanura hembra (*Lagostomus maximus*). Tesis doctoral. 180 páginas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.
10. Kelly GL, Papanicolaou GN (1925) The mechanism of the periodical opening and closing of the vaginal orifice in the guinea pig. Am J Anat 2: 387-411.
11. Weir BJ (1974) The tuco tuco and plains viscacha. Sym Zool Soc Lond 34: 113-130.
12. Addo PG, Awumbila B, Awotwi E, Ankrah N-A (2007) Comparative characterization of the oestrous cycles of the grasscutter (*Thryonomys swinderianus*) and the guinea pig (*Cavia porcellus*) by the hystricomorph vaginal membrane perforation phenomenon. Livestock Research for Rural Development 19: e-63.
13. Bekyürek T, Liman N, Bayram G (2001) Diagnosis of sexual cycle by means of vaginal smear method in the Chinchilla (*Chinchilla lanígera*). Lab Anim 36: 51-60.
14. Flamini MA, Díaz AO, Barbeito CG, Portiansky EL (2012) Morphology, morphometry, histochemistry and lectin histochemistry of the vagina of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*). Biotech Histochem 87: 81-94.
15. Hafez ESE (1970) Female reproductive organs. En: Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals, Hafez ESE (ed). Editorial Lea and Febiger. Philadelphia, pp. 74-106.
16. Baker R, Lumsden JH (2000) Color Atlas of Cytology of the Dog and Cat. Ed. Mosby, inc. St. Louis.
17. Westwood FR (2008) The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. Toxicol Pathol 36: 375-384.
18. Montes GS, Alonso CR, Hutter JC, Montoro LS (1978) Determinación colpocitológica de la secreción estrogénica durante el proestro en la rata albina Wistar. Rev Med Vet (Bs. As.) 59: 113-117.
19. Montes GS, Luque EH (1988) Effects of ovarian steroids on vaginal smears in therat. Acta Anat 133: 192-199.
20. Bennet JP, Vickery BH (1970) Rats and Mice. En: Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals, Hafez ESE (ed) Editorial Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 299-315.

21. Phoenix C (1970) Guinea Pig. En: *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*, Hafez ESE (ed) Editorial Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 244-257.
22. Magalhanes H (1970) Hamster. En: *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*, Hafez ESE (ed) Editorial Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 258-272.
23. Thrall MA, Olson PN (1999) The vagina. En: *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*. 2th ed, Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH (eds) Editorial Mosby, inc. St. Louis, pp. 240-248.
24. Lencioni J (1962) El colpocitograma. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
25. Buchanan DL, Kurita T, Taylor JA, Lubahan DB, Cunha GR, Cooke PS (1998) Role of stromal and epithelial estrogen receptors in vaginal epithelial proliferation, stratification and cornification. *Endocrinology* 139: 4345-4352.
26. Mayor P, López Bejar M, Jori F, Fenech M, López-Gatius (2003) Reproductive functional anatomy and oestrous cycle pattern of the female brush-tailed porcupine (*Atherurus africanus*, Gray 1842) from Gabon. *Anim Reprod Sci* 77: 247-259.
27. Long JA, Evans HM (1922) The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memories of University of California* 6: 1-148.
28. Selle RM (1922) Changes in the vaginal epithelium of the guinea pig during the oestrous cycle. *Am J Anat* 30: 429-449.
29. Vrčibč H, Horvat B, Danjanov I (1991). Lectin histochemistry of mouse vagina during the oestrous. *J Histochem Cytochem* 39: 1685-1692.
30. Felipe AE, Castro A, Callejas SS, Cabodevila JA (2000). Morphological study of the vagina of the *Myocastor coypus* (Coypo). *Rev Chil Anat* 18: 231-235.
31. Felipe AE, Cabodevila JA, Callejas SS (2001) Characterization of the oestrous cycle of the *Myocastor coypus* (coypo) by means of exfoliative colpocytology. *J Neotrop Mammal* 8: 129-137.
32. Gonçalves dos Reis AC (2009) Estudio colpocitológico e aspectos endocrinos de pacas (*Agouti paca*, L.1766) adultas. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Dissertação (mestrado) pp 1-75.
33. Centola GM (1978) Surface features of exfoliated vaginal epithelial cells during the oestrous cycle of the rat examined by scanning electron microscopy. *J Anat* 127: 553-561.
34. Stenson GB (1988) Oestrus and de vaginal smear cycle of the river otter, *Lutra canadensis*. *J Reprod Fertil* 83:605-610.
35. Guimarães DA, Garcia SC, Le Pendu Y, Albuquerque I (2011) Determinação do ciclo estral em catetos Pecaritajacu: aspectos colpocitológicos e clínicos. *Acta Amaz* 41: 583-588.
36. Rubenstein BB (1937) The relation of cyclic changes in human vaginal smears to body temperatures and basal metabolic rates. *Am J Physiol* 119: 635-641.
37. Santos AC, Viana DC, Bertassoli BM, Oliveira GB, Oliveira DM, Bezerra FVF, Oliveira MF, Assis-Neto AC (2015). Characterization of the oestrous cycle in *Galea spixii* (Wagler, 1831). *Pesq Vet Bras* 35: 89-94.
38. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP (2002) Determination of the oestrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62 (4A): 609-614.
39. Silva LB, Alonso CR, Idiart JR (1997) Colpocitología exfoliativa en el coipo (*Myocastor coypus*). *Rev Vet Argent* XIV: 18-24.
40. Deanesly R (1966) Pro-oestrus in the guinea-pig: hormonal stimulation of the vaginal epithelium. *J Reprod Fertil* 12: 205-212.
41. Felipe AE, Bianchi CP (2009) Characterization of cellular types during the oestrous cycle of the *Myocastor coypus* (COYPU). *Scientifur* 33: 49-53.