

**ESTUDIO SOBRE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE
LA MUCOSA OVIDUCTAL Y EL MESOTELIO PERITONEAL
DE LA VACA**

Je. Yániz Pérez de Albéniz

(043) "2000" YAN

1600201180+



Universitat de Lleida
Registre General

15 DES. 1999

B: 5505

S:



Universitat de Lleida

Estudio sobre la estructura y función de la
mucosa oviductal y el mesotelio peritoneal de
la vaca



Memoria de Tesis presentada para la obtención del título de Doctor

por

Jesús Yániz Pérez de Albéniz

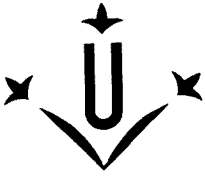
1884-38160

0159-63460

© Jesús Yániz Pérez de Albéniz

ISBN: 84-699-1848-6

Dep. Legal: HU-21-2000



Universitat de Lleida
Departament de Producció Animal

Av. Alcalde Rovira Roure, 177
25198 LLEIDA
Tl. 973-702500
FAX 973-238264

Dr. FERNANDO LÓPEZ GATIUS, Catedrático de Escuela Universitaria en el Departamento de Producción Animal de la Universitat de Lleida, y la **Dra. PILAR SANTOLARIA BLASCO**, Profesora Titular de Escuela Universitaria del Departamento de Producción Animal de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN

Que la Tesis Doctoral "Estudio sobre la estructura y función de la mucosa oviductal y el mesotelio peritoneal de la vaca" ha sido realizada en el Departamento de Producción Animal de la Universitat de Lleida bajo su dirección, y que **JESÚS YÁNIZ PÉREZ DE ALBÉNIZ** reúne todos los requisitos necesarios para optar al grado de doctor.

Lleida, 20 de noviembre de 1999

Fdo. Fernando López Gatus

Fdo. Pilar Santolaria Blasco

El presente trabajo de Tesis se ha realizado en el Departamento de Producción Animal y el Servicio de Microscopia Electrónica de la Universitat de Lleida y ha sido financiado por la misma Universidad con el Proyecto Pre-Competitivo 0812 y por el Convenio entre la Universidad y la empresa privada C0103, gestionado por el Centre de Transferència de Tecnologia de la Universitat de Lleida.

El autor ha recibido una Beca Predoctoral para la Formación de Investigadores del Comissionat per a universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya (Referencia FI-PG/97-00657) durante la realización de su trabajo de Tesis.

**A mis padres, por haberme dado la vida
en dos ocasiones**

A mi hermana

Escucha, Sancho, cómo se oyen cada vez mas cerca los ladridos de los perros en la oscuridad de la noche. Eso significa que nos estamos moviendo.

Escucha, Sancho, como los ladridos de los perros se oyen cada vez mas lejos en la oscuridad de la noche. Eso significa que estamos avanzando.

“El Quijote”
Miguel de Cervantes, 1616

ÍNDICE

Abreviaturas, unidades y adjetivos

Capítulo 1: Introducción y objetivos de estudio.....	1
Capítulo 2: Revisión bibliográfica.....	7
Capítulo 3: Objetivos.....	89
Capítulo 4: Study of the functional anatomy of the bovine oviductal mucosa.....	93
Capítulo 5: A scanning electron microscopy study of the peritoneal mesothelium covering the genital area in the cow.....	125
Capítulo 6: Intraperitoneal insemination and retrograde sperm transport of spermatozoa in dairy cows.....	147
Capítulo 7: Discusión general.....	163
Capítulo 8: Conclusiones.....	179
Capítulo 9: Perspectivas.....	183
Resum-Resumen-Summary.....	187
Agradecimientos.....	201
Curriculum vitae.....	205

Abreviaturas, Unidades y Adjetivos

AI	Artificial insemination
AIJ	Ampullary-isthmic junction
DIPI	Direct peritoneal insemination
EGF	Epidermal growth factor
GAG	Glucosaminoglucano
GIFT	Gamete intra-Fallopian transfer
HCG	Human chorionic gonadotrophin
IGF	Insuline growth factor
im	Intramuscular
No	Number
PBS	Phosphate buffered saline
POST	Peritoneal oocyte and sperm transfer
SEM	Scanning electron microscopy
TEM	Transmission electron microscopy
TUJ	Tubouterine-junction
UAI	Unión ámpulo-istmica
UUT	Unión útero-tubarica
mm	milímetro (10^{-3} m)
μ m	micra/s (10^{-6} m)
nm	namómetro (10^{-9} m)
Craneal	extremo ovárico del oviducto.
Caudal	extremo uterino del oviducto

CAPÍTULO 1

Introducción
Y
objetivos de estudio



1 **Introducción y objetivos de estudio**

La inseminación artificial es la técnica aplicada a la reproducción con mayor repercusión económica de cuantas se han puesto en práctica en ganado vacuno (Foote, 1996). A pesar del notable éxito conseguido, los estudios que amplían el conocimiento sobre la fisiología espermática en el aparato genital de la hembra siguen contribuyendo a mejorar la eficacia de la inseminación. Esta es la idea general sobre la que se ha desarrollado este trabajo.

El conocimiento de la anatomía y fisiología del tracto genital femenino es fundamental para comprender los mecanismos de transporte espermático. A pesar de ello, la fisiología del tracto genital femenino se ha estudiado con menos amplitud que la fisiología del espermatozoide, siendo un área de la biología de la reproducción en la que actualmente se está realizando escasa investigación (Drobnis y Overstreet, 1992). Por tanto, se planteó como objetivo general de esta tesis la realización de un estudio morfológico de la mucosa oviductal y mesotelio peritoneal en la vaca, estructuras directamente implicadas en el transporte espermático tras la inseminación intrauterina e intraperitoneal, respectivamente. Para ello se hizo en primer lugar una revisión bibliográfica que nos permitió analizar la situación actual del problema y plantear una serie de objetivos concretos de estudio.

En los últimos años se han descrito de forma detallada aspectos sobre la anatomía y fisiología de la región caudal del istmo, considerada como la zona de reservorio espermático funcional más importante (Hunter et al., 1991; Wrobel et al., 1993;

Lefebvre et al., 1997). Sin embargo, los restantes tramos o segmentos del oviducto no se conocen con tanta profundidad, a pesar de su importancia en el transporte de gametos, fecundación y desarrollo embrionario temprano. Por consiguiente, nos planteamos como primer objetivo **estudiar la anatomía funcional de la mucosa oviductal de la vaca a lo largo del ciclo sexual y evaluar las implicaciones en el transporte de los gametos**

Dado que la cavidad peritoneal es el destino de parte de los espermatozoides que alcanzan la región oviductal, bien tras la monta natural o la inseminación, y que la inseminación intraperitoneal ha resultado en gestaciones a término (Hunter, 1988), nos planteamos como segundo objetivo **desarrollar un estudio mediante microscopía electrónica de barrido sobre la morfología de la superficie serosa que recubre el tracto genital de la vaca y ligamentos asociados, y evaluar las posibles implicaciones en el transporte de espermatozoides tras la inseminación intraperitoneal.**

Finalmente, conociendo la capacidad del oviducto para captar pequeñas partículas de la cavidad peritoneal y transportarlas hasta el útero y la capacidad del útero para eliminar espermatozoides hacia la vagina tras la inseminación, planteamos como último objetivo **estudiar el efecto de la vitalidad y concentración espermática sobre el transporte retrógrado de los espermatozoides tras la inseminación intraperitoneal.**

Para el cumplimiento de estos objetivos se realizó una revisión bibliográfica, resumida en el capítulo 2, y tres estudios, desarrollados en los capítulos 3, 4 y 5. La **revisión bibliográfica** se ha centrado en la anatomía y fisiología del oviducto y mesotelio peritoneal de la vaca y sus implicaciones en el transporte de espermatozoides. También se han considerado las técnicas asociadas a la deposición de gametos en la cavidad peritoneal. En el **primer estudio** realizamos una descripción de la anatomía funcional de la mucosa oviductal de la vaca a lo largo del ciclo sexual. En el **segundo estudio** describimos la morfología de la

superficie serosa que recubre el tracto genital de la vaca y ligamentos asociados. Por último, analizamos el flujo retrógrado de espermatozoides tras la inseminación intraperitoneal en el tercer estudio.

Bibliografía:

1. Drobnis, E.Z., and J.W. Overstreet 1992 Natural history of mammalian spermatozoa in the female reproductive tract. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 14:1-45.
2. Foote, R.H. 1996. Review: dairy cattle reproductive physiology research and management. Past progress and future prospects. *J. Dairy Sci.* 79:980-990.
3. Hunter, R.H.F. 1988. The fallopian tubes. Their role in fertility and infertility. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
4. Hunter, R.H.F., B. Flechon, and J.E. Flechon 1991. Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: a scanning electron microscope study. *Tissue and cell*, 23:641-656.
5. Lefebvre, R., M.C. Lo, and S.S. Suarez 1997. Bovine Sperm Binding to Oviductal Epithelium Involves Fucose Recognition. *Biol. Reprod.* 56:1198-1204.
6. Wrobel, K.H., R. Kujat, and G. Fehle 1993. The bovine tubouterine junction: general organization and surface morphology. *Cell Tissue Res*, 271:227-239.



CAPÍTULO 2

Revisión Bibliográfica

2

Revisión Bibliográfica

ÍNDICE:

A) Aspectos históricos relacionados con el oviducto-----	11
B) Anatomía y fisiología oviductal e implicaciones en el transporte de gametos. -----	17
B.1. - Anatomía del oviducto en la vaca -----	17
B. 1.1. - Anatomía macroscópica -----	17
<i>Topografía</i> -----	18
<i>Morfometría</i> -----	21
B.1.2. - Anatomía microscópica -----	21
<i>Serosa</i> -----	21
<i>Muscular</i> -----	22
<i>Mucosa</i> -----	23
B.2. Fisiología oviductal-----	27
B.2.1. La motricidad oviductal e implicaciones en el transporte de los gametos -----	27
B.2.2. El líquido del oviducto e implicaciones en el transporte de los gametos. -----	30
<i>Composición del líquido oviductal</i> -----	30
<i>Producción y acumulación del líquido del oviducto durante el ciclo sexual</i> --	31
<i>Regulación de la formación del líquido oviductal</i> -----	32
<i>Dirección del flujo del líquido oviductal</i> -----	32
B.3. Transporte de gametos en el tracto genital-----	33
B.3.1. Transporte del ovocito -----	33
B.3.2. Transporte de los espermatozoides-----	35
<i>Transporte hacia el oviducto</i> -----	35
<i>Almacenamiento y liberación de los espermatozoides</i> -----	36
<i>Selección espermática en el tracto reproductor femenino</i> -----	43
<i>Capacitación espermática</i> -----	46
<i>Vida útil de los espermatozoides en el oviducto</i> -----	47

C) Anatomía y fisiología del peritoneo	47
C.1.- Anatomía	47
<i>Morfometría y variaciones regionales</i>	49
C.2. Fisiología	49
C.2.1 Funciones de las células mesoteliales	49
C.2.2.- Líquido peritoneal y su efecto sobre los espermatozoides.	50
<i>Composición</i>	50
<i>Origen del líquido peritoneal</i>	51
<i>Importancia del líquido peritoneal sobre la fisiología espermática</i>	52
D) Técnicas asociadas a la deposición de gametos en la cavidad peritoneal	53
D.1.- Inseminación intraperitoneal	53
D.1.1.- Espermatozoides	54
<i>Número de espermatozoides.</i>	54
<i>Volumen de la dosis seminal</i>	56
<i>El medio de dilución de los espermatozoides y tratamientos</i>	56
<i>Capacitación espermática tras la inseminación intraperitoneal</i>	56
<i>Efecto del medio peritoneal sobre los espermatozoides</i>	58
<i>Vida útil de los espermatozoides tras la inseminación intraperitoneal.</i>	58
D.1.2.- Momento de inseminación	59
D.1.3.- Lugar de deposición	61
D.1.4.- Transporte de los espermatozoides tras la inseminación intraperitoneal	61
D.1.5.- Riesgo de infecciones, adherencias e inmunización espermática	63
D.1.6 - Resultados de la inseminación intraperitoneal en diferentes especies	64
D.2.- Inseminación intraoviductal	67
D.3.- Deposition intraperitoneal de ovocitos y espermatozoides	69
E) Conclusiones	69
F) Bibliografía	70

A) ASPECTOS HISTORICOS RELACIONADOS CON EL OVIDUCTO

La evolución de los conocimientos sobre la anatomía y fisiología del oviducto de los mamíferos ha estado estrechamente ligada a los descubrimientos realizados sobre la fisiología de la reproducción en la hembra. Así, en el caso de Aristóteles (384-322 a de C), que proponía que el embrión se formaba al mezclarse el semen del macho con la sangre uterina o fluidos menstruales, producidos a su vez en el útero y considerados semen femenino, concedió en definitiva poca importancia a los oviductos, de los que solamente describió las circunvoluciones (Aristóteles, 1994).

Herophilus de Chalcedon (siglo III a. de C) dejó de considerar el útero como análogo a los testículos y relacionó los “testiculi foeminis” u ovarios con la producción del semen femenino (Hunter, 1988). También comparó el epidídimo y vasos deferentes del macho con el oviducto de la hembra. Se refirió a ellos como los “ductus deferens” femeninos, situados lateralmente a los ovarios. Ello le llevó a pensar que los oviductos transmitían semen desde los ovarios a la vejiga de la orina, al igual que ocurría con los vasos deferentes masculinos (Bodemer, 1969). Esta idea fue recogida y perpetuada por Soranus de Ephesus (siglo II d. de C) en su tratado clásico de ginecología. La supuesta pérdida del semen femenino en la vejiga hizo suponer a Soranus que no guardaba relación con la generación.

Galeno (130-200 d. de C) fue el primer gran patólogo que usó la experimentación y probablemente el último gran pensador y escritor de la antigüedad. Basándose en estudios sobre animales domésticos con útero bicorne, describió los oviductos terminando en los ápices uterinos, en lugar de la vejiga (Bodemer, 1969). No obstante, seguía creyendo que los oviductos eran análogos a los conductos seminales del macho, cuya función era transportar el “semen femenino” hasta el útero, donde confluiría con el semen masculino y se formaría el embrión.

La consideración de que los oviductos eran estructuras análogas a los conductos seminales masculinos permaneció vigente casi catorce siglos después de Galeno.

En 1543, Andreas Vesalius publicó “De humani corporis fabrica”, en el que, además de la línea continuista respecto a las ideas precedentes, parece que confundió el ligamento propio del ovario con un conducto deferente que transportaría el semen femenino desde el ovario hasta el útero. A pesar de ello, sus estudios sirvieron de base para que un discípulo suyo, Gabriel Fallopius (1523-1562), realizara la primera descripción morfológica exacta del órgano que ahora lleva su nombre. En su libro “Observationes anatomicae” (1561) (en Fallopii, 1973), en el que parece intentar corregir errores o presentar nueva información no descrita por su predecesor, escribe:

“El conducto seminífero (meatus seminiferus) tiene su origen en los cuernos uterinos; es fino, muy estrecho, de color blanco y tiene el aspecto de un nervio. Tras una pequeña distancia comienza a ensancharse y a enrollarse como el pámpano de una vid hasta cerca del final, donde se despliega, y termina en un extremo amplio que, debido a su color rojo, aparece membranoso y fresco. Este extremo está algo hecho jirones y raído, como si fuera el fleco de una pieza de ropa desgastada, y tiene una abertura amplia que siempre se encuentra cerrada por la aposición de estos flecos. Sin embargo, si se abren cuidadosamente y se separan forman, como si fueran la boca acampanada de una trompeta de bronce. Debido a la semejanza del conducto seminal, desde su origen hasta su extremo, que me recuerda la forma de este instrumento clásico, eliminando o no las sinuosidades, lo denomino la tuba uteri (trompeta del útero). Presentan esta disposición en todos los animales, no sólo en el hombre, sino también en ovejas y vacas, y en todos los demás animales que he diseccionado.”

Fallopius describió la existencia y características anatómicas del oviducto, pero su trabajo no supuso un avance importante respecto al conocimiento fisiológico contemporáneo.

En el inicio de un cambio de mentalidad hay que citar a Fabricius (1537-1619), cuyos estudios más destacados en la materia los realizó en gallinas. Acuñó el término “ovarium” para la estructura donde se originaban los huevos, que eran recogidos por el oviducto y recubiertos con varias capas. De esta manera introdujo también la idea de la actividad secretora del oviducto. El establecimiento de una homología entre el ovario de las aves y de los mamíferos llegaría de la mano Johannis van Horne (1668) y sus discípulos, especialmente de Graaf, 1671, 1672 (en Bodemer, 1969). Este último describió los folículos terciarios en el ovario de los mamíferos, que posteriormente tomarían su nombre. Consideró el folículo como el huevo de los mamíferos y observó su desaparición tras la cópula en la coneja, seguido de la aparición de blastocistos en el útero, pocos días después. El nombre de De Graaf se encuentra indefectiblemente unido al de los folículos ováricos. Sin embargo, hay autores (Ankum *et al.*, 1996) que consideran que su mayor contribución la realizó en la fisiología del oviducto (fig 1). De hecho, probablemente fue el primero en comprender la verdadera función del oviducto, reconoció algunas situaciones patológicas como el hidrosalpinx y la gestación ectópica. Sin embargo, tras él permaneció la duda de cómo era posible el paso de los folículos por un diámetro tan reducido como el del oviducto.

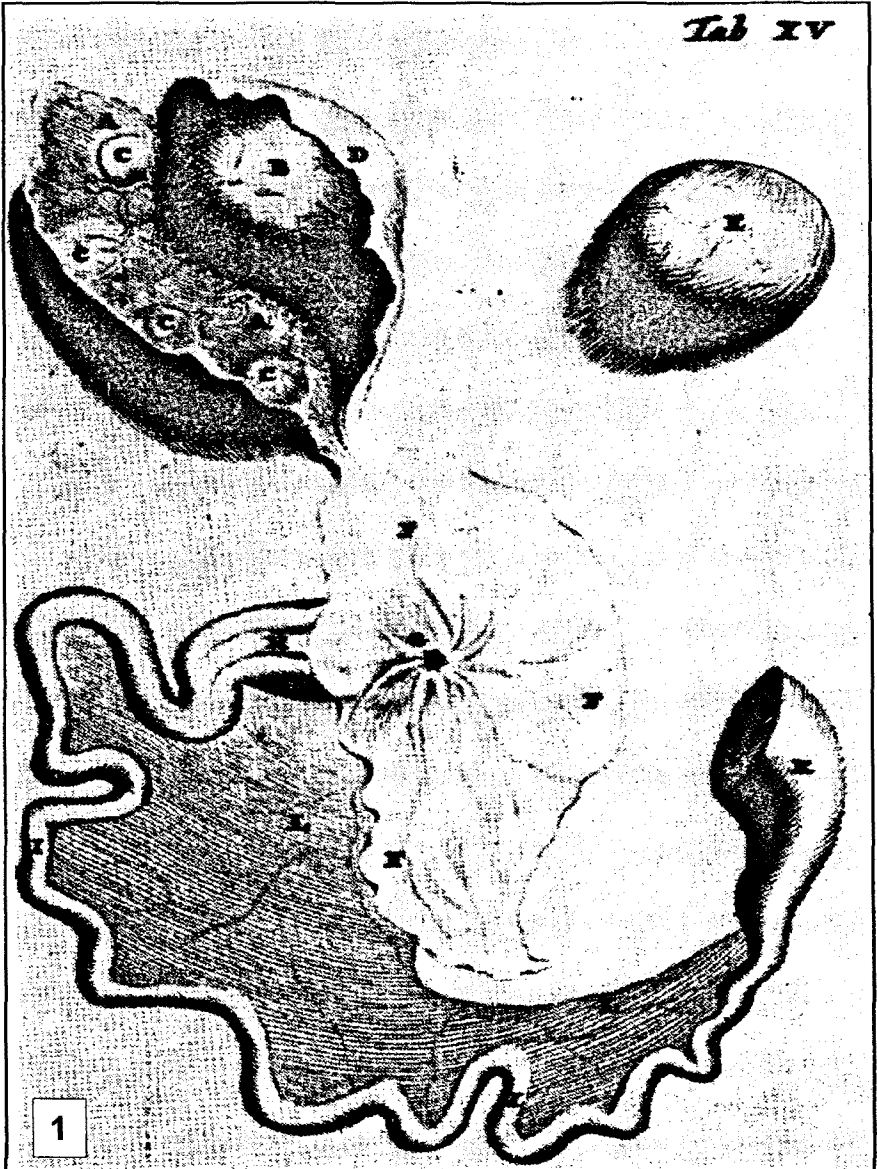
Los pensadores de finales del siglo XVII creían que el ovocito de los mamíferos ya estaba fecundado en el ovario y que embrión era recogido y transportado hasta el útero por el oviducto. El descubrimiento de los espermatozoides a finales del siglo XVII (Leeuwenhoek, 1679, en Ford, 1989), no hizo sino aumentar la confusión, estableciéndose una disputa entre los que atribuían a los ovocitos o a los espermatozoides el papel principal en la formación del embrión. Hasta 1824 no se demuestra experimentalmente que la generación requiere el contacto entre el ovocito y el fluido seminal (Prévost y Dumas, 1824, en Bodemer, 1969). Además sostienen la idea de que la fecundación sucede en el oviducto (Dumas 1827, en Bodemer, 1969). Ese mismo año, von Baer descubrió el verdadero ovocito de mamíferos, eliminando la confusión existente entre ovocito y folículo. Este descubrimiento aumentó el énfasis en el estudio de las funciones del

oviducto. Se describieron cambios macroscópicos entre diferentes fases del ciclo sexual y durante la gestación. En 1834 Purkinge y Valentín descubrieron la presencia de cilios en la superficie interna del oviducto, capaces de mover pequeñas partículas. A ellos se atribuyó la captación y el transporte de ovocitos. También se concedió importancia a la actividad secretora del oviducto. En 1854 Birchhoff dedujo que el espermatozoide se introduce en el ovocito durante la fecundación. Todo ello hizo que hacia la mitad del siglo XIX el conocimiento del oviducto de los mamíferos caminara cada vez más próximo a la realidad. Se conocía la estructura general y los posibles mecanismos de transporte del ovocito; se reconocía al oviducto como el lugar de fecundación y desarrollo embrionario temprano y se sospechaba su papel secretor. Las teorías especulativas e infundadas comenzaban por fin a declinar. Sin embargo, no se desarrolla la teoría de la fecundación hasta 1885, por Oscar Hertwig (Giordan *et al.*, 1987).

A partir de ese momento, la experimentación apoyada en importantes avances tecnológicos ha permitido ampliar los conocimientos a niveles ultraestructurales y moleculares. Recientemente han surgido nuevas interpretaciones fisiológicas del oviducto, considerado como un filtro que disminuye el número de espermatozoides que alcanzan la ampolla (Kann y Fouquet, 1977) o como un lugar de almacenamiento de los espermatozoides previo a la ovulación (Hunter-Wilmot, 1984; Larsson y Larsson, 1986; Hunter *et al.*, 1991). Tal como sucedió con anterioridad, estos descubrimientos han impulsado nuevos estudios sobre la anatomía y fisiología oviductal y entre los que intentamos situar esta tesis.

Figura 1.- Tabula Decima-Quinta: Exhibet Testiculum five Ovarium Vaccinum apertum, prout illud ante coitum observari solet ("De Mulierum organis generationi inservientibus", De Graaf, 1672)

AA. Testiculus secundum longitudinem apertus; B. Ovum maximum seu maturum in Testiculo adhuc contentum; CC. Ova minora seu immatura in Testiculo haerentia; DD. Membrana Testicularum Dartos appellata; E. Ovum maximum è Testiculo exemptum; F. Tubae Fallopianae membranosa expansio; G. Foramen coartatum in Tubae extremitate existens; H. Tubae Fallopianae extremitas; II. Tubae pars reliqua; K. Cornu uterini pars abscissa; L. Tubae ligamentum in hominibus aliis vesperilionum afsimilatum



B) ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA OVIDUCTAL E IMPLICACIONES EN EL TRANSPORTE DE GAMETOS.

B.1. - ANATOMÍA DEL OVIDUCTO EN LA VACA

B. 1.1. - ANATOMÍA MACROSCÓPICA

El oviducto es una estructura tubular enrollada que deriva del conducto paramesonéfrico, o conducto de Müller. El número de circunvoluciones varía con las especies. En algunas como la coneja es completamente recto, mientras que en otras, como la cerda, está intensamente enrollado. El oviducto de la vaca tiene un grado de enrollamiento intermedio. El número de circunvoluciones depende en gran medida de la longitud del oviducto (Hunter, 1988).

Atendiendo a criterios de anatomía macroscópica, el oviducto suele dividirse en cuatro segmentos (fig. 2): el primer segmento adyacente al útero es el **istmo**, con una pared gruesa y muscular, y cuya mucosa forma pliegues más bajos; la **ampolla** porción ancha, con una pared fina y abundantes pliegues mucosos en la luz; el **infundíbulo**, abertura abdominal en forma de embudo cerca del ovario cuyo borde libre posee unas proyecciones irregulares que forman las **fimbrias**. Las fimbrias se encuentran libres excepto en el polo superior del ovario donde una de las fimbrias, la fimbria ovárica, está unida al ovario, asegurándose así una aproximación a la superficie ovárica. Es posible que esta unión sea esencial para la captación normal del ovocito. Algunos autores (Nilsson y Reinius, 1969) proponen reclasificar las porciones del oviducto en 4 segmentos basados en criterios anatómicos y fisiológicos: **preampolla** que incluye fimbrias e infundíbulo, **ampolla**, **istmo** y **unión útero-tubárica**. Según los autores esta clasificación es particularmente útil para describir la morfología y función en diferentes especies; sin embargo Dickey y Hill (1974) sugieren que esos criterios no son aplicables al oviducto de la vaca.

Wrobel *et al.*, 1993 consideraron la unión útero-tubárica de la vaca dividida en tres partes: segmento oviductal terminal, zona de transición propiamente dicha y ápice del cuerno uterino. El ligamento infundíbulo-cornual, que contiene musculatura lisa longitudinal, se une principalmente al borde antimesosalpígeo oviductal.

El oviducto cubre al ovario más o menos extensamente. Así, en la cerda lo cubre por completo, mientras que en la yegua sólo cubre la fosa de ovulación y en la vaca lo cubre parcialmente. En el momento de la ovulación se produce una aposición del infundíbulo al ovario por acción muscular (Pauerstein, 1979). El orificio abdominal, "Ostium abdominale", del oviducto conecta la cavidad peritoneal con el exterior, a través del útero y la vagina. El espacio luminal del oviducto disminuye progresivamente en sentido distal, de manera que el menor diámetro lo encontramos en la parte posterior del istmo. En la unión útero-tubárica (UUT), el oviducto aumenta progresivamente en grosor hasta alcanzar el ápice del cuerno uterino.

Topografía

Topográficamente, el oviducto se encuentra suspendido y envuelto por las dos hojas del mesosalpinx, un pliegue peritoneal que deriva de la capa lateral del ligamento ancho y que se continua, sin límite aparente, con el mesovario o con el mesometrio (Johnson y Foley, 1974). Tomando la inserción del mesosalpinx como referencia, podemos distinguir dos bordes en el oviducto, el borde mesosalpígeo y el antimesosalpígeo. A lo largo de este último se une el ligamento infundíbulo-cornual o "Mesotuvarium superius", una membrana fina, con fibras musculares lisas, que también se une al margen medial de las fimbrias y al ápice uterino (Hafez y Blandau, 1969).



Figura 2: Visión general de la unión útero-tubárica y las estructuras adyacentes. a Segmento oviductal terminal; b zona de transición; c ápice uterino; d ampolla; e infundíbulo; f mesometrio; g mesosalpinx; h ligamento infundíbulo-cornual. Fte: Wrobel et al., 1993.

La bolsa ovárica, incompleta en la vaca, es un fondo de saco formado por el oviducto y tres ligamentos: infundíbulo-cornual (“Mesotubarium superius”), propio del ovario (“Ligamentum ovarii proprium”) y el ligamento ancho en sus tres porciones: mesométrica, mesosalpíngica y mesovárica.

Morfometría

La longitud media del oviducto de la vaca se aproxima a los 25 cm. Parece que su crecimiento se completa sobrepasada la pubertad (Hunter, 1988). En la cerda también se ha observado un aumento de la longitud del oviducto a partir del primer estro tras el destete (Rigby, 1968). Bateman *et al.* (1983) constataron una reducción de la fertilidad en la coneja al aumentar quirúrgicamente la longitud del istmo. Posiblemente el aumento de la longitud del oviducto con la edad en diferentes especies mamíferas esté relacionado con la fertilidad.

La ampolla comprende aproximadamente la mitad de la longitud del oviducto, mientras que el istmo desarrolla un trayecto ligeramente inferior (Lombard *et al.*, 1950). El diámetro del oviducto en novillas oscila entre 1 y 3 mm en el istmo, 3 a 5 mm en la ampolla y 5 a 7 mm a nivel del orificio abdominal. Finalmente, el área superficial del oviducto oscila entre los 20 y los 30 cm².

B.1.2. - ANATOMÍA MICROSCÓPICA

El oviducto es un órgano tubular cuya pared consta de tres capas concéntricas: serosa, muscular y mucosa.

Serosa

La membrana serosa recubre externamente el oviducto y está formada por tejido conectivo laxo, cubierto por un estrato de células mesoteliales, que se continuará

con el del peritoneo. El tejido conectivo está abundantemente vascularizado. Se observan en él fibras de tejido muscular liso, bien subperitoneales o alrededor de los vasos. La morfología de esta capa externa se describirá con mas detalle en el apartado 2.4.

Muscular

La capa muscular o miosalpinx es interna a la serosa. Su grosor y número de capas concéntricas varía en los diferentes segmentos del oviducto, siendo mayor en el istmo. La capa muscular del istmo consta de una lámina longitudinal interna, particularmente bien desarrollada en las bases de los pliegues longitudinales primarios, una lámina intermedia en espiral o circular que representa el grueso de la musculatura, y un sistema externo incompleto de haces musculares aislados, con orientación longitudinal predominante (Wrobel *et al.*, 1993). Esta lámina muscular longitudinal externa está entremezclada con haces musculares subserosos, de orientación variable. Hacia el útero, los haces musculares externos aumentan en grosor y convergen, formando una capa completa a nivel del ápice uterino. La capa intermedia aumenta también hacia el útero, mientras que la capa longitudinal interna disminuye gradualmente, de modo que en el ápice del cuerno uterino sólo se observan haces longitudinales ocasionales, situados bajo la superficie endometrial. En la ampolla, la capa muscular es fina y resulta difícil distinguir láminas musculares longitudinales o circulares. No existe una lámina definida de musculatura longitudinal interna sino más bien haces musculares dispersos, que se continúan dentro de la lámina propia de los pliegues mucosos complejos que se observan en esta zona. Además existen fibras circulares intermedias, que se ven frecuentemente interrumpidas por haces longitudinales externos.

El miosalpinx recibe inervación simpática y parasimpática. No obstante, la información sobre la inervación del tracto genital femenino en rumiantes es bastante escasa (Wrobel y Kujat, 1993). En general se describen dos tipos de

fibras post-ganglionares: fibras largas con el cuerpo neuronal situado en los ganglios prevertebrales y que inervan musculatura lisa vascular y no vascular, y fibras cortas, que se originan en ganglios a nivel de la unión cervico-vaginal y se extienden principalmente hacia la musculatura no vascular (Owan *et al.*, 1967; Pauerstein *et al.*, 1974). En algunas especies, la densidad de fibras adrenérgicas cortas se encuentra modulada por hormonas esteroideas. En el miometrio de la oveja, por ejemplo, disminuyen durante la gestación (Renegar y Rexroad, 1990). Isla *et al.* (1989) observaron una predominancia de adenoreceptores β en el oviducto bovino. En el oviducto de la vaca la inervación adrenérgica produce relajación en lugar de contracción. La combinación de receptores β_1 y β_2 , mediadores de la dilatación, con la actividad intrínseca muscular espontánea, parecen los factores principales que afectan la motricidad oviductal en esta especie. En este sentido, el oviducto de la vaca difiere del de la coneja (Howe y Black, 1973) y cerda (Rodríguez-Martínez, 1984), en los que predominan los receptores α , y del oviducto humano (Whilhelmsson y Lindblom, 1980), en el que la noradrenalina produce una inhibición de la actividad espontánea de la capa muscular circular y longitudinal interna e intermedia pero proporciona una respuesta excitadora en la capa muscular externa. En cuanto a la inervación colinérgica, existe un cierto consenso en que inerva mínimamente el miosalpinx, aunque la mucosa puede recibir fibras colinérgicas. Además de la inervación adrenérgica y colinérgica, la inervación peptidérgica puede jugar un papel importante en la fisiología oviductal, tal y como se ha descrito en la cerda (Czaja *et al.*, 1996).

Mucosa

La mucosa oviductal o endosalpinx consta de una lámina epitelial cilíndrica monoestratificada que descansa en una lámina propia que forma la estructura de los pliegues mucosos epiteliales del oviducto. En general se distinguen pliegues primarios, secundarios, e incluso terciarios, que amplían considerablemente la superficie interna. El grado de plegamiento varía entre las regiones del oviducto,

siendo más pronunciado en el infundíbulo. La mucosa de la ampolla está dispuesta en pliegues elevados y ramificados, cuya altura disminuye hacia el istmo y que se convierten en pliegues de escasa altura en la unión útero-tubárica.

En la vaca, los pliegues mucosos de las fimbrias presentan una distribución irregular (Hafez y Kanagawa, 1973). La mucosa del infundíbulo presenta un complejo patrón de foliación (Beck & Boots, 1974), caracterizado por la formación de pliegues longitudinales altos y con ramificaciones muy complejas que asemejan a estructuras foliares. Cada pliegue primario se ramifica en numerosos pliegues secundarios y estos a su vez en otros terciarios (Lombard *et al.*, 1950).

La mucosa de la ampolla se proyecta también formando numerosos pliegues primarios longitudinales con ramificaciones secundarias y terciarias (Lombard *et al.*, 1950). Su estructura es una mezcla entre ramificación arborescente y panal de abeja (Hafez y Kanagawa, 1973). Esta compleja configuración ocupa casi por completo la luz, cuya amplitud depende del volumen de los pliegues, condicionado a su vez por el calibre de los vasos y la cantidad de líquido intersticial. Al final de la fase folicular se desarrolla un edema en la mucosa por acción de los estrógenos, por lo que disminuye el espacio potencial de la luz oviductal. Este edema podría tener implicaciones en el transporte de los gametos a nivel de la ampolla, permitiendo una mayor interacción del epitelio con los ovocitos. El contenido de líquido es mínimo, por lo que la masa de células foliculares del cúmulo oóforo está en íntimo contacto con la mucosa ciliada.

La mucosa del istmo está formada por pliegues de altura media, cuyo ápice está más cerca de la luz que de la base (Johnson y Foley, 1974). El número de pliegues longitudinales a nivel del istmo oscila entre 4 y 8, regularmente distribuidos. Aunque la ramificación es mucho más simple que en segmentos anteriores, los pliegues longitudinales primarios están interconectados por pliegues secundarios, que discurren oblicuamente, crestas y cordones (Wrobel *et al.*, 1993). El edema de

la mucosa producido por efecto de los estrógenos es especialmente intenso en la porción más caudal del oviducto y podría tener repercusiones en el transporte espermático (Hunter, 1988). Entre los pliegues longitudinales se observa un sistema de saculaciones, con su extremo cerrado (fondo) dirigido en sentido ovárico (Wrobel *et al.*, 1993). De las paredes de algunas de estas saculaciones se originan además unas criptas túbulo-alveolares cortas.

La unión útero-tubárica presenta una luz con forma de U en la que los extremos se orientan hacia el borde antimesométrico y la base hacia el mesométrico (Wrobel *et al.*, 1993). Esta reducción del espacio luminal se debe a un engrosamiento de la mucosa en el borde antimesométrico. A este nivel comienzan a aparecer las primeras glándulas uterinas, que son más frecuentes en borde antimesométrico, engrosando la mucosa. Los pliegues longitudinales primarios del segmento tubárico terminal comienzan a divergir al llegar a la unión útero-tubárica. Los del borde antimesentérico son más cortos y terminan en la zona dilatada de mucosa. El resto de los pliegues a veces se fusionan y, tras atravesar toda la unión útero-tubárica, se ensanchan y aplanan antes de terminar en las primeras crestas transversas del ápice uterino. Al igual que en el istmo, pliegues secundarios y crestas separan unas saculaciones particularmente bien desarrolladas, con criptas ocasionales. La porción uterina de la unión útero-tubárica se extiende hasta que comienzan a aparecer las primeras carúnculas. Posee una luz central con forma de estrella, mientras que la mucosa forma crestas transversales de escasa altura. Las aberturas de las glándulas uterinas son de diferentes tamaños y se sitúan sobre todo en el espacio entre las crestas, con o sin ligera elevación en forma de cráter. En esta zona ya de transición se observa un aumento del grosor de mucosa por la presencia de glándulas.

Variaciones cíclicas

El epitelio oviductal experimenta cambios importantes en la población epitelial a lo largo del ciclo sexual, bajo el efecto de las hormonas esteroideas ováricas. Durante la fase folicular se observa un claro predominio ciliar, especialmente en

las regiones anteriores (Abe y Oikawa, 1993). Es precisamente en estas zonas, infundíbulo y ampolla anterior, donde los cambios epiteliales son mas marcados, con una predominancia de las células secretoras al final de la fase luteal. En los primates, el predominio secretor típico de la fase luteal parece estar asociado a una deciliación celular, a diferencia de la vaca, en la que se atribuye a un cambio en la proporción de ambos tipos celulares y a una disminución de la altura de las células ciliadas. Al final de la fase luteal se observa en el infundíbulo y ampolla anterior un desprendimiento de las células secretoras. Algunos autores lo achacan a una regeneración tisular (Wrobel *et al.*, 1993) mientras que otros sugieren que se trata de una función secretora tipo apocrina (Nilsson, 1972). En los tramos posteriores, istmo y unión útero-tubárica, los cambios en la población epitelial son poco evidentes, aunque se ha descrito la pérdida en células ciliares en la zona basal de saculaciones del istmo durante el diestro y proestro (Wrobel *et al.*, 1993).

Morfometría de la lámina mucosa

Los estudios existentes sobre la morfometría de la lámina mucosa se basan principalmente en el estudio de cortes histológicos transversales. En el infundíbulo, las mediciones de los pliegues primarios y la cuantificación del número de pliegues secundarios y terciarios son difíciles de realizar debido a la complejidad del entrecruzamiento. Los cortes histológicos a nivel del orificio abdominal permiten observar unos 21 pliegues secundarios que surgen de cada pliegue primario y a su vez 7 pliegues terciarios surgen de cada pliegue secundario (Lombard *et al.*, 1950). Las preparaciones a nivel de la ampolla muestran una media de 20 pliegues primarios longitudinales, llegando hasta 40 en algunos casos, y de cada pliegue primario surgen, de media, 8 pliegues secundarios. El número de pliegues longitudinales primarios en el istmo oscila entre 4 y 8.

La altura y anchura media de los pliegues longitudinales en las diferentes regiones del oviducto se han recogido en la tabla 1.

Tabla 1. Morfometría de la lámina mucosa en las diferentes regiones del oviducto de la vaca, según Lombard *et al.* (1950).

	Altura media (mm)	Anchura media (mm)
Fimbrias	5.39	-
Infundíbulo	1.83	0.152
Ampolla	1.29	0,085
Istmo	0.178	0,199

También se han realizado estudios sobre la morfometría del epitelio oviductal bovino a lo largo del ciclo sexual (Abe y Oikawa, 1993; Lombard *et al.*, 1950; Mc Daniel *et al.*, 1968). La altura de las células ciliadas del infundíbulo y la ampolla disminuye notablemente durante el diestro, mientras que las células secretoras apenas experimentan cambios apreciables (Abe y Oikawa, 1993). En el istmo y la unión útero-tubárica, en cambio, se observan pocos cambios de altura a lo largo del ciclo sexual.

B.2. FISIOLÓGÍA OVIDUCTAL

B.2.1. LA MOTRICIDAD OVIDUCTAL E IMPLICACIONES EN EL TRANSPORTE DE LOS GAMETOS

Desde hace unas décadas se ha asumido la importante influencia de la motricidad oviductal sobre el transporte de los gametos. Estudiando las variaciones de la motricidad oviductal a lo largo del ciclo sexual, algunos investigadores (Ruckebusch y Bayard, 1975; Rodríguez-Martínez, 1984) observaron una mayor frecuencia de contracciones durante el estro y metaestro, fases relacionadas con el

transporte del ovocito y los espermatozoides. En un estudio más detallado, Bennet *et al.* (1988) evaluaron la motricidad oviductal y la compararon con los niveles plasmáticos de progesterona. Durante la fase luteal las contracciones fueron de baja amplitud y frecuencia. Ambas aumentaron entre 3 y 5 días antes del comportamiento éstrico. Esta actividad consiste principalmente en contracciones musculares longitudinales, que se intercalan con contracciones musculares circulares durante el estro. La segmentación debida a la actividad de la capa muscular circular se considera como un factor importante en el movimiento de los espermatozoides hacia la ampolla. Tras el estro, la actividad muscular es similar a la observada en el proestro, con una disminución de la actividad entre 3 y 5 días después del estro (Black y Asdell, 1958). En este trabajo se observó también una mayor actividad en el oviducto ipsilateral al lado de la ovulación, posiblemente debida a un efecto local del ovario o del ovocito.

Entre los mecanismos que regulan la actividad contráctil del miosalpinx, las hormonas esteroideas ováricas ocupan un lugar predominante. La mayor actividad motriz sucede bajo el efecto de los estrógenos, mientras que el aumento de progesterona ejerce un efecto relajante (Hunter, 1988). Parece que las hormonas esteroideas ováricas actúan modificando la cantidad de receptores adrenérgicos de las células musculares lisas. Por otra parte, los estrógenos incrementan el número de uniones tipo gap entre las células musculares de ratas (Garfield *et al.*, 1980) y el contenido de actinmiosina de los tejidos miométriales de conejas (Michael y Schofield 1969). Igualmente, la concentración de receptores para la oxitocina en las células musculares del oviducto parece estar regulado por el nivel plasmático de estrógenos.

Se han detectado receptores para la oxitocina en el miosalpinx de la oveja (Ayad *et al.*, 1990), rata (Soloff, 1975) y coneja (Maggi K *et al.*, 1988). Su concentración alcanza el máximo nivel durante el estro y parece estar regulada por los niveles plasmáticos de estradiol (Gilbert *et al.*, 1992). Los niveles de oxitocina en sangre son bajos durante el periodo del estro y el contenido de

oxitocina en el ovario es mínimo en este momento. Sin embargo parece que se producen pulsos de secreción de gran amplitud y corta duración. En el momento de la ovulación, la concentración de oxitocina en el líquido oviductal aumenta por la contribución del líquido folicular y las células de la granulosa que penetran en el oviducto. Esto podría tener consecuencias en la motricidad oviductal y el transporte de gametos. La inyección de oxitocina a dosis fisiológicas aumenta la motricidad oviductal de manera significativa la fase folicular, alcanzando un máximo el día del estro (Gilbert *et al.*, 1992). El efecto fue variable en los diferentes segmentos oviductales. Así, la respuesta en la ampolla era dosis-dependiente, mientras que en el istmo se observaba una gran excitación independientemente de la dosis y en la unión ampulo-ístmica y unión útero-tubárica había un escaso nivel de respuesta a cualquier dosis. La duración del efecto era menor en la ampolla y unión ampulo-ístmica que en regiones posteriores. El intervalo de tiempo en el que se observaba un aumento de la sensibilidad a la oxitocina dependía también de las regiones. La ampolla y unión útero-tubárica eran más sensibles únicamente el día del estro, mientras que la unión ampulo-ístmica ampliaba el periodo de sensibilidad a dos días antes y dos después del estro.

Por último, las prostaglandinas parecen modificar la contractilidad oviductal, probablemente por ser liberadas en las proximidades de las terminaciones nerviosas (Hunter, 1988). En general las prostaglandinas de la serie F favorecen la contracción del istmo bajo predominio estrogénico mientras que las de la serie E producen relajación y se activan bajo predominio progestágeno. Sin embargo existen muchas ideas contradictorias en cuanto a la acción de las prostaglandinas sobre la funcionalidad oviductal *in vivo* con respecto a la observada *in vitro*. Se han observado variaciones de acción dosis o especie-dependientes y variaciones regionales.

B.2.2. EL LÍQUIDO DEL OVIDUCTO E IMPLICACIONES EN EL TRANSPORTE DE LOS GAMETOS.

El oviducto contiene en su espacio luminal una cierta cantidad de líquido, en ausencia de situaciones patológicas. Este líquido experimenta variaciones en volumen y composición a lo largo del ciclo reproductivo y de la gestación y es más abundante cuando los gametos y el embrión están presentes (Hunter, 1988). De este modo provee un ambiente adecuado para los acontecimientos que suceden en su trayecto, tales como maduración y el transporte de los gametos, la capacitación espermática, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano. Muchas de las sustancias presentes en el líquido oviductal ejercen un efecto directo y favorecedor sobre estos acontecimientos, tal y como se ha demostrado en estudios *in vitro*.

Composición del líquido oviductal

El líquido oviductal bovino está constituido en parte por compuestos séricos (Malayer *et al.*, 1988; Boice *et al.*, 1990; Gerena y Killian, 1990), resultado de una filtración selectiva de la sangre, y por los productos de secreción del epitelio (Wegner y Killiam, 1992), aun no muy bien conocidos (Gandolfi *et al.*, 1989a; Ellington, 1991). También se ha registrado la presencia de algunos elementos de los folículos ovulatorios y del líquido uterino. Respecto a los elementos séricos, se encuentran elementos nutritivos como la glucosa, aminoácidos, hormonas (insulina, esteroides ováricos), factores de crecimiento (EGF: epidermal growth factor, IGF: insulin-like growth factor) y de diversas proteínas como la albúmina y las inmunoglobulinas. El epitelio tubárico, por su parte, secreta proteínas a lo largo del ciclo estral, tales como glucoproteínas no específicas, factores de crecimiento y citoquinas. La composición de electrolitos del líquido oviductal se caracteriza por una concentración de calcio y fosfatos mucho más baja que en el suero. Algunos aminoácidos, como la alanina, glicina, taurina y glutamina están presentes en concentraciones elevadas. Sin embargo, parece que todos los aminoácidos son esenciales para el desarrollo embrionario. El piruvato, el lactato

y la glucosa, substratos energéticos indispensables para el desarrollo del embrión, provienen del suero, aunque los dos primeros pueden ser sintetizados por las células del oviducto. Su concentración en el líquido oviductal varía a lo largo del ciclo sexual. Así, la concentración de glucosa aumenta en el líquido oviductal en el momento de la ovulación para disminuir progresivamente tras la misma. De todas formas, la concentración de glucosa es menor en el líquido oviductal (0.1 a 0.2 mM) que en el suero (3.3 mM). En contraste, la concentración de lactato aumenta después de la ovulación, lo que sugiere un papel importante de este substrato en el desarrollo embrionario.

En definitiva, el líquido oviductal está compuesto de una mezcla compleja, con una composición diferente a la del suero materno y variable a lo largo del ciclo sexual.

Producción y acumulación del líquido del oviducto durante el ciclo sexual

Como ya hemos comentado, el líquido oviductal se forma por trasudación selectiva de la sangre y por secreción activa del endosalpinx. Utilizando diferentes métodos de canulación (Roberts *et al.*, 1975; Kavanaugh and Killiam, 1988; Kavanaugh *et al.*, 1992; Greve *et al.*, 1996) se ha demostrado que el volumen secretado por ambos oviductos varía durante el ciclo sexual. Este volumen es máximo durante la fase folicular y mínimo durante la fase luteal o la gestación (Tabla 2).

Tabla 2: Cantidad de líquido oviductal en la vaca producido durante el estro o la fase luteal. Las cantidades representan los ml de líquido producidos en 24 horas.

Estro (ml)	Fase luteal (ml)	Referencia
4.1	0.7	Stanke <i>et al.</i> (1973)
2.0	0.2	Roberts <i>et al.</i> (1975)
3.8	0.2	Greve <i>et al.</i> , (1996)

Regulación de la formación del líquido oviductal

La importancia del líquido oviductal en acontecimientos decisivos para el éxito reproductivo ha aumentado el interés sobre los factores que regulan su producción. Se sabe que las modificaciones en la concentración de hormonas esteroideas ováricas en sangre producen cambios cuantitativos y cualitativos en el mismo, actuando directamente sobre el epitelio y modificando el flujo sanguíneo local. La influencia de las hormonas esteroideas ováricas en la secreción oviductal se ha demostrado mediante ovariectomía en conejas en estro (Bishop, 1956). La cantidad de líquido oviductal disminuyó de 1.2 ml. a 0.2 ml/24h. La inyección de estradiol hizo aumentar la producción hasta los niveles típicos del estro lo que destaca la importancia predominante de los estrógenos en su regulación. En la oveja se obtuvieron resultados comparables (Restall, 1966; Mc Donald y Bellve, 1969). Los niveles máximos de 1.3 a 1.4 ml/24 h, disminuían tras la ovariectomía hasta niveles de 0.05 a 0.09 ml/24h. Esta disminución se contrarrestaba con la inyección de benzoato de estradiol pero no con la progesterona. Desde el punto de vista práctico, los tratamientos hormonales de sincronización y superovulación pueden producir modificaciones sobre el líquido oviductal que conduzcan a una disminución en las tasas de concepción (Hunter, 1988).

Entre los mecanismos que controlan la formación del fluido oviductal, la inervación simpática parece uno de los de mayor transcendencia (Gott *et al.*, 1988). Ya hemos comentado que las hormonas esteroideas modifican la cantidad de receptores adrenérgicos. Una estimulación de los receptores β adrenérgicos en la coneja provoca un aumento del flujo de iones de cloro hacia la luz oviductal, con la consiguiente acumulación de líquido la misma.

Dirección del flujo del líquido oviductal

Durante el estro, la mayor parte del líquido oviductal se drena en la cavidad peritoneal desde la ampolla. Este flujo supone hasta un 90 % en la vaca (Hammer,

1973). En el momento en el que el embrión desciende hacia el útero, la dirección del escaso líquido oviductal existente parece ser la opuesta (Bellve y McDonald, 1970). Las evidencias sobre la dirección del líquido oviductal se han obtenido ligando el extremo proximal de la ampolla en animales en estro, observándose que el líquido se acumulaba en el oviducto hasta el momento del descenso embrionario normal (Hammer, 1973). Las causas que explican la dirección del flujo del líquido oviductal pueden ser complejas, pero probablemente participan el edema de la mucosa, las contracciones musculares y las corrientes ciliares, todos ellos bajo la influencia de las hormonas esteroideas ováricas. No obstante, resulta difícil explicar las interacciones entre el volumen y la dirección del flujo del líquido oviductal con el transporte de gametos (Hunter, 1988).

B.3. TRANSPORTE DE GAMETOS EN EL TRACTO GENITAL

B.3.1. TRANSPORTE DEL OVOCITO

El transporte del ovocito incluye dos acontecimientos que se pueden tratar independientemente: 1) la captación del ovocito; y 2) el transporte del mismo a lo largo de la ampolla hasta la unión ampulo-ístmica, el lugar de la fecundación (Eddy y Black, 1974; Eddy *et al.*, 1978).

La captación del ovocito por el infundíbulo puede ser resultado de un intenso batido ciliar, con una gran concentración y actividad de los mismos en el momento del estro. Además, las contracciones del mesosalpinx contribuyen al desplazamiento del infundíbulo sobre la superficie ovárica, ejerciendo un efecto de "barrido".

Las células del cúmulo oóforo se han considerado importantes en el transporte de los ovocitos, sirviendo como punto de apoyo a los cilios. Blandau (1969) observó cómo unas resinas esféricas del tamaño del ovocito colocadas en el infundíbulo de conejas en estro no eran transportadas hacia el ostium y permanecían en el mismo

lugar en rotación continua. Sin embargo, los ovocitos de la vaca poseen muy pocas células del cúmulo en el momento de la ovulación o incluso carecen de las mismas (Lorton y First 1979). En este caso, la membrana pelúcida podría jugar un papel importante ya que su superficie presenta la estructura de una red dispersa con numerosos poros (Dudkiewicz y Williams, 1977).

Algunos trabajos sugieren que la membrana de los cilios juega un papel importante en el transporte de los ovocitos. Presenta un glicocáliz con una cierta especialización en el ápice de los mismos y una gran densidad de cargas eléctricas negativas (Anderson y Hein, 1977). Para demostrar la importancia de estas cargas en la captación del ovocito, Nortwood y Anderson. (1980) las neutralizaron mediante el recubrimiento del epitelio de las fimbrias con un polímero, la poli-L-lisina, bloqueando la captación del ovocito en un 94% comparado con el lado contralateral.

El transporte de los ovocitos desde el orificio abdominal y hasta el lugar de fecundación es muy rápido, realizándose en unos pocos minutos. Tras esta fase de transporte rápido el ovocito se sitúa a nivel de la unión ampulo-istmica, a la espera de la fecundación.

El batido de los cilios y las contracciones de la musculatura lisa de los mesenterios y de las paredes del oviducto se han considerado como las fuerzas predominantes en esta segunda fase del transporte (Blandau y Boiling, 1973; Halbert *et al.*, 1967a,b). Una vez más, la contracción de la musculatura lisa y el batido ciliar aumentan bajo un predominio estrogénico, asegurándose así un transporte eficaz. Existen algunas contradicciones en cuanto al papel de los cilios. Mientras Brosens y Vasquez (1976) hallaron una correlación entre el número de células ciliadas en el oviducto de la mujer y el grado de fertilidad, existen casos de mujeres que han gestado a pesar de tener los cilios inmóviles, en particular las que presentan el síndrome de Kartagener o de inmovilidad ciliar (Afzelius, 1979).

B.3.2. TRANSPORTE DE LOS ESPERMATOZOIDES

Transporte hacia el oviducto

Los espermatozoides se transportan hacia el lugar de fecundación, la unión ampulo-ístmica, en dos fases: una rápida y otra de transporte lento. La mayor parte de los espermatozoides que se transportan durante la fase rápida o inicial de transporte espermático no son viables (Hunter y Wilmut, 1984) y por lo tanto no participan directamente de la fecundación. La distensión de la vagina durante la monta o la manipulación táctil durante la inseminación artificial provoca la liberación de oxitocina que aumenta las contracciones del útero y oviducto, propulsando los espermatozoides hasta las regiones anteriores del tracto reproductor femenino (VanDemark y Moeller, 1951). Overstreet y Cooper (1978) recogieron espermatozoides móviles en la ampolla de una de siete conejas entre 1 y 15 minutos tras la monta. De estos espermatozoides, sólo un 8 % tenían motilidad, 98 % presentaban las membranas acrosómicas dañadas y en el 15 % se habían disociado las cabezas.

Es posible que parte del plasma seminal penetre en el oviducto tras la inseminación. Rowson (1955) estudió el movimiento de partículas radio-opacas en el tracto genital tras la inseminación intrauterina en una novilla en estro, demostrando que penetraban en el oviducto en 30 minutos en condiciones normales y en solo 2 minutos tras la adición de oxitocina. Sin embargo, los constituyentes del plasma seminal probablemente ejercen poco efecto sobre los espermatozoides transportados hasta los oviductos, debido a su extrema dilución, neutralización o competición con otros constituyentes del tracto genital (Hafez y Blandau, 1969).

La segunda fase mantenida de transporte se inicia dentro de unos pocos minutos tras la inseminación y continúa durante aproximadamente 8 a 16 horas. Los espermatozoides viables, potencialmente fecundantes, se transportan hasta el oviducto mediante motilidad espermática y contracciones uterinas (Hawk, 1983).

Existen pocas evidencias que apoyen un transporte espermático activo dirigido hacia los oviductos. El papel principal del movimiento flagelar podría ser mantener los espermatozoides en suspensión en los fluidos uterinos, evitando que se adhieran a las superficies epiteliales (Hunter, 1988). El número de espermatozoides transportados hasta el oviducto aumenta gradualmente y luego disminuye (Dobrowolski y Hafez, 1970).

Almacenamiento y liberación de los espermatozoides

Tras la cubrición, los espermatozoides del toro ascienden hasta el istmo caudal, donde se forma el reservorio espermático. Se necesita un periodo aproximado entre 6 y 8 horas para que un número suficiente de espermatozoides colonice el istmo caudal para asegurar la fecundación (Hunter y Wilmut, 1984; Wilmut y Hunter, 1984). Tras la monta natural, muchos de estos espermatozoides pueden esperar hasta 22 horas en el istmo antes de la fecundación en el caso de la vaca (Hunter y Wilmut, 1984). El reservorio espermático funcional puede reducir el riesgo de polispermia y regular los cambios en el estado fisiológico de los espermatozoides.

Evidencias sobre la existencia del reservorio espermático

Se han acumulado numerosas evidencias a lo largo de los años que indican que existe un reservorio espermático en el oviducto de mamíferos. Ovestreet y sus colaboradores (1978a,b), llevaron a cabo una serie de experimentos, cuidadosamente controlados, y diseñados para determinar la distribución y motilidad de los espermatozoides en el tracto reproductor de la coneja. Los resultados mostraron evidencias sobre la acumulación de espermatozoides vivos en el istmo caudal del oviducto antes de la ovulación. Suturando en varios puntos a lo largo del oviducto, Hunter y sus colaboradores (1981, 1982, 1984), demostraron que la unión útero-tubárica y el istmo caudal eran los lugares donde se formaba una reserva de espermatozoides viables en la cerda, oveja y vaca. Adicionalmente Suarez (1987), observó un gran número de espermatozoides

móviles en el istmo caudal de oviductos de ratón, mientras que solamente se observaban unos pocos en las regiones más craneales.

Funciones del reservorio espermático

Se han atribuido varias funciones al reservorio espermático. Si se elimina quirúrgicamente el istmo caudal, hay un aumento de la polispermia en la cerda (Hunter y Leglise, 1978); por lo tanto el istmo caudal parece actuar como elemento barrera que previene la polispermia. El reservorio espermático puede servir también para aumentar la motilidad espermática y la fertilidad durante el estro, puesto que los espermatozoides incubados con epitelio oviductal *in vitro* permanecen móviles y fértiles más tiempo que los espermatozoides incubados solos o con otros tejidos (Chian y Sirard, 1994; Dobrinski *et al.*, 1996; Polland *et al.*, 1991; Raychoudhury y Suarez, 1991; Suarez *et al.*, 1991). Esto es especialmente importante para especies con estros largos, como la yegua. Momentos antes de la ovulación, el istmo puede promover la capacitación espermática, produciendo la liberación de espermatozoides listos para la fecundación. En general parece que el reservorio asegura que espermatozoides fértiles estén disponibles en el oviducto en el momento de la ovulación.

Mecanismos de formación del reservorio espermático.

Se han propuesto numerosos mecanismos que contribuyen a la formación del reservorio espermático, como la unión de los espermatozoides al epitelio oviductal, la retención en moco, el estrechamiento localizado del istmo, el edema de la pared del istmo y la reducción de la motilidad espermática en el istmo (Lefebvre *et al.*, 1995)

- 1- **Unión de espermatozoides al epitelio oviductal.** Una vez en el istmo caudal, los espermatozoides se unen al epitelio oviductal, del cual pueden ser liberados en el momento próximo a la ovulación para fecundar los ovocitos.

De hecho, tras un lavado de todos los espermatozoides no unidos, Smith y Yanagimachi (1991) encontraron que los espermatozoides que permanecían eran capaces de fecundar in vivo. La unión de los espermatozoides al epitelio oviductal puede ser un factor primario en la regulación de la formación del reservorio espermático en los mamíferos placentados (Lefebvre *et al.* 1997).

Los espermatozoides de toro unidos al epitelio oviductal in vitro mantienen su viabilidad y capacidad fecundante mucho más tiempo que los que nadan libremente. En caballo, los espermatozoides unidos mantenían su motilidad más tiempo que los libres. En definitiva, la unión de los espermatozoides al epitelio oviductal parece mantener la motilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides en la reserva hasta el momento de la ovulación. El mecanismo del mantenimiento de la motilidad parece estar ligado a la supresión del incremento intracelular de calcio.

Los espermatozoides se adhieren a las células del epitelio oviductal por su membrana plasmática rostral. Esta unión es dinámica y provoca cambios en la comunicación intercelular entre células oviductales vecinas y en la secreción de proteínas de nueva síntesis por las mismas. Los espermatozoides experimentan cambios funcionales que incluyen un aumento de su longevidad, cambios estructurales en su membrana, capacitación e hiperactivación. Estos cambios pueden determinar la adquisición de su capacidad fecundante tanto in vivo como in vitro.

La capacidad de adhesión de los espermatozoides se ha estudiado en varios modelos. Los espermatozoides son capaces de unirse a substratos no celulares, incluyendo plásticos, a un extracto sintético de la lámina basal (Matrigel), al oolema de los ovocitos de mamíferos y a componentes de la membrana del ovocito, intactos o solubilizados con calor, y a la zona pelúcida (Thomas *et al.*, 1997). Los mecanismos específicos de esta unión se han aclarado sólo para la membrana pelúcida. Igualmente muestran capacidad de

unión a diversos sustratos celulares. Así, espermatozoides de ratón capacitados, con el acrosoma intacto, se unen a eritrocitos mediante un mecanismo mediado por α -galactosa. Los espermatozoides se unen también a las células de Sertoli, pero con el mecanismo de uniones intercelulares tipo desmosoma. Ninguno de estos mecanismos de unión parece implicado en la interacción entre los espermatozoides y las células epiteliales del oviducto, en la que espermatozoides móviles, no capacitados y con el acrosoma intacto se adhieren a células somáticas sin fusión o desarrollo de complejos de unión intercelular especializados. Diversos estudios sugieren que las glucoproteínas de membrana, con sitios de unión específicos de cada especie, podrían estar implicadas en la unión de los espermatozoides al epitelio. Los sitios de reconocimiento podrían ser los carbohidratos terminales de las glucoproteínas. Estudios recientes han ayudado a caracterizar el tipo de interacción existente entre los espermatozoides y las células del oviducto. En hámster, la unión de los espermatozoides y las células oviductales se bloqueaba específicamente con fetuina y ácido siálico (el carbohidrato terminal de la fetuina), pero no con la asialofetuina. En contraposición, la asialofetuina y su carbohidrato terminal, la galactosa, inhibían la unión de espermatozoides de caballo a explantes de células oviductales de yegua. En un estudio reciente, Lefebvre *et al.* (1997) demostraron como la fucosa bloqueaba la unión de espermatozoides de toro a explantes oviductales de vaca. Esto indica que la unión de los espermatozoides al epitelio del istmo implica una interacción específica ligando-receptor que incluye ácido siálico en el hámster, galactosa en equino y fucosa en bovino. En el reconocimiento y adhesión celular en otros sistemas biológicos también intervienen carbohidratos, como la unión de los espermatozoides de ratón a la glicoproteína ZP3 de la membrana pelúcida y la unión mediada por selectina de los leucocitos a las células endoteliales.

- 2- **Retención en moco.** Es posible que el moco oviductal favorezca la unión entre los espermatozoides y el epitelio oviductal, formando un tapón

impenetrable. Una sustancia mucosa producida por explantes oviductales bovinos y porcinos produce una retención de espermatozoides homólogos cuando se añade al medio de cultivo. Suarez *et al.* (1997) extrajeron quirúrgicamente los oviductos de 8 novillas tras la inseminación. Tras teñir con PAS los diferentes segmentos, observaron la presencia de mucopolisacáridos a lo largo de todo el oviducto, tanto antes como después de la ovulación. Sorprendentemente, no hallaron una relación entre la acumulación de espermatozoides y las zonas con material más intensamente teñido. La intensidad de la tinción se asumió relacionada con la densidad de los mucopolisacáridos presentes. Los espermatozoides presentaron una distribución homogénea por las zonas claras y oscuras, anchas y estrechas. Esto sugiere que en lugar de formar un tapón impenetrable, el moco oviductal puede proporcionar una superficie pegajosa (una manta mucosa o un glicocáliz) que impide la progresión de los espermatozoides. La superficie del moco oviductal sería pegajosa en lugar de deslizante como en el cuello uterino, porque los espermatozoides de toro se adhieren fuertemente a la superficie del moco segregado por los explantes de oviducto de vaca.

- 3- **Obstrucción física.** La luz estrecha del istmo oviductal se encuentra en cierta manera ocluida por los pliegues longitudinales de la mucosa (Suarez, 1989). Esta luz puede hacerse más estrecha durante el estro, debido al edema de la pared oviductal, aumento de la altura del epitelio mucoso, o contracción del miosalpinx. Además, el curso del oviducto no es rectilíneo en las especies domésticas. Mientras que estas características pueden estar relacionadas con otras funciones, proporcionan ciertamente un laberinto a través del cual deben pasar los espermatozoides.

Las contracciones peristálticas adováricas o el batido de los cilios del epitelio oviductal podrían contribuir a confinar los espermatozoides en el istmo caudal (Suarez, 1989). La mayoría de los trabajos experimentales referentes a estos factores se plantearon responder a la pregunta de cómo eran transportados los

espermatozoides hasta la unión útero-tubárica, en lugar de cómo se evita que lleguen. Por lo tanto, la reexaminación de estos factores podría revelar su importancia en el mantenimiento de un reservorio espermático. Estos factores no parece que afectasen el movimiento de los espermatozoides de ratón en el oviducto, pero podría ser diferente en la vaca, al ser los espermatozoides del toro de mayor tamaño. Partículas aplicadas a la superficie de los cilios del istmo de la vaca y la oveja se barrían hacia el útero.

- 4- **Inhibición del movimiento de los flagelos.** En 1975, Overstreet y Cooper observaron que los espermatozoides recogidos del istmo del oviducto de la coneja antes de la ovulación eran inmóviles o escasamente móviles. Estos espermatozoides podían ser reactivados por dilución en el medio de cultivo o el líquido de la ampolla. La dilución en el medio de cultivo resultó en la hiperactivación de la mitad de los espermatozoides recogidos 4 horas tras la cubrición. Suarez (1987) observó que grupos de espermatozoides dentro del istmo caudal del oviducto de ratón permanecían inmóviles. Se han propuesto varios factores para la disminución de la actividad flagelar en el oviducto. Estos incluyen unos niveles elevados de potasio extracelular, una temperatura baja, una disminución de substratos metabólicos, y una disminución de las secreciones que aumenta la viscosidad del fluido luminal. No hay ninguna evidencia directa de que ninguno de estos mecanismos esté actuando *in vivo*; sin embargo todos, excepto la temperatura baja, podrían explicar la reactivación observada por Overstreet y sus colegas.

Liberación de espermatozoides del reservorio espermático funcional

En los mamíferos, a diferencia de las aves, la fecundación polispermica es patológica, dando lugar invariablemente a cigotos con fracaso en su desarrollo (Hunter, 1996). Se debe a la presencia de un número excesivo de espermatozoides en el lugar de fecundación cuando el ovocito secundario está presente (Austin,

1993). En condiciones fisiológicas la proporción de ovocitos y embriones puede ser próxima a la unidad en los estadios iniciales de la ovulación (Hunter, 1996), de donde se infiere una regulación extremadamente precisa del número de espermatozoides que alcanzan la unión ampulo-istmica. Esta proporción aumenta solamente tras la activación de los ovocitos y la inducción del bloqueo a la polispermia, cuando la presencia de espermatozoides viables en la vecindad del cigoto no implica riesgo alguno.

Algunos trabajos sugieren que el folículo preovulatorio controla la liberación de espermatozoides de el reservorio espermático (Hunter, 1996). En su interior contienen hormonas esteroideas, prostaglandinas y péptidos como la oxitocina, relaxina y varios factores de crecimiento. Parece que existe un mecanismo contracorriente local que permitiría el paso de hormonas desde la vena ovárica hasta la rama oviductal de la arteria ovárica que irriga el istmo. Se ha observado el paso contracorriente de prostaglandinas y hormonas esteroideas. Estas señales endocrinas desde el folículo preovulatorio hasta el istmo podrían transmitirse hasta el endosalpinx provocando un cambio en la composición de los líquidos oviductales, que podría influir en los espermatozoides almacenados.

Las uniones celulares entre los espermatozoides y las células oviductales del istmo parecen estar regulados por los niveles de hormonas esteroideas, especialmente por las concentraciones crecientes de estradiol, como se ha observado *in vitro* (Suarez *et al.*, 1991). Por otro lado, el hecho de que bajo la predominancia progestágena se produzcan escasas uniones al endosalpinx y un ascenso en masa hasta el sitio de fecundación, con una elevada polispermia (Hunter, 1967), sugiere que la progesterona reduce progresivamente la unión de los espermatozoides al istmo caudal. Asumiendo que las interpretaciones anteriores son correctas, el cambio de una secreción estrogénica a progestágena que se inicia por efecto del pico preovulatorio de gonadotrofina puede ser el principal mecanismo de control de la liberación de los espermatozoides unidos al epitelio del istmo caudal (Hunter, 1996). En esencia, una acción de la

concentración creciente de progesterona puede ser la disminución gradual de la efectividad de los receptores epiteliales para los espermatozoides. Apoyando a esta hipótesis, la microinyección local de progesterona en el istmo (Hunter , 1972) o incluso la inyección intramuscular de la misma (Day y Polge, 1968) aumentan la incidencia de la polispermia.

El aumento en la movilización de calcio es otro mecanismo propuesto mediante el que la progesterona puede provocar la liberación de espermatozoides (Hunter, 1996). Este cambio iónico es necesario para que se complete la capacitación y aumente la motilidad espermática (Yanagimachi, 1981, 1988). Esto se refleja en cambios de membrana alrededor de la cabeza espermática , culminando en la reacción acrosómica. En hamster se ha observado como se produce la liberación de los espermatozoides de la mucosa ístmica cuando se completa la capacitación (Smith y Yamagimachi, 1991).

Finalmente, es posible que los productos sintetizados por el ovocito maduro y las células del cúmulo complementen la acción de la progesterona en la regulación cuantitativa de la activación y liberación de espermatozoides del reservorio espermático (Hunter, 1996).

Selección espermática en el tracto reproductor femenino

Los espermatozoides se transportan hasta el lugar de fecundación o se eliminan del tracto reproductor femenino en un periodo corto de tiempo. La desaparición de espermatozoides del tracto reproductor se produce por flujo retrógrado, fagocitosis o pérdida en la cavidad peritoneal.

La retención de espermatozoides en el tracto reproductor femenino es baja con respecto al total de espermatozoides inseminados. Dobrowolski y Hafez (1970) inseminaron intravaginalmente 2×10^9 espermatozoides en vacas en estro y recogieron en el tracto genital 13.4 , 3.8 y 0.9 % de los espermatozoides inseminados a las 1, 8 y 24 horas, respectivamente. El-Bana y Hafez (1970)

recogieron 1.61 y 0.03 % de los espermatozoides inseminados en la vagina a las 16 y 40 horas, respectivamente. Doce horas tras la inseminación, Mitchel *et al.* (1985), recogieron 6.3 y 6.5 % de 1×10^9 y 420×10^6 espermatozoides inseminados en el cuerpo uterino de vacas en estro. Algunos estudios han mostrado cómo los espermatozoides sometidos a congelación-descongelación son incapaces de progresar en el tracto genital tan eficazmente como los del semen fresco. Lineweaver *et al.*, (1970) inseminaron 32×10^6 espermatozoides congelados y descongelados y 34×10^6 espermatozoides en fresco en el cuerpo uterino de novillas (6 por tratamiento) y recogieron una media de 191 y 458 células espermáticas, respectivamente, de los oviductos a las 4 horas tras la inseminación.

En cuanto a la distribución de los espermatozoides en el tracto reproductor de la hembra, de los 420 millones depositados en el útero de vacas en estro, se recogieron un 6.5 % de los mismos en el tracto genital femenino 12 horas tras la inseminación (Mitchel *et al.*, 1985), presentando la siguiente distribución: 6 % en vagina, 0.4 % en el cérvix, 0.1 % permaneció en el útero y solamente el 0.1 % (8×10^3) fue transportado a la unión útero-tubárica e istmo. Dobrowolski y Hafez (1970) observaron la misma distribución tras inseminar con semen fresco.

Por su parte, Larsson y Larsson (1985) depositaron 160 millones de espermatozoides en el útero posterior de novillas en estro, recogiendo en el tracto reproductor 14.6 y 0.6 % de los los espermatozoides inseminados a las 2 y 12 horas, respectivamente. En la vagina hallaron el 98.6 y el 88.4 % de los espermatozoides y solamente 0.05 y 1.8 % se recogieron del oviducto. En otro estudio posterior (Larsson y Larsson, 1986) inseminaron tres novillas con 20 millones de espermatozoides congelados y descongelados en el útero posterior, recogiendo después espermatozoides dentro de las diferentes partes del oviducto. A las 12 horas tras la inseminación se encontraron un total de 46 espermatozoides a lo largo de los oviductos de las tres novillas. La mayoría de los espermatozoides se habían eliminado hacia el cuello uterino y la vagina.

Para estudiar la importancia del flujo retrógrado, Mitchel *et al.* (1985) depositaron 420 millones de espermatozoides en el cuerpo uterino de vacas en estro. Recogieron todo el moco descargado desde el momento de la inseminación hasta el sacrificio. A las 12 horas tras la inseminación se sacrificó a los animales y cuantificaron los espermatozoides. Se retuvieron en el moco el 73 % de los espermatozoides iniciales. El 60,7 % se eliminaba con el moco cervical, el 0.06 % se perdía en la orina, un 4.4 % eran aspirados por la vagina, 1.3 % se adhería al equipamiento y 6.5 % se retenía en el tracto genital. A las 6 horas tras la inseminación, el 51.8 % de los espermatozoides se había eliminado del tracto genital por flujo retrógrado. El flujo retrógrado supuso el 90 % de los espermatozoides recogidos y se considera la causa más importante de pérdida de espermatozoides.

La fagocitosis se ha considerado como la segunda forma más importante de eliminación de espermatozoides del tracto reproductor de la hembra. Roark y Herman (1950) observaron una infiltración de linfocitos en el útero en el inicio del estro, y Howe y Black (1963) detectaron un aumento de linfocitos con la presencia de espermatozoides. Posteriormente se hallaron leucocitos polimorfonucleares en proceso de digestión de espermatozoides en todas las partes del tracto genital de la vaca (Mattner, 1968). Los leucocitos polimorfonucleares procedentes de la sangre digieren tanto espermatozoides vivos (móviles) como muertos. Mattner, (1969) y Mitchel *et al.* (1985) sugirieron que la diferencia entre los espermatozoides utilizados en la inseminación y los hallados tras la misma (27 %), representaban los espermatozoides fagocitados.

Otra vía de eliminación de espermatozoides del tracto genital es hacia la cavidad peritoneal, tanto en la fase rápida como en la mantenida del transporte espermático (Overstreet y Cooper, 1978; Overstreet *et al.*, 1978). Sin embargo, la cantidad de espermatozoides transportados por el oviducto hacia la cavidad

peritoneal se cree que contribuye poco a la pérdida de espermatozoides (Larsson, 1986).

Capacitación espermática

Para que los espermatozoides sean capaces de fecundar el ovocito deben capacitarse (Austin, 1951; Chang, 1951). Durante la migración por el tracto reproductor de la hembra, los espermatozoides se capacitan y adquieren la capacidad de fecundar el ovocito. Las secreciones del oviducto juegan un papel importante en la preparación de los espermatozoides para la fecundación por medio de la inducción de la capacitación y reacción acrosómica. Dentro de las secreciones del tracto reproductor, los glucosaminoglucanos (GAG) se han asociado directamente a estos procesos. Estas moléculas generalmente se unen covalentemente a residuos séricos de un núcleo proteico (Ax *et al.*, 1984). El complejo GAG-proteína se denomina como proteoglucano. Son una parte importante de la matriz intercelular y de los fluidos biológicos y forman parte de las secreciones del sistema reproductor femenino, incluido el moco, que es necesario para el transporte de espermatozoides y ovocitos (Lee y Ax., 1984). En el sistema reproductor de la vaca, los GAGs predominantes y con mayor actividad biológica son el condroitín sulfato A, B y C, el ácido hialurónico, la heparina y la heparina sulfatada (Lee *et al.*, 1986). El mecanismo de inducción de la reacción acrosómica por los GAGs en bovino parece ser por activación directa de la entrada de calcio, activación de la fosfolipasa A₂, o por activación de una proteína Kinasa dependiente de c-AMP (Varner *et al.*, 1991). Adicionalmente, una elevada producción de GAGs provocan la expansión de las células del cúmulo ooforo que rodean los ovocitos, lo que permite la formación de dos pronúcleos en el ovocito bovino fertilizado *in vitro* (Lee y Ax, 1984). Handrow *et al.*, 1989, encontraron que la heparina es más efectiva induciendo la reacción acrosómica que otros GAG, debido a su elevado grado de sulfatación. La cantidad de GAG en el aparato reproductor de la vaca fue medida por Lee y Ax, 1984, observando una disminución significativa de GAGs en segmentos anteriores al cérvix. No obstante, a pesar de que el moco cervical contenía niveles significativamente

mayores de GAGs que el resto del tracto reproductor, no inducían la reacción acrosómica. Este podría ser un mecanismo para asegurar que la reacción acrosómica no ocurra prematuramente en el transcurso de los espermatozoides por el aparato genital de la vaca.

Vida útil de los espermatozoides en el oviducto

El eyaculado contiene una población heterogénea de espermatozoides, que abarca desde espermatozoides inmaduros hasta muertos (Mann, 1964). Esta heterogeneidad puede tener diversas causas, incluyendo la naturaleza de la esteroidogénesis y la frecuencia de utilización del macho. Otros factores de variación de la viabilidad espermática son las condiciones del tracto genital femenino, especialmente la composición de los líquidos luminales (Hunter, 1988) y la presencia de infecciones. Con todas estas consideraciones en mente, la vida media de los espermatozoides en el tracto reproductor de la vaca oscila entre 24 y 48 horas, siendo menor cuando se utiliza semen congelado.

C) ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL PERITONEO

C.1.- ANATOMÍA

La cavidad peritoneal está cubierta por una membrana serosa. Las membranas serosas están constituidas por una capa de células mesoteliales superficiales que descansan sobre una membrana basal que las separa de un tejido conjuntivo de grosor variable (Barberini *et al.*, 1977). Sobre la membrana serosa se puede observar líquido peritoneal, con células flotando en el mismo, que posee un efecto lubricante y que, presumiblemente, evita el rozamiento producido por el deslizamiento de las vísceras (Andrews y Porter, 1973).

El conocimiento actual sobre la morfología de las superficies serosas mesoteliales deriva de estudios ultraestructurales realizados en varias especies

animales. Odor (1954) fue el primero que utilizó el microscopio electrónico en el estudio del mesotelio del oviducto de la rata. Posteriores investigaciones han permitido describir la morfología ultraestructural del mesotelio seroso en varias especies animales y hombre. El mesotelio, epitelio escamoso simple de origen mesodérmico, tapiza las cavidades pleural, pericárdica y peritoneal, tanto en las superficies parietales como en las viscerales. El mesotelio generalmente aparece como una capa continua, formada por células aplanadas y elongadas. Las características morfológicas típicas de las células mesoteliales son las siguientes (Eskeland y Kjaerheim, 1966):

- Presencia de microvellosidades en la superficie celular.
- Uniones estrechas entre las células
- Contacto de las células con la membrana basal.
- Presencia de vesículas micropinocíticas en el citoplasma.

La primera descripción de las microvellosidades en las células mesoteliales se atribuye a Kolossow (1893) (en Pfeiffer et al., 1987) que describió la existencia de estructuras parecidas a los pelos en las superficies celulares de las células mesoteliales del peritoneo y pericardio. Estas estructuras, difíciles de observar al microscopio óptico convencional, las describió más tarde Odor (1954) utilizando microscopía óptica de contraste de fases y a una mayor resolución con microscopía electrónica de transmisión para el mesotelio oviductal de la rata. En la superficie mesotelial se pueden observar además microporos y en algunos tipos de mesotelio aberturas intercelulares, cilios solitarios y vesículas.

La presencia de aberturas intercelulares ha recibido un interés especial por su relevancia en la diálisis peritoneal en la especie humana. Se cree que participan en el drenaje líquido de la cavidad peritoneal y están conectadas a canales linfáticos subperitoneales. Se han descrito principalmente en la superficie diafragmática del hámster, ratón y hombre (Allen, 1936; Tsilibary y Wissing, 1977, 1987; Fukuo *et al.*, 1990; Gaudio *et al.*, 1988). También se han observado en otras localizaciones

como el mesenterio intestinal de ratón (Ettarh y Carr, 1996), o la bolsa ovárica del hamster (Shinohara *et al.*, 1985).

Morfometría y variaciones regionales

En algunos trabajos (Gaudio *et al.*, 1988; Ettarh y Carr, 1996) se describe la presencia de un mayor número de células por unidad de superficie, de densidad y longitud de microvellosidades en el mesotelio visceral que en el parietal. Igualmente existen diferencias regionales en la densidad de microvellosidades del mesotelio que recubre tejidos y órganos concretos. Parece que las células mesoteliales de los órganos con mayor motricidad como el corazón están recubiertas por una mayor densidad de microvellosidades que otras menos sujetas a rozamientos como los riñones (Andrews & Porter, 1978; Furubayashi *et al.*, 1984).

C..2. FISIOLÓGÍA

C.2.1 FUNCIONES DE LAS CÉLULAS MESOTELIALES

Las células mesoteliales juegan un papel importante en muchos acontecimientos que suceden en la cavidad peritoneal, tales como el transporte transperitoneal de moléculas, la lubricación peritoneal y la inflamación y defensa. Poseen una gran actividad sintética y secretora. Son la principal fuente de prostaglandinas, citoquinas y fosfolípidos en la cavidad peritoneal (Stylianou *et al.*, 1990; Topley y Williams, 1994), sintetizan y secretan varias citoquinas pro y anti-inflamatorias (Topley y Williams 1994), y contribuyen significativamente al desarrollo de procesos fibrinolíticos (Van Hinsbergh *et al.*, 1990). El mesotelio actúa también como una barrera al paso de macromoléculas. Los datos clínicos derivados de pacientes sometidos a diálisis peritoneal demuestran que esta monocapa es importante en el control del paso de proteínas a la cavidad peritoneal.

C.2.2.- LÍQUIDO PERITONEAL Y SU EFECTO SOBRE LOS ESPERMATOZOIDES.

Composición

El líquido peritoneal de la vaca sana es claro y sin color o ligeramente amarillento o rosado (Whitney *et al.* 1999). El volumen de líquido oviductal en la vaca sana es muy escaso, oscilando entre 0 y 5 ml (Kopcha y Schultze, 1991) y cantidades importantes pueden reflejar situaciones patológicas (Hirsch y Townsend, 1982). El volumen de líquido peritoneal parece experimentar fluctuaciones a lo largo del ciclo sexual en la mujer, siendo mayor en la fase luteal. En vacuno, se ha observado un incremento en la cantidad de líquido peritoneal en período final de la gestación.

La concentración de proteínas en el líquido peritoneal es menor que en el plasma. No obstante, refiriéndonos a la bibliografía, el contenido proteico del fluido peritoneal bovino es muy variable. La mayoría de los autores considera que un contenido en proteínas hasta 3 o 3.5 g/dl es normal. Esta variabilidad en la concentración de proteínas en el líquido peritoneal se puede atribuir a los cambios que se producen a lo largo del ciclo sexual. Esto se ha demostrado en la mujer, en la que se ha observado un aumento en la concentración de proteínas durante el metaestro (Bouckaert *et al.*, 1986).

La composición en electrolitos es muy parecida a la del plasma. La concentración de hormonas esteroideas en el líquido peritoneal de la mujer es mayor que en el suero durante la fase luteal. Durante la fase folicular, la concentración de hormonas esteroideas ováricas es parecida en líquido peritoneal y plasma (Donnez *et al.*, 1982) o es mayor la de progesterona pero no la de estrógenos (Koninckx *et al.*, 1974). La concentración de cortisol, en cambio, es menor en el líquido peritoneal que en el plasma

Flotando en el líquido peritoneal se observan células de diversa naturaleza, principalmente neutrófilos, eosinófilos y macrófagos y en menor proporción linfocitos y células mesoteliales. La cantidad de estas células se ve modificada en situaciones fisiológicas, como los cambios hormonales que se producen con la pubertad, la edad o el ciclo sexual, o en situaciones patológicas como en las infecciones (Davis *et al.*, 1976).

Origen del líquido peritoneal

La mayor parte de estudios realizados en la especie humana coinciden en que el líquido peritoneal es un producto de exudación, principalmente de origen ovárico. La hipótesis sobre un origen ovárico la soporta el hecho de que hay una cantidad significativamente mayor de hormonas esteroideas ováricas en el fluido peritoneal que en el plasma tras la ovulación; que la cantidad de líquido peritoneal oscila durante el ciclo sexual, aumentando tras la ovulación; y que en las mujeres postmenopaúsicas, las que usan anticonceptivos y el hombre la cantidad de líquido peritoneal es muy pequeña (Koninckx *et al.*, 1974). La menor concentración de proteínas que en el suero sugiere que el líquido peritoneal se forma por trasudación. Existe la posibilidad de que la secreción del cuerpo lúteo temprano aún no vascularizado se dirija preferentemente hacia la cavidad peritoneal, creando un ambiente hormonal específico para el ovocito liberado y el oviducto.

Como ya hemos indicado, el líquido oviductal tiene un flujo neto hacia la cavidad peritoneal durante el estro. Las cantidades de líquido oviductal producidas en 24 horas (Tabla 1) oscilan entre los 2 y 4.1 ml, según los autores. Siendo la cantidad de líquido peritoneal tan escasa en la vaca, es posible que el líquido oviductal contribuya a la formación del líquido peritoneal. La obstrucción de las trompas en la mujer disminuye la cantidad de líquido peritoneal (Chryssicopoulos *et al.*, 1991). Sin embargo, otros estudios indican que en mujeres sin trompas de Fallopio, el volumen de líquido peritoneal no se ve significativamente modificado (Koninckx *et al.*, 1974).



Importancia del líquido peritoneal sobre la fisiología espermática

No existe una barrera selectiva que separe el líquido peritoneal y el oviductal. Aunque durante el estro el líquido oviductal fluye del oviducto a la cavidad peritoneal, es posible que el fluido peritoneal o sus constituyentes puedan entrar en los oviductos, especialmente en el momento de la ovulación, en el que se crean corrientes para transportar el ovocito (Soldati *et al.*, 1993). Por lo tanto, el microambiente en el que suceden las interacciones de los gametos in vivo puede estar constituido no sólo por líquido oviductal sino también por líquido peritoneal y folicular. En el caso de la deposición intraperitoneal de gamentos, el efecto del fluido peritoneal sobre los mismos adquiere un carácter especialmente relevante.

El líquido peritoneal de mujeres fértiles o infértiles puede influir negativamente en la motilidad espermática, tal y como se ha demostrado en varios estudios. Como ya se ha indicado, la composición del líquido peritoneal es variable y está influida por la concentración de hormonas ováricas. Esto hace que el efecto ejercido por el líquido peritoneal sobre la motilidad espermática pueda variar dependiendo del nivel hormonal. En un estudio realizado en la mujer (Guidi *et al.*, 1993) se observó como el líquido peritoneal procedente de mujeres con ciclos estimulados hormonalmente mantenía mejor y de forma más sostenida la motilidad espermática que el de mujeres con ciclos espontáneos. También existen estudios en los que se observan variaciones individuales sobre el efecto del líquido peritoneal en la motilidad espermática y la capacitación, pudiendo tener un efecto positivo, negativo o neutro (Revelli *et al.*, 1992). En 1993, Soldati *et al.* aislaron un factor lipídico en el fluido peritoneal de la mujer responsable de la inmovilización de espermatozoides.

D) TECNICAS ASOCIADAS A LA DEPOSICION DE GAMETOS EN LA CAVIDAD PERITONEAL

D.1.- INSEMINACIÓN INTRAPERITONEAL

Tras la monta o la inseminación intrauterina, los espermatozoides alcanzan el lugar de fecundación siguiendo un trayecto ascendiente por el tracto genital. Sin embargo, los espermatozoides pueden alcanzar también a la unión ampulo-ístmica siguiendo el mismo trayecto que el ovocito desde la cavidad peritoneal. Esto puede ocurrir tras la monta o inseminación intrauterina, ya que algunos espermatozoides alcanzan la cavidad peritoneal tras atravesar el oviducto y pueden ser captados de nuevo por las fimbrias del mismo oviducto o el contralateral (First, 1954), o tras la deposición de espermatozoides en la cavidad peritoneal.

Los trabajos clásicos de Spallanzani demostraron cómo hembras castradas unilateralmente, en las cuales el oviducto contralateral era extirpado, eran potencialmente fértiles, indicando la capacidad del oviducto intacto de captar los ovocitos que caen en la cavidad peritoneal (Hafez y Blandau, 1969).

La capacidad del oviducto de capturar pequeñas partículas de la cavidad peritoneal y transportarlas hasta el útero se conoce desde hace tiempo. En 1925, Von Ott recogió tinta del cuello uterino de una mujer tras depositarla en el saco de Douglas peritoneal. También se ha observado cómo huevos de áscaris y partículas de carbón (Reynolds, 1949) o de almidón (Decker y Decker, 1954) colocadas en diferentes áreas de la cavidad abdominal pueden alcanzar el útero a través de los oviductos.

Estas observaciones sugirieron a algunos investigadores la posibilidad de intentar un nuevo tipo de inseminación en la cual se depositaban los espermatozoides directamente en la cavidad peritoneal y eran transportados hasta el lugar de fecundación en sentido descendente. Odd Skjerven, 1955, fue el primero en

intentar con éxito la inseminación intraperitoneal en mamíferos, en concreto sobre una novilla. Posteriormente se han conseguido gestaciones tras la inseminación intraperitoneal en vacas adultas (McDonald y Sampson, 1957), cobaya (Rowlands, 1957), coneja (Hadek, 1958, Mroueh y Mastroianni, 1966, Adams, 1969), primates (Van Pelt, 1970), Cabra (González, 1972), Cerda (Hunter, 1978), oveja (Negobatikov *et al.*, 1981) y en la especie humana (Manhes y Hermabessiere, 1985; Forrler *et al.* 1986a; Forrler *et al.* 1986b). Recientemente, las técnicas de inseminación intraperitoneal se han utilizado como tratamiento de infertilidad en la especie humana (Hovatta *et. al.*, 1990; Crosignani *et al.*, 1991; Evans *et al.*, 1991; Karlstrom *et al.*, 1991; Seracchioli *et al.*, 1991) y como alternativa a la inseminación intrauterina en el síndrome de la vaca repetidora (López-Gatius, 1995).

La inseminación intraperitoneal puede tener algunas ventajas sobre el resto de las técnicas de inseminación, tales como la ausencia de barreras naturales como el moco cervical o la unión útero-tubárica, el aumento de espermatozoides en el lugar de fecundación y la mejora del momento de inseminación con relación a la ovulación (Turhan *et al.*, 1992).

A continuación revisaremos los factores implicados en el éxito o fracaso de la inseminación intraperitoneal y realizaremos un breve resumen final de los resultados en las especies en las que se ha practicado.

D.1.1.- ESPERMATOZOIDES

Número de espermatozoides.

Existe una cierta discusión respecto a cuál es el número óptimo de espermatozoides a utilizar en la inseminación intraperitoneal de cada especie. La duda inherente a esta cuestión es hasta qué punto aumentar el número de espermatozoides ejerce un efecto positivo al aumentar la fertilidad o negativo al aumentar la polispermia.

En la cobaya, el número mínimo de espermatozoides necesarios para provocar la gestación fue de 30 millones y con 50 millones se consiguió un 100 % de fertilidad (Rowlands, 1957). En cambio la diferencia entre cuerpos lúteos y fetos, era mayor en el caso de 50 millones, aunque solamente había una tendencia no significativa. En un estudio realizado sobre coneja Adams (1969) utilizó dosis comprendidas entre 10 y 390 millones de espermatozoides en un volumen entre 0.3 y 1 ml y a diferentes intervalos respecto a la inyección inductora de la ovulación de hCG. La proporción de ovocitos fecundados fue mayor al aumentar el número de espermatozoides pero al mismo tiempo disminuyó la proporción de recuperación de embriones. Esto lo achacó a que un número elevado de espermatozoides puede provocar una destrucción y reabsorción temprana de los embriones. Sin embargo, en un estudio en cerda, Hunter (1978) no observó ninguna relación entre el volumen del inseminado o el momento de inseminación y la proporción de ovocitos perdidos.

En rumiantes, en las experiencias realizadas en cabra y vaca se utilizaron cantidades elevadas y constantes de espermatozoides, que oscilaron según los casos entre 45 (López-Gatius, 1995) y 2500 (González, 1972) millones de espermatozoides. En el único estudio realizado en oveja (Negobatikov *et al.*, 1981), la fertilidad aumentaba de manera progresiva entre 54 y 83 % al incrementar la dosis seminal de 20 a 80 millones de espermatozoides.

Por otra parte, en la especie humana se han conseguido gestaciones con solamente 0.1 (Turhan *et al.*, 1992), 0.2 (Lesec, G *et al.*, 1989) y 0.5 millones de espermatozoides (Forrler *et al.*, 1986a).

En conclusión, dada la dispersión existente en la bibliografía, se deben desarrollar nuevos estudios que permitan determinar el número óptimo de espermatozoides para la inseminación intraperitoneal en ganado vacuno.

Volumen de la dosis seminal

El volumen de la dosis seminal podría ser otro factor importante para la inseminación intraperitoneal. No obstante, en la mayoría de estudios realizados se han utilizado volúmenes muy pequeños, en general es menor de 1 ml, al utilizarse semen no diluido o concentrado.

Un menor volumen podría disminuir la respuesta inmunológica por un lado y evitar diluciones excesivas por otro. Morueh (1966) observó menor reacción en peritoneo cuando concentró los espermatozoides mediante centrifugación. Sin embargo, el gran volumen del eyaculado en el cerdo hizo que Hunter (1978) inseminara cerdas intraperitonealmente con volúmenes entre 5 y 20 ml, dependiendo de la concentración del eyaculado. A pesar de esto no se observaron peritonitis importantes y los resultados de fertilidad fueron relativamente altos.

El medio de dilución de los espermatozoides y tratamientos

Las observaciones de Hadek (1958), que no consiguió fecundar conejas inseminando intraperitonealmente con semen lavado una sola vez, aunque sí tras dos lavados, pusieron de relieve la importancia del tratamiento de los espermatozoides. Según este autor, la presencia del plasma seminal podría resultar perjudicial en la inseminación intraperitoneal. En la mayoría de trabajos realizados en la especie humana se realizan lavados y precapitación de los espermatozoides antes de la inseminación. Sin embargo, los estudios que comparen resultados respecto a espermatozoides no diluidos son muy escasos.

Capacitación espermática tras la inseminación intraperitoneal

Tras la inseminación intrauterina, los espermatozoides se liberan del plasma seminal y entran en contacto con las secreciones del tracto genital, ricas en glicoproteínas que favorecen la capacitación. Tras la inseminación intraperitoneal, en cambio, los espermatozoides se diluyen en el líquido peritoneal, que parece

tener efectos perjudiciales sobre los mismos, y solamente contactan con glucoproteínas oviductales, en el caso de ser captados por las trompas.

Algunos autores sugieren que los espermatozoides depositados en la cavidad peritoneal necesitan más tiempo para capacitarse que los depositados en el tracto genital (Hadek, 1958). En la coneja, el hecho de que la mayor fertilidad se obtuviese cuando se inseminaba entre 13 y 16 horas antes de la ovulación, sugiere que la capacitación requiere más tiempo que en la inseminación convencional (Mroueh y Mastroianni, 1966).

Sin embargo, parece que la mayoría de los espermatozoides entran en el oviducto de la coneja en la primera hora tras la inseminación (Rowlands, 1957), con lo que es probable que la capacitación de los espermatozoides depositados en la cavidad peritoneal tenga lugar principalmente, si no completamente, dentro del oviducto (Adams, 1969). Por otra parte, algunos autores sugieren que la capacitación en el oviducto requiere más tiempo que en el útero (Adams y Chang, 1962)

Según Hunter (1978), la capacitación espermática tras la inseminación intraperitoneal requiere entre 5 y 6 horas, a diferencia de las 2-3 horas necesarias tras la inseminación o monta natural o 3-4 horas tras la inseminación directa en el cuerno uterino. Esto sugiere un efecto perjudicial del medio peritoneal sobre los espermatozoides. Hay estudios que indican que el útero y el oviducto actúan sinérgicamente en la capacitación de espermatozoides en coneja (Adams y Chang, 1962; Bedford, 1968) y cerda (Hunter y Dziuk, 1968; Hunter y Hall, 1974), y que este flujo ascendente implica la separación de los espermatozoides del plasma seminal. En el caso de la inseminación intraperitoneal, aunque puede existir un cierto lavado en el medio peritoneal, es muy probable que se produzca entrada de líquido seminal con los espermatozoides. Hay componentes del plasma seminal que se sabe que producen un retraso en la capacitación en la cerda (Hunter y Hall, 1974).

Efecto del medio peritoneal sobre los espermatozoides

En la coneja, Moroueh y Mastroianni (1966), observaron como el pH del líquido peritoneal tras la inseminación intraperitoneal era de 7.63 y 7.31 para dos animales estudiados a las 4 horas tras la inseminación. Este autor, sugiere que el pH es inferior al del oviducto y esto podría tener efectos perjudiciales sobre los espermatozoides. El efecto del medio peritoneal sobre los espermatozoides depende en gran medida de la permanencia de los mismos en la cavidad peritoneal, antes de ser captados por los oviductos. Esta a su vez puede ser dependiente del lugar, del momento de inseminación y de la especie animal. Como ya hemos comentado, los espermatozoides que penetran en el oviducto de la coneja tras la inseminación intraperitoneal probablemente lo hacen dentro de la primera hora tras la inseminación. Sin embargo, el estudio realizado por González (1972) en cabra, indica que los espermatozoides son captados de manera paulatina y lenta, iniciándose a las 4-5 horas tras la inseminación y alcanzando un máximo alrededor de la ovulación, 12 a 18 horas tras la inseminación. Por lo tanto el efecto puede ser mayor debido a una permanencia más larga de los espermatozoides en la cavidad peritoneal.

Vida útil de los espermatozoides tras la inseminación intraperitoneal.

En la coneja, Adams (1969) observó un fallo en la fecundación cuando se inseminaban intraperitonealmente 30 horas antes de la ovulación. Este intervalo podría coincidir con la vida media de los espermatozoides. Sin embargo, el hecho de que los espermatozoides depositados en la vagina o el oviducto 30 horas antes de la ovulación sean capaces de fecundar un 30 % de los ovocitos sugiere que la vida media de los espermatozoides podría ser menor tras el paso por la cavidad peritoneal. La otra explicación posible es que la mayor cantidad de espermatozoides utilizados en la inseminación vaginal e intraoviductal aumenten la probabilidad de supervivencia hasta la ovulación.

La vida útil de los espermatozoides tras la inseminación intraperitoneal podría estar ligada a la existencia de un reservorio espermático funcional. A pesar de que no existen estudios en los que se aborde este tema, se sabe que los espermatozoides son transportados desde los oviductos hacia el útero tras la inseminación intraperitoneal, aunque no se sabe si los espermatozoides transportados son vivos o muertos. Es posible que los espermatozoides que penetran en el oviducto alcancen la zona caudal del istmo, donde podrían almacenarse como sucede tras la inseminación por vías convencionales. Otra posibilidad es el almacenamiento en otras regiones del oviducto e incluso en la cavidad peritoneal. Tras introducir espermatozoides en la ampolla e istmo, Lefebvre *et al.*(1995) observaron como los espermatozoides se unían indistintamente al epitelio de las dos regiones del oviducto, siendo el factor limitante la posibilidad de acceso a las mismas. En el caso de la inseminación intraperitoneal, los espermatozoides acceden primero a las regiones anteriores del oviducto y quizá se forme en ellas una reservorio espermático. Por otro lado, ya hemos comentado la capacidad de los espermatozoides de unirse a ciertos tipos celulares, aunque no está demostrado que se unan a las células mesoteliales.

D.1.2. - MOMENTO DE INSEMINACIÓN

El momento óptimo de inseminación en el caso de la inseminación intraperitoneal podría ser diferente que en el caso de la inseminación intrauterina. El transporte espermático y el tiempo necesario para que se produzca la capacitación son los factores más importantes en ambos casos.

En la cobaya se obtuvo mayor proporción de gestaciones cuando se inseminaba en las 8 horas que sucedieron al final del estro (Rowlands, 1957), aunque parece que el ovocito de la cobaya se mantiene viable hasta 20 horas tras la ovulación. Para Hadek, 1958, el momento óptimo de inseminación intraperitoneal en la coneja se sitúa entre las 1 y 2 horas tras la monta, es decir, 8 horas antes de la ovulación. Sin embargo, las conejas utilizadas por Mroueh & Mastroianni (1966), solamente gestaron cuando se inseminaron entre 12 y 16 horas antes de la

ovulación, si bien esta se calculaba arbitrariamente como 12 horas tras la inyección de hCG, existiendo variaciones individuales importantes que pudieron influir en los resultados obtenidos. En un trabajo posterior en la misma especie (Adams, 1969), se obtuvo una elevada proporción de ovocitos fecundados hasta 15 horas antes de la inyección de hCG, es decir hasta unas 30 horas antes de la ovulación.

En la cerda, el momento óptimo de inseminación se sitúa entre las 0 y 12 horas previas a la ovulación según Hunter (1978). Inseminaciones fuera de este rango dieron lugar a una baja fecundación. Este periodo breve en el que la inseminación intraperitoneal dio buenos resultados se puede explicar por la actividad del extremo fimbriado próximo a la ovulación.

Al igual que en el caso de la inseminación intrauterina, es posible que el momento óptimo de inseminación requiera un compromiso entre probabilidad de fecundación y calidad del ovocito (Dalton et al., 1998). En inseminaciones demasiado tempranas, la cantidad de espermatozoides potencialmente fecundantes en el momento de la ovulación se vería muy reducida, aunque si alguno tiene éxito, el embrión resultante sería de calidad, al proceder de ovocitos jóvenes. Inseminaciones muy tardías tendrían el efecto contrario. Sin embargo, hay dos diferencias fundamentales entre las inseminaciones intrauterina e intraperitoneal. En la inseminación intraperitoneal el transporte espermático parece depender de la capacidad de captación por los oviductos y no existen las barreras físicas de la inseminación uterina. La captación espermática parece mayor en el momento cercano a la ovulación, en el que la motricidad del oviducto y mesosalpinx aumentan para la captación del ovocito. La otra gran diferencia es la capacitación espermática, que podría verse retrasada en el caso de la inseminación intraperitoneal. Si estas dos ideas ampliamente asumidas son ciertas, sería necesario buscar un momento óptimo de inseminación que supusiera un compromiso entre un transporte eficiente de espermatozoides y adecuada capacitación espermática. Las soluciones que podrían abordarse pasarían por

capacitar los espermatozoides previamente a la inseminación y sincronizar la ovulación, tal y como se realiza en la especie humana, o utilizar hormonas, como estrógenos, prostaglandinas y oxitocina, que aumentasen la captación de los mismos horas antes de la ovulación.

D.1.3.- LUGAR DE DEPOSICIÓN

Se han practicado dos rutas principales de acceso a la cavidad peritoneal: a través de la pared abdominal, principalmente a nivel de la línea alba, y a través del fórnix vaginal. La más utilizada las especies domésticas, salvo en la vaca, ha sido la primera. La inyección a través del fórnix vaginal se ha realizado en la vaca y la mujer.

La importancia del lugar de inseminación se pone de manifiesto por el hecho de que en el trabajo de Hunter (1978) en la cerda, una proporción de los animales estudiados presentaron ovocitos fecundados solamente en un lado del tracto genital.

Sin embargo, no hay estudios en los que se hayan comparado las dos rutas de acceso. La deposición a través del fórnix vaginal presenta dos ventajas sobre la inyección a través de la pared abdominal. En primer lugar, se trata de una técnica con menos riesgos de infecciones, al no existir contacto entre la aguja y la piel. En segundo lugar, la deposición del semen se realiza, probablemente, más cerca de los ovarios. En el caso de la inseminación a través de la pared abdominal, la grasa epiplóica, la bolsa peritoneal y las vísceras suponen obstáculos entre los espermatozoides y los oviductos.

D.1.4.- TRANSPORTE DE LOS ESPERMATOZOIDES TRAS LA INSEMINACIÓN INTRAPERITONEAL

Los estudios sobre el transporte espermático tras la inseminación intraperitoneal se han realizado mediante sacrificio a intervalos regulares tras la inseminación y

búsqueda de espermatozoides en el tracto genital mediante la realización de lavados.

Entre las 5 y las 6 horas tras la inseminación en la coneja se recuperaron entre 4000 y 76000 espermatozoides en los oviductos y entre 0 y 28000 del útero (Mroueh y Mastroianni, 1966). En dos animales sacrificados 24 horas tras la inseminación, se hallaron 5000 espermatozoides en los oviductos y ninguno en el útero. Es curioso señalar como tras la inseminación de conejas con cuerpos lúteos de 1 día, no se recuperó ningún espermatozoide en los oviductos de 7 conejas. Cuando se inseminaron 5 conejas con un cuerpo luteo de 8 días el número medio de espermatozoides en los oviductos fue de 10600 y en el útero de 8000. Sin embargo, al no especificarse el número de espermatozoides introducidos en la cavidad abdominal, resulta difícil hacerse una idea de la eficiencia del transporte espermático.

En un interesante experimento (González, 1972), inseminó cabras intraperitonealmente a través de la línea alba. La proporción de espermatozoides recuperados en el tracto genital tras la inseminación fue muy baja a pesar de que las dosis seminales fueron considerablemente elevadas, del orden de varios miles de millones. Se detectó la presencia de espermatozoides en el oviducto 4 horas tras la inseminación, aunque en baja cantidad. Esta cantidad era máxima en los oviductos entre las 8 y 12 horas tras la inseminación y en el útero entre las 12 y 18 horas. La cantidad de espermatozoides en el tracto genital fue significativamente menor para animales inseminados fuera del estro, y presentaron un máximo entre las 12 y 18 horas tras la inseminación.

A juzgar por el escaso número de espermatozoides accesorios y la escasa fecundación de los ovocitos, la mayor parte de los espermatozoides depositados en la cavidad peritoneal no entran en el oviducto y son rápidamente fagocitados por leucocitos polimofonucleares (Hunter, 1978).

En cuanto a los mecanismos de transporte, el hecho de que el oviducto capte y transporte partículas inertes de la cavidad peritoneal hace suponer que el transporte pasivo juega un papel relevante. La captación de los espermatozoides y partículas se atribuye a la propia motricidad del oviducto y ligamentos asociados y quizá ayudados por las corrientes locales creadas por los cilios. Ambos mecanismos son especialmente activos en el momento próximo a la ovulación. No obstante, recientemente se ha demostrado que el líquido folicular ejerce una cierta quimiotaxis sobre los espermatozoides en la especie humana (Díaz *et al.*, 1990). Si este mecanismo es efectivo en otras especies, es posible que en el momento de la ovulación el transporte activo tenga una mayor transcendencia.

D.1.5. - RIESGO DE INFECCIONES, ADHERENCIAS E INMUNIZACIÓN ESPERMÁTICA

Mroueh y Mastroianni (1966) realizaron laparatomías a intervalos regulares tras la inseminación intraperitoneal de conejas y observó la presencia de un exudado peritoneal de un color marrón y un volumen comprendido entre unos pocos ml y 30 ml, atribuido a la irritación producida por los espermatozoides y el plasma seminal. La cantidad de líquido peritoneal fue considerablemente menor en las conejas en las que se utilizó semen concentrado mediante centrifugación de semen completo. Aunque no se describieron con detalle, se citó la presencia de adherencias, probablemente consecuencia de la organización del exudado fibrinoso.

En la cerda y la cabra, la inseminación intraperitoneal no produjo peritonitis apreciable, probablemente debido a una eficiente fagocitosis de los espermatozoides, y bacterias seminales asociadas, por leucocitos polimorfonucleares (Hunter, 1978; González, 1972).

En la especie humana se han realizado muchos estudios sobre las características del semen para disminuir este riesgo. Así, se han utilizado mecanismos de purificación de espermatozoides mediante lavado y centrifugación. También se

han utilizado la antibioterapia para prevenir infecciones. Crosignani y sus colaboradores describen en 1991 la peritonitis observada en dos mujeres tras la inseminación intraperitoneal sin antibioterapia. La utilización rutinaria de antibióticos en tratamientos posteriores previno el desarrollo de nuevas infecciones. En un estudio reciente, Ragni *et al.*, 1997 no observaron inmunización frente a los espermatozoides en mujeres inseminadas hasta tres veces.

Hay que hacer notar la escasez de trabajos sobre los efectos de la inseminación intraperitoneal repetida. En cualquier caso, el peritoneo de los rumiantes se caracteriza por su baja sensibilidad a las infecciones. De hecho en ninguno de los trabajos de inseminación intraperitoneal en rumiantes se observan reacciones de ningún tipo.

Podemos considerar que utilizando la técnica de la inseminación intraperitoneal existe riesgo de infección y respuesta inmune frente a los espermatozoides y que no se suelen desarrollar procesos tales como reacciones anafilácticas, peritonitis, y adherencias graves tras la inseminación intraperitoneal.

D.1.6 - RESULTADOS DE LA INSEMINACIÓN INTRAPERITONEAL EN DIFERENTES ESPECIES

Aunque la inseminación intraperitoneal parece útil para el tratamiento de una amplia gama de problemas de fertilidad en la especie humana, en las especies animales se han realizado muy pocos estudios sobre la misma. Los resultados de la inseminación intraperitoneal pueden depender en gran medida de la especie. Así por ejemplo, la vida útil de los espermatozoides precisa ser superior en las especies politocas para asegurar la fecundación. Pasamos a describir a continuación los resultados obtenidos en términos de gestaciones y nacimientos en las diferentes especies, comparando técnicas de inseminación en los casos en que existe dicha información.

En la vaca sólo se han desarrollado tres experimentos en los que se utiliza la inseminación intraperitoneal. El primer intento lo realizó Odd Skjerven en 1955 sobre una novilla nulípara. El semen utilizado en este experimento fue diluido en citrato-yema de huevo con antibióticos. Tras la localización del folículo preovulatorio mediante palpación rectal, introdujo una cánula en la cavidad peritoneal a través del fórnix vaginal, acercó el supuesto ovario preovulatorio a la punta de la cánula y depositó el semen en la proximidad del ovario. La novilla quedó gestante y parió un ternero sano, demostrándose así la accesibilidad de la ruta peritoneal. En 1957, McDonald y Sampson, inseminaron intraperitonealmente 4 novillas inyectando semen diluido o no diluido y de calidad variable a través de la pared abdominal en la región de la fosa paralumbar derecha y cerca del final del estro. Solamente una inseminación de seis resultó en gestación, utilizando una dosis de 1.5 ml de semen no diluido, obtenido 12 horas antes. En el trabajo más reciente en vacas repetidoras (López-Gatius, 1995), se inseminaron 62 vacas a través del fórnix vaginal con dosis comerciales de semen congelado. Todas las dosis procedían de un solo eyaculado y contenían una concentración de unos 45 millones de espermatozoides por dosis. Se obtuvieron 9 gestaciones, cifra semejante al grupo control: 13 gestaciones de 63 inseminadas en el cuerpo uterino. Los parámetros reproductivos subsiguientes de las vacas no gestantes fueron semejantes en los dos tipos de inseminación. En ninguno de los estudios llevados a cabo en ganado vacuno se han detectado efectos adversos sobre el peritoneo.

En la cobaya, Rowlands (1957) comparó la fertilidad obtenida tras la inseminación intraperitoneal a través de la línea alba y la inseminación vaginal, obteniendo en ambos casos un 80%. Cuando se incrementaba la concentración espermática a 50 millones de espermatozoides, mejoraba la fertilidad y disminuía, aunque no significativamente, la proporción de ovocitos fecundados.

En la coneja Mroueh & Mastroianni, (1966) obtuvieron unos mejores resultados cuando inseminaron las conejas en el intervalo comprendido entre las 4 horas

antes y el momento de la inyección ovulatoria de hCG que fuera de este periodo. Sin embargo, los resultados de implantación fueron peores que los obtenidos tras la inseminación vaginal (2.9 frente a 7.8), a diferencia de Hadek, cuyos resultados fueron opuestos. En 1969, Adams confirmó los bajos resultados de Morueh y Mastroianni, pero los explica más bien debido a un número o insuficiente o excesivo de espermatozoides en el oviducto tras la inseminación intraperitoneal.

En el único estudio realizado sobre **cabra** (González, 1972) se consiguieron 3 gestaciones y nacimientos de 10 cabras inseminadas intraperitonealmente a través de la línea alba, con 2500 millones de espermatozoides.

En la **cerda**, Hunter (1978) consiguió un 60 % de ovocitos fecundados cuando inseminaba entre las 0 y las 12 horas previas a la ovulación. En ningún caso llegó a alcanzar el 90-100% de fecundación que se observa tras la monta natural.

En la **oveja** la inseminación intraperitoneal puede resultar ventajosa respecto a la inseminación vaginal (Negobatikov *et al.*, 1981). Sin embargo, para la realización de este estudio se accedió a la cavidad peritoneal con un laparoscopio y se realizó la inseminación en la proximidad del ovario. Este hecho probablemente contribuyó a conseguir unos excelentes resultados.

En un estudio realizado sobre **primates** (Van Pelt, 1970), se inseminaron seis monas de la especie *Macaca mulatta*, consiguiéndose gestaciones cuando la dosis utilizada oscilaba entre 52 y 183 millones de espermatozoides, indicando que un número elevado de espermatozoides no resultaba contraindicado.

La inseminación intraperitoneal en la especie **humana** se realizó por primera vez en 1985 por Manhes y Hermabessiere. Posteriormente se ha utilizado en el tratamiento de diversos problemas de infertilidad con factor masculino, cervical, inexplicado e inmunológico (Turhan *et a.*, 1992). La metodología en estos trabajos supone la capacitación espermática previa a la inseminación y la

sincronización de la ovulación. Los resultados son variables entre grupos y oscilan entre un 7 % (Lesec *et al.*, 1989) y un 30 % (Cimino *et al.*, 1988) de éxito dependiendo en gran medida del tipo de infertilidad que se trate. Tuhan *et al.*, 1992 consiguieron una probabilidad de gestación en parejas con problemas de infertilidad similar a la de una población normal tras la cópula. En numerosos estudios comparativos (Hawata *et al.*, 1990; Gregoriou *et al.*, 1993; Ajossa *et al.*, 1997; Tiemessen *et al.*, 1997) se obtuvo la misma proporción de gestaciones utilizando la inseminación intrauterina y la intraperitoneal. Seracchioli *et al.* (1991) obtuvieron resultados comparables a la transferencia intraoviductal de gametos y a la fecundación *in vitro* con transferencia de embriones.

D.2.- INSEMINACIÓN INTRAOVIDUCTAL

Algunas de las cuestiones planteadas en la inseminación intraperitoneal podrían abordarse mediante técnicas incluidas en la inseminación intraoviductal. Esta técnica proporciona la posibilidad de introducir el número de espermatozoides deseado directamente en el oviducto sin contacto previo con el medio peritoneal. Esto puede proporcionar información muy valiosa respecto a aspectos como la capacitación, el número de óptimo de espermatozoides dentro del oviducto y el momento de inseminación.

La única experiencia descrita en vaca por Hawk *et al.*, en 1988 no proporcionó resultados alentadores. Inseminaron vacas inducidas a superovulación depositando el semen en el infundíbulo vía laparoscópica. La proporción de ovocitos perdidos fue mucho mayor que tras la inseminación intrauterina y aquellos que recuperaron tenían muy pocos espermatozoides accesorios en la membrana pelúcida y un porcentaje de fecundación muy bajo.

Los trabajos de inseminación oviductal en oveja han dado muy buenos resultados. En 1991, Jabbour y Evans consiguieron un 95 % de fecundación y un elevado porcentaje de división tanto con semen fresco como congelado, llegando a mejorar los resultados de la inseminación intrauterina. En un estudio posterior

usando la misma técnica, Maxwell *et al.* (1993) confirmaron la ventaja de la inseminación oviductal frente a la intrauterina, en este caso mayor para todos los tipos de semen. También estudiaron el momento óptimo de inseminación, que en ambos casos resultó ser 44 horas tras la retirada de la esponja, es decir alrededor de la ovulación.

Los resultados obtenidos en la oveja obligan a un replanteamiento de algunos de los principios expuestos en la inseminación intraperitoneal. Si la inseminación en el oviducto mejora los resultados de la inseminación intrauterina, incluso cuando la inseminación se realiza en el periodo próximo a la ovulación, hace suponer que la capacitación se realiza en un intervalo corto, a pesar de no pasar por el útero. La dosis utilizada era de 50 millones de espermatozoides por oviducto en el trabajo de Jabbour y Evans (1991), y entre 10.000 y 10 millones de espermatozoides en el de Maxwell *et al.* (1993). La elevada concentración de espermatozoides introducidos en el oviducto en el primer trabajo no pareció tener un efecto perjudicial sobre la fecundación ni sobre las primeras divisiones embrionarias. En el último trabajo, los resultados de fecundación eran similares dentro del rango descrito. A pesar de los resultados espectaculares obtenidos en estos trabajos, hay que hacer notar que no se incluyó el estudio del desarrollo embrionario más allá del estadio embrionario de 4 células.

Al igual que en el caso de la inseminación intraperitoneal, la inseminación intraoviductal se ha desarrollado como una técnica de tratamiento de casos de infertilidad en la especie humana. En ella a menudo se combina con la transferencia de ovocitos, acuñándose el término GIFT (Gamete Intrafallopian Transfer) (Asch *et al.*, 1986). Los trabajos comparativos con otras técnicas de inseminación poseen en general un escaso valor ya que se han limitado a series reducidas de casos. Dooley *et al.* (1988), obtuvieron mejores resultados mediante esta técnica que cuando se combinaban la inseminación intrauterina e intraperitoneal.

D.3.- DEPOSICION INTRAPERITONEAL DE OVOCITOS Y ESPERMATOZOIDES

El éxito de la inseminación intraperitoneal, unido al hecho de que se producían gestaciones tras la resección de un ovario y el oviducto contralateral llevó a la hipótesis de que la transferencia peritoneal de ovocitos y espermatozoides se podría utilizar en el tratamiento de la infertilidad. Hasta el momento solamente se han realizado ensayos en la especie humana (Mason *et al.*, 1987; Sharma *et al.*, 1987), con deposición de ovocitos maduros y espermatozoides capacitados en la cavidad peritoneal. Los mejores resultados se han obtenido utilizando un mínimo de 4 millones de espermatozoides móviles para evitar la dilución peritoneal y de 4 ovocitos. Esta técnica evidencia la capacidad oviductal para captar incluso ovocitos extraováricos. No obstante, dadas las notables diferencias anatómicas, se plantea difícil el desarrollo de esta técnica en las especies animales.

E) CONCLUSIONES

Los conocimientos sobre la anatomía funcional de la mucosa oviductal en la vaca son muy escasos. El mesotelio peritoneal se ha estudiado con detalle en la especie humana y animales de laboratorio, pero no tenemos información de la existencia de descripciones del mesotelio peritoneal del tracto genital de la vaca. Por último, existen muy pocos estudios de inseminación intraperitoneal, y la mayor parte de ellos se ha realizado con el objetivo de solucionar problemas de infertilidad en la especie humana. Los objetivos de esta tesis, expuestos en el siguiente capítulo, pretenden ampliar los conocimientos sobre estas materias que permitan profundizar sobre la fisiología oviductal así como en diversos aspectos de la tecnología de la reproducción bovina.

F) BIBLIOGRAFIA

1. Abe, H., and P. Oikawa 1993 Observations by scanning electron microscopy of oviductal epithelial cells from cows at follicular and luteal phases. *Anat. Rec.*; 235:399-410.
2. Adams, C.E., and M.C. Chang 1962 Capacitation of rabbit spermatozoa in the Fallopian tube and in the uterus. *J. Exp. Zool.* 15, 159.
3. Adams, C.E. 1969 Intraperitoneal insemination in the rabbit. *J. Reprod. Fertil.* 18:333-339.
4. Afzelius, B.A., 1979 The inmotile cilia syndrome and other ciliary diseases. *Int Rev Exp Pathol* 19:1-44
5. Ajossa, S., G.B. Melis, A. Cianci, M.E. Coccia, A.M. Fulghesu, G. Giuffrida, S. Guerriero, A. Lanzone, and G. Francoscarselli 1997 An open multicenter study to compare the efficacy of intraperitoneal insemination and intrauterine insemination following multiple follicular development as treatment for unexplained infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* 14:15-20.
6. Allen, L. 1936 The peritoneal stomata. *Anat. Rec.* 67:89-103.
7. Anderson, R.G., and C.E. Hein 1977 Distribution of anionic sites on the oviduct ciliary membrane. *J. Cell Biol.* 72:482-492.
8. Andrews, P.M., and K.R. Porter 1973 The ultrastructural morphology and possible functional significance of mesothelial microvilli. *Anat. Rec.* 177:409-426.
9. Ankum, W.M., H.L. Houtzager, and O.P. Bleker 1996 Renier De Graaf (1641-1673) and the Fallopian tube. *Hum. Reprod. Update.* 2:365-369.
10. Aristóteles 1994 Reproducción de los animales. Editorial Gredos, Madrid.
11. Ash, R.H., J.P. Balmaceda, L.R. Ellsworth, and P.C. Wong 1986 Preliminary experiences with gamete intrafallopian transfer (GIFT). *Fertil. Steril.* 45: 366-371.
12. Austin, R. 1951 Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res B4:* 581-596.
13. Austin, C.R. 1963 Fertilization and transport of the ovum. In: C.G. Hartman, ed. Pergamon Press, Oxford, pp. 285-320.

14. Ayad, V.J., S.A. McGoff, and D.C. Wathes 1990. Oxytocin receptors in the oviduct during to oestrus cycle of the ewe. *J. Endocrinol.* 124: 353-359.
15. Ax, R.L., R.R. Handrow, C.N. Lee, K. Dickson, and R.W. Lenz 1984 New developments in the understanding of fertilization. Proceedings of the 10^o Tech. Conference of AI and Reproduction. P. 93.
16. Bateman, B.G., C.A. Eddy, and J.D. Kitchin,3d 1983 Effect of lengthening the fallopian tube on fertility in the rabbit. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 147:569-573.
17. Barberini, F., F. Carpino, T. Renda, and P. Motta 1977 [Observations by scanning electron microscopy (SEM) on the surface of mesothelial cells of different peritoneal areas of rat (author's transl)]. *Anat. Anz.* 142:486-496.
18. Beavis, J., J.L. Harwood, G.A. Coles, and J.D. Williams 1993 Intraperitoneal phosphatidylcholine levels in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis do not correlate with adequacy of ultrafiltration. *J Amer Soc Nephrol* 3:1954-1960.
19. Beck, L.R. and L.R. Boots 1974 The comparative anatomy, histology and morphology of the mammalian oviduct. pp. 1-51. In: Johnson. AD., Foley. CW., ed.
20. Bedford, J.M. 1968 Importance of the Fallopian tube for capacitation in the rabbit. *Proc. 6th Int. Congr. Anim. Reprod., Paris*, 1: 35-37.
21. Bellve, A.R. and M.F. McDonald 1970 Directional flow of fallopian tube secretion in the ewe at onset of the breeding season. *J. Reprod. Fertil.* 22:147-149.
22. Bennett, W.A., T.L. Watts, W.D. Blair, S.J. Waldhalm, and J.W. Fuquay 1988 Patterns of oviducal motility in the cow during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 83:537-543.
23. Bishop D.W. 1956 Active secretion in the rabbit oviduct. *Am. J. Physiol* 187:347-352.
24. Black, D.L., and S.A. Asdell 1958 Transport through the rabbit oviduct. *Amer. J. Physiol.* 192: 63-68.

25. Blandau, R.J. 1969 Gamete transport. Comparative aspects. In Hafez, E.S.E., and R.J. Blandau 1969 *The mammalian oviduct*. University of Chicago Press, Chicago and London, pp 129-162.
26. Blandau, R.J. and J.L. Boling 1973 An experimental approach to the study of egg transport through the oviducts of mammals. pp. 400-15. In: Segal SJ et. al., ed.
27. Bodemer, C.W. 1969 History of the mammalian oviduct. In Hafez, E.S.E. and R.J. Blandau *The mammalian oviduct*. University of Chicago Press, Chicago and London, pp 3-26.
28. Boice, M.L., R.D. Geisert, R.M. Blair, and H.G. Verhage 1990 Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. *Biol. Reprod.* 43:457-465.
29. Bouckaert, P.X., J.L. Evers, W.H. Doesburg, L.A. Schellekens, P.H. Brombacher, and R. Rolland 1986 Patterns of changes in proteins in the peritoneal fluid of women during the periovulatory phase of the menstrual cycle. *J. Reprod. Fertil.* 77:329-336.
30. Brosens, I.A., and G.J. Vasquez 1976 Fimbrial microbiopsy. *J Reprod Med* 16: 171-178.
31. Chang M.C. 1951 Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168: 698-699.
32. Chian, R.C., and M.A. Sirard 1994 Fertilizing ability of bovine spermatozoa cocultured with oviduct epithelial cells. *Biol Reprod* 52: 156-162.
33. Chian, R.C., S. Lapointe, and M.A. Sirard 1995 Capacitation in vitro of bovine spermatozoa by oviduct epithelial cell monolayer conditioned medium. *Mol. Reprod. Dev.* 42:318-324.
34. Chryssicopoulos, A., T. Mantzavinos, A. Kontoravdis, N. Toumbanakis, and P.A., Zourlas 1991 Peritoneal fluid volume parameters in infertile patients. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 18:175-179.
35. Cimino, C., G. Guastella, G. Comparetto, D. Gullo, A. Perino, M.A. Benigno, G. Barba, and E. Cittadini 1988 Direct intraperitoneal insemination (DIPI)

- for the treatment of refractory infertility unrelated to female organic pelvic disease. *Acta Eur. Fertil.* 19:61-68.
36. Crosignani, P.G., G. Ragni, G.C. Finzi, L. De Lauretis, M.D. Olivares, and L. Perotti 1991 Intraperitoneal insemination in the treatment of male and unexplained infertility. *Fertil. Steril.* 55:333-337.
 37. Czaja, K., J. Kaleczyc, W. Sienkiewicz, M. Majewski, and M. Lakomy 1996 Peptidergic innervation of the porcine oviduct studied by double-labelling immunohistochemistry. *Folia Histochem. Cytobiol.* 34:141-150.
 38. Dalton, J.C., S. Nadir, J.H. Bame, M. Noftsinger, R.L. Nebel and R.G. Saacke. 1998. Effect of artificial insemination time and natural service on accessory sperm number, fertilization status and embryo quality in cattle. *J. Anim. Sci.* 76:239.
 39. Davis, R.H., D.L. Kramer, and H.S. Pitkow 1976 Endocrine influences on peritoneal fluid cellular content. *Microsc. Acta*, 78:385-387.
 40. Day, B.N., and C. Polge 1968 Effects of progesterone on fertilisation and egg transport in the pig. *J. Reprod. Fertil.* 17:227-230.
 41. Decker, A. and W.H. Decker 1954 A tubal function test. *Obstet. Gynecol.* 4:35-38.
 42. Díaz, C.V., F.V. Ortega, A.K. Ambe, M.L.A. Díaz-Perez, and S.K. Krivitzky 1990 Evidence that human follicular fluid contains a chemoattractant for spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 54: 1180-1182.
 43. Dickey, J.F. and J.R. Hill, Jr. 1974 Histochemistry and electron microscopy of the bovine oviduct. pp. 53-63. In: Johnson A.D. and Foley CW. ed.
 44. Dobrinski, I., S.S. Suarez, and B.A. Ball 1996 Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro. *Biol. Reprod.* 54:783-788.
 45. Dobrowolski, W. and E.S. Hafez 1970 Transport and distribution of spermatozoa in the reproductive tract of the cow. *J. Anim. Sci.* 31:940-943.
 46. Donnez, J., S. Langerock, and K. Thomas 1982 Peritoneal fluid volume and 17 beta-estradiol and progesterone concentrations in ovulatory, anovulatory, and postmenopausal women. *Obstet. Gynecol.* 59:687-692.

47. Dooley, M., D. Lim Howe, M. Savvas, and J.W. Studd 1988 Early experience with gamete intrafallopian transfer (GIFT) and direct intraperitoneal insemination (DIPI). *J. R. Soc. Med.* 81:637-639.
48. Drobnis, E.Z., and J.W. Overstreet 1992 Natural history of mammalian spermatozoa in the female reproductive tract. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 14:1-45
49. Dudkiewicz, A., and W. Williams 1977 Fine structural observations of the mammalian zona pellucida by scanning electron microscopy. *Scanning electron microscopy* 2:317-324.
50. Eddy, C.A., and D.L. Black 1974 Ovum transport through rabbit oviducts perfused with 6-hydroxydopamine. *J. Reprod. Fertil.* 38:189-191.
51. Eddy, C.A., J.J. Flores, D.R. Archer, and C.J. Pauerstein 1978 The role of cilia in fertility: An evaluation by selective microsurgical modification of the rabbit oviduct. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 132:814-821.
52. El Banna, A.A., and E.S. Hafez 1970 Sperm transport and distribution in rabbit and cattle female tract. *Fertil. Steril.* 21:534-540.
53. Ellington, J.E. 1991 The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of literature. *Cornell Vet.* 81:313-328
54. Eskeland, G., and A. Kjaerheim 1966 Regeneration of parietal peritoneum in rats. 2. An electron microscopical study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 68:379-395.
55. Ettarh, R.R., and K.E. Carr 1996 Ultrastructural observations on the peritoneum in the mouse. *J. Anat.* 188:211-215.
56. Evans, J., C. Wells, L. Gregory, and S. Walker 1991 A comparison of intrauterine insemination, intraperitoneal insemination, and natural intercourse in superovulated women. *Fertil. Steril.* 56:1183-1187.
57. Falloppii, G. 1973 Classic pages in obstetrics and gynecology: Gabrielis Falloppii: Observationes anatomicae ad petrum mannam medicum cremonensem. Venetiis, M. A. Ulmum, 1561. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 117:144

58. First A. 1954 Transperitoneal migration of ovum or spermatozoon. *Obstet. Gynecol.* 4: 431-434
59. Ford, B.J. 1989 Antony van Leeuwenhoek-microscopist and visionary scientist. *Journal of Biological Education*, 23:293-299.
60. Forrler, A., P. Dellenbach, I. Nisand, L. Moreau, C. Cranz, A. Clavert, and Y. Rumpler 1986a Direct intraperitoneal insemination in unexplained and cervical infertility. *Lancet*, 1:916-917.
61. Forrler, A., E. Badoc, L. Moreau, P. Dellenbach, C. Cranz, A. Clavert, and Y. Rumpler 1986b Direct intraperitoneal insemination: first results confirmed. *Lancet*, 2:1468
62. Fukuo Y., H. Shinohara, and T. Matsuda 1990 The distribution of lymphatic stomata in the diaphragm of the golden hamster. *J. Anat.* 169: 13-21.
63. Furubayashi, R., H. Miyamoto, T. Tanii, and T. Ishibashi. 1984. Scanning electron microscopic observations of serosal surfaces of the internal organs in the calf. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 55:20-24.
64. Gandolfi F., T.A.L. Brevini, S. Modine, D.G. Cran, and R.M. Moor. 1989. Oviduct environment and embryonic development: in vivo and in vitro relationship. In Lauria A and Gandolgo F (eds) "in vitro approaches to mammalian gamete maturation and embryonic development" 106:303-312.
65. Gandolfi, F., T.A.L. Brevini, and R.M. Moor. 1989b. Effect of oviduct environment on embryonic development. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 38:107-115.
66. Gaudio, E., E.A. Rendina, and L. Pannarale 1988 Surface morphology of the human pleura. A scanning electron microscopic study. *Chest*, 92:149-152.
67. Garfield, R.E., M.S. Kannan, and E.E. Daniel 1980 Gap junction formation in miometrium; control by estrogens, progesterone and prostaglandins. *Am. J. Physiol.* 238: C81-C89.
68. Gerena R.L. and G.J. Killian 1990 Electrophoretic characterization of proteins in oviduct fluid of cows during the estrous cycle. *J Exp Zool* 256:113-120.
69. Gilbert, C. L., P. J. Cripps, and D. C. Wathes. 1992. Effect of oxytocin on the pattern of electromyographic activity in the oviduct and uterus of the ewe around oestrus. *Reprod. Fertil. Dev.* 4:193-203.

70. Giordan A., V. Host, D. Tesi, R. Gagliarde 1987 Conceptos de biología. 2. Ed. Labor Barestrona.
71. González, C.S. 1972 Intraperitoneal insemination in goats. Proc. 7th Int Cong Anim Reprod AI, *VII*:1501-1506.
72. Gott, A.L., S.M. Gray, A.F. James, and H.J. Leese 1988 The mechanism and control of rabbit oviduct fluid formation. Biol. Reprod. *39*:758-763.
73. Gregoriou, O., C. Papadias, S. Konidaris, A. Gargaropoulos, and E. Kalampokas 1993 A randomized comparison of intrauterine and intraperitoneal insemination in the treatment of infertility. Int. J. Gynaecol. Obstet. *42*:33-36.
74. Greve, T., M. Schmidt, and T.H. Hansen 1996 Collection of oviduct fluid in heifers. Deut. Tierarztl. Wochenschr. *103*:291-293.
75. Guidi, F., A. Revelli, G. Soldati, J. Stamm, M. Massobrio, A. Piffaretti Yanez, and M. Balerna 1993 Influence of peritoneal fluid from spontaneous and stimulated cycles on sperm motility in vitro. Andrologia. *25*:71-76.
76. Hadek, R. 1958 Intraperitoneal insemination of rabbit doe. Proc Soc Exp Biol Med, *99*:39-40.
77. Hafez, E.S.E., and R.J. Blandau 1969 The mammalian oviduct. University of Chicago Press, Chicago and London.
78. Hafez, E.S.E., and H. Kanagawa 1973 Scanning electron microscopy of the bovine reproductive tract in female. Cornell Vet. *63*:469-482.
79. Halbert, S.A., P.Y. Tam, R.J. Adams, and R.J. Blandau 1976a An analysis of the mechanism of egg transport in the ampulla of the rabbit oviduct. Gynecol. Invest. *7*: 306-320.
80. Halbert, S.A., P.Y. Tam , and R.J. Blandau 1976b Egg transport in the rabbit oviduct: the roles of cilia and muscle. Science *191*: 1052-1053.
81. Hammer, C.E. 1973 Oviductal fluid: composition and physiology. In: Greep R.O., and E.B. Astwood (eds) Handbook of physiology, Section 7, Endocrinology II. American Physiological Society, Washington DC, pp 141-155.

82. Handrow, R. R., N.L. First, and J.J. Parrish 1989, Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin: *J Exp Zool*, 252, p. 174.
83. Hawk, H.W. 1983 Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *J. Dairy Sci.* 66:2645-2660.
84. Hawk, H. W., H. H. Conley, R. J. Wall, and R. O. Whitaker. 1988. Fertilization rates in superovulating cows after deposition of semen on the infundibulum, near the uterotubal junction or after insemination with high numbers of sperm. *Theriogenology* 29:1131-1142.
85. Hirsch, V.M., and H.C.G. Townsend 1982 Peritoneal fluid analysis in the diagnosis of abdominal disorders in cattle: A retrospective study. *Can. Vet. J.* 23:348-354.
86. Horne, H.W., and J. Thibault, 1962: Sperm migration through the human female reproductive tract. *Fertil. Steril.* 13, 135-139.
87. Hovatta, O., H. Kurunmaki, A. Tiitinen, P. Lahteenmaki, and A.I. Koskimies 1990. Direct intraperitoneal or intrauterine insemination and superovulation in infertility treatment: a randomized study. *Fertil. Steril.* 54:339-341.
88. Howe, G.R. and D.L. Black 1963 Spermatozoan transport and leucocytic responses in the reproductive tract of calves. *J. Reprod. Fert.* 6:305-311.
89. Howe, G.R., and D.L. Black 1973 Autonomic nervous system and oviduct function in the rabbit. I. Hormones and contraction. *J. Reprod. Fertil.* 33:425-430.
90. Hunter, R.H.F. 1967. Polyspermic fertilisation in pigs during the luteal phase of the oestrus cycle. *J. Exp. Zool.* 165:451-460.
91. Hunter, R.H.F., and P.J. Dziuk 1968. Sperm penetration of pig eggs in relation to the timing of ovulation and insemination. *J. Reprod. Fertil.*, 15: 199-208.
92. Hunter, R.H.F. 1972. Local action of progesterone leading to polyspermic fertilization in pigs. *J. Reprod. Fertil.* 31:433-444.

93. Hunter, R.H.F., and J. P. Hall. 1974. Capacitation of boar spermatozoa: the influence of postcoital separation of the uterus and Fallopian tubes. *Anat. Rec.* 180:597-604.
94. Hunter, R.H.F. 1978 Intraperitoneal insemination, sperm transport and capacitation in the pig. *Anim. Reprod. Sci.* 1:167-179.
95. Hunter R.H.F., and P.C. Leglise 1978 Polyspermic fertilization following tubal surgery in pigs, with particular reference to the role of the isthmus. *J. Reprod Fertil* 24:233-246.
96. Hunter, R.H.F. 1981 Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *J. Reprod. Fertil.* 63:109-117.
97. Hunter, R.H.F., L. Barwise, and R. King 1982 Sperm transport, storage and release in the sheep oviduct in relation to the time of ovulation. *Br. Vet. J.* 138:225-232.
98. Hunter, R.H.F., and R. Nichol 1983 Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *J. Exp. Zool.* 228:121-128.
99. Hunter, R.H.F. 1984 Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J. Reprod. Fertil.* 72:203-211.
100. Hunter R.H.F., and Wilmut I. 1984 Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod. Nutr. Dev.* 24:597-608.
101. Hunter, R.H.F. 1988 *The fallopian tubes. Their role in fertility and infertility.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
102. Hunter, R.H.F., B. Flechon, and J.E. Flechon 1991 Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: a scanning electron microscope study. *Tissue and cell*, 23:641-656.
103. Hunter, RHF. 1996 Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilisation to avoid polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.*; 44:417-422.

104. Isla, M., G. Costa, A. Garcia Pascual, D. Triguero, and A. Garcia Sacristan 1989 Intrinsic spontaneous activity and beta-adrenoceptor-mediated tubal dilatation affect ovum transport in the oviduct of the cow. *J. Reprod. Fertil.* 85:79-87.
105. Jabbour, H.N. and G. Evans 1991 Fertility of superovulated ewes following intrauterine or oviducal insemination with fresh or frozen-thwed semen. *Reprod. Domest. Anim.* 3:1-7.
106. Johnson, A.D., and C.W. Foley 1974 The oviuduct and its functions. Academic Press, Inc. New York and London,
107. Kann, M.L., and J.P. Fouquet 1977 Bull spermatozoa in the female tract after natural mating. A preliminary ultrastructural study of uterotubal junction. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 17: 165-172.
108. Karlström P.O., T. Bergh, O. Bakos, Ö. Lindkvist, and M. Palmstierna 1991 Direct insemination-clinical results and comparison between two methods of sperm preparation. *Fertil. Steril.* 56:945.
109. Kavanaugh, J.F., and G.J. Killian 1988 Bovine oviductal cannulations. *Journal of Investigative Surgery*, 1:201-208.
110. Kavanaugh J.F., A.A. Grippo, and G.J. Killian 1992 Cannulation of the bovine ampullary isthmic oviduct. *Journal of Investigative Surgery*, 5:11-17.
111. Koninckx, P.R., I.A. Brosens, and W.H. Heyns 1974 Peritoneal fluid in female fertility and sterility. In F.K. Beller, and G.F.B. Schumacher. (eds) "The biology of the fluids of the female genital tract" pp. 415-426
112. Kopcha, M., and A.E. Schultze 1991 Peritoneal fluid. Part I. Pathophysiology and classification fo nonneoplastic effusions. *Compend. Cont. Ed.* 13:519-526.
113. Lapointe, S., I. Ahmad, M.M. Buhr, R.D. Lambert, and M.A. Sirard 1996 Modulation of postthaw motility, survival, calcium uptake, and fertility of bovine sperm by female genital products. *J. Dairy Sci.* 79:2155-2162.
114. Larsson, B., and D.K. Larsson 1985 Distribution of spermatozoa in the genital tract of artificially inseminated heifers. *Acta Vet Scand* 26:385.

115. Larsson, B. 1986 Transperitoneal migration of spermatozoa in heifers. *J. Vet. Med. A.* 33:714-718.
116. Larsson, B., and D.K. Larsson. 1986. Sperm location in the oviducts of artificially inseminated dairy cattle. *Acta Vet. Scand.* 27:303-312.
117. Lee, C.N., and R.L. Ax 1984 Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J. Dairy Sci.* 67:2006-2009.
118. Lee C.N., M.K. Clayton, S.M. Bushmeyer, N.L. First, and R.L. Ax 1986 Glycosaminoglycans in ewe reproductive tracts and their influence on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro. *J Anim Sci* 63: 861.
119. Lefebvre, R., P. J. Chenowet, M. Drost, C. T. LeClear, M. MacCubbin, J. T. Dutton, and S. S. Suarez. 1995. Characterization of oviductal sperm reservoir in cattle. *Biol. Reprod.* 53:1066-1074.
120. Lefebvre, R., and S.S. Suarez 1996 Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biol. Reprod.* 54:575-582.
121. Lefebvre, R.; M.C. Lo, and S.S. Suarez 1997 Bovine Sperm Binding to Oviductal Epithelium Involves Fucose Recognition. *Biol. Reprod.* 56:1198-1204.
122. Lesec G., H. Manhes, R.I. Hardy, E. Richard, A. Force, F. Dejardin, J.L. Montmarin, and P. Gilbert-Jeantet 1989 In-vivo transperitoneal fertilization. *Hum. Reprod.* 4:521.
123. Lineweaver, J.A., E.S. Hafez, M.H. Ehlers, W.M. Dickson, and J.R. King 1970 Sperm transport in cattle and gonadotropin-treated calves. *Cornell. Vet.* 60:372-382.
124. Lombard, L., B.M. Banner, and S.H. McNutt 1950 The morphology of the oviduct of virgin heifers in relation to the oestrus cycle. *J. Morphol.* 86:1-15.
125. LopezGatius, F. 1995 Intraperitoneal insemination in repeat-breeder cows: a preliminary report. *Theriogenology*, 44:153-158.
126. Lorton S.P., and N.L. First 1979 Hyaluronidase does not disperse the cumulus oophorus surrounding bovine ova. *Biol Reprod* 21: 301-308.

127. Maggi M., A.D. Gerazzini, S. Giannini, S. Torrisi, E. Baldi, M. Di Tomasso, P.J. Munson, D. Rodbard, and M. Serio 1988 Vasopressin and oxytocin receptors in vagina myometrium and oviducts of rabbits. *Endocrinology* 122:2970-2980.
128. Malayer J.R., P.J. Hansen, and W.C. Buhi 1988 Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus, *J Exp. Zool.* 248: 345-353.
129. Manhes, M., and Hermabessiere, J. 1985 Fécondation intrapéritoneale première grossesse obtenue sur indication masculine. Oral presentation, 3rd International Forum Andrology, Paris, June 1985.
130. Mann T 1964 The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. Methuen, London.
131. Mason, B., V. Sharma, A. Riddle, and S. Campbell 1987 Ultrasound-guided peritoneal oocyte and sperm transfer (POST). *Lancet*, 1:386
132. Mattner, P.E., and W.H. Braden, 1963: Spermatozoa in the genital tract of the ewe-I. Rapidity of transport. *Aust. J. Biol. Sci.* 16, 473-481.
133. Mattner, P.E. 1963: Spermatozoa in the genital tract of the ewe-II. Distribution after coitus. *Aust. J. Biol. Sci.* 16, 688-694.
134. Mattner, P.E. 1968 The distribution of spermatozoa and leucocytes in the female genital tract in goats and cattle. *J. Reprod. Fertil.* 17:253-261.
135. Mattner, P.E. 1969 Phagocytosis of spermatozoa by leucocytes in bovine cervical mucus in vitro. *J Reprod Fertil* 20:133.
136. Maxwell, W.M.C., G. Evans, S.L. Rhodes, and M.A. Hillard 1993 Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviducal insemination with low numbers of fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 5:57-63.
137. McDaniel, J.W., H. Scalzi, and D.L. Black 1968 Influence of ovarian hormones on histology and histochemistry of the bovine oviduct. *J. Dairy Sci.* 51:754-761.
138. McDonald, L.E., and J. Sampson 1957 Intraperitoneal insemination of the heifer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* , NY, 95:815-817.

139. McDonald, M.F., and A.R. Bellve 1969 Influence of oestrogen and progesterone on flow of fluid from the Fallopian tube in the ovariectomized ewe. *J. Reprod. Fertil.* 20:51-61.
140. McNutt, T.L., P. Olds-Clarke, A.L. Way, S.S. Suarez, and G.J. Killian 1994 Effect of follicular or oviductal fluids on movement characteristics of bovine sperm during capacitation in vitro. *J. Androl.* 15:328-336.
141. Michael, C.A., and B.M. Schofield 1969 The influence of the ovarian hormones on the actinomyosin content and the development of tension in uterine muscle. *J. Endocrinol.* 44:501-511.
142. Mitchel, J.R., P.L. Senger, and O.L. Rosenberger 1985 Distribution and retention of spermatozoa with acrosomal and nuclear abnormalities in the cow genital tract. *J. Anim. Sci.* 61: 956.
143. Mroueh, A., and L. Mastroianni 1966 Insemination via the intraperitoneal route in rabbits. *Fertil. Steril.* 17:76-82.
144. Negobatikov, G., V. Zhirnokleev, and S. Zarudnev 1981 An experiment on paragenital insemination of sheep. *Zhivotnovodstvo*, 1:54-56.
145. Nilsson, O., and S. Reinus 1969 Light and electron microscopic structure of the oviduct. In Hafez, E.S.E., and R.J. Blandau *The mammalian oviduct.* University of Chicago Press, Chicago and London, pp 57-85.
146. Nilsson, O. 1972 Ultrastructure of the process of secretion in the rat. Uterine epithelium at preimplantation. *J. Ultrastruct. Res* 40: 572-580.
147. Norwood, J.T., and G.W. Anderson 1980 Evidence that adhesive sites on the tips of oviduct cilia membranes are required for ovum pickup in situ. *Biol. Reprod.* 23:788-791.
148. Odor, D.L. 1954 Observations of the rat mesothelium with the electron and phase microscopes. *A. Am. J. Anat.* 95:433-465.
149. Overstreet, J.W. and G.W. Cooper 1975 Reduced sperm motility in the isthmus of the rabbit oviduct. *Nature*, 258:718-719.
150. Overstreet, J.W., and G.W. Cooper 1978 Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit: I. The rapid transit phase of transport. *Biol. Reprod.* 19:101-114.

151. Overstreet, J.W., G.W. Cooper, and D.F. Katz 1978 Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit: II. The sustained phase of transport. *Biol. Reprod.* 19:115.
152. Owman, C.H., E. Rosengren, and N.O. Sjöder 1967 Adrenergic innervation of the human female reproductive organs: a histochemical and chemical investigation. *Obstet. Gynecol.* 30: 763-773.
153. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, R.R. Handrow, M.M. Sims, and N.L. First 1989 Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod.* 40:1020-1025.
154. Pauerstein, C.J., B.J. Hodgson, and M.A. Kramen 1974 The anatomy and physiology of the oviduct. In Wynn RM (ed). *Obstet. Gynecol. Annual.* Vol 3. Appleton-Century-Crofts, New York, pp 137-201.
155. Pauerstein, C.J., and C.A. Eddy 1979 The role of the oviduct in reproduction; our knowledge and our ignorance. *J. Reprod. Fertil.* 55:223-229.
156. Pfeiffer, C.J., D.C. Pfeiffer, and H.P. Misra 1987 Enteric serosal surface in the piglet. A scanning and transmission electron microscopic study of the mesothelium. *J. Submicrosc. Cytol.* 19:237-246.
157. Pollard, J.W., C. Plante, W.A. King, P.J. Hansen, K.J. Betteridge, and S.S. Suarez 1991 Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. *Biol. Reprod.* 44:102-107.
158. Ragni, G., A. Lenzi, L. Gandini, C. Cristiani, G.C. Lombroso, M.D. Olivares, H. Wyssling, F. Dondero, and P.G. Crosignani 1993 Lack of immunization after intraperitoneal insemination of spermatozoa. *Andrologia.* 25:3-5.
159. Raychoudhury S.S., and S.S. Suarez 1991 Porcine sperm binding to oviductal explants in culture. *Theriogenology* 1991 36:1059-1070.
160. Renegar R.H., and C.E. Rexroad jr 1990. Uterine adrenergic and cholinesterase-positive nerves and myometrial catecholamine concentrations during pregnancy in sheep. *Acta Anat (Basel)* 137: 373-381.
161. Restall, B.J. 1966 The fallopian tube of the sheep. II. The influence of progesterone and oestrogen on the secretory activities of the fallopian tube. *Aust. J. Biol. Sci.* 19:187-197.

162. Revelli, A., G. Soldati, J. Stamm, M. Massobrio, E. Topfer Petersen, and M. Balerna 1992 Effect of volumetric mixtures of peritoneal and follicular fluid from the same woman on sperm motility and acrosomal reactivity in vitro. *Fertil. Steril.* 57:654-660.
163. Reynolds, S.R.M. 1949 *Physiology of the uterus* (ed. 2) New York, Hoeber.
164. Rigby, J.P. 1968 The length of the uterine horn and fallopian tube. *Res. Vet. Sci.* 9:551-556.
165. Roark D.B., and H.A. Herman 1950 Physiological and histological phenomena of the bovine estrual cycle with special reference to vaginal-cervical secretions. *Mo Agr Exp Sta Bull* 455.
166. Roberts, G.P., J.M. Parker, and H.W. Symonds 1975 Proteins in the luminal fluid from the bovine oviduct. *J. Reprod. Fertil.* 45:301-313.
167. Rodríguez-Martínez, H. 1984 Effect of adrenergic agents on the in vitro motility of porcine oviducts. *Zbl Vet Med A* 31: 91-194
168. Rowlands, I.W. 1957 Insemination of the guinea-pig by intraperitoneal injection. *J. Endocrinol.* 16:98-106.
169. Rowson, L.E.A. 1955 The movement of radio-opaque material in the bovine uterine tract. *Bri. Vet. J.* 111:334.
170. Ruckebusch, Y., and F. Bayard 1975 Motility of the oviduct and uterus of the cow during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 43:23-32.
171. Seracchioli, R., C. Melega, A. Maccolini, M. Cattoli, C. Bulletti, L. Bovicelli, and C. Flamigni 1991 Pregnancy after direct intraperitoneal insemination. *Hum. Reprod.* 6:533-536.
172. Sharma, V., B. Mason, G. Pinker, A. Riddle, J. Pampiglione, N. Ford, and S. Campbell 1987 Ultrasound-guided peritoneal oocyte and sperm transfer. *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer* 4: 89.
173. Shinohara, H., T. Nakatani, and T. Matsuda 1985 The presence of lymphatic stomata in the ovarian bursa of the Golden Hamster. *Anat. Rec.* 213:44-52.
174. Skjerven, O. 1955 Conception in a heifer after deposition of semen in the abdominal cavity. *Fertil. Steril.* 6:66-67.

175. Smith, T.T. and R. Yanagimachi 1991 Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J. Reprod. Fertil.* 91:567-573.
176. Soldati, G.A., A. Piffaretti Yanez, G. Medici, U. Eppenberger, and M. Balerna 1993 Purification of a factor from human peritoneal fluid that is able to immobilize spermatozoa. *Hum. Reprod.* 8:428-436.
177. Soloff, M.S. 1975 Oxytocin receptors in rat oviduct. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65: 205-212.
178. Stylianou E., L.A. Jenner L.A., M. Davies, G.A. Coles, and J.D. Williams 1990 Isolation, culture, and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney International* 37: 1563-1570.
179. Suarez, S.S. 1987 Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ. *Biol. Reprod.* 36:203-210.
180. Suarez, S.S. 1989 Sperm motility in the oviduct. In "Fertilization in mammals". Bavister B.D., Cummins J., Roldan E.R.S. (eds). Serono Symposia, Norwell, Massachusetts pp:111-124.
181. Suarez, S.S., M. Drost, K. Redfern, and W. Gottlieb 1990 Fertilization in the oviduct. In Bavister B.D. Cummins J., Roldan E.R.S. (eds): "Fertilization in mammals" Norwell M.A.: Serono symposia, pp 111-114.
182. Suarez, S.S., K. Redfern, P. Raynor, F. Martin, and D.M. Phillips 1991 Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct in vitro: possible role in formation of a sperm reservoir. *Biol. Reprod.* 44:998-1004.
183. Suarez, S.S., K. Brockman, and R. Lefebvre 1997 Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. *Biol. Reprod.* 56:447-453.
184. Thomas, P.G., B.A. Ball, G.G. Igotz, I. Dobrinski, J.E. Parks, and W.B. Currie 1997 Antibody directed against plasma membrane components of equine spermatozoa inhibits adhesion of spermatozoa to oviduct epithelial cells in vitro. *Biol. Reprod.* 56:720-730.
185. Tiemessen, C.H., R.S. Bots, M.F. Peeters, and J.L. Evers 1997 Direct intraperitoneal insemination compared to intrauterine insemination in

- superovulated cycles: a randomized cross-over study. *Gynecol. Obstet. Invest.* 44:149-152.
186. Topley, N., and J.D. Williams 1994 Role of the peritoneal membrane in the control of inflammation in the peritoneal cavity. *Kidney International* 46:S1-S8.
187. Tsilibary, E.C., and S.L. Wissing 1977 Absorption from the peritoneal cavity: SEM study of the mesothelium covering the peritoneal surface of the muscular portion of the diaphragm. *J. Anat.* 149:127-133.
188. Tsilibary, E.C. and S.L. Wissing 1987 Light and electron microscope observations of the lymphatic drainage units of the peritoneal cavity of rodents. *Am. J. Anat.* 180:195-207.
189. Turhan, N.O., P.G. Artini, G. D'Ambrogio, F. Droghini, A. Volpe, and A.R. Genazzani 1992 Studies on direct intraperitoneal insemination in the management of male factor, cervical factor, unexplained and immunological infertility. *Hum. Reprod.* 7:66-71.
190. Van Hinsbergh, V.W.M., T. Kooistra, M.A. Scheffer, J.H. Van Bockel, and G.N.P. Van Muijen 1990 Characterisation and fibrinolytic properties of human omental tissue mesothelial cells. Comparison with endothelial cells. *Blood* 75: 1490-1497.
191. Van Pelt, L.F. 1970 Intraperitoneal insemination of *Macaca Mulata*. *Fertil. Steril.* 21:159-162.
192. Vandemark, N.L., and A.N. Moeller 1951 Speed of spermatozoan transport in reproductive tract of estrus cow. *Am. J. Physiol.* 165:674-679.
193. Varner, D.D., D.W. Forrest, F. Fuentes, T.S. Taylor, R.N. Hooper, S.P. Brinsko, and T.L. Blanchard 1991 Measurement of glycosaminoglycans in follicular, oviductal and uterine fluids of mares. *J Reprod Fertil* 44: 297.
194. Versalius, A. 1543 *De humani corporis fabrica libri septem*. Basel.
195. Von Ott, D. 1925 Eine neue Methode zur Prüfung der tuberdurchgängig Keit. *Zentralbl. Gynäk.*, 1:546.
196. Wasserman, P.M. 1994 Gamete interactions during mammalian fertilization. *Theriogenology* 41: 31-44.

197. Wegner, C.C., and G.J. Killian. 1992. Origin of oestrus-associated glycoproteins in bovine oviductal fluid. *J. Reprod. Fertil.* 95:841-854.
198. Wilhelmsson, L., and B. Lindblom 1980 Adrenergic responses of the various smooth muscle layers at the human uterotubal junction. *Fertil Steril* 33: 280-282.
199. Whitney, M.S., A.J. Roussel, and D.J. Cole 1999 Cytology in bovine practice: solid tissue, pleural fluid, and peritoneal fluid specimens. *Veterinary Medicine*, 94:277-289.
200. Wilmut, I., and R.H.F. Hunter 1984 Sperm transport into the oviducts of heifers mated early in oestrus. *Reprod. Nutr. Dev.* 24:461-468.
201. Woodruff, J.D., and C.F. Pauerstein 1969 The history of the fallopian tubes. In: *The Fallopian tube. Structure, function, pathology, and management.* J.D. Woodruff and C.J. Pauerstein, eds. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1-8.
202. Wrobel, K.H., and R. Kujat 1993 The bovine tubouterine junction: general innervation pattern and distribution of adrenergic, cholinergic, and peptidergic nerve fibers. *Cell Tissue Res*, 274:493-501.
203. Wrobel, K.H., R. Kujat, and G. Fehle 1993 The bovine tubouterine junction: general organization and surface morphology. *Cell Tissue Res*, 271:227-239.
204. Yanagimachi R. 1981 Mechanisms of fertilisation in mammals. In L. Mastroianni, J.D. Biggers (eds): "Fertilisation and Embryonic Development In Vitro." New York: Plenum Press, pp 81-82.
205. Yanagimachi R. 1988 Mammalian fertilisation. In E. Knobil, J. Neill (eds): "The Physiology of Reproduction", 2nd. Ed. New York: Raven Press, pp 135-185.

CAPÍTULO 3

Objetivos

3

Objetivos

El presente trabajo tiene como objetivo general la descripción de las características morfológicas y funcionales de la mucosa oviductal y mesotelio peritoneal en la vaca, y se ha estructurado en los siguientes objetivos específicos.

- 1.** Describir la anatomía funcional de la mucosa oviductal de la vaca a lo largo del ciclo sexual y evaluar las implicaciones en el transporte de los gametos .
- 2** Estudiar las peculiaridades de la superficie serosa que recubre el tracto genital de la vaca y ligamentos asociados y evaluar las implicaciones en el transporte de espermatozoides tras la inseminación intraperitoneal.
- 3** Estudiar el efecto de la vitalidad espermática y el número de espermatozoides en el transporte retrógrado de los mismos tras la inseminación intraperitoneal.

CAPÍTULO 4

Study of the Functional Anatomy of Bovine Oviductal Mucosa

Jesus L. Yaniz¹, Fernando Lopez-Gatius¹, Pilar Santolaria² and
K. June Mullins³

¹Dept de Producción Animal. Universidad de Lleida. 25198 Lleida. Spain.

²Dept. Producción Animal. E.U. Politécnica de Huesca, 22071 Huesca, Spain.

³Dept. of Dairy Science. Virginia Polytechnic Institute and State University,
Blacksburg, Virginia 24061

(Anatomical Record; submitted for publication)

4

Study of the Functional Anatomy of Bovine Oviductal Mucosa**ABSTRACT**

The oviducts of 36 cyclic cows were examined to study the structure of the oviductal mucosa. Oviducts were divided into 12 equal segments for analysis. The oviductal infundibulum is an asymmetric funnel shaped structure surrounding the ostium. It is divided along the free border of the mesosalpinx and presents one wide and one narrow side. The mucosa of the wide side possesses a system of low interconnected cords that converge distally forming primary folds. The folds in the narrow side start sharply from the free margin and fuse toward the ostium abdominale. Areas between folds throughout the lumen of the bovine oviduct show a high degree of complex organization. Interfold spaces are occupied by secondary and small interconnected folds which join to form a system of cul-de-sacs. In the infundibulum, these cul-de-sacs open toward the ovary, while cul-de-sacs present in the caudal isthmus and in the UTJ open toward the uterus. Marked cyclic, regional and interregional changes were observed in the epithelium of the oviducts studied. In the follicular phase, the secretory cells increase in number and prominence toward basal areas between folds, and within pockets and cul-de-sac areas of the infundibulum and ampulla. Although these differences decrease in caudal segments, the epithelium covering basement areas of some isthmus pockets contain groups of bleb secretory cells. Near to the time of ovulation, numerous spermatozoa were found in the periphery of the caudal isthmus within pockets of basal interfold areas, as well as within pockets and cul-de-sacs of the tubo-uterine junction. Individual spermatozoa were also observed in peripheral areas of the ampullary-isthmus junction and ampulla. Marked variations were observed in the bovine oviductal mucosa depending on the

oviductal segment, basal or apical areas of the folds, and phase of the oestrus cycle.

Key words: Oviduct, Mucosal arrangement, Epithelial changes, Sperm Transport, Bovine

INTRODUCTION

The oviductal mucosa takes part in events that determine reproductive success, such as gamete transport, fertilization and early embryonic development. The luminal surface of the oviduct is thrown up throughout its length into primary and secondary folds. The former are longitudinal while the latter extend deep into the lumen and branch in different directions (Abdalla, 1968). The degree of folding is most pronounced in the infundibulum and is progressively lower and less complex toward the isthmus (Lombard et al., 1950). Historically, descriptions of oviductal anatomy have been based on the study of two dimensional sections and have been centered on the number, height and complexity of branching longitudinal folds. Recently, the belief that the caudal isthmus and utero-tubal junction (UTJ) act as a functional sperm reservoir have increased research interest in this region. Using Scanning Electron Microscopy, Hunter et al. (1991) depicted the pattern of folds, ridges, grooves and furrows in the bovine UTJ and caudal isthmus and claim that these structures could provide an obstacle for ascending spermatozoa. Additionally, Wrobel et al (1993), have shown a system of lateral outpocketings with short tubuloalveolar crypts in the bovine UTJ. However, a clearly defined three-dimensional model has not been established for the complete bovine oviduct. Such a model would preclude the development of a concept of gamete transport across this organ in relation to the mucosa. The following study was undertaken to clarify the structure of the bovine oviductal mucosa with reference to follicular and luteal phases of the estrus cycle.

MATERIALS AND METHODS

Three procedures were utilized to examine anatomical features of the bovine oviduct. These included stereomicroscopy, scanning electron microscopy (SEM) and model reconstruction of tracings from serial sections.

Animals

Sixty-two oviducts from 31 adult Friesian cows were obtained 15-30 min. after slaughter in an abattoir. The animals were classified according to phases of the oestrus cycle: estrus (day 1), postestrus (days 2-4), diestrus (days 5-15) and proestrus (days 16-21), based on ovarian and genital tract findings as well as serum progesterone levels (Grunert, 1982). Eight animals in estrus, five in postestrus, thirteen in interestrus and five in proestrus were examined.

Scanning electron microscopy

Samples were prepared for scanning electron microscopy (SEM) as follows: the oviducts were removed and placed in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4). After they had been dissected free of the mesosalpinx and infundibulo-cornual ligament, the Fallopian tubes were opened longitudinally with scissors, spread on a flat surface, and divided into 12 equal segments. The tissue specimens were totally immersed in 2.5% glutaraldehyde (Prolabo, Fontenay S/ Bois, France) in PBS (pH 7.4) for 24 h. Fixed tissue was rinsed in PBS (pH 7.4), postfixed in 1% osmium tetroxide (Merk, Darmstadt, Germany) in PBS for 2h. and washed again in PBS buffer. Fixation and washing were carried out at 4° C and then the tissues were dehydrated in graded ethanol (25-100%) and substituted with acetone. Specimens were then subjected to critical-point drying (Anderson, 1951) using liquid CO₂ substitution. Dehydrated specimens were mounted on aluminium stubs, coated with carbon and gold in a Balzers sputter coater (Liechtenstein), then examined and photographed in a Zeiss DSM 940 (Oberkochen, Germany)

SEM at 15 kV. Approximately 600 blocks were examined in this study.

Stereomicroscopy

Oviducts were dissected and fixed as above, and then immersed in a 0.1 M phosphate buffer solution. The mucosal regions were then observed throughout the length of the oviduct with a Leyca stereomicroscope.

Model reconstruction

Sets of 20-25 serial sections (5 μm) stained with hematoxylin and eosin were taken at 20 μm intervals from the isthmus, ampullary-isthmic junction and the ampulla regions of the oviduct. Mucosal tracings were then made (approximately 40X) and aligned with respect to paired fiducial points between sheets of 3.18 mm pleixiglas (Mullins and Saacke, 1989). Artistic rendition was based in model reconstruction as well as on stereomicrographs of oviductal surfaces. Oviducts for this purpose were opened longitudinally, fixed intact, without dividing into segments, in Bouins fixative and stained with hematoxylin for 10 minutes. Samples were then submerged in 70 % ethanol for observation and photomicrography.

Sperm transport

The general distribution of spermatozoa within the oviductal mucosa was studied in five additional cows. After palpation per rectum of a normal corpus luteum, estrus was synchronized with a luteolytic dose of cloprostenol (500 mg, im; Estrumate, Shering Plough Animal Health) (Lopez-G 1989, Lopez-G and Vega-Prieto 1990). Estrus, detected by direct observations of the behavior of the animals, was confirmed per palpation by rectum at the time of insemination (López-G and Camón-Urgel, 1991). The cows were artificially inseminated 12 to 24 h after onset of estrus with two straws of sperm deposited deep into the uterine

horns. Each unit of frozen semen contained approximately 45 million spermatozoa from a commercial bull of proven fertility. After insemination, the cows were left undisturbed before being transported to a local abattoir for slaughter 24-26 h post insemination. Three animals had ovulated at the time of slaughter.

All oviducts were collected. Three animals (6 oviducts) were prepared for histology and two (4 oviducts) for scanning electron microscopy (SEM). SEM samples were prepared as described above. Samples were prepared for histology by dissecting away the serosa, from the intact oviducts. Segments approximately 2 cm long were taken from the center of the ampulla, the ampullary-isthmic junction, the caudal isthmus (adjacent to the UTJ) and from the UTJ. They were then fixed in Bouin's fixative for 24 hours, dehydrated in ethanol and embedded in paraffin. Segments were sectioned in both longitudinal and cross section at a thickness of 5 μm and stained with hematoxylin and eosin for localization of spermatozoa.

RESULTS

The overall structure of the oviductal mucosa was closely comparable in all specimens examined. However, in agreement with others studies, individual variation occurred in the amplitude of folds, which was maximum in the follicular phase and decreased following estrus.

Infundibulum

The infundibulum in the cow is an asymmetric funnel shaped structure with a wide and a narrow side. These structures are aligned along a plain that includes the medial binding of the mesosalpinx, the lateral insertion of the infundibulo-cornual ligament and the ostium abdominale (Fig. 1).

The mucosa of the fimbriated end of the wide side is distinguished by small cords, which originate in the undulated anterior border (Fig. 2). Some of these cords form a net between folds and others converge distally forming longitudinal folds that fuse and increase in height before the ostial opening (Fig. 3). The mucosa of the narrow side exhibits numerous and tortuous folds that increase sharply in height from the free margin and converge toward the ampulla (Fig. 4). Transitional areas between the wide and narrow sides exhibit high longitudinal folds. The mucosa in the medial and lateral edges of the wide side exhibits three to eight tall longitudinal undulations.

Secondary folds run obliquely in the lateral walls of primary folds and branch toward basal areas between folds with a slope that creates the formation of cul-de-sacs with their opening usually pointing in an ovarian direction (Fig. 3). Furthermore, secondary folds tend to angle from basement toward apical areas of the primary folds as they progress in a direction from the ostium to the free margin (Fig. 3).

The basement area between primary folds show a great degree of organization as a net of oval shaped pockets, which appear to be formed by extensions of secondary folds as well as other mucosal projections. Contained within these oval wells are rows of small shallow grooves (Fig. 5).

The epithelium of the infundibulum in follicular phase samples exhibit prominent and numerous ciliated cells in apical areas of the folds (Fig. 6). However, the number and protrusion of secretory cells is increased in the complex net-like structures and pockets within basal areas between folds (Fig. 7). In late luteal phase samples, the population of ciliated cells decreases while bulbous processes of secretory cells are predominant throughout all areas of the epithelial surface.

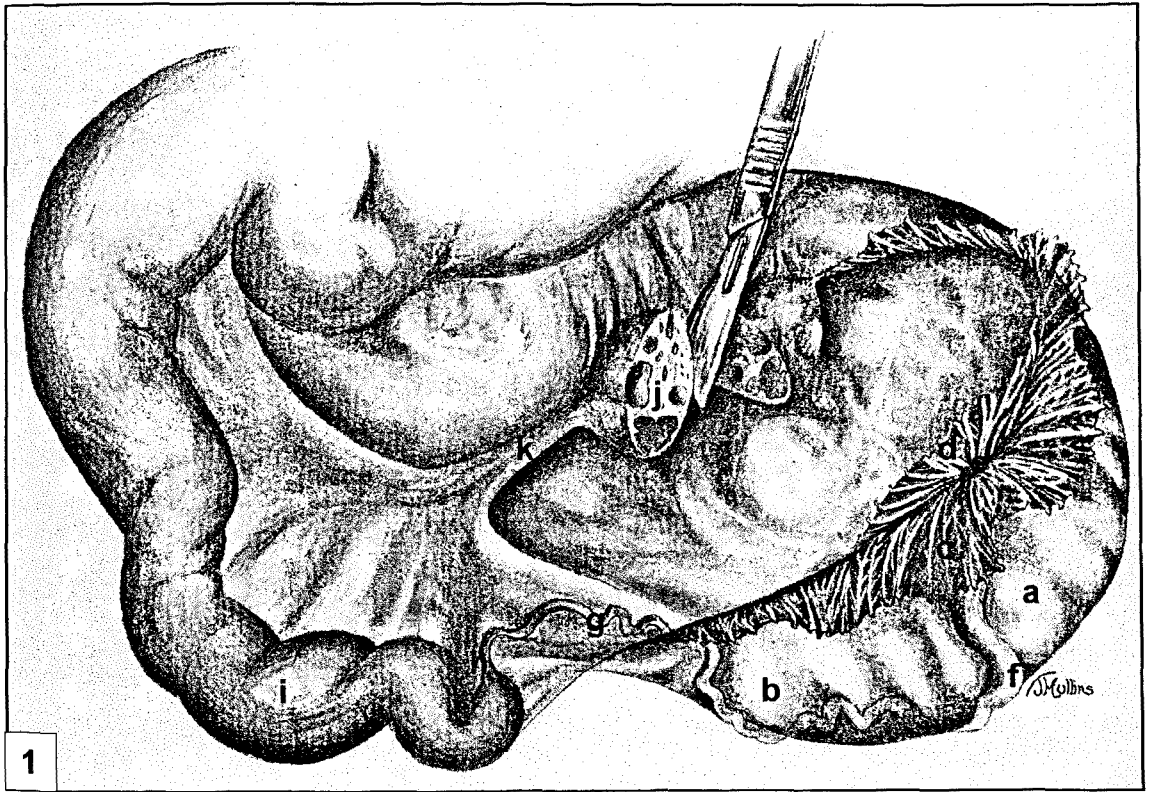
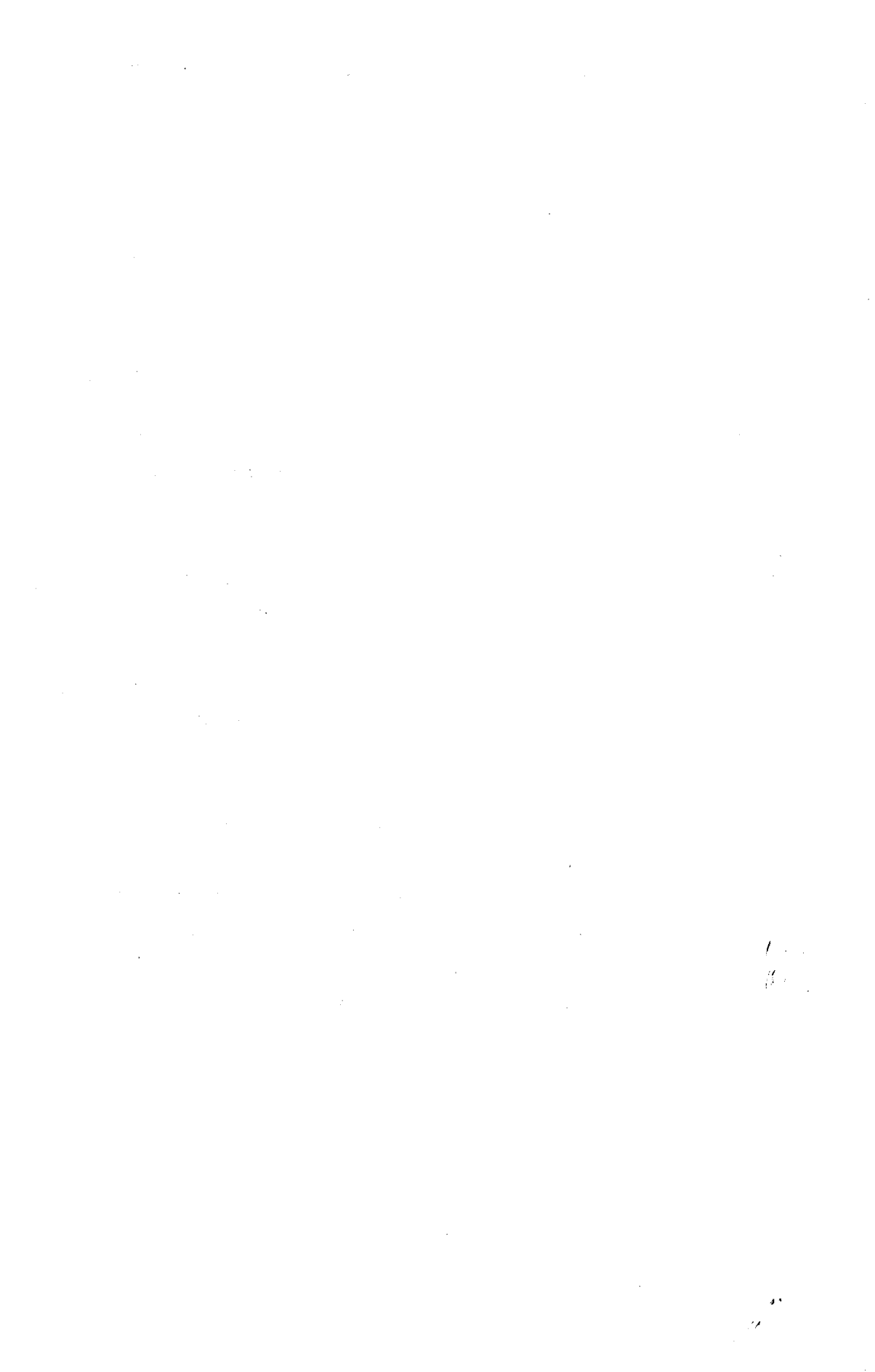


Fig. 1. Illustration of the bovine oviduct and adjacent structures. a Mesosalpinx; b infundibulo-cornual ligament; c wide side of the infundibulum; d narrow side of the infundibulum; e ostial opening; f ampullar portion of the oviduct; g isthmic portion of the oviduct; h tubo-uterine junction; i uterine horn; j ovary; k proper ligament of ovary (June Mullins)



Ampulla

Longitudinal undulated folds from the infundibulum converge and enter the ampulla forming 6-10 high prominent primary folds (900 to 1300 μ m) that alternate with less prominent, lower folds (300 to 500 μ m) (Fig. 8). Some primary folds may occasionally disappear within the ampulla, while other branch, filling in the vacated space. The number and height of primary fold complexes decrease toward the ampullary-isthmic junction. Small transverse rib-like ridges originating on lateral walls of adjacent folds frequently connect in basal areas bordering pockets and cul de sac like structures. Secondary branching and divergent folds occur frequently and occasionally merge or disappear. These secondary folds in the ampulla run obliquely along the lateral walls of primary folds in the same basal to apical orientation as occurs in the infundibulum.

In the ampulla, the basement area between longitudinal folds is characterized by a complex system of small interconnected folds (Figs. 8, 17a). Between mucosal projections, deep hollows are formed which decrease in diameter distally. Tridimensional reconstruction and SEM observations indicate a high degree of organization within these regions which often appear as oval shaped pockets. These pockets appear to be bordered by extensions of lateral secondary folds extending from the walls of adjacent primary folds. Oval pockets are nonoriented and contain rows of shallow furrow-like folds and grooves (Figs. 9, 17a).

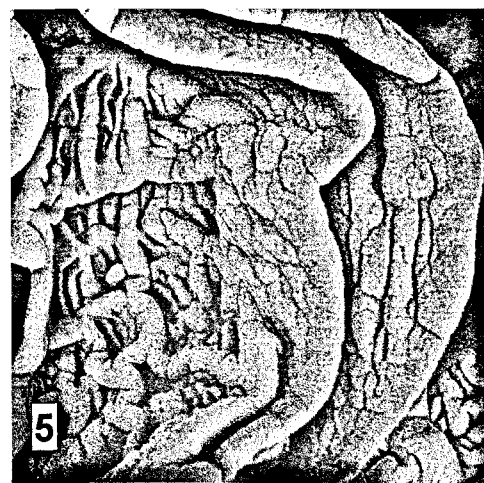
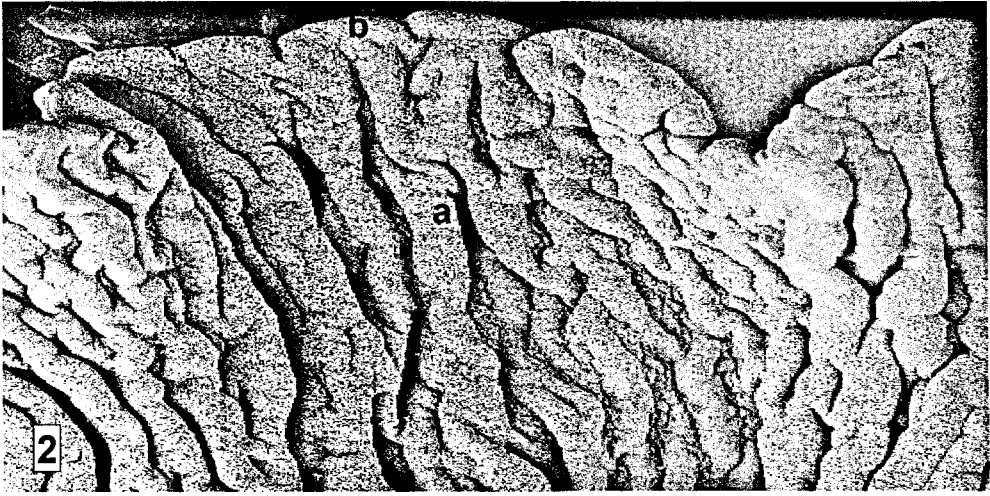
The epithelium of the distal ampulla in both follicular and luteal phase oviducts is similar in appearance to that described in the infundibulum. However, differences between phases of the oestrus cycle and between basal and apical areas of the folds decrease toward the caudal ampulla, where fewer secretory cells are evident.

Fig. 2. Fimbrial margin from the wide side of the infundibulum. Numerous low and interconnected cords (a) start in the free and undulated border (b). SEM, postestrus. x 31

Fig. 3. Portion of the wide side of the infundibulum. Note the distal evolution of cords (a) forming both primary folds (b) and a net between folds (c). Note also the caudal evolution of primary folds that fuse (d) and increase in height (e) and the orientation of secondary folds along their lateral walls (f). A system of pockets (g) and cul-de-sacs with their open end pointing to the ovary (arrow) are visible in the spaces between folds. SEM, estrus. x 7.

Fig. 4. High and tortuous primary folds (a) that start sharply from the free border (b) may be seen in the narrow side of the infundibulum. The distal convergence of folds (c) and the system of pockets, with rows of small folds in basal regions are also visible in the spaces between folds (d). SEM, postestrus. x 17

Fig. 5. More detailed view of the pockets formed between the infundibular primary folds. The rows of small folds in the bases of the pockets are clearly visible. SEM, postestrus. x 43.



Ampullary-isthmic junction (AIJ).

The mucosa of this region forms folds of moderate size interconnected by relatively short lateral branches and with bifurcations (Fig. 10). The lateral folds have become shallow and are organized in rows which occur nearly perpendicular to the primary folds, often creating a "tooth-like" appearance (Figs. 10, 17b). A typical characteristic of this oviductal segment is the irregular topical outline of longitudinal primary folds (Figs. 10,11).

The spaces between folds are occupied by irregular grooves which lack the net-like or oval pocket organization apparent in the ampulla. Irregular folds in the bases of these areas occasionally fuse forming crypts, as is shown in figs 10 and 11.

The epithelium in this segment is transitional with the ampulla and isthmus, showing less variation between phases of the oestrus cycle or apical to basal differences than is apparent in the infundibulum or ampulla.

Isthmus

The mucosa of the isthmus is furrowed longitudinally into 4-6 low and thick primary folds (Figs 12-14). Convergence or divergence of primary folds is less frequent in the isthmus. Secondary branching from lateral walls of each primary fold in the isthmus form oblique angles which initiate in apical areas and progress toward basement areas of the folds in a direction from the UTJ to the ostium. This direction is opposed to the angular direction of lateral folds observed in the ampulla and infundibulum (Figs. 14, 17c). Orientation of secondary folds become more transverse toward the AIJ (Fig. 12) and more oblique toward the UTJ (Fig. 14)




Fig. 6. Epithelial surface in the apical area of a primary infundibular fold from an estrus sample. This view shows the predominance of ciliated cells over secretory cells which are partially concealed by the surrounding cilia. Ciliated cells (c) and secretory cells (s) are apparent. SEM, estrus. x 1720.

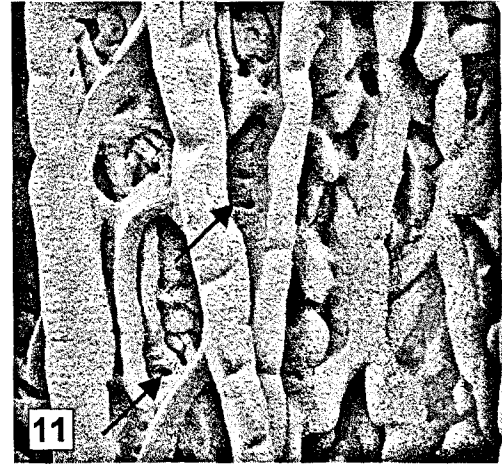
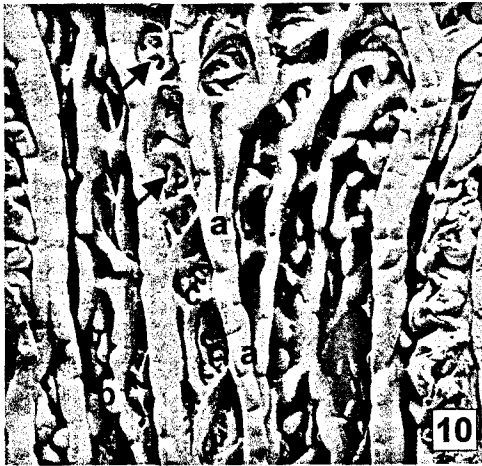
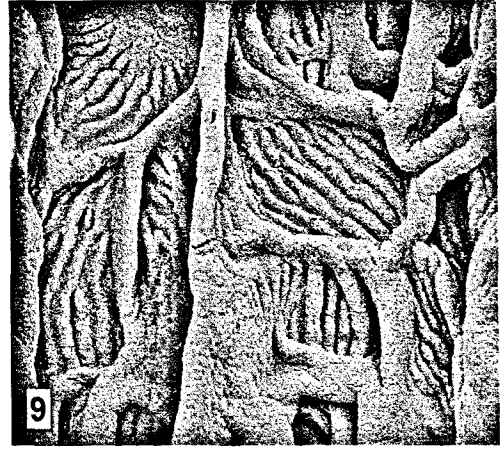
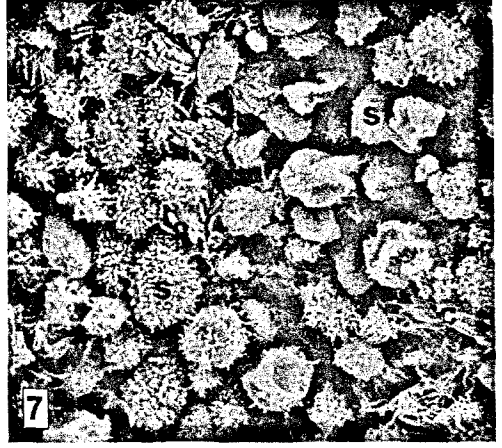
Fig. 7. Epithelial surface lining the pockets formed between folds from the same cow in estrus. Note predominance of bleb secretory cells. Ciliated cell (c), secretory cell (s). SEM, estrus. x 1720.

Fig. 8. Ampullary portion of the oviduct. This micrograph illustrates the size variation of longitudinal folds, high(a) and medium or low (b), the orientation of secondary folds along their walls (c) and the complex system of pockets in the spaces between folds (d). SEM, estrus. x 19.

Fig. 9. More detailed view of the pockets formed between folds. The rows of small folds in the bases of the pockets are clearly shown. SEM, postestrus. x 48.

Fig. 10. This micrograph of the ampullary-isthmic junction illustrates the numerous divergences of folds (a), the irregular outline of folds forming round-shaped luminal projections (b) and the orientation of secondary folds (c), almost perpendicular to primary folds. Also visible are the pockets formed in spaces between folds (d) including crypts in their bases (arrow). SEM, postestrus. x 17.

Fig. 11. A higher magnification micrograph of the ampullary-isthmic junction showing the narrow crypts in the base of the pockets (arrow) and the irregular outline of primary folds. SEM, postestrus. x 34



Numerous shallow pockets are apparent in basal areas between primary longitudinal folds creating a honeycomb-like appearance. The bases of the pockets are flat and occasionally contain the opening of tight crypts (Figs. 12-14). Caudal orientation of pockets openings increase toward the uterus (Fig. 14).

The epithelium of the isthmus shows little change in the degree of ciliation between phases of the estrous cycle in the apical areas or along walls of primary folds. However, pockets within basement areas exhibit an apparent deciliation during metaestrus and diestrus (fig 13). Additionally, the epithelium covering the basement areas of some pockets contain groups of bleb secretory cells during estrus and diestrus (Fig. 15).

Utero-tubal junction (UTJ)

Figure 16 illustrates a general organization of the bovine UTJ. Note the prominent oblique orientation of secondary folds extending from the walls of primary folds into basement regions. Their slope appears to culminate in the formation of cul-de-sacs with their opening pointing in uterine direction. This orientation is as opposed to that observed in the infundibulum (see fig. 3). Areas between folds are occupied by shallow oval pockets with narrow crypts and the opening of the first uterine glands. In the caudal area of the UTJ, the folds appear flat and wide and diminish toward the uterine apex.

Sperm Transport

Hematoxylin-stained sections showed spermatozoa in the caudal isthmus and UTJ of all the inseminated the oviducts studied, with a predominant distribution in basement areas. Fig. 18 shows a longitudinally-sectioned crypt in the caudal isthmus with a group of spermatozoa in the lumen alligned parallel to the walls. No spermatozoa were found cranial to the isthmus.

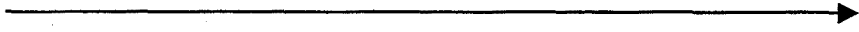


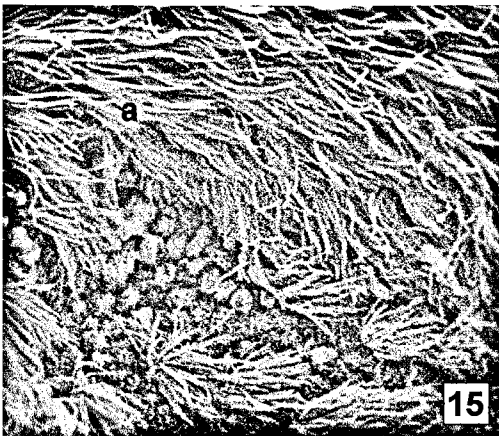
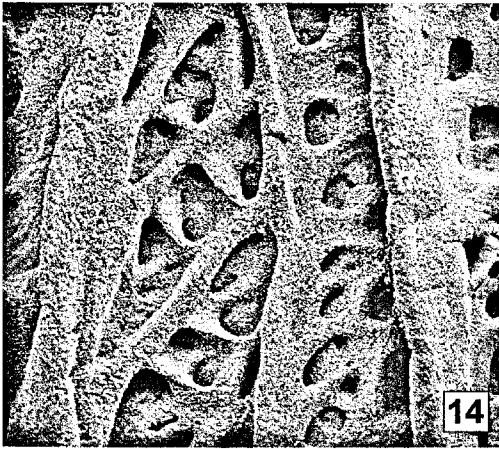
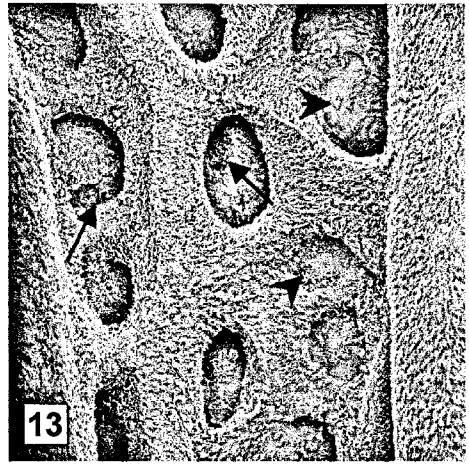
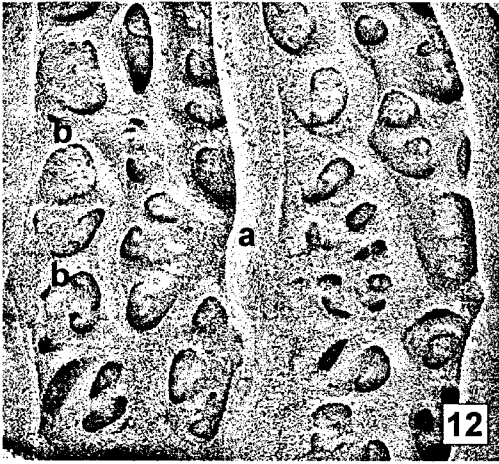
Fig. 12. Luminal surface of the upper isthmus showing the low thick, and rounded primary folds (a), the almost perpendicular or slightly oblique orientation of secondary folds (b), and the system of pockets between parallel-running longitudinal folds (c). SEM, postestrus. x 62

Fig. 13. A higher magnification micrograph of the upper isthmus showing narrow crypts in the basal areas of the pockets (arrows), and ciliated cells covering the entire surface, except for areas in the base of pockets (arrowheads). SEM, postestrus. x 159

Fig. 14. Luminal surface of the lower isthmus showing the clearly oblique orientation of secondary folds and the system of pockets between parallel-running longitudinal folds. SEM, postestrus. x 67.

Fig. 15. In the isthmus, non-protruding secretory cells are partially concealed by the cilia (a), except in the basement area of some pockets (b) from animals in estrus and postestrus. SEM, estrus. x 1720.

Fig. 16. Surface morphology of the utero-tubal junction, opened longitudinally. The arrangement of secondary folds forming cul-de-sacs with their opening pointing to the uterus is visible between terminal primary folds. The spaces between folds are occupied by superficial pockets with crypts in their bases. SEM, postestrus. x 13



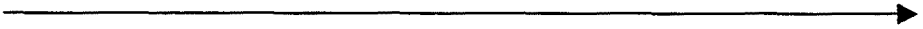
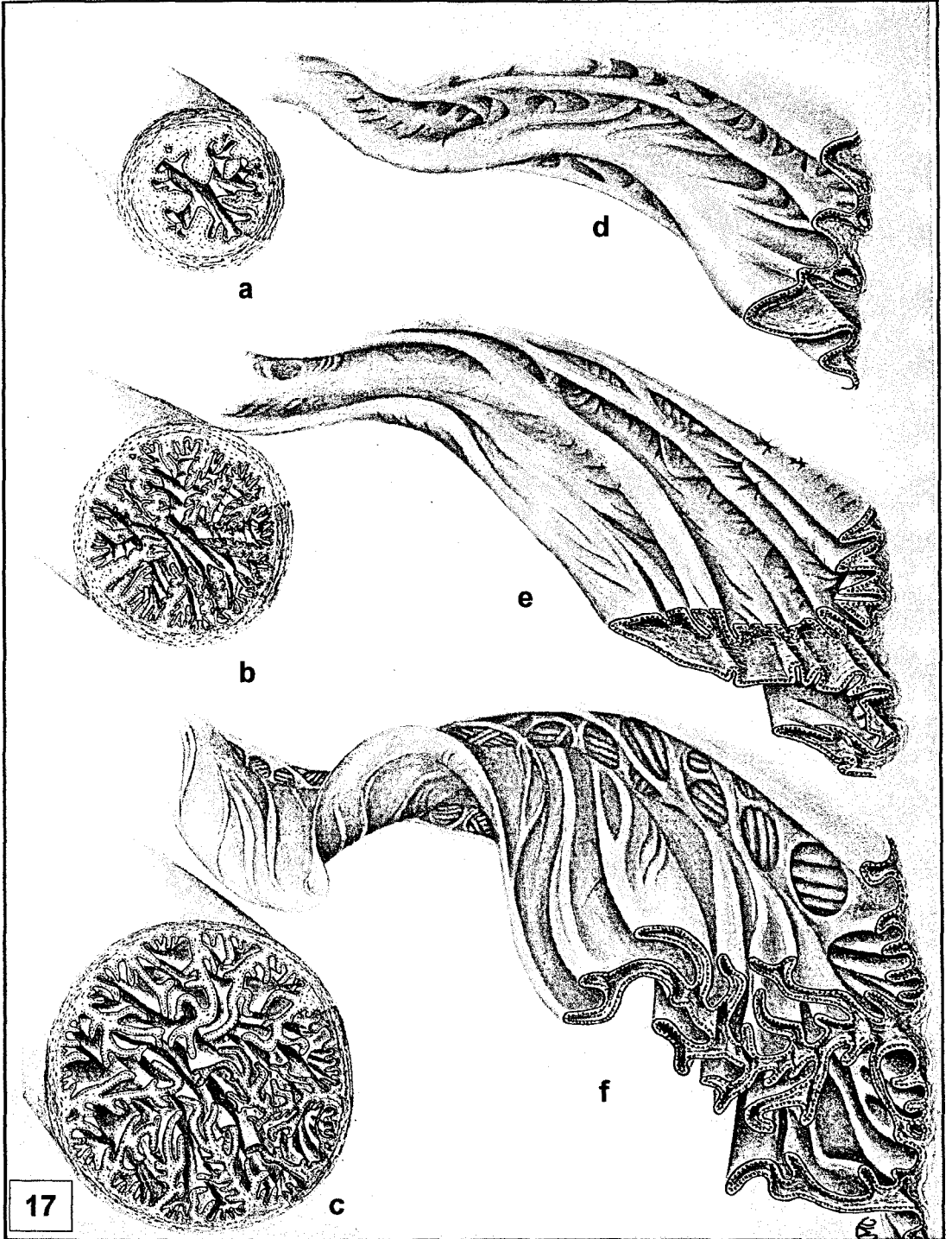


Fig. 17. Illustrations based on model reconstruction and stereo microscopic examination of surface stained specimens. Cross sections through the isthmus (a), the AIJ (b) and the ampulla (c) demonstrate the comparative increase in diameter from isthmus to ampulla, as well as the increase in the relative height of the folds within each. A longitudinal segment of one representative primary fold including the basement area from the isthmus (d), the AIJ (e), and the ampulla (f) demonstrate the comparative differences of directional secondary folds along the lateral walls as well as the organized structure within basement areas from each representative segment.



The use of scanning electron microscopy confirmed the peripheral distribution of spermatozoa into the caudal segments. They were observed found as single sperm or in small groups, usually within spaces between folds. They were prominent in the pocket-like structures of the caudal isthmus, or within the cul-de-sacs like structures of the UTJ. Additionally, single spermatozoa were observed in the grooves of the AIJ on the ampulla of some oviducts.

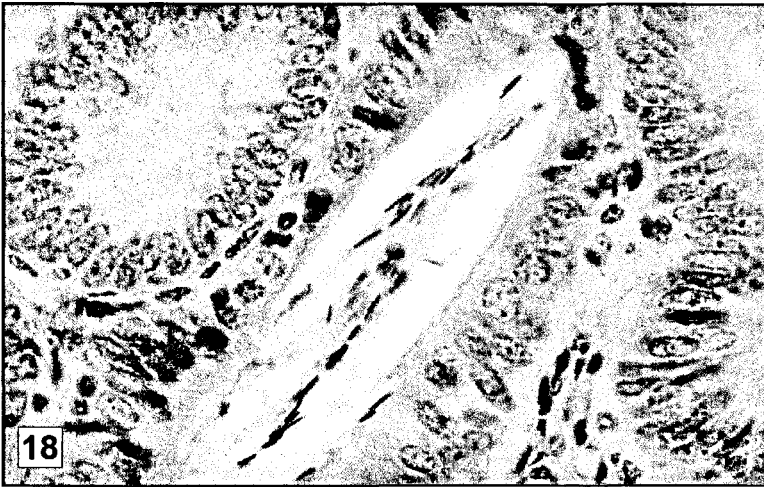


Fig 18. Hematoxylin-eosin stained section showing a group of parallel aligned spermatozoa within a crypt in the caudal isthmus of a preovulatory cow. x 135.

DISCUSSION

It has been extensively assumed that oviductal mucosa is organized in a vast net of longitudinal folds which decrease in height and number toward the uterus. These folds show an important branching and spread across the entire bovine oviduct (for reviews see Hafez and Blandau, 1969; Johnson and Foley, 1974; Hunter, 1988). In the present study, however, the simultaneous use of scanning electron microscopy and graphic reconstruction of the surface contours of the bovine oviductal mucosa reveal a tridimensional structure more complicated than hitherto recognized.

It is clear from this work that the infundibulum of the cow occurs as a two sided, funnel-like structure, including a wide and a narrow side. The highest mucosal folds in the narrow side are located near the free margin. This fold arrangement was described for the entire infundibular surface by Lombard et al. (1950). However, in our study, endosalpinx near the free border of the wide side forms a net of low cords interconnected, that converge forming primary folds. These folds increase in height before the ostial opening. In both infundibular sides, primary folds fuse or disappear in their downward course. Tridimensional reconstruction and SEM preparations indicate that pockets appear to be formed within the infundibular structure by extension of lateral folds from the walls of adjacent primary folds, these pocket are wide and superficial. Rows of shallow groove-like folds are contained within these oval wells . In addition, the slope of secondary folds, descending from the lateral walls of primary folds, determine the formation of cul-de-sacs with their opening pointing in the ovarian direction. Cilia lining the infundibulum are considered to be of primary importance in the pickup and transport of ovulated eggs. In the rabbit (Odor and Blandau, 1973) direct relationship has been suggested between the successful transport of eggs over the infundibulum and the number of ciliated cells present in the epithelium. In our study, ciliated cells are more numerous along lateral walls and in apical areas of the longitudinal folds than in basal areas between folds. Similar findings have

been described in woman (Ferency, 1972; Patek, 1972). It is likely that, an arrangement of high contoured and ciliated folds near the ostium facilitate egg transport to the ampulla.

A treebranch-like structure was observed in the ampulla, in agreement with findings by Gaddum-Rosse and Blandau, (1973). Divergence of folds occurred frequently in the bovine ampulla but, occasionally, the folds fuse or disappear. Furthermore, we distinguished two types of longitudinal folds according to their height, including high and medium or low folds. From one to three folds, either medium or low in height, were found to occur intermittant between two high folds. As described previously (Abe and Oikawa, 1993), an extensive distribution of ciliated cells during the follicular phase and of bleb secretory cells during the luteal phase was observed, especially in the infundibulum and cranial ampulla. Also, in the follicular phase infundibular and ampullar samples, a clear decrease in the population of ciliated cells was found to occur in the basal areas between folds.

Frequent divergences and interconnections of folds were observed in the AIJ, in agreement with Hunter et al. (1991). In addition, we observed an irregular outline at the apex of primary folds (Figs. 10, 11) and the appearance of narrow crypts in the bases of the pockets. Functionally, the confluence of male and female gametes is assumed to occur at the ampullar-isthmic junction. The presence in this area of excessive numbers of competent spermatozoa is a possible cause of polyspermy , one of the principal anomalies of fertilization (Hunter, 1996). The anatomy of the mucosa in this area, with numerous luminal projections and basal crypts, could constitute the last anatomical barrier to the sperm prior to fertilization. This idea is supported in the present study by the distribution of spermatozoa observed deep within the grooves and crypts formed in basal areas between folds in this oviductal segment.

Findings in the isthmic and UTJ were similar to those extensively reported.

Convergence or divergence of folds were scant in the isthmus, as described by Hunter et al. (1991). The folds broaden, flatten, diverge and disappear in the UTJ, in agree with Wrobel et al. (1993). Our observations concerning the isthmus and UTJ support the findings obtained by Wrobel, et al. 1993, who described a system of lateral outpocketings which occur between the mucosal projections and form blind ends which point in an ampullary direction. From the bottom of these outpocketings, narrow crypts originate. Our results show, furthermore, that the crypts described by Wrobel at the UTJ level are present throughout the mucosa of the isthmus. Additionally, we observed a caudal increase of the slope of secondary folds, orientation of pockets at the isthmus level, and presence of bleb secretory groups covering the basement areas of some pockets.

Areas between folds of the bovine oviduct show a high degree of organization in spite of their complexity. These interfolds areas are occupied by secondary folds of varying height, which are often interconnected. Interspersed between these mucosal projections is a complex system of pockets and grooves which are organized such that in the infundibulum, interconnecting folds form cul-de-sacks which open to the ovary (Fig. 3), while similar interconnecting folds in the caudal isthmus and in the UTJ form cul-de sacks and pockets which open to the uterus (Fig. 16). The morphology of these pockets decreases in complexity from the infundibulum to the isthmus and they are non-oriented after the anterior isthmus. The crypts found within basal area of the pockets are absent in the infundibulum and ampulla. After insemination, large concentrations (hundreds or thousands) of spermatozoa are sequestered in the so-called functional reservoir in the UTJ and caudal portion of the isthmus before ovulation (Hunter, 1981; Hunter and Wilmut, 1984). In this area, we found spermatozoa prior as well as immediately following ovulation, primarily located within pockets and crypts of the caudal isthmus and UTJ.

Numerous mechanisms have been proposed for the sequestering of sperm forming a functional reservoir. These include the binding of sperm to oviductal epithelium,

entrapment within mucus , localized constriction of the isthmus, oedema of the isthmus wall, and depressed sperm motility in the isthmus (Overstreet, 1983; Suarez, 1998). In addition, the complex tridimensional structure of the oviductal mucosa, including folds, ridges, grooves and cul-de-sacs appears to present a physical barrier to the ascent of spermatozoa. This barrier may also contribute to the formation of a functional sperm reservoir (Hunter et al, 1991). The complex yet well organized structure presented here, including the orientation of the slope of secondary folds along lateral walls of primary folds and orientation of basal pockets and cul-de-sacs, all of which appear to be specific for each segment of the oviduct, support this idea.

In summary, the bovine oviductal mucosa exhibits a vast system of mucosal topography with regional differences. The epithelium also varies depending on phase of the oestrus cycle, the oviductal segment and basal or apical areas within folds.

ACKNOWLEDGMENTS

The present study received financial support from the University of Lleida (Proyecte de Recerca 0812), from CTT University of Lleida (Convenio C0103); J.L; Yaniz was supported by a Grant from the Generalitat of Catalunya n° FI97 00657. The Electron Microscopy Service of the University of Lleida is acknowledged for technical assistance.

LITERATURE CITED

1. Abdalla O. Observations on the Morphology and Histochemistry of the Oviducts of the Sheep. *J. Anat.* 1968;102:333-344.
2. Abe H, Oikawa P. Observations by scanning electron microscopy of oviductal epithelial cells from cows at follicular and luteal phases. *Anat. Rec.* 1993; 235:399-410.

3. Anderson TF. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans NY Acad Sci*, 1951; 13:130-134.
4. Ferenczy A, Richart RM, Agate FJ, Purkerson ML, Dempsey EW. Scanning electron microscopy of the human fallopian tube. *Science*, 1972; 175:783-784.
5. Gaddum Rosse P, Blandau RJ. In vitro studies on ciliary activity within the oviducts of the rabbit and pig. *Am. J. Anat.* 1973; 136:91-104.
6. Grunert E. Sexualzyklus. In: *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind*. E. Grunert and M. Berchthold, eds. Parey, Berlin Hamburg, 1982, pp. 52-63.
7. Hafez ESE, Blandau RJ. *The mammalian oviduct*. University of Chicago Press, Chicago and London, 1969.
8. Hunter RHF. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *J.Reprod. Fertil.* 1981; 63:109-117.
9. Hunter RHF, Wilmut I. Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod. Nutr. Dev.* 1984; 24:597-608.
10. Hunter RHF. *The fallopian tubes. Their role in fertility and infertility*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1988.
11. Hunter RHF, Flechon B, Flechon JE. Distribution, Morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: a scanning electron microscope study. *Tissu and Cell.* 1991; 23:641-656.
12. Hunter RHF. Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilisation to avoid polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.* 1996; 44:417-422.
13. Johnson AD, Foley CW. *The oviuduct and its functions*. Academic Press, Inc. New York and London, 1974.
14. Lombard L, Banner BM, McNutt SH. The morphology of the oviduct of virgin heifers in relation to the oestrus cycle. *J. Morphol.* 1950; 86:1-15.
15. LopezGatius F. Effects of cloprostenol, human chorionic gonadotropin and estradiol benzoate treatment on estrus synchronization in dairy cows.

- Theriogenology, 1989; 32:185-195.
16. LopezGatius F, VegaPrieto B. Pregnancy rate of dairy cows following synchronization of estrus with cloprostenol, hCG, and estradiol benzoate. *J. Vet. Med. A.* 1990; 37:452-454.
 17. LopezGatius F, CamónUrgel J. Confirmation of estrus rates by palpation per rectum of genital organs in normal repeat dairy cows. *J. Vet. Med. A.* 1991; 38:553-556.
 18. Mullins KJ, Saacke RG. Study of the functional anatomy of bovine cervical mucosa with special reference to mucus secretion and sperm transport. *Anat. Rec.* 1989; 225:106-117.
 19. Odor D, Blandau R. Egg transport over the fimbrial surface of the rabbit oviduct under experimental conditions. *Fertil. Steril.* 1973; 24:292-300.
 20. Overstreet JW. Transport of gametes in the reproductive tract of the female mamal. In: *Mechanism and control of animal fertilization*, Hartmann, J.F. ed. New York Academic Press, 1983, pp. 499-543.
 21. Patek E, Nilsson L, Johannisson E. Scanning electron microscopic study of the human fallopian tube. Report I. The proliferative and secretory stages. *Fertil. Steril.* 1972; 23:549-565.
 22. Suarez SS. Oviductal sperm reservoir in mammals: mechanism of formation. *Biol. Reprod.* 1998; 58:1105-1107.
 23. Wrobel KH, Kujat R, Fehle G. The bovine tubouterine junction: general organization and surfac morphology. *Cell Tissue Res*, 1993; 271:227-239.