



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Descripción Histológica del Oviducto de la Perra

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Sonia Abigail Sanchez Meneses

Directora

Dra. Estela Cuevas Romero

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2021



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Descripción Histológica del Oviducto de la Perra

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Sonia Abigail Sanchez Meneses

Comité Tutorial

Dra. Estela Cuevas Romero
Dra. Leticia Nicolás Toledo
Dr. Octavio Sánchez García

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2021

El presente proyecto de tesis fue llevado a cabo en el laboratorio de Endocrinología del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta en las inmediaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Posgrado de Maestría en Ciencias Biológicas; adscrito al Programa para el fortalecimiento del Posgrado Nacional Padrón Nacional de Posgrado (PNCP) en el nivel consolidado.

Para su desarrollo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del apoyo recibido en la beca CONACyt (1004334), el apoyo parcial al proyecto de investigación (257549) de la Dra. Estela Cuevas Romero.



**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Sonia Abigail Sánchez Meneses** realiza para la obtención del grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Descripción histológica del oviducto en la perra”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., AGOSTO 5 DE 2021

DRA. LETICIA NICOLÁS TOLEDO

DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO

DR. OCTAVIO SÁNCHEZ GARCÍA

DRA. MARGARITA JUÁREZ ROMERO

DRA. MARÍA DE LOURDES ARTEGA CASTAÑEDA



COMITÉ ACADÉMICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sirva este medio para describir el proceso de revisión de la tesis realizada por la estudiante **Sonia Abigail Sánchez Meneses** titulada **Descripción histológica del oviducto en la perra** para optar por su grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**.

El documento de la tesis de **Sonia Abigail Sánchez Meneses** fue revisado por mi como directora de tesis antes de presentarse en cada examen tutorial y, posteriormente a los exámenes tutorales, los miembros de su comité tutorial realizaron también sus respectivas observaciones. De manera que el documento, llevó un proceso de revisión por varios profesores expertos en el tema. En el mes de julio, el documento final de la tesis fue procesado con el programa del Turnitin marcando poco texto con similitudes (1%). Los textos detectados con similitud fueron corregidos por la estudiante. Se volvió a procesar el documento y marcó 0%. Por lo anterior, confirmo que **la estudiante no incurrió en ninguna práctica no deseable** en la escritura de la tesis.

Sin más por el momento, reciban atentos saludos.

CORDIALMENTE
Tlaxcala, Tlax., a 11 de agosto de 2021


Dra. Estela Cuevas Romero
Directora de tesis



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



Agradecimientos a título personal

Agradezco mucho a los doctores del CTBC que me brindaron sus conocimientos en cada una de las clases, talleres y congresos, gracias a ellos conocí mundos nuevos y me hicieron dar cuenta de lo grande y lo lejos que puede ir la ciencia, que todo debe ser cuestionado y que existen cosas desconocidas hasta en lo más común.

Mis agradecimientos principalmente van a la Dra. Estela Cuevas Romero que creyó en mí desde el primer día, y aún sin conocerme me brindó el apoyo necesario. Sin ella no hubiese podido ser posible este logro y no me hubiera encontrado en este momento académico ni emocional, me ayudó a ver lo lejos que podría ir mi carrera si me lo proponía y que existía un mundo más allá de lo que yo conocía, gracias a ella por aceptarme en su grupo de trabajo y por darme un tema de tesis el cual me enamoró día a día. Admiro demasiado su labor como académica, investigadora y mujer, su ejemplo me ha servido en demasía y me ha inspirado a fijarme nuevas metas y a conocer el camino que realmente quiero seguir.

Otro agradecimiento va dirigido a mi grupo de trabajo el cual me hizo sentir bienvenida en un mundo completamente nuevo para mí, su colaboración y conocimientos siempre fue de gran ayuda para desarrollar cada aprendizaje adquirido en esta etapa.

No siempre somos conscientes del impacto que tenemos sobre las otras personas, sobre su forma de ver el mundo, esta etapa y todas las personas que tuvieron que ver en ella cambiaron mi vida y no tiene idea de cómo impactaron sobre la persona que soy y quiero ser.

Gracias infinitas por creer en mí.

Dedicatorias

Este logro va dedicado principalmente a mi familia, la cual nunca ha dejado de creer en mí y siempre me ha apoyado con todos los ánimos en cada uno de mis proyectos. Por su amor y toda su ternura con la que siempre me han tratado. A mi pequeña sobrina que su vida ha venido a iluminar mi vida, que no sabes cuánto te amaba aún sin conocer tu rostro, espero jamás faltarte y poderte proteger siempre que me necesites. Espero algún día poder retribuirles la mitad de lo que ustedes me han dado y ser mejor cada día por y para ustedes. Y que algún día logre ser la mitad de lo grande que ustedes me ven, los amo demasiado. Familia este logro es tan suyo como mío. ¡Lo logramos! Ustedes y yo amigos...

Dedico también a todos mis amistades cercanas, por alentarme a dar este paso y creer en mí en momentos donde yo no lo hacía, por soñar conmigo cuando este paso aún no se concretaba y por apoyarme en cada etapa. Gracias por estar conmigo en aquel momento tan duro, por motivarme, escucharme y estar ahí.

A las amistades nuevas que hice durante la maestría las cuales me llevo en el alma, hicieron de esta etapa de las mejores de mi vida, convivir y conocerlas me hizo realmente feliz.

Los amo infinitamente.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Generalidades del oviducto	1
1.2 Funciones del oviducto	4
1.2.1 Transporte de gametos	4
1.2.2 Almacenamiento espermático	9
1.2.3 Capacitación espermática	10
1.2.4 Desarrollo embrionario	11
1.3 Hormonas esteroides y oviducto	12
1.3.1 Estrógenos	12
1.3.2 Progesterona	13
2. Antecedentes	14
3. Objetivos	32
4.1. Objetivos generales	32
4.2. Objetivos específicos	32
4. Metodología	33
5. Resultados	35
6.1. Regionalización del oviducto	35
6.2. Proporción de células ciliadas y secretoras	45
6.3. Receptores de estrógenos	46
6. Discusión	48
7.1. Regionalización del oviducto	48
7.2. Presencia de criptas	52
7.3. Proporción de células ciliadas y secretoras	53
7.4. Receptores de estrógenos	53
8. Conclusión	57
9. Referencias	58

1. Introducción

1.1 Generalidades del oviducto

En los mamíferos, los oviductos son estructuras tubulares que comunican a los ovarios con el útero. La función de éste es indispensable para llevar a cabo diversos eventos reproductivos (Buhí y cols. 1990). El oviducto presenta características particulares que permite que se lleven a cabo en éste diversas actividades fundamentales para la reproducción de la especie. Algunas de estas son: proporcionar el entorno adecuado para el almacenamiento de los gametos masculino y femenino, maduración final de los ovocitos, transporte de los gametos, así como proporcionan el ambiente óptimo para que se lleve a cabo la fertilización y colaboran en el desarrollo de los embriones en sus primeras etapas de desarrollo (Lee y cols. 2018).

El oviducto se divide en cinco regiones: la FIM, INF, AMP, IST y la UTJ, cada estructura cumple funciones muy particulares. La pared del oviducto está formada por tres capas de tejido: la externa o serosa formada por tejido conectivo altamente irrigado; la intermedia o muscular formada por fibras de músculo liso; y la interna o mucosa, compuesta de células epiteliales ciliadas y secretoras organizadas en columnas (epitelio columnar pseudoestratificado) y tejido conectivo o estroma. Los dos tipos de células epiteliales se encuentran entremezcladas, aunque existe cierta regionalización de predominancia de uno u otro tipo (Suarez y Pacey, 2006).

Capa muscular. En los mamíferos, desde el AMP hasta la UTJ, la capa muscular se compone predominantemente de células musculares lisas con una porción muscular longitudinal externa y otra circular interna (miosalpinx) (Halter y cols. 2011). La túnica muscular es más gruesa hacia la región del IST, que es la región proximal al útero (Bacha y Bacha, 2001). En las porciones anteriores del oviducto humano se aprecian la capa longitudinal externa y circular media; mientras que, en las porciones posteriores se observa una capa longitudinal interna. Además de la longitudinal externa y la circular media, la frecuencia de las contracciones son mayores en la capa muscular circular que en la longitudinal (Helm y cols. 1982).

Capa epitelial. La capa epitelial se encuentra revestida por células ciliadas y secretoras que decrecen en su número según la región del oviducto, sus funciones son variables, desde proporcionar el entorno adecuado para que se lleven a cabo las diversas funciones de esta estructura, colaboran con el transporte de los gametos, interactúan con éste y con el embrión en sus primeras etapas de desarrollo (Li y Winuthayanon, 2017). La lámina propia se encuentra formada por tejido conectivo y abarca invaginaciones de revestimiento epitelial, es decir, las células secretoras. Estas contienen nutrientes para los ovocitos y los espermatozoides, promueven la capacitación de estos para la fertilización de los ovocitos y dan el sostén al embrión en sus primeros estadios de vida (Steinhauer y cols. 2004; Xie y cols. 2018; Abdelhamed y cols. 2018).

Las criptas son estructuras formadas por el epitelio oviductal, se encuentran presentes en diversas especies, en las ovejas se han observado desde la zona del AMP, hasta la zona del IST, es en este último donde se ha observado una alta presencia de estas estructuras con una apertura predominante orientada hacia el útero y el extremo ciego orientado al ovario. Esta zona se conoce como la principal región encargada del almacenamiento espermático; En vacas y cerdas se ha observado que las criptas con sus extremos ciegos orientados en dirección ampular pueden ser esenciales para el almacenamiento espermático a espera del momento adecuado para llevar a cabo la fertilización. Además de que en regiones más caudales del IST y la UTJ, estas estructuras junto con los pliegues de la mucosa podrían servir como barrera fisiológica para los espermatozoides, reduciendo así el número de éstos que llegan al AMP (Yánizy cols. 2014).

Epitelio oviductal en la fimbria/infundíbulo. En el humano, ratón y conejo, la FIM contiene un menor número de células ciliadas y un mayor porcentaje de células secretoras. Su epitelio se compone de células cilíndricas simples (Ng y Barker, 2015; Xie y cols. 2018; Pedrero y cols. 2013). En humanos, las células ciliadas del oviducto son abundantes en la zona de la FIM y escasas en el IST (Abdelhamed y cols. 2018). La mucosa (endosalpinx) tiene una distribución longitudinal, reduciendo la luz a nivel de la AMP, a una serie de hendiduras estrechas que se ramifican (Dyce y cols. 2011; Halter y cols. 2011). En conejas, la FIM está formada por pliegues de epitelio, no presenta capa muscular y ayuda en la captura del óvulo liberado por el ovario (Pedrero y cols. 2013). Dicha estructura es la encargada de recoger el ovocito liberado (Ng y

Barker, 2015). El INF corresponde a la región que continúa a la FIM. En ovejas, la mucosa forma pliegues longitudinales y surcos que forman algunas criptas superficiales con ramas cortas, formado principalmente por células ciliadas (Yániz y cols. 2014).

Epitelio oviductal en el ámpula. El AMP comprende aproximadamente la otra mitad del oviducto, su diámetro es mayor comparado con el IST. Los pliegues longitudinales del INF convergen en el AMP, formando un complejo sistema de pliegues primarios y secundarios interconectados. Los pliegues primarios disminuyen hacia la zona del IST, los pliegues secundarios se observan anchos, oblicuos o perpendiculares a los pliegues primarios que se dirigen hacia las áreas basales entre pliegues o se conectan con algún pliegue primario adyacente, formando pliegues sin salida con aperturas en su mayoría apuntando hacia el ovario. En esta estructura se observa la formación de criptas por los pliegues mucosos. En la zona más caudal del AMP, proximal al ovario, algunos de estos pliegues primarios desaparecen o se continúan hasta el IST, mostrándose una estructura con menos pliegues. Las células epiteliales de la unión del AMP con el IST se observa como epitelio de transición (Yániz y cols. 2014). La capa muscular es delgada orientada circularmente, en el AMP ocurre principalmente la fertilización (Suarez y Pacey, 2006).

Epitelio oviductal en istmo. El IST comprende casi la mitad de la longitud del oviducto, tiene una capa muscular gruesa orientada longitudinal y circularmente (Suarez y Pacey, 2006). Esta región es el principal sitio de almacenamiento espermático, el contacto de los espermatozoides con las células epiteliales y algunos compuestos moleculares que componen a dicha región ayuda a la selección de los espermatozoides, a mantenerlos viables, y en la capacitación espermática (Miller 2015).

Epitelio oviductal en la unión útero-tubal. En el humano, la región UTJ es la porción proximal al útero, ahí se forma la capa muscular del oviducto, proporciona una barrera para los microorganismos infecciosos que provienen del útero y leucocitos que pudieran entrar, selecciona el paso de los espermatozoides y regula su movimiento desde el útero hacia el oviducto (Suarez y Pacey, 2006).

1.2 Funciones del oviducto

El oviducto lleva a cabo diversas funciones vitales para la reproducción de las especies, como son: 1) la captura del ovocito después de la ovulación, 2) el control de la migración de los espermatozoides al sitio de fertilización, 3) el mantenimiento de un microambiente adecuado para la fertilización, y 4) la nutrición del embrión en sus primeras etapas de desarrollo y su transporte hacia el útero (Saint y cols. 2019).

1.2.1 Transporte de gametos

Seguido de la ovulación, el oviducto por medio de la FIM recoge al ovocito con la ayuda de las contracciones del miosalpinx y por adhesión a los cilios del oviducto y las células del cúmulo (Halter y cols. 2011). Una vez que los espermatozoides entran al aparato reproductor de la hembra, éstos cruzan por diversos obstáculos que dan lugar a que solo los más aptos sobrevivan para llegar al oviducto. En la vagina, los espermatozoides tienen que sobrevivir a las condiciones ácidas que tiene ésta, antes de ingresar al cuello uterino, el flujo del moco cervical elimina agentes patógenos y a los espermatozoides débiles y no móviles (Li y Winuthayanon, 2017). En los oviductos, el transporte de los gametos se lleva a cabo por: 1) la secreción de las células secretoras que proporcionan el medio de transporte y los nutrientes necesarios para la sobrevivencia de los gametos, 2) los cilios de las células epiteliales que proporcionan el empuje en la dirección requerida, y 3) la contracción de las células musculares (Suarez 2006). Las células secretoras producen líquido oviductal, el cual es rico en aminoácidos y otros componentes proporcionando un microambiente óptimo para que se lleve a cabo el desarrollo y maduración de los ovocitos, la capacitación de espermatozoides, la fertilización, y la supervivencia embrionaria (Jingu y cols. 2018). El transporte de los óvulos se lleva a cabo por acción de los cilios y del músculo liso. Los receptores de estrógenos (ER) y de progesterona (PR) se localizan en los cilios del oviducto, regulando la frecuencia del batido ciliar para el transporte. En el AMP, los ovocitos se mantienen unidos al epitelio por un periodo de tiempo variable (Coy y cols. 2010).

Una vez que los espermatozoides llegan al oviducto, existen mecanismos que los guían a través de este y los preparan para llevar a cabo la fertilización, estos son:

Reotaxis. El contacto de los espermatozoides con el fluido oviductal generado por el trasudado de la circulación y las células que componen al epitelio oviductal (ciliadas y secretoras), proporciona el medio adecuado para que se lleven a cabo los procesos de capacitación espermática. La capacitación espermática es un proceso el cual modifica la morfología del espermatozoide. Este proceso incluye una afluencia de iones de bicarbonato y calcio, eliminación de factores decapacitantes, cambio en el pH y actividades proteosómicas de los espermatozoides, así como el aumento en la fosforilación de la proteína tirosina (Li y Winuthayanon, 2017). La interacción del epitelio con los espermatozoides provoca la modificación de las proteínas de superficie del espermatozoide que dará lugar a la hiperactivación, activando el canal catiónico de los espermatozoides (Catsper). Este es un canal iónico dependiente del voltaje que se ubica en el flagelo del espermatozoide, selectivo al Ca^{2+} y sensible al pH, controla la entrada de iones de calcio con carga positiva, en conjunto con otros canales iónicos, facilita la entrada de calcio. Esta afluencia conduce a un aumento de la concentración de calcio intracelular y da lugar al aumento de la motilidad espermática. Una vez activado el Catsper, el movimiento de la cola o flagelo del espermatozoide se ve aumentado dando lugar a un latido asimétrico, que dará una mayor fuerza al empuje de los espermatozoides a la zona de fertilización (Li y Winuthayanon, 2017).

Termotaxis. El camino de los espermatozoides por el oviducto se ve guiado por la capacidad de estos para detectar diferencias en temperatura dentro del oviducto. Estudios han reportado que la variación en la temperatura del oviducto se ve influenciada según la etapa del ciclo estral. Los cambios en la temperatura varían según la etapa del ciclo estral, aumentando en periodos horas previas a la ovulación. La región caudal del IST es 1-2 °C menor que la porción craneal del AMP. Esta reducción de temperatura en el IST reduce la movilidad de los espermatozoides momentos previos a la ovulación, facilitando su almacenamiento e hiperactivación (Hunter 2012).

Quimiotaxis. La fusión del líquido oviductal y el líquido folicular después de la ovulación proporciona diferentes moléculas que facilitan el movimiento de espermatozoides (Li

y Winuthayanon, 2017). En humanos, el complejo cúmulo-ovocito secreta progesterona (P4) que se une a sus respectivos receptores presentes en el espermatozoide. Ello afecta la hiperactivación de los espermatozoides y la reacción del acrosoma (Villanueva y cols. 1995). El cúmulo-ooforo sintetizan y secretan P4, la cual actúa como quimioatrayente de espermatozoides (Teves y cols. 2006) (Figura 1).

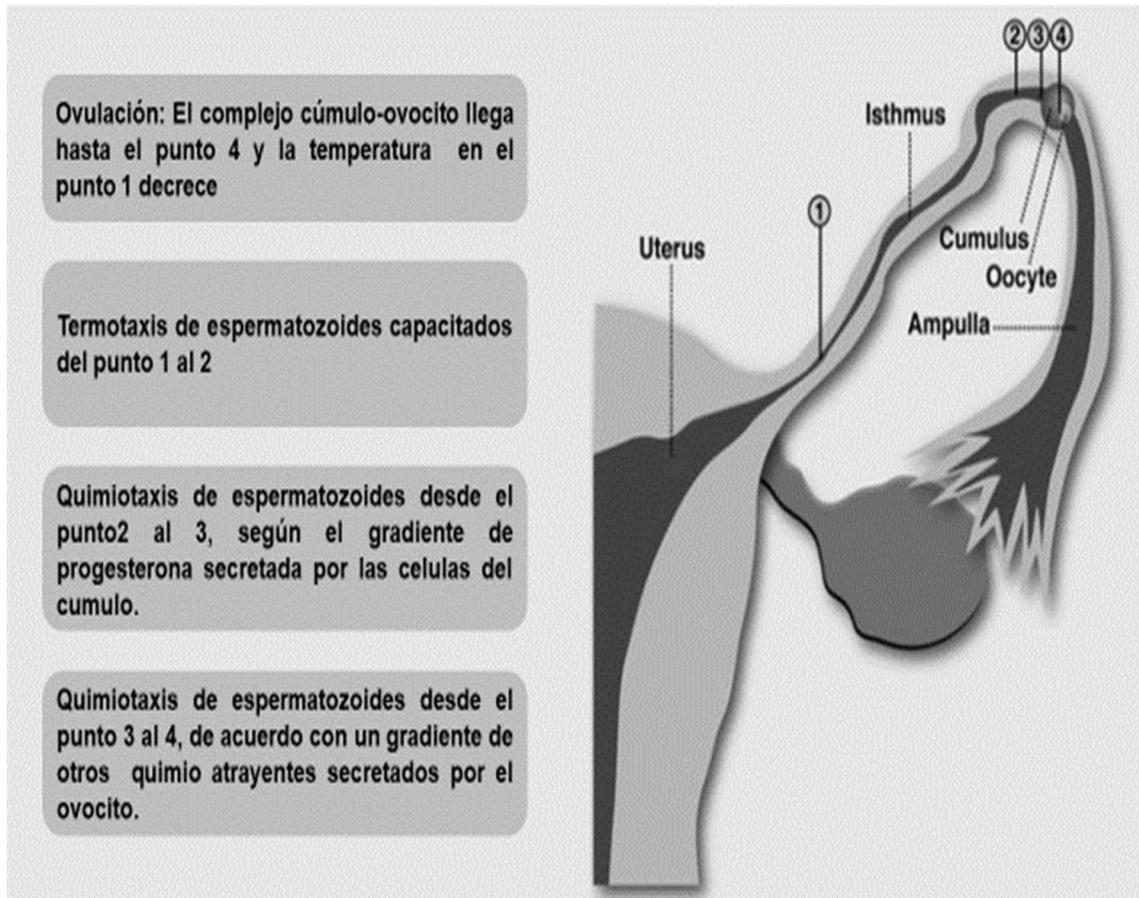


Figura 1. Secuencia de eventos que ocurren en el camino del espermatozoide a la fertilización. Los espermatozoides ya en la región del IST y capacitados pueden ser guiados primero por termotaxis, el sitio del IST tiene una temperatura más baja y por su parte la zona del ampulla tiene una temperatura más cálida. Cerca del sitio de fertilización los espermatozoides pueden ser guiados por quimiotaxis al complejo cúmulo-ovocito, esto según el gradiente de progesterona presente en la periferia del complejo. Los espermatozoides ya dentro del cúmulo ooforo detectan otros quimioatrayentes más potentes que son secretados por el ovocito. Adaptado de Oren y cols. 2008.

Las quimosinas juegan un papel importante en la fusión del espermatozoide con el ovocito (Kverka y cols. 2012). El líquido oviductal contiene diversos tipos de quimiocinas producidas por la célula de la granulosa a partir de folículos preovulatorios en el humano y se encuentran regulados por TNF- α . Entre las quimosinas están CCR1, CCR5 y CCR6, y los ligandos para éstos modulan directamente la función de los espermatozoides (Isobe y cols. 2002). Las interacciones ligando-receptor promueven la motilidad de los espermatozoides y la quimiotaxis, los ligandos CCL20 presentes en el líquido folicular pueden unirse al CCR6 y alterar el movimiento de los espermatozoides (Caballero y cols. 2014). Otra molécula quimioatrayente presente en el líquido oviductal es el péptido natriurético auricular (ANP) y su precursor A (NPPA). El ANP se sintetiza en las células de la granulosa del ovocito, para ser secretada al líquido oviductal. Este péptido induce la exocitosis acrosómica en espermatozoides y ejerce su acción mediante el receptor de ANP (NPR1). Este péptido inhibe la reanudación de la meiosis de los ovocitos en ratas (Zamir y cols. 1995). Los endocannabinoides y sus receptores, el 1 y 3, se encuentran en el líquido oviductal y en la cabeza y cuerpos de los espermatozoides, respectivamente (Li y Winuthayanon, 2017).

Células ciliadas y transporte de gametos. El paso de los gametos y el embrión por el oviducto depende de las concentraciones de E2 y P4. En ratas, la aplicación de E2 reduce el tiempo de paso del gameto por el oviducto, mientras que la aplicación de P4 retarda el transporte de este (Orihuela y Croxatto, 2001). Los efectos del E2 se encuentran mediados por la presencia de sus receptores (Orihuela y cols. 2002). El batido ciliar es estimulado por E2 y reducido por P4 (Mahmood y cols. 1998). Existe una contradicción en relación con la frecuencia de batido ciliar (FBC) dependiendo la etapa del ciclo estral, en algunos estudios se ha demostrado el cambio en la frecuencia del batido ciliar conforme la etapa del ciclo. Sin embargo, en otros no se ha observado cambio alguno. Nishimura y cols. (2010) demostraron en un estudio realizado en cobayas que la FBC aumento en la fase folicular, manteniéndose en la etapa ovulatoria y en la fase lútea temprana aumentando su pico más alto, disminuyendo para la fase lútea intermedia y aumentando nuevamente en la fase lútea tardía. Estas observaciones demuestran que la FBC se encuentra controlada por la presencia de E2 y P4.

Contracción muscular y transporte de gametos. Además del movimiento de los cilios del epitelio, la contracción muscular juega un papel importante para el paso de los gametos y el embrión por el oviducto. Dixon y cols. (2009) demostraron que la contracción del músculo tubárico es esencial para impulsar el movimiento de los gametos y lo hacen de manera pendular. El latido ciliar, junto con las secreciones oviductales, sirve de lubricante y protección de los ovocitos. La contracción muscular se encuentra dada por diversos factores. Wånggren y cols. (2008) determinaron que tanto las prostaglandinas como las hormonas esteroideas regulan la contracción del músculo oviductal. La concentración de las prostaglandinas es mayor durante el periodo periovulatorio en comparación con las fases folicular y lútea. Esto se relaciona con el aumento de E2 durante el período periovulatorio, y sugiere que la P4 tiene un papel inhibitorio. El oviducto presenta receptores para PGE1, PGE2 (EP1-4) y PGF2 α (FP), la PGE2 induce la contracción muscular oviductal mediante los receptores de prostaglandinas EP1 y el EP3 que regula la contracción del músculo longitudinal, o la relajación mediante los receptores de prostaglandinas EP2 y EP4 (Wånggren y cols. 2008).

Elementos nerviosos cercanos al músculo liso del oviducto, como inervaciones colinérgicas, donde la acetilcolina juega un papel importante en la contracción muscular del oviducto, y en la vasodilatación de las arterias oviductales en conejos (Jankovic y cols. 2004). Las endotelinas participan en la fertilización y el desarrollo temprano del embrión. Los antagonistas del receptor de endotelina disminuyen el número de embriones de dos blastómeros (Myoungkun y cols. 2010). En oviducto de humano se han identificado la presencia de receptores de oxitocina, específicamente en las regiones del AMP e IST, los cuales aumentan durante la fase secretora temprana del ciclo menstrual. En tratamientos con estrógenos se ha observado el aumento de dichos receptores a oxitocina. El proceso de contracción y relajación intermitente del oviducto inducido por la oxitocina juega un papel importante para el transporte de los ovocitos, dichos movimientos son de gran importancia en el AMP ya que crean una presión intraluminal negativa reteniendo al ovulo en esta zona hasta el momento de la fertilización. (Janković y cols. 2001).

1.2.2 Almacenamiento espermático

El oviducto actúa como reservorio de espermatozoides. La interacción de los espermatozoides con el epitelio y las secreciones oviductales condicionan el medio adecuado para la supervivencia e hiperactivación de espermatozoides (Li y Winuthayanon, 2017). El almacenamiento espermático permite a las hembras tener la posibilidad de gestar sin necesidad de tener un apareamiento inmediato. Esta capacidad no es exclusiva de los mamíferos, ya que otros animales pueden almacenar a los gametos masculinos por días y hasta años. En el humano, se consiguen fertilizaciones exitosas con coitos 6 días previos a la ovulación. Algunas serpientes que almacenan espermatozoides durante 7 años, algunas hormigas almacenan espermatozoides durante una década después de un solo apareamiento. El sitio de almacenamiento debe proporcionar además de un sitio de reservorio, debe regular la función de los espermatozoides, incluida la viabilidad, capacitación y la vida útil de éstos (Sakkas y cols. 2015; Miller 2015).

La región encargada del almacenamiento espermático es el IST. En la gata, el número de espermatozoides almacenados es mayor en las criptas epiteliales que en el lumen del oviducto. En cerdas, hay una distribución alta de espermatozoides almacenados en la porción de la UTJ y el IST caudal (Tummaruk y Tienthai, 2010). En humanos, los espermatozoides se unen a la superficie apical del epitelio oviductal mediante sus cabezas. El transporte en el oviducto es mucho más lento por el moco presente en esta estructura. La presencia de los espermatozoides altera de forma específica la respuesta del perfil proteómico secretor del oviducto. Las diversas proteínas encontradas en presencia de los gametos influyen en la maduración, viabilidad y función de los gametos y, a su vez, éstos pueden variar según la especie (Miller 2015; Georgiou y cols. 2005).

Los espermatozoides se mantienen unidos al epitelio del IST disminuyendo su motilidad espermática, alargando con esto su vida útil. Los sitios de almacenamiento espermático reconocen y seleccionan a la población de espermatozoides más aptos para llevar a cabo la fertilización. Éstos son liberados de forma gradual para pasar al AMP y con esto reducir las posibilidades de que ocurran polispermia. La proteólisis contribuye a la liberación de espermatozoides del epitelio oviductal. La interacción del epitelio con los espermatozoides puede suprimir el aumento normal de calcio libre intracelular de los espermatozoides útiles para

la capacitación espermática (Miller 2015). Miller (2015) mostró que los espermatozoides de la cerda se unen a glucanos como el trisacárido de Lewis X (LeX) y bi-SiaLN. Dada la unión directa de la cabeza de los espermatozoides al epitelio sugiere que los receptores a estos glucanos existen en esa porción del gameto. Además, el oviducto contiene glucoproteínas que participan en la adherencia de los espermatozoides al epitelio del IST (Leese y cols. 2001). Las especies reactivas de oxígeno, generadas por el metabolismo celular normal, disminuye la viabilidad, motilidad y capacidad de los espermatozoides para lograr la fertilización del ovocito. Las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GPx) y tiorredoxina (Trx) pueden ayudar a regular el equilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los antioxidantes en los espermatozoides (Georgiou y cols. 2005).

1.2.3 Capacitación espermática

La capacitación espermática comienza desde que los espermatozoides son depositados en la vagina. La región de la UTJ e IST son los principales sitios de almacenamiento y capacitación. El proceso de capacitación implica diversos cambios estructurales y funcionales, remodelado en la membrana plasmática, cambios en su fluidez y composición, hay un aumento intracelular del calcio, activación de canales iónicos y alteraciones en el movimiento de su flagelo. Este proceso le permite al espermatozoide mejorar su movilidad haciéndolo más ágil el movimiento del flagelo, proporcionándole la fuerza necesaria para moverse a través del epitelio del oviducto. Esta reacción le confiere al gameto masculino una mayor flexibilidad para girar entre los pliegues de la mucosa oviductal y llegar hasta el sitio de fertilización, donde el espermatozoide se une a la zona pelúcida del ovocito por medio de receptores de membrana (Suarez, 2008; Coy y cols. 2012). El moco vaginal facilita la eliminación de la membrana plasmática, la eliminación de colesterol de la membrana plasmática es un requisito de gran importancia para la capacitación. En la capacitación actúan moléculas como el esteroil sulfatasa y las especies reactivas de oxígeno (ROS), producidas por los leucocitos que se infiltran en el moco post coital y actúan como pre-capacitantes. En el endometrio, la proteína de unión a ácido siálico facilita la unión y movimiento de Ca^2 hacia el espermatozoide, ayudando a la

remodelación de la membrana (Jonge, 2017). Cada segmento diferente del oviducto representa un microambiente específico que favorece la capacitación de los espermatozoides y la fertilización del óvulo, además de condicionar el sustrato para el desarrollo embrionario en sus primeras etapas (Li y Winuthayanon, 2017).

1.2.4 Desarrollo embrionario

El volumen del fluido oviductal cambia según la etapa del ciclo estral por la que esté cursando la hembra, además de esto el fluido dado por el lecho capilar y la secreción de los epitelios varía según la región del oviducto de la que se esté hablando (Hunter 2012). Miki y Claphan (2013) mostraron que la prolactina se encuentra involucrada en el aumento y disminución de la secreción de líquido oviducto. La conformación del líquido oviductal aún tiene grandes incógnitas. La presencia de aquaporinas regula el contenido de agua dentro del oviducto (Leese y cols. 2001). La composición del líquido oviductal varía dependiendo de la especie animal y del estado hormonal. De manera general, este fluido contiene K^+ y HCO_3^- , glucosa, arginina, alanina, glutamato, glicina, leucina, fenilalanina, taurina e hipotaurina, afectando la viabilidad de los gametos y embriones (Leese y cols. 2001).

El oviducto es importante en el desarrollo del embrión en sus primeros estadios de maduración, el tiempo que pasa el embrión en el oviducto varía según la especie. En vaca, el embrión abandona el oviducto hasta la etapa de mórula de 16 células, alrededor de los 4 o 5 días. En la perra, el embrión abandona el oviducto alrededor de los 7 días post- fecundación. En el microambiente oviductal ocurren grandes cambios para el embrión, cambios que incluyen las primeras divisiones meióticas hasta la activación del genoma embrionario (Banliat y cols. 2020). Durante el tiempo que pasan los embriones en el oviducto, su metabolismo se va modificando. El embrión unicelular requiere de un metabolismo oxidativo, dada la alta presencia de mitocondrias maternas, el sustrato principal es el piruvato que es generado por las células del folículo ovárico. Las tasas glucolíticas al comienzo de la gestación son bajas dada la inhibición de la hexoquinasa y la fosfofructosa quinasa. La presencia alta de glucosa puede afectar el

desarrollo embrionario en sus primeras etapas. A medida que el número de mitocondrias disminuye durante la división celular del embrión, la expresión del transportador de glucosa aumenta hasta que ésta excede al piruvato. La mayor disponibilidad de glucosa (glucólisis) se acelera en la etapa principalmente de blastocisto, y toda la glucosa se metaboliza a lactato (Folmes y Terzic, 2014). Los cambios en el estado redox en el desarrollo del embrión o el aumento de las especies reactivas de oxígeno, requeridas para eventos de diferenciación, son algunos de los posibles papeles que se le ha dado al estrés oxidativo en el desarrollo embrionario. El glutatión ayuda a proteger al embrión de estrés oxidativo (Li y Winuthayanon, 2017).

1.3 Hormonas esteroides y oviducto

1.3.1 Estrógenos

El estrógeno (E2) más potente producido por el organismo es el 17 β -estradiol. La señalización celular de estrógenos está mediada por los receptores de estrógenos alfa y beta (ER α y ER β). El E2 estimula la proliferación de células epiteliales en el tracto reproductivo femenino, entre otros. En ratones, el ER α media los principales efectos proliferativos del E2, mientras que el ER β modula los efectos proliferativos de ER α (Liu y cols. 2002). Las células epiteliales encontradas en el anestro se diferencian por la influencia del E2 en el proestro tardío, incluida la hipertrofia celular y la ciliación (Derussi y cols. 2012). En el proestro y estro se aumenta el número de células ciliadas a lo largo de todo el oviducto (England y cols. 2013).

Lamy y cols. (2016) encontraron que las concentraciones de P4 en el líquido oviductal en bovinos son más altas en el periodo de fase lútea media, mientras que la concentración más alta de E2 es en el periodo pre-ovulatorio. En la yegua y el hámster dorado, los niveles más altos de P4 en el líquido oviductal se han encontrado en el periodo post-ovulatorio. En la yegua, las concentraciones de E2 son mayores en la etapa pre-ovulatoria (Hilde y cols. 2015). Los estrógenos también participan en la acumulación de líquido oviductal en comparación con la aplicación de P4, donde esta acumulación se ve disminuida (Leese y cols. 2001). Las células epiteliales ciliadas y secretoras son susceptibles a la concentración hormonal, el E2 es el

principal regulador de estas células, induce a la hipertrofia, maduración y aumentos en la altura de las células. La P4 induce atrofia celular y disminuye la actividad secretora de las células epiteliales. Estos cambios hormonales pueden influir en la tasa de secreción al modular el movimiento de iones a través del epitelio oviductal (Leese y cols. 2001).

1.3.2 Progesterona

La P4 regula la morfología y funcionalidad del oviducto (Tahir y cols. 2012). La P4 actúa a través de dos receptores, el receptor nuclear convencional, en sus dos isoformas PRA y PRB, y dos receptores potenciales, a los cuales se les ha denominado, componentes de membrana del receptor de progesterona (PGRMC) 1 y 2. El PGRMC1 tiene acciones anti-apoptóticas en las células de la granulosa de la rata, regula la reacción del acrosoma de los espermatozoides en cerdos y humanos, la maduración del ovocito en bovinos y la relajación del miometrio durante la gestación en humanos (Saint y cols. 2012).

La P4 participa como un regulador cuantitativo y cualitativo del fluido oviductal, y en la contracción del músculo liso del oviducto. Además, los PRs se localizan en el IST y UTJ participando en el almacenamiento y mantenimiento de espermatozoides (England y cols. 2013). En el oviducto de la vaca, la P4 ayuda en el desarrollo embrionario temprano a través de cambios en el ambiente oviductal. La cantidad y composición del fluido oviductal es regulado por la P4. La P4 regula el transporte del embrión al útero, ya que reduce la motilidad del oviducto y la de los cilios a través de acciones no genómicas (Saint y cols. 2012). En la cerda, el E2 y la P4 ayuda en la relajación del músculo liso inducida por la LH sobre el oviducto (Gawronska y cols. 2000).

2. Antecedentes

La perra presenta características en su reproducción que la diferencian de otras hembras de mamíferos, particularidades antes, durante y después de la ovulación (López 2014). La investigación en la reproducción de esta especie presenta grandes incógnitas dadas las características tan propias en esta hembra.

2.1 Fisiología reproductiva del macho y cópula

La edad de madurez sexual es variable en el perro según la raza y/o talla, puede oscilar entre los 6 a 24 meses. En razas pequeñas esta puede comenzar de los 6 a 8 meses, en algunas razas como el Beagle esta puede ser entre los 15 y 16 meses. Los machos de esta especie producen espermatozoides durante todo el año. La maduración de los espermatozoides ocurre en el epidídimo, alcanzando la capacidad de fertilización en la cola del epidídimo. La espermatogénesis tiene una duración de 62 días y los gametos masculinos tardan en tránsito por el epidídimo alrededor de 15 días (Nagashima y Songsasen, 2021).

El órgano copulador del macho está compuesto por una raíz, cuerpo y glande. En su porción distal, al nivel de la raíz, presenta dos cuerpos cavernosos separados por un tabique medio (Getty y Sisson, 2002). Estos cuerpos cavernosos se encuentran compuestos por tejido eréctil, revestido cada uno por una túnica albugínea de tejido conectivo denso con fibras elásticas (Bacha y Bacha, 2001). En su parte craneal presenta un hueso, él *os penis*, considerado como una porción osificada del cuerpo cavernoso. Ventralmente se presenta un surco para la uretra, dorsalmente convexo, cranealmente reducido y con una prolongación fibrosa curvada (Getty y Sisson, 2002). Los machos muestran conductas de monta y empuje desde una edad temprana, 4 a 5 semanas, dichas actitudes permiten el aprendizaje de las conductas de apareamiento propias de su sexo. En los adultos, las feromonas presentes en la descarga vulvar y en la orina de la hembra en celo atraerán al macho (Ettinger y Feldman, 2007). Una vez que la hembra se encuentra receptiva el macho intentará montarla, una vez montado el macho se sujetará por los flancos hacia delante y penetra a la hembra. La erección se verá ayudada por los

estímulos de roce con la vulva de la hembra, existirá un flujo de sangre hacia los cuerpos cavernosos que junto al hueso peneano brindarán la rigidez necesaria para la penetración, previa a esta intromisión se eyaculara la fracción pre-espermática. Durante la penetración se estimularán las terminaciones sensitivas peneanas, por la temperatura y presión ejercida por la vagina. En esta fase se produce la ingurgitación completa de la porción larga y del bulbo del glande que dará lugar a la fijación del pene dentro de la vulva (abotonamiento). Durante la erección, el semen llega a la uretra prostática, e impulsado a través de la uretra pélvica. Con ayuda de las contracciones de los músculos bulbocavernoso e isquiocavernoso, el semen es expulsado por el orificio uretral externo y se produce la eyulación, la cual dura de 1 a 2 minutos (Ettinger y Feldman, 2007). Al finalizar la eyulación el macho pasará uno de los miembros por la grupa de la hembra quedando enfrentados por la cola. En esta posición, el pene sufrirá una flexión de 180° dentro de la vulva este movimiento no causará dolor ni molestia. En algunos machos este movimiento se obvia, quedando algunos paralelos o sobre la hembra. Durante el abotonamiento se eyaculará la fracción prostática, este tiene una duración de 10 a 45 minutos (Stornelli y García, 2016).

2.2 Anatomía reproductiva de la hembra

Los órganos reproductores de la perra se encuentran conformados por los ovarios, encargados de la producción de los gametos femeninos y hormonas, los oviductos, los cuernos uterinos y el cuerpo del útero, la vagina y el vestíbulo que se abre al exterior en la vulva, que por igual tiene función para la micción (Figura 2; Dyce y cols. 2011). Dichos órganos varían en sus tamaños dada la diversidad en las tallas de las razas existentes en esta especie. Los ovarios son de forma oval alargada, de longitud media de 2 cm, se sitúan caudalmente al riñón y asientan a la altura de las vértebras LII o LIV. Se encuentran envueltos completamente por la bolsa ovárica, que es la fusión del mesovario distal y el mesosalpinx, formada por dos capas con gran cantidad de grasa y músculo liso, lo que hace que los ovarios no sean tan visibles como en otras especies (Figura 3; Getty y Sisson, 1993).

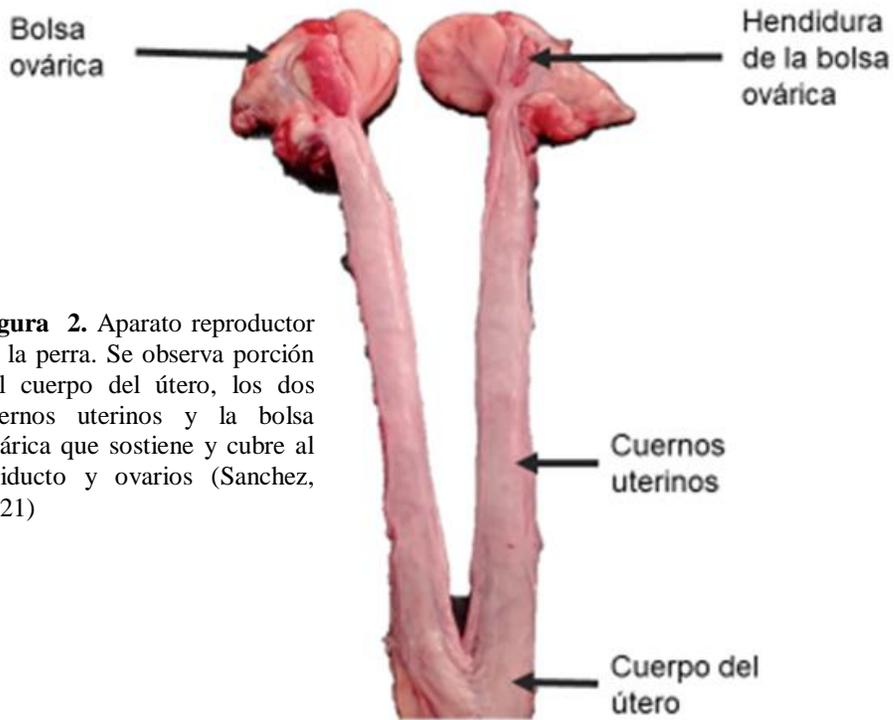


Figura 2. Aparato reproductor de la perra. Se observa porción del cuerpo del útero, los dos cuernos uterinos y la bolsa ovárica que sostiene y cubre al oviducto y ovarios (Sanchez, 2021)

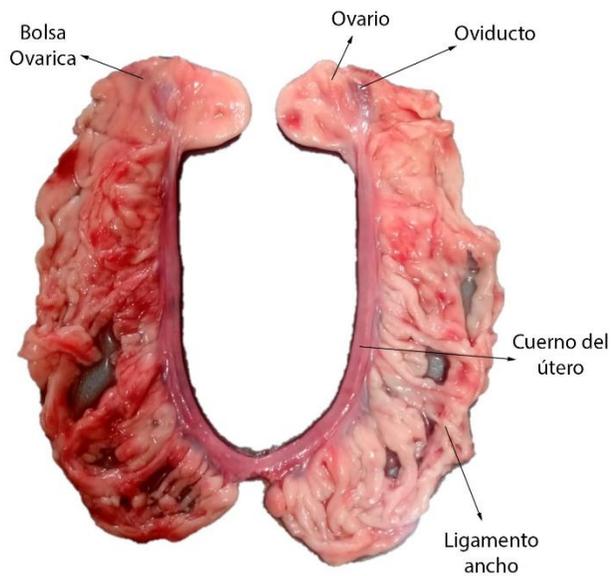


Figura 3. Aparato reproductor de la perra con ligamento. Se observa los cuernos uterinos rodeados por el ligamento ancho, la bolsa ovárica se presenta con gran contenido de grasa lo que hace poco observable a los ovarios (Sanchez, 2021)

El ovario está unido por los ligamentos ovárico y suspensorio. La bolsa ovárica se abre en la pared medial con una hendidura donde se pueden observar un pequeño número de fimbrias de color más oscuro. El oviducto sigue un curso tortuoso dentro de las paredes de la bolsa ovárica, presentando una amplia curva que pasa primero en dirección craneal al ovario para continuar caudalmente al mesosalpinx, la unión del oviducto con el cuerno del útero no presenta tanta grasa en comparación con otras especies (Figura 4; Dyce y cols. 2011).

El ovario es irrigado por la arteria ovárica que se origina de la aorta abdominal. La arteria ovárica, a su vez, se divide en tres ramas: 1) la rama ovárica ; b) la rama tubárica que irriga las porciones craneales del oviducto, el mesosalpinx, la bolsa ovárica (en la rata) y el tercio craneal y medial del ovario; c) la rama uterina se anastomosa con las ramas segmentales de la arteria uterina e irrigan a la porción craneal del cuerno uterino; y d) la arteria urogenital da origen a la arteria uterina y emite ramas segmentales que se anastomosan con la arteria ovárica (Céspedes y cols. 2006).

En la perra, los oviductos, de 5 a 8 cm de longitud, se dirigen cranealmente por la parte lateral de la bolsa ovárica y luego por la parte medial (Getty y Sisson, 1993). Se encuentran ubicados dentro de la bolsa ovárica, la entrada de ésta se ve reducida por la protrusión de la fimbria. Las porciones siguientes del oviducto siguen un curso tortuoso dentro de la bolsa ovárica, el oviducto hace una curva que se dirige de forma craneal en el mesovario distal y luego cruza craneal al ovario para continuar caudalmente por el mesosalpinx. Estos se conectan directamente con los cuernos uterinos (Figura 4 y 5; Dyce y cols. 2011). El útero presenta un cuerpo pequeño (de 2 a 3 cm) con dos cuernos alargados (12-15 cm) (Figura 2) que asientan totalmente en el abdomen, divergiendo hacia cada riñón. La vagina es relativamente grande y estrecha cranealmente. El vestíbulo vaginal conecta la vagina y el orificio uretral con la vulva (Getty y Sisson, 1993).

2.3 Fisiología reproductiva de la hembra

Generalmente, las perras son consideradas monoéstricas no estacionales, con un solo celo por estación reproductiva, primavera y otoño en la mayoría de los individuos (Nagashima y Songsasen, 2021). En la mayoría de las razas, si bien existen algunos meses con mayor actividad sexual, no se ha podido demostrar una distribución bimodal de los periodos estrales (Concannon y cols. 2011). La pubertad es variable según el tipo de raza, ésta se alcanza en torno a los 6 a 7 meses con un rango de 4 a 24 meses. Las razas pequeñas presentan su primer celo a los 6-10 meses, por su parte las razas de talla grande lo presentan a los 18-24 meses (López 2014). El ciclo estral de la perra difiere al de otras especies, éstas presentan una fase lútea espontánea con una duración similar o un poco más extensa que su fase folicular 64 ± 1 día. Por su parte, la gestación tiene una duración de alrededor de 65 ± 1 día (Stornelli y cols. 2006; Concannon, 2011). Las perras y la mayoría de los cánidos salvajes ovulan espontáneamente en ausencia de un macho. El ciclo estral de las perras se divide en 4 fases, que presentan características muy particulares, estos se describen a continuación.

Proestro. Esta etapa tiene una duración de 5 – 20 días, con un promedio de 9 días. El periodo desde el inicio del proestro hasta el inicio del próximo proestro, se conoce como el intervalo inter-estro (Martí 2011). En la hembra hay un aumento del tamaño de la vulva, con descarga serosanguinolenta de origen uterino. Esto corresponde al incremento en la irrigación del útero, que producirá la salida por diapédesis de eritrocitos hacia la luz del vestíbulo vaginal, que en conjunto con las secreciones uterinas constituirán la descarga vulvar (López 2014). La mucosa vaginal se observa edematizada, cambiando su tono de rosado a blanco a medida que avanza el periodo, con presencia de líquido serosanguinolento superficial. Los pliegues se vuelven más profundos dando una apariencia lisa. Los frotis del epitelio vaginal, al principio de esta etapa, muestran células parabasales acompañadas de un número variable de neutrófilos. Sucesivamente estas células van cambiando, para observar células escamosas intermedias y más tarde células cornificadas grandes con ausencia de neutrófilos, los picos de carnificación se observan 1 a 6 días previos al aumento de la LH (Concannon, 2011).

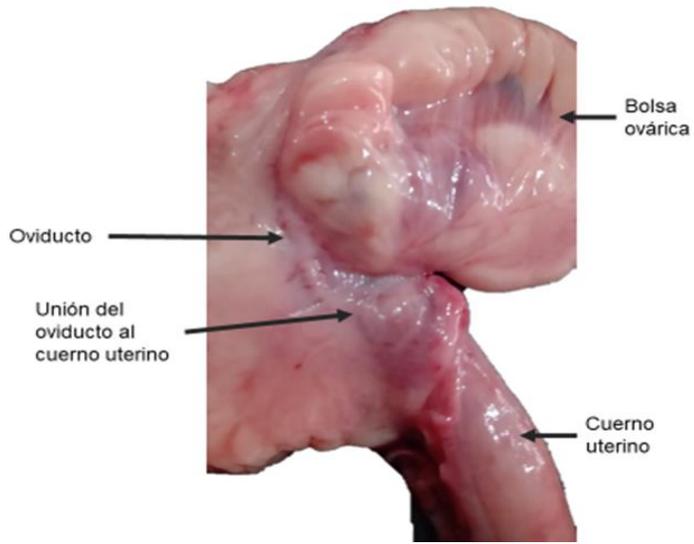
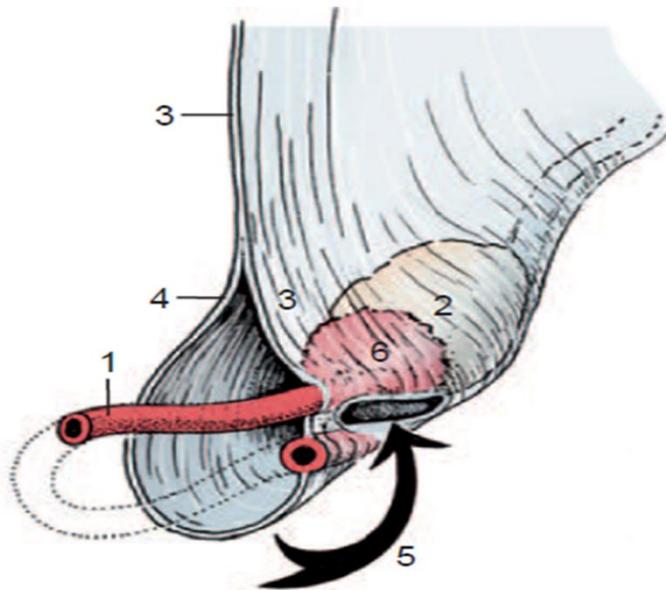


Figura 4. Presentación in vivo del oviducto y el cuerno del útero, en la figura se puede apreciar claramente la bolsa ovárica que envuelve al oviducto, así como la unión que tiene con el cuerno del útero (Sanchez, 2021)

Figura 5. Sección esquemática del sistema de suspensión del ovario y el oviducto. La bolsa ovárica presenta una hendidura estrecha con el ovario atrapado en ella. 1, tuba uterina; 2 ovario; 3, mesovario; 4, mesosalpinx; 5, la flecha indica la hendidura de la bolsa ovárica; 6, fimbria-infundíbulo. Adaptado de Dyce y cols. 2011.

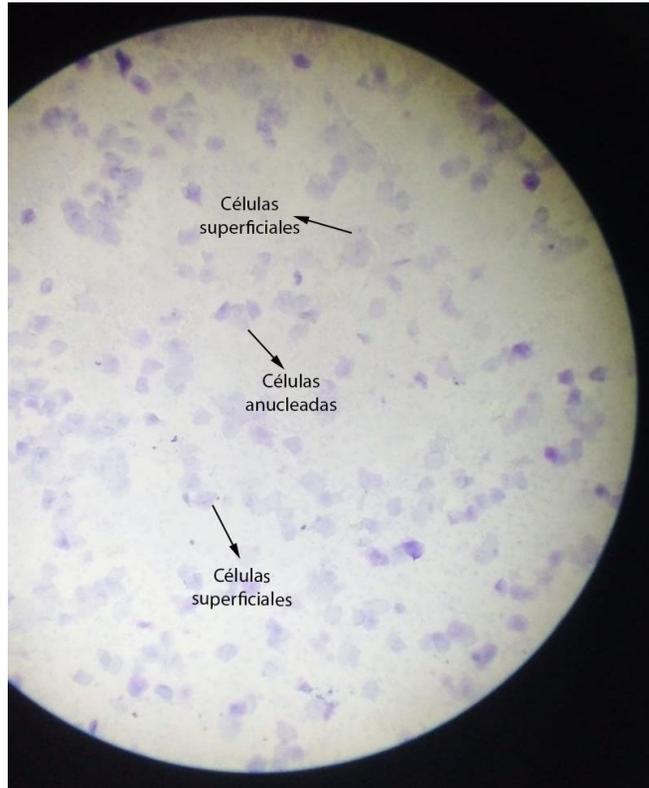


Los folículos ováricos en desarrollo producen un aumento gradual en los niveles de E2, de 10 a 14 días. Luego de alcanzar su pico máximo 2 a 3 días previos a la receptividad, existirá un descenso rápido de éste y consigo el aumento de la LH. Los niveles séricos de E2, aumentaran progresivamente de 5 a 15 pg/ml (~20-55 pmol/l) inicialmente, para llegar a alcanzar picos de 40-120 (media 70) pg/ml (~150-450, media 255 pmol/l) (Concannon, 2011; Figura7). Al comienzo de esta etapa comienza la atracción de los machos por las hembras, con intentos de monta no consentidos y mostrando un comportamiento agresivo a ellos, que disminuye conforme este periodo evoluciona. El periodo termina cuando la hembra presenta receptividad por los machos, esto ocurre de 0.5- 3 días post el pico de E2 y dentro de un día del pico pre-ovulatorio de LH. El proestro fisiológico culmina con el pico pre-ovulatorio de LH. La atracción del macho se ve dada por la acción de la secreción de feromonas (Concannon, 2011).

La perra presenta una luteinización folicular pre-ovulatoria, relacionada con el aumento sérico de los niveles de P4, hecho que ocurre de 1 a 2 días previos al pico de LH. La luteinización se refiere al cambio morfológico y bioquímico de las células de la granulosa y de la teca, las cuales se transforman en células grandes (granulosas luteales) y pequeñas (tecales luteales), para dar lugar al cuerpo lúteo. Este hecho coincide en la mayoría de las especies con el periodo post-ovulación. Contrario a lo ocurrido en las perras, el cual involucra tanto células de la teca como de la granulosa, pero sin diferenciación a células luteales grandes y pequeñas, la explicación a dicho evento es aún un tema desconocido (De Los Reyes y cols. 2017).

Estro. El estro tiene una duración de alrededor de 5-15 días, disminuyendo lenta o rápidamente después de los 5 a 10 días, con un promedio de 9 días (Martí 2011; Concannon, 2011). Clínicamente se define que el estro dura hasta que anatómicamente y vaginalmente ya no se observen signos de cornificación total o máxima, sino más bien haya descamación regional extensa, con aparición de células no cornificadas. El epitelio se observa adelgazado y existirá la migración de neutrófilos a la luz, dichos cambios suelen ocurrir entre 6 y 11 días posteriores al pico de la LH. Anatómicamente se puede observar el arrugamiento de la mucosa vaginal, esto en respuesta a la fuerte disminución de los estrógenos, el pico máximo de este evento sucede entre el 4-5 día. En la citología, se observa la presencia de células intermedias y superficiales queratinizadas, algunos eritrocitos y poca presencia de moco (Figura 6; Stornelli 2016).

Figura 6. Citología vaginal de perra. Se observan algunas células superficiales, con núcleo pequeño y gran cantidad de células anucleadas (Sánchez, 2021).



Endocrinológicamente, el estro ocurre en respuesta a la disminución del E2, que comienza a disminuir poco antes del pico de LH y continua durante todo el estro, este inicio se facilita de forma sinérgica por el rápido aumento de la P4 resultante del pico de LH. Hay un declive en los valores de E2, desde los valores máximos del proestro tardío a valores intermedios de 10 a 20 pg/ml (40 a 90 pmol/l). Por su parte, la P4 sérica aumenta por encima de 1 a 3 ng/ml (3 a 6 nmol/l) previo al pico preovulatorio de LH, aumentando inmediatamente o posterior de 1 a 3 días hasta llegar a 10 a 25 ng/ml (~30 a 80 nmol/l) al día 10, al final del estro o poco después de este. La ovulación ocurre aproximadamente 2-3 días posterior al pico de LH. Los óvulos se liberan como ovocitos primarios y no se vuelven fértiles durante 2 hasta 4 días después de la ovulación, montas 9 días antes a 8 días después de la ovulación pueden dar lugar a una fertilización exitosa (Urhausen y cols. 2011; Concannon, 2011; Goodman 2002). En esta etapa

se observa la receptividad de la hembra al macho. El tamaño del edema vulvar disminuye al igual que la descarga serosanguinolenta, observándose descargas vulvares y una vulva flácida, lo cual permite la penetración del macho. En algunas hembras, esta variación de color no se ve marcada (Stornelli 2016).

Metaestro. Con una duración de 50 a 80 días, esta es la etapa donde el celo cesa, al igual que el edema y la descarga vulvar, y la perra rechaza al macho (Stornelli 2016). La duración va de 2 a 3 meses si la perra no ha quedado gestante, cuando ésta ha quedado preñada dura aproximadamente 67 días (Martí 2011). El metaestro comienza de 7 a 10 días después del aumento de la LH. En la citología vaginal se observa una disminución en las células cornificadas, la presencia de células superficiales y escamas anucleadas. Los niveles de P4 permanecen elevados (Martí 2011). La P4 sérica aumenta progresivamente a picos de 15 a 80 ng/ml (50 a 250 nmol/l) entre el día 20 y el 35 del ciclo, luego disminuye lentamente por debajo de 1 ng/ml (~ 3 nmol/l) en el día 55-90 (media 70). Los valores de E2 van de 15 a 30 pg/ml (~ 15 a 110 pmol/l), con valores paralelos a los de la P4 en esta etapa (Concannon, 2011).

Anestro. Con una duración de 80-240 días, durante el anestro, el ovario se encuentra inactivo. En esta etapa, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) hipotalámica aumenta su amplitud, favoreciendo la progresión del anestro temprano al tardío (Okkens y Kooistra, 2006). La GnRH estimula la liberación de las gonadotropinas pituitarias, LH y FSH. La frecuencia del pulso de LH aumenta en perras a medida que avanza el anestro. Durante esta etapa, la concentración de FSH aumenta, mientras que la de LH es baja hasta el final del anestro. Por su parte, el aumento en la concentración de FSH induce la foliculogénesis y finaliza el anestro (Kutzler, 2018). En la fase folicular implica un grupo de maduración de 2 a 8 folículos por ovario (Concannon, 2011). La citología vaginal muestra escasas células parabasales y neutrófilos y la mucosa vaginal se muestra delgada y enrojecida con capilares visibles. El E2 sérico varía entre 5 a 10 pg/ml (~ 15 a 35 pmol/l). La P4 permanece por debajo de 1 ng/ml (por debajo de ~ 4 nmol/l). La LH basal es baja, menor de (<1 a 2 ng/ml, con pulsos esporádicos y de picos variables, a menudo altos 3-30 ng/ml, a intervalos de 7 a 18 h. La FSH es alta (50 a 400 ng/ml, media de 140), con pulsos que rebasan los valores mencionados (Concannon, 2011).

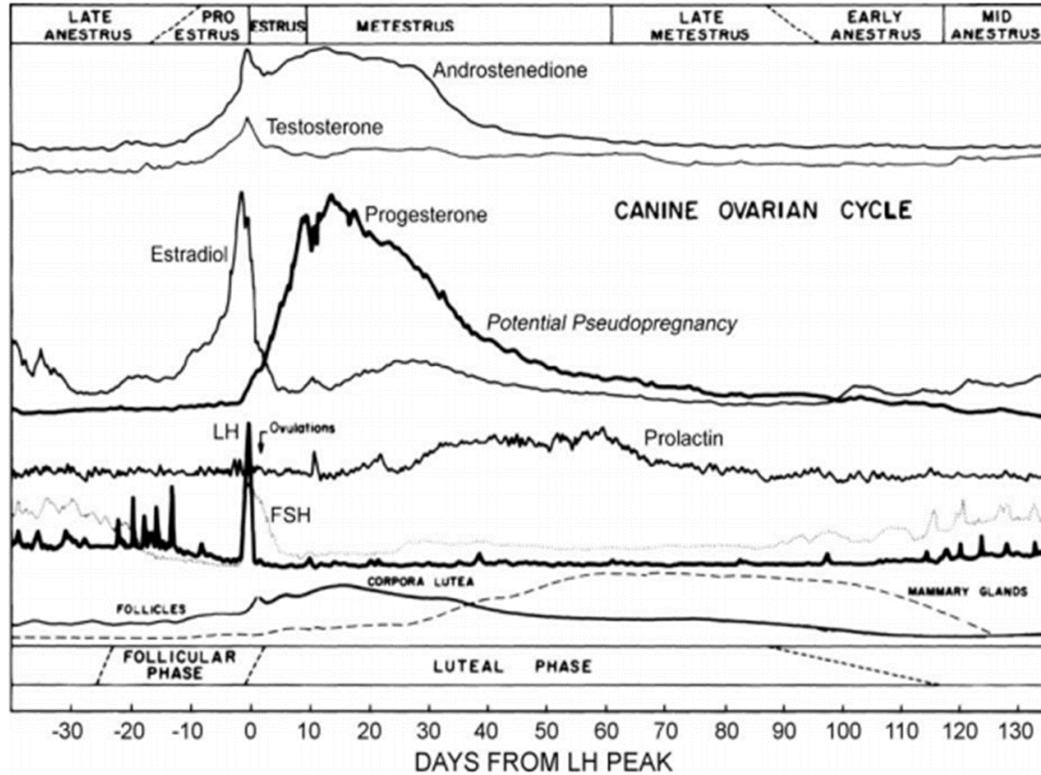


Figura 7. Ciclo estral de la perra. Esquema de los cambios en las concentraciones de las hormonas reproductivas. Se observa un pico del estradiol en el proestro tardío, 1-2 días previos al pico de LH; el aumento de la progesterona previo a la ovulación refleja la luteinización preovulatoria; el comienzo del estro y final del proestro se caracteriza por la disminución de las concentraciones de estradiol y el aumento de las concentraciones de progesterona, esta alcanza su pico máximo en el metaestro temprano. La disminución lenta de la progesterona dura 4-8 semanas refleja la regresión lútea lenta, así como un aumento en el tamaño mamario. Adaptado de Concannon, 2011.

La perra presenta una luteinización folicular pre-ovulatoria relacionada con el aumento sérico de los niveles de P4, lo que ocurre de 1 a 2 días previos al pico de LH. La luteinización se refiere al cambio morfológico y bioquímico de las células de la granulosa y de la teca, las cuales se transforman en células grandes (granulosas luteales) y pequeñas (tecales luteales), para dar lugar al cuerpo lúteo. Este hecho coincide en la mayoría de las especies con el periodo post-ovulación. Por el contrario, a lo ocurrido en las perras, el cual involucra tanto células de la teca como de la granulosa, pero sin diferenciación a células luteales grandes y pequeñas (De Los Reyes y cols. 2017).

2.4 Folliculogénesis ovárica en la perra

La información sobre el desarrollo folicular en esta especie es rudimentaria y escasa, la formación de ovogonias se puede apreciar en el feto alrededor del día 42 posterior al coito, el número de folículos varía en relación con la edad de la hembra. En perras periovulares (6 a 10 meses de edad) se observan más folículos que en las perras prepúberes (< 6 meses) y en las maduras (>10 meses) (Songsasen y Wildt, 2007). Los datos en relación con el crecimiento folicular en las etapas de anestro y proestro en las perras son mínimos. La detección del comienzo de la ovulación se ha realizado indirectamente, mediante la observación de la conducta, frotis vaginales y determinación de hormonas en sangre (Hirata y cols. 2018). El crecimiento folicular en la perra difiere al de otras especies. Los folículos permanecen debajo de la superficie ovárica, en la corteza, y estos comienzan a ser visibles hasta el proestro tardío. A pesar de que en el ovario de la perra hay varios folículos de diversos tamaños, la mayoría de estos se encuentran en una etapa antral temprana (-2mm de diámetro) y requieren de un crecimiento sustancial para convertirse en ovocitos preovulatorios (4-13mm) (Songsasen y Wildt, 2005).

En la perra, hay folículos ováricos en 5 distintos estadios, clasificados según su morfología, tamaño, tipo y número de capas de células foliculares y la presencia de líquido folicular. Los folículos primordiales se forman desde el día 17 hasta el 54 posterior al nacimiento, se caracteriza por la presencia de ovocitos de aproximadamente 25 μm de diámetro, contiene solo una capa de células de la granulosa y no presenta zona pelúcida. Contienen un núcleo central con nucléolo, grandes mitocondrias redondeadas, retículo citoplasmático liso y pequeños cuerpos de Golgi (Songsasen y Wildt, 2005).

Los folículos preantrales primarios se observan a partir de alrededor del día 120 post-nacimiento, contienen ovocitos pequeños de coloración pálida de alrededor $78 \pm 15 \mu\text{m}$. La zona pelúcida se comienza a formar y se vuelve más evidente a medida que crece la célula, esta se caracteriza por una malla de red fibrosa con numerosas fenestraciones de tamaño intermedio, el grosor de la zona pelúcida (ZP) de un ovocito completamente desarrollado es de 10 μm . Ésta comienza a presentar proyecciones trans-zonales de las células del cúmulo y llegan hasta la ZP, el oólema emite una serie de microvellosidades delgadas. Los núcleos se observan redondos y

ligeramente aplanados, la envoltura nuclear se observa lisa (Lesegno y cols. 2007). Las mitocondrias aumentan en cantidad a medida que crece el ovocito, debido a una mayor actividad metabólica. El citoplasma tiene matrices granulares, contiene hebras o laminillas de retículo endoplasmático liso y los cuerpos de Golgi aumentan en número (Reynaud y cols. 2006). En esta etapa aparecen gotas lipídicas compuestas por grasas saturadas, triglicéridos, colesterol, fosfolípidos y glicolípidos (Nagashima y Songsasen, 2021).

Los folículos preantrales secundarios contienen ovocitos desarrollados $>100 \mu\text{m}$, compuestos por lípidos citoplasmáticos oscuros. Los folículos antrales se comienzan a observar en perras a partir de los 6 meses. Posterior al pico de LH, los folículos antrales avanzan y se agrandan para convertirse en folículos pre-ovulatorios con una medida de 4 a 13 mm. La ZP es fácilmente visible en esta etapa, debido a la notable estructura de carbohidratos específicos de la especie dentro de esta estructura. Las proteínas de la ZP de esta especie se originan en las células de la granulosa y en el ovocito, estas se sintetizan y expresan de forma secuencial (Songsasen y Wildt, 2007). Reynaud y cols. (2006) observaron que posterior al pico de la LH, se produce algo de mucificación en las capas de la granulosa periférica que rodean las capas densas internas. Las células de la granulosa son responsables de la inhibición de la meiosis, sugiriéndose que una estrecha relación entre el ovocito y la corona radiada después del pico de la LH podría contribuir al retraso entre la ovulación y la reanudación meiótica. Los folículos en crecimiento experimentan atresia previa a la etapa preovulatoria. Los folículos preantrales exhiben dos tipos de regresión, el tipo A implica cambios necróticos de los ovocitos y la zona pelúcida, y la B involucra necrosis en las células de la granulosa. Esto da como resultado el desarrollo de un pseudoantro, condensación de los cromosomas y arrugamiento de la envoltura nuclear en la atresia folicular (Songsasen y Wildt, 2007).

En la perra se puede observar una incidencia alta en la presencia de folículos poli-ovocíticos (11%), en comparación con el gato (4%), humano (3%) y el mono Rhesus (2%). Dichos folículos pueden contener de 2 hasta 17 ovocitos (promedio de 2 – 3). Estos no aparecen hasta poco antes del primer estro. Existe una relación morfológica homogénea entre éstos cuando un folículo contiene menos de 3 ovocitos y heterogénea cuando sobrepasan dicho número. Muchos de estos ovocitos se encuentran en distinto estado de desarrollo o incluso

algunos de estos ya se hallan en un proceso de degeneración. En relación con el tamaño y localización, los ovocitos situados en la periferia son más pequeños y alcanzan un crecimiento tardío. Este evento ocurre con mayor frecuencia en perras jóvenes, disminuyendo a medida que la perra envejece (Astudillo, 2016; Songsasen y Wildt, 2005).

2.5 Maduración del ovocito en la perra

La perra presenta una característica muy particular en su reproducción, ya que el producto de su ovulación es un ovocito detenido en meiosis I de la profase I. Los ovocitos completan su maduración nuclear y citoplasmática dentro del oviducto dentro de 48 a 72 h posteriores a la ovulación, bajo la influencia de P4. Dados estos rasgos tan particulares, el estudio de este evento ha sido de poco éxito y grandes incógnitas (López 2014). Los folículos pre-ovulatorios (4- 13 mm de diámetro) liberan ovocitos (118-135 μm) dentro del oviducto para completar la maduración 2- 3 días posteriores, en la porción del AMP. Este evento ocurre en presencia de altos niveles de P4 (Songsasen y Wildt, 2005). Lesegno y cols. (2007) mostraron que 3 días posteriores a la ovulación el cúmulo ovocito canino se encontraba aún en etapa vesícula germinal. El espacio perivitelino se forma, pero se limita a menos de 1/5 parte del perímetro del ovocito con una distancia entre el oolema y la ZP que no excede más de 1 mm. Los ovocitos en etapa de vesícula germinal contienen una alta variedad de microtúbulos subcorticales y pequeños asteres de tubulina visibles en todo el ooplasma, los cromosomas se encuentran compactados (Lesegno y cols. 2008).

Dada el tiempo de maduración del ovocito, los espermatozoides ya se encuentran presentes alrededor de los complejos cúmulo- ovocito antes del inicio de la maduración. Saint-Dizier y cols. (2001) observaron que la fertilización de los espermatozoides al ovocito puede ocurrir cuando éste último se encuentra en etapa inmadura y, a su vez, los gametos masculinos inducen la reanudación de la meiosis del ovocito. Lesegno y cols. (2008) observaron el comienzo de la metafase I a las 98 h post-ovulación, y la metafase II a las 105 h post- ovulación. Las células del cúmulo son pocas y más sueltas, de forma irregular con proyecciones laterales muy delgadas y alta presencia de material gelatinoso. La cariólisis es evidente, con un citoplasma rico en mitocondrias, retículo endoplásmico y aparatos de Golgi. En la metafase I,

los cromosomas se organizan en una placa paralela al oolema que se distribuyen en parches de 2 mm juntos o pegados formando una forma de herradura. El cuerpo polar se observa redondo y en las proximidades de la placa. El espacio perivitelino se hace evidente hasta la etapa de metafase II. En esta etapa, las proyecciones transaccionales se ven retraídas en el espacio perivitelino o en la ZP, las microvellosidades son numerosas y colocadas sobre el segundo cuerpo polar. Los cromosomas se encuentran separados entre sí, se observan dos centros organizadores de microtúbulos dispuestos simétricamente a 5 mm de los cromosomas. El cuerpo polar se observa alargado, parcialmente fragmentado y alejado de la placa de la metafase. En ambas etapas, los gránulos corticales se distribuyen uniformemente debajo del oolema (Lesegno y cols. 2008).

Algunos factores que permiten a los ovocitos caninos reanudar la meiosis son los antioxidantes, como la cisteína y el ácido ascórbico (Songsasen y Wildt., 2007). Las hormonas ováricas son otro factor importante. La adición de estradiol-17 β y/ o P4 aumenta la proporción de ovocitos en metafase II, esto en etapa folicular. De igual manera, la exposición de los ovocitos a la gonadotropina coriónica equina (eCG) promueve la reanudación de la meiosis y ayuda a que estos se desarrollen hasta la etapa de metafase II. También, la exposición de los ovocitos a la hormona del crecimiento promueve la expansión de las células del cúmulo del ovocito (Songsasen y Wildt., 2007). Sustancias como el beta-mercaptoetanol (β ME) protege a los ovocitos del estrés oxidativo, aumentando la producción de glutatión intracelular, y mejora la capacidad de maduración nuclear. Además, proteínas específicas producidas por las células epiteliales del oviducto favorecen la maduración del ovocito (Songsasen y Wildt., 2007).

2.6 Fertilización del ovocito

En la perra la fertilización de los ovocitos también se presenta como un evento muy particular, el cual aún no se conoce por completo. Observaciones obtenidas por Reynaud y cols. (2006), demuestran que la fertilización en esta especie ocurre a las 92 h posteriores a la ovulación, con la presencia de los ovocitos en las regiones distales, más cercanas al cuerno del útero. Esto contrasta con otros mamíferos donde la fertilización ocurre en la parte proximal de esta estructura, específicamente el AMP.

2.7 Oviducto de la perra y hormonas ováricas

El oviducto de la perra tiene cinco regiones de proximal a distal: FIM, INF, AMP, IST y UTJ. Las FIM son eversiones de la mucosa del infundíbulo, ésta conecta cranealmente con el ovario y distalmente con el INF, el INF es la porción craneal que conecta con el ovario por medio de las FIM, se encuentra localizado dentro de la abertura ovárica y toma forma de embudo, presenta una abertura por la cual ingresa el óvulo a la trompa uterina (Figura 8; Praderio 2016). El AMP es la porción que sigue al infundíbulo. El IST es más estrecho. Al unirse con el cuerno del útero, esta región es embebida dentro del orificio uterino de la tuba y funciona como una barrera para los espermatozoides y óvulos (Dyce y cols. 2011).

El oviducto canino lleva a cabo funciones específicas en esta especie, éste proporciona el entorno adecuado para que se lleve a cabo la maduración de los ovocitos. Como ya se mencionó anteriormente, la perra ovula ovocitos inmaduros. El AMP es la zona donde se lleva a cabo la maduración y fertilización del ovocito (Tahir y cols. 2012). Además, el oviducto en la perra participa en la capacitación espermática y almacenamiento de los espermatozoides, puesto que dichos gametos permanecen viables hasta 11 días dentro de la estructura, esperando el momento adecuado para llevar a cabo la fertilización de los ovocitos (England y cols. 2013). Así, las células que conforman a estas estructuras permiten la capacitación y la sobrevivencia de los espermatozoides que aguardan hasta la madurez del ovocito para llevar a cabo la fertilización (Steinhauer y cols. 2004; England y cols. 2013). Los embriones no abandonan el oviducto antes de la etapa de mórula o blastocisto, 8-10 días después de la ovulación. El ambiente del oviducto es regulado por P4 (Tahir y cols. 2012). La fertilización de los ovocitos caninos ocurre a las 90 h post-ovulación, a pesar de la presencia de estos ya en el oviducto. Esto sugiere la necesidad de un período mínimo en el oviducto previo a la fertilización. A las 92 h, los ovocitos ya se encuentran en la parte distal del oviducto, en contraste con otros mamíferos donde la fertilización ocurre en la parte proximal de esta estructura (Reynaud y cols. 2006).

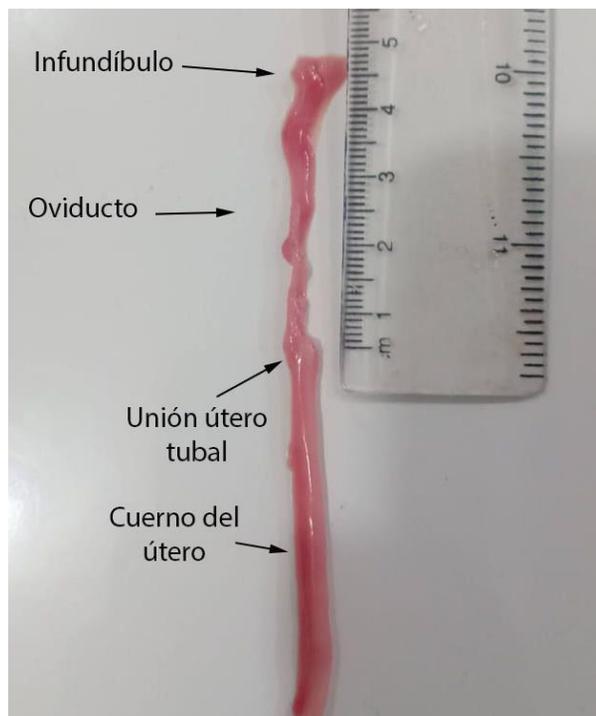


Figura 8. Oviducto. El oviducto ha sido separado de la bolsa ovárica y ovario, en la imagen se puede observar macroscópicamente una porción del cuerno uterino y la conexión que tiene con el oviducto, el oviducto presenta algunas porciones tortuosas, el infundíbulo se observa en forma de embudo (Sanchez, 2021)

El tiempo de los espermatozoides dentro del oviducto de esta especie puede ser significativamente largo, permaneciendo viables dentro de esta estructura por un prolongado tiempo, los apareamientos en la perra pueden ocurrir 9 días previos a la ovulación y dar como resultado gestaciones exitosas. Las criptas uterinas son los principales reservorios de espermatozoides (Rijsselaere y cols. 2014). Los estudios relacionados con la distribución y supervivencia de espermatozoides en el tracto reproductivo de la perra son limitados. Durante el apareamiento natural, los espermatozoides son depositados en la porción craneal de la vagina de la hembra. Posteriormente, se distribuyen por el tracto reproductivo gracias a las contracciones vaginales y uterinas, entre 25 a 50 s posteriores al apareamiento se pueden encontrar los espermatozoides ya en las puntas craneales de los cuernos uterinos (England y Burgess, 2003; Rijsselaere y cols. 2014).

Los ovocitos pueden llegar a tener una vida útil de hasta 8 días post-ovulación, en comparación a 8- 18 h en otras especies. Los cigotos abandonan el oviducto antes de la etapa de mórula o blastocito, hecho que ocurre de 8 a 10 días post-ovulación (Reynaud y cols. 2005). Dichos eventos tienen lugar en concentraciones altas y crecientes de P4, evento que se relaciona

con la luteinización pre-ovulatoria de los folículos ováricos. En algunas especies se ha demostrado que la P4 juega un importante rol como regulador de la morfología y funcionalidad del oviducto, sin embargo, en la perra, aun no se conoce del todo cómo funciona la P4 en la regulación de dichas funciones (Tahir y cols. 2012).

La expresión de PR y ER en el oviducto de la perra ha sido poco estudiada. Tahir y cols. (2012) demostraron que los PR se expresan en las capas de AMP, IST y UTJ. La expresión de los receptores varía en torno a la ovulación en las capas estromales y musculares, permaneciendo constantemente altas en el epitelio, dicho estudio concluye que la expresión dependiente de tejido sugiere que la P4 modula las funciones del oviducto. Las regiones del ampulla y fimbria tienen ERs en las tres capas de tejido y en diferentes etapas del ciclo estral, así como durante y posterior a la gestación, siendo mayor hacia el proestro. Este marcaje fue disminuyendo progresivamente hasta metaestro tardío donde se elevó (Vermeirsch y cols. 2002). Vermeirsch y cols. (2002) identificaron PR en el epitelio, estroma y células del músculo liso de la FIM y AMP, durante distintas etapas del ciclo estral y gestación. Encontraron que los PRs disminuyen, desde el proestro hasta el metaestro temprano, en las tres capas de tejido del AMP, para aumentar subsecuentemente en el estroma y tejido muscular en la etapa de metaestro tardío. En la FIM, la presencia del PR disminuye desde el proestro hasta el metaestro temprano en las capas del epitelio y estroma, aumentando ligeramente en la capa del estroma en el metaestro tardío, disminuyendo en todas las capas para el anestro, gestación y periodo post-parto. Tahir y cols. (2012) encontraron PR en la capa epitelial aumenta previo al pico de LH y ovulación, y en el tejido epitelial se observa un ligero aumento de los RP de las tres capas del IST, aumentando únicamente en el tejido epitelial de la UTJ para el día 7 post-ovulación.

Los niveles altos de P4 se asocian con la atrofia de las células secretoras y la pérdida de cilios, contrario a lo que ocurre con los niveles de E2. La P4 induce regresión del epitelio oviductal. En la perra, los niveles crecientes de P4 aumentan la apoptosis de las células del epitelio del IST y UTJ, 4 días post-ovulación y en la fase lútea media (Urhausen y cols. 2011). La UTJ es la zona principal de almacenamiento espermático junto con la porción proximal del cuerno uterino, encontrando en este un mayor porcentaje de células secretoras en el proestro y estro (England y cols. 2013; Urhausen y cols. 2011). En la perra, los RP son expresados de

manera diferencial en el músculo liso sugiriendo su efecto en la contracción y transporte de gametos; mientras que su expresión en el IST y UTJ podría relacionarse el almacenamiento y mantenimiento de espermatozoides (Concannon, 2011; England y cols. 2013).

Hipótesis

1. Se encuentra una mayor proporción de células ciliadas en las regiones de la FIM e INF, y una menor cantidad en las regiones del IST y UTJ, son en estas últimas zonas donde predominan las células secretoras, por su parte el AMP cuenta con una proporción mixta de ambas células. Las criptas se encuentran en todo el oviducto. La distribución de los receptores de estrógenos es mayor hacia la región FIM-INF, en comparación con el resto de las regiones.

3. Objetivos

4.1. Objetivos generales

- Describir las características histológicas del oviducto de la perra.

4.2. Objetivos específicos

1. Identificar las regiones del oviducto de la perra.
2. Describir los componentes histológicos que conforman a la estructura
3. Cuantificar el porcentaje de células ciliadas y secretoras existentes en cada porción de la estructura
4. Identificar la presencia de criptas a lo largo del oviducto de la perra.
5. Localizar la presencia de receptores de estrógenos en cada región y capa que compone al oviducto en la perra.

4. Metodología

Animales. Se utilizaron oviductos de perras adultas en anestro (n=6) obtenidos de ovariectomías realizadas en clínicas veterinarias bajo las condiciones bioéticas y anestesia apropiadas.

Tinción del oviducto. Los oviductos se fijaron con la solución de Bouin-Duboscq por 12 h. Se deshidrataron con alcoholes en concentración ascendente (60-100%), e incluyeron en parafina. Los oviductos se cortaron transversalmente a 7 μm con un micrótopo y fueron colocados en una laminilla. Los cortes se tiñeron mediante la tinción tricrómica de Masson, se deshidrataron en alcoholes de concentraciones ascendentes y fueron cubiertos con Cytoseal TM 60 y un cubreobjetos.

Identificación de las regiones oviductales. Por observación al microscopio se identificaron las regiones FIM, INF, AMP, ITS y UTJ. Para la descripción de cada región oviductal, las laminillas fueron observadas en sus características de las capas epitelial y muscular.

Conteo de las células ciliadas y secretoras. Una vez identificada cada una de las regiones de cada oviducto, se tomó una laminilla de la mitad de cada región, la cual se tiñó mediante la tinción ácido peryódico de Schiff (PAS) para determinar la presencia de células ciliadas y secretoras. El conteo se realizó tomando fotografías a 100x al azar (usando 5 cuadrantes, 20 células por cuadrante) en un corte por cada región. Se contarán 100 células y se calculará la proporción células ciliadas y secretoras.

Identificación de células positivas a ERs. Se utilizaron laminillas de la porción media de cada región de dos perras, se utilizaron para realizar la técnica de inmunohistoquímica. Para la determinación de la expresión de los receptores de estrógenos mediante el método avidina-biotina-peroxidasa-HRP (ABC), donde los cortes, ya hidratados, se incubaron en una solución buffer de citratos (pH= 6) durante tres noches. Posteriormente, los cortes se incubaron con los anticuerpos primarios anti-ER α (1:50; MA3-310; Thermo Scientific, MA, USA) en una cámara húmeda a 4°C durante una noche. Seguido de ello, los cortes se incubaron con un anticuerpo secundario goat anti-mouse (1:250; sc-2005; Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) durante dos

horas a temperatura ambiente. Después, los cortes fueron lavados con una solución buffer de fosfatos (PBS; pH= 7.2) e incubados con el ABC durante 1 h. Para luego realizar el revelado en una solución de diaminobenzidina (DAB) al 0.05% y H₂O₂ al 3% en PBS hasta obtener el marcaje de las células. Finalmente se deshidrataron los cortes en alcoholes de concentraciones ascendentes y fueron cubiertos con Cytoseal TM 60 y un cubreobjetos. Las células inmunoreactivas fueron observadas en la laminilla con un microscopio de luz visible (Nikon ECLIPSE E600) y se les tomaron fotos con una cámara OLYMPUS de 5.1 mega pixeles.

La puntuación de inmunohistoquímica se determinó mediante la evaluación de intensidad de la tinción marrón positiva de núcleos o citoplasma de las cinco regiones que componen al oviducto FIM, INF, AMP, IST y UTJ. En las tres capas histológicas que componen a esta estructura, músculo, estroma y epitelio. Esta calificación se realizó por dos evaluadores en una escala de ABUNDANTE, MEDIO y POCO.

Análisis estadístico: Se realizó una ANOVA de una vía para el análisis de la proporción de células ciliadas y secretoras

5. Resultados

Cabe mencionar que no en todas las perras fue posible tener todas las regiones del oviducto debido a problemas en la escisión de esta estructura. Así como a la complicación técnica de las ondulaciones del oviducto que hicieron que algunas porciones de las regiones fueran cortadas de manera longitudinal en vez de transversal. A pesar de ello, se usaron las regiones correctamente cortadas para hacer los análisis.

6.1. Regionalización del oviducto

Macroscópicamente, el oviducto en la perra se observó como una estructura tubular que rodea al ovario dentro de la bolsa ovárica, presenta algunas curvaturas en su camino (Figura 9). Histológicamente, se determinaron cinco regiones: FIM, INF, AMP, IST y UTJ. La FIM se observó como una región de forma amorfa con proyecciones largas, en forma de guante que rodean el ovario (Figura 10). La capa epitelial se distingue por estar formado por células cilíndricas simples ciliadas, dichas células se encuentran ampliamente distribuidas, el estroma es abundante, se puede apreciar la presencia de algunos paquetes de músculo liso (Figura 11). El INF se muestra como una estructura circular, con una ligera capa muscular en orientación circular, la cual va cerrando por completo a medida que avanza la estructura a la siguiente región (Figura 12). La luz se observa poco dilatada cuando la estructura ha cerrado por completo, existe alta ramificación del epitelio. El epitelio se muestra como una sola capa de células cilíndricas, con una abundante proporción de cilios (Figura 13). La región craneal del AMP es la región que conecta enseguida con el INF y se observa una luz más dilatada en comparación con las otras estructuras y no tan ramificada, en las regiones más cercanas al INF el AMP se presenta con una capa muscular en orientación circular más delgada que va engrosando a medida avanza al IST. El AMP Presenta un epitelio cilíndrico simple y una porción disminuida de células ciliadas en comparación con la estructura previa. En la porción más caudal la capa circular del músculo se ve engrosada y comienza a aparecer una capa longitudinal interna muy delgada que engrosa el perímetro de la estructura, la luz se observa disminuida (Figura 14).

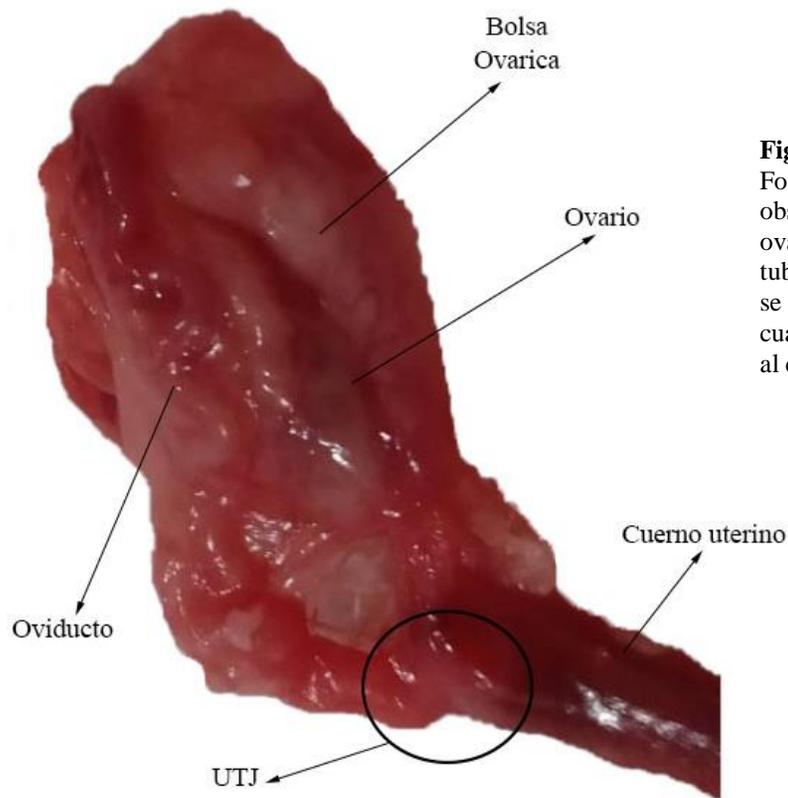


Figura 9. Ovario y oviducto. Fotografía tomada in vivo, se puede observar al oviducto rodeando al ovario, se presenta como una estructura tubular con varias curvaturas, también se puede apreciar a la bolsa ovárica la cual se ve de color más claro. La unión al cuerno del útero es visible.

La presencia de células ciliadas sigue disminuyendo, por su parte el número de células secretoras va en aumento. El diámetro del IST craneal, así como su luz se ve reducido. La capa muscular se observa gruesa, la capa longitudinal interna sigue siendo visible junto con la capa muscular circular, la cual se presenta muy engrosada. Algunas fibras de esta capa se apartan del oviducto para formar contiguamente el mesotubario. Las células ciliadas se ven disminuidas en mayor proporción, con una alta proporción de células secretoras (Figura 15). Las porciones más caudales del IST, la luz se reduce por completo, la capa muscular circular externa se ve muy engrosada. El mesotubario rodea al oviducto y se acompaña de gran presencia de tejido conectivo. Las células secretoras dominan a la estructura y las células ciliadas se encuentran disminuidas en gran medida, vasos sanguíneos rodean la estructura (Figura 16). La UTJ es la estructura que une directamente al oviducto con el cuerno uterino, se observa la presencia de gran cantidad de tejido conectivo, la luz se reduce al mínimo, la capa muscular se ve engrosada y la orientación de las fibras musculares circular externa predomina, la capa longitudinal interna

desaparece, hay una alta presencia de glándulas, así como de células secretoras, las células ciliadas han reducido en gran cantidad. Las criptas predominan en la luz (Figura 17).

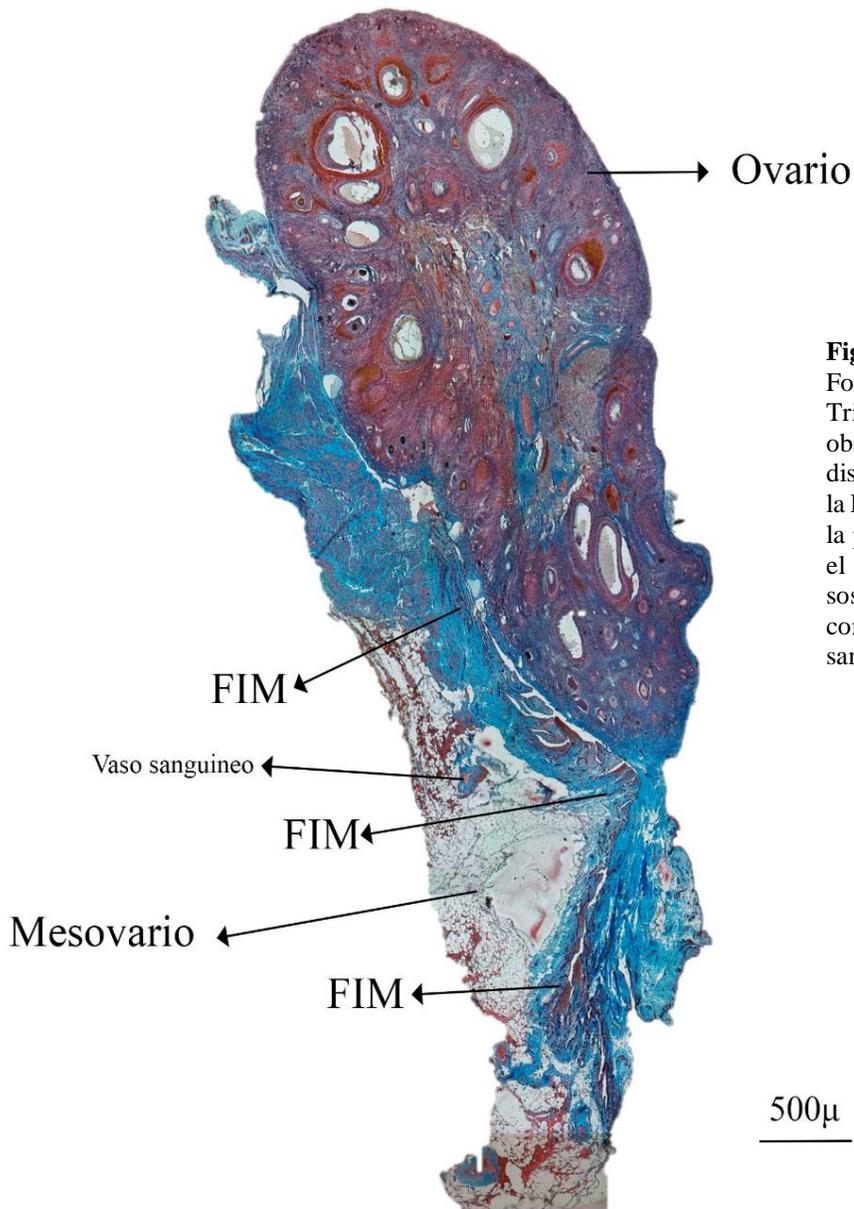


Figura 10. Ovario y oviducto. Fotografía tomada a 4x. Tinción Tricromía de Masson. Se puede observar el ovario con folículos en distintos estados de maduración, la FIM lo rodea. Se puede apreciar la presencia del mesovario que es el ligamento encargado de dar el sostén a estas estructuras, así como de algunos vasos sanguíneos.

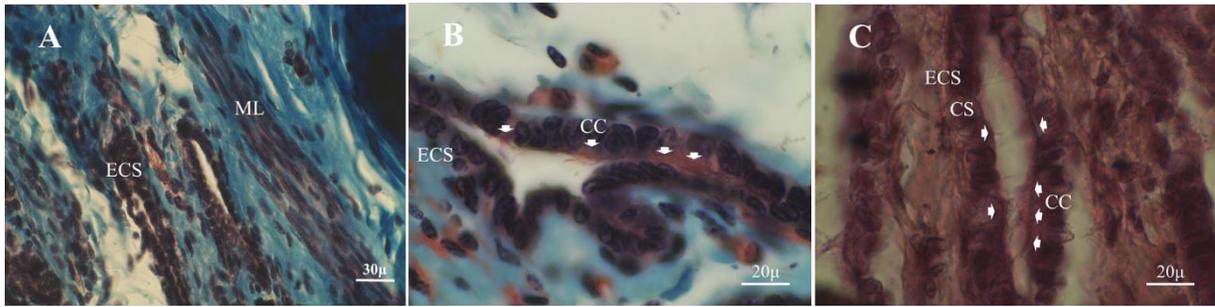


Figura 11. Microfotografías tomadas de cortes transversales en la porción de la FIM: A): Objetivo 40x Tinción tricrómica de Masson. Se puede observar un paquete de músculo liso en orientación circular, la presencia de epitelio cilíndrico simple. B) Objetivo 100x, Tinción tricrómica de Masson. Se observa epitelio cilíndrico simple, se pueden apreciar algunas células ciliadas (flechas blancas). C) Objetivo 100x, tinción PAS. Se observan varias células ciliadas, además de células secretoras. Abreviaturas: músculo liso (ML), epitelio cilíndrico simple (ECS), células ciliadas (CC), células secretoras (CS)

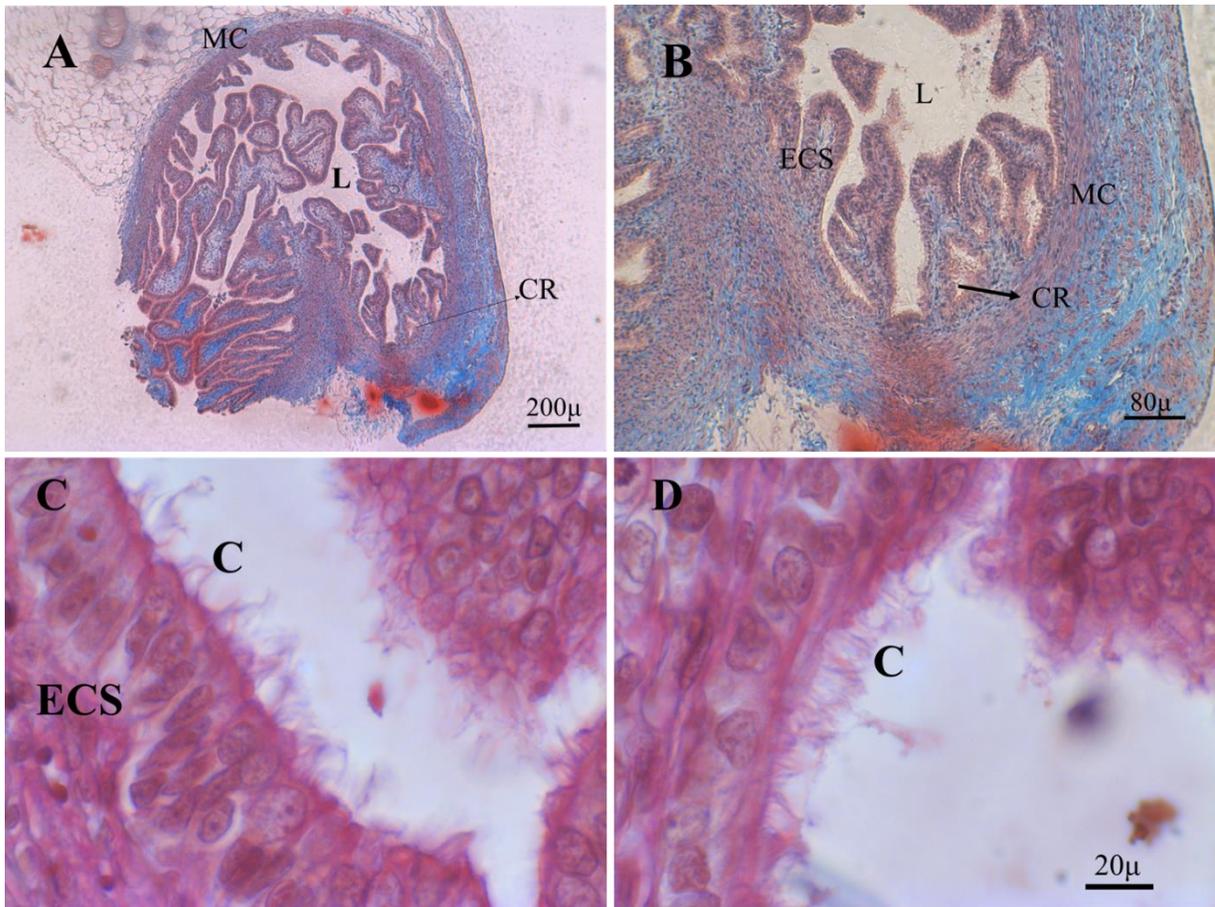


Figura 12. Microfotografías tomadas de cortes transversales en la porción de la FIM. A) objetivo 4X, tinción tricrómica, la estructura no termina de cerrar su perímetro, se observa algunas proyecciones y criptas (flecha). La luz se observa dilatada. B) objetivo 10X, se observa una delgada capa muscular en dirección circular. C) objetivo 100X, tinción PAS, capa de epitelio cilíndrico simple (ECS), con alta presencia de cilios que se observa en el límite apical de las células del epitelio. Abreviaturas: criptas (C), cilios (C), (CR) criptas, epitelio (E), epitelio cilíndrico simple (ECS), luz (L), musculatura circular (MC).

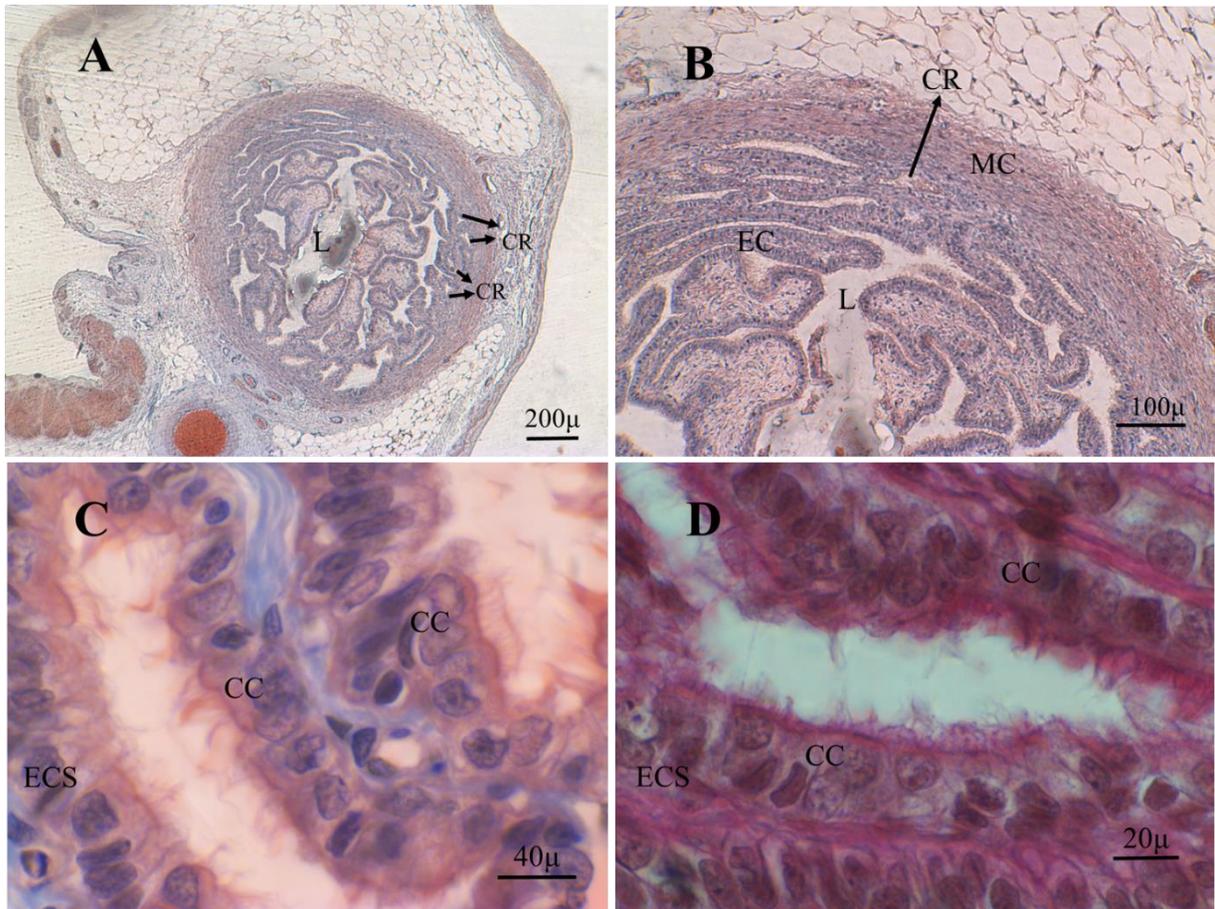


Figura 13. Microfotografías tomadas de cortes transversales en la porción del INF. A) objetivo 4X, El musculo liso en orientación circular ha cerrado por completo la circunferencia, las flechas indican la presencia de criptas. La luz se observa abierta sin embargo existe una extensa ramificación del epitelio. B) objetivo 10X, se observa la capa muscular en orientación circular. C) 40X el epitelio formado por una sola capa de células cilíndricas con presencia de cilios en su superficie apical. D) 100X Tinción PAS, se observan varias células ciliadas y unas cuantas células secretoras. Abreviaturas: cilios (C), criptas (CR), epitelio (E), epitelio cilíndrico simple (ECS), luz (L), musculatura circular (MC), células ciliadas (CC).

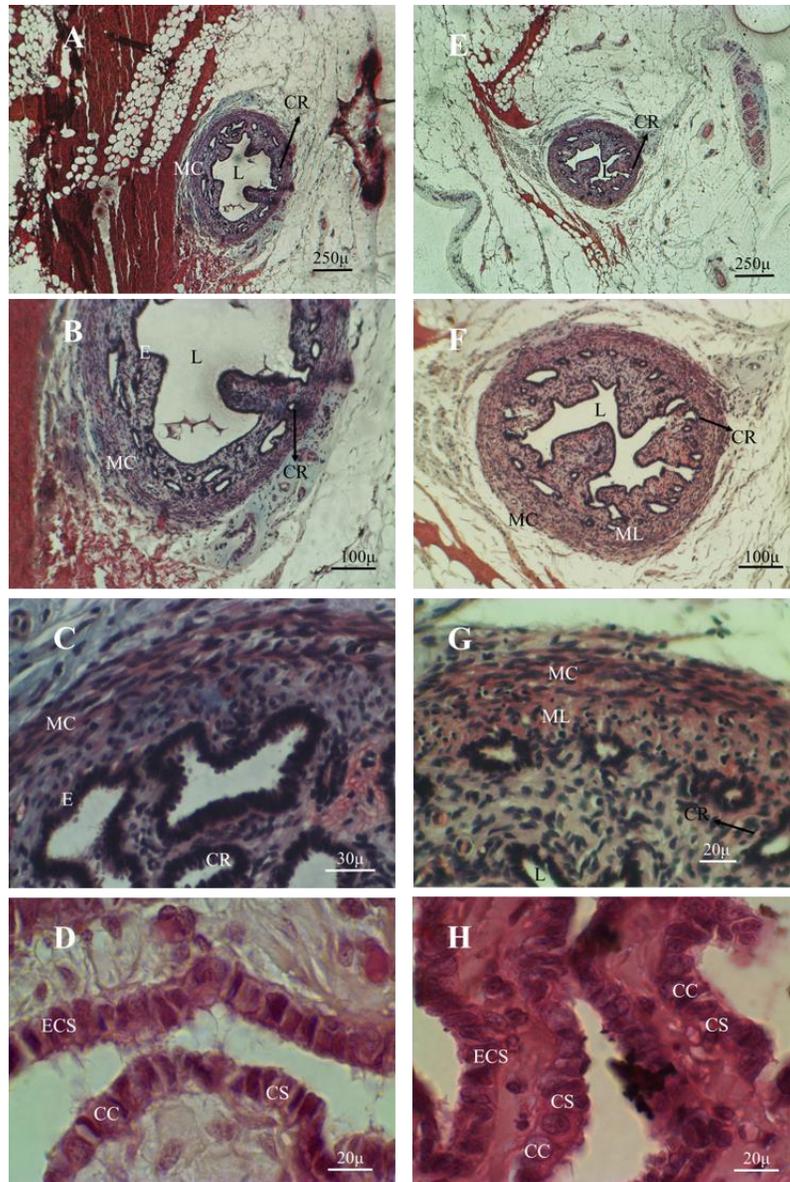


Figura 14. AMP. Microfotografías tomadas de cortes transversales en la porción del AMP. A) objetivo 4X AMP craneal, se observa una luz amplia, y la presencia de algunas criptas. B) objetivo 10X la musculatura circular es más gruesa que la observada en las regiones anteriores. C) objetivo 40X, musculatura en orientación circular. D) el epitelio cilíndrico simple se ve compuesto por algunas células ciliadas que componen a esta estructura, así como otras células secretoras. E) AMP Caudal, las criptas se ven aumentadas en número y tamaño. F) El diámetro se ve engrosado, la luz se ve más reducida. G) Comienza a aparecer la musculatura longitudinal. H) Las células ciliadas son aún presentes y visibles en cantidad, también son detectadas las células secretoras. Abreviaturas: Células ciliadas (CC), criptas (CR), epitelio (E), epitelio cilíndrico simple (ECS), luz (L), musculatura circular (MC), Células secretoras (CS), musculatura longitudinal (ML).

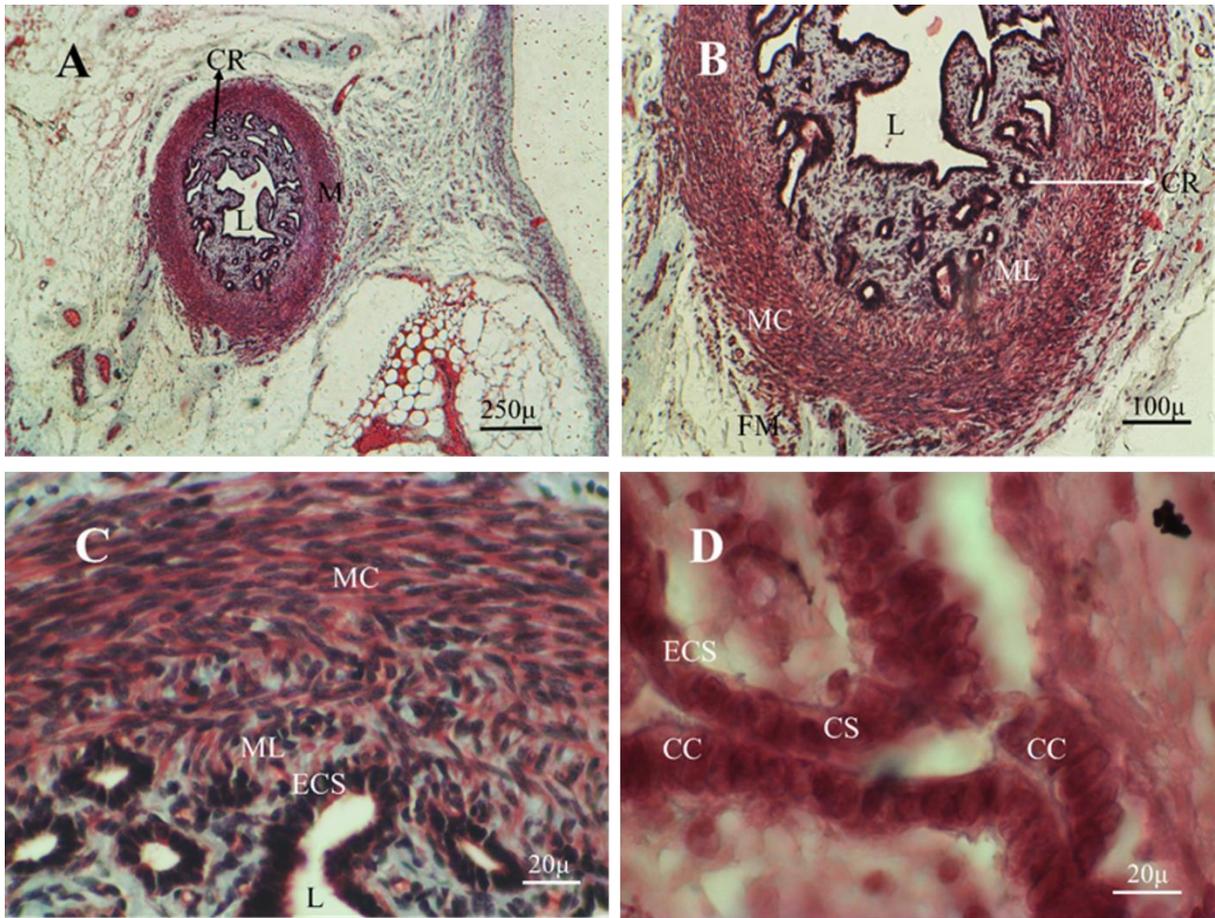


Figura 15. IST craneal. Microfotografías tomadas de cortes transversales en la porción del IST craneal. Tinción tricrómica A) Objetivo 4X, el diámetro se ve más engrosado. B) la Luz se redujo las criptas se observan abundantes, es visible como algunas fibras musculares escapan de la estructura. C) Objetivo 40X es visible la capa muscular circular mayormente engrosada y la musculatura longitudinal. D) objetivo 100X, Tinción PAS, algunas células ciliadas son visibles, así como las células secretoras. Abreviaturas: Células ciliadas ciliados (CC), criptas (CR), epitelio (E), epitelio cilíndrico simple (ECS), luz (L), musculatura circular (MC), Células secretoras (CS), musculatura longitudinal (ML), fibra muscular (FM).

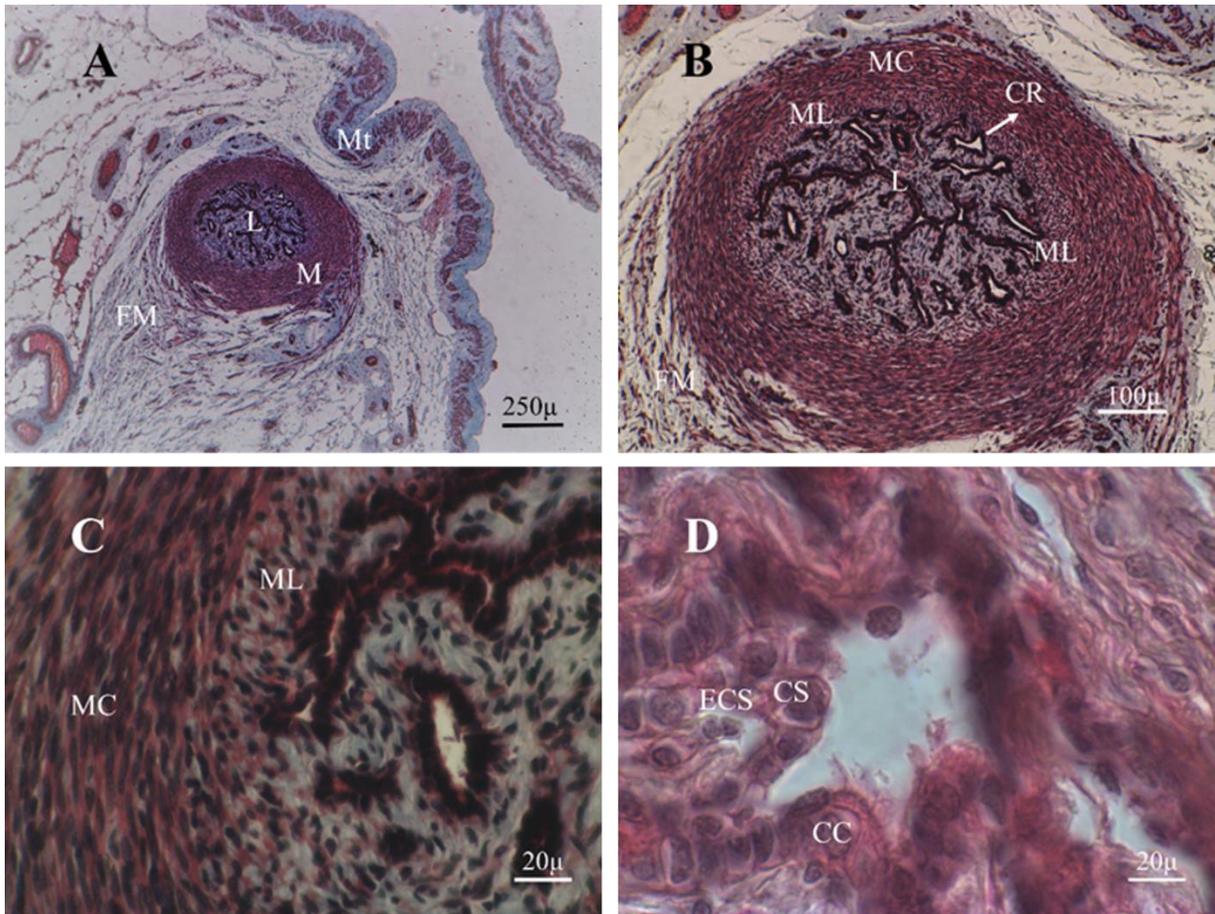


Figura 16. IST caudal. Microfotografías tomadas de cortes transversales en la porción del IST caudal. Tinción tricrómica. A) objetivo 4X, la luz se observa completamente cerrada, la capa muscular es muy gruesa, muchas fibras musculares escapan al mesotubarío. B) objetivo 10X, las criptas siguen estando presentes y son de mayor tamaño. C) objetivo 40X, la capa muscular en orientación circular es gruesa, la capa muscular longitudinal se reduce en su tamaño. D) objetivo 100X, el epitelio está formado por células cilíndricas simples, las células ciliadas se ven muy reducidas en comparación con las células secretoras. Abreviaturas: Células ciliadas (CC), criptas (CR), epitelio (E), epitelio cilíndrico simple (ECS), luz (L), musculatura circular (MC), Células secretoras (CS), musculatura longitudinal (ML), fibra muscular (FM), mesotubarío (Mt).

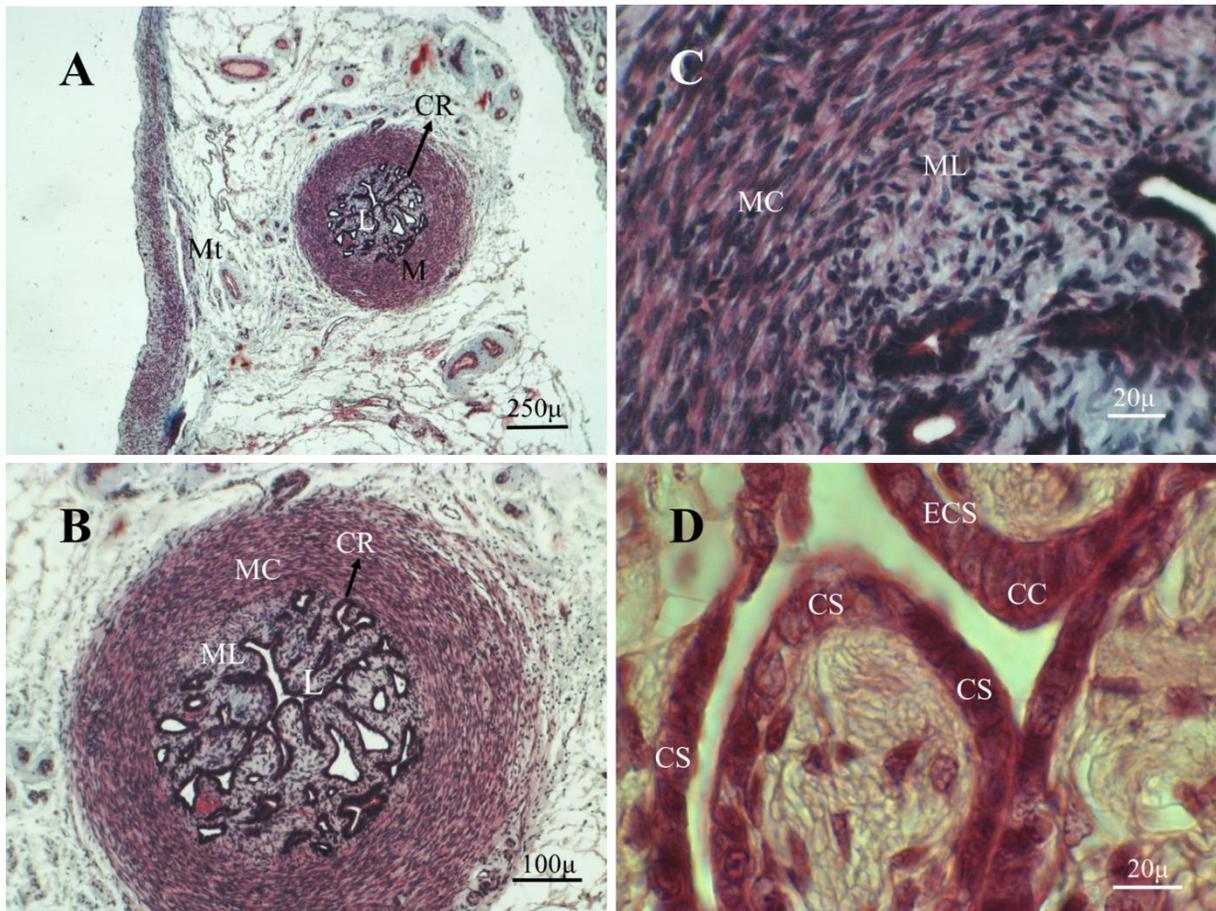


Figura 17. UTJ. Microfotografías tomadas de cortes transversales en la porción de la UTJ. Tinción tricrómica. A) objetivo 4x, el mesotubario se encuentra muy cercano a la estructura, la región se observa con una capa muscular muy prominente, la luz se ve reducida. B) 10X la flecha indica las criptas, las cuales son predominantes y de gran tamaño. C) objetivo 40X, la musculatura longitudinal es mínima y desaparece, la musculatura circular externa es la predominante. D) objetivo 100X, las células secretoras dominan en el epitelio cilíndrico simple, la proporción de células ciliadas es menor. Abreviaturas: Células ciliadas cilios (CC), criptas (CR), epitelio cilíndrico simple (ECS), luz (L), musculatura circular (MC), Células secretoras (CS), musculatura longitudinal (ML), musculo (M), mesotubario (Mt).

6.2. Proporción de células ciliadas y secretoras

Los resultados muestran que existe mayor proporción de células ciliadas en las estructuras de la FIM. Esta proporción disminuye gradualmente hasta llegar a la región de la UTJ, la disminución de células ciliadas en la región de la AMP anterior a la posterior se ve marcada, al igual que la del IST anterior y posterior. La proporción de células secretoras aumentó gradualmente como avanza el oviducto hasta región de la UTJ donde se observa su mayor expresión, el aumento del número de células secretoras en la región del AMP posterior en comparación con el AMP anterior es notable, al igual que la región del IST posterior y el anterior (Figura 18).

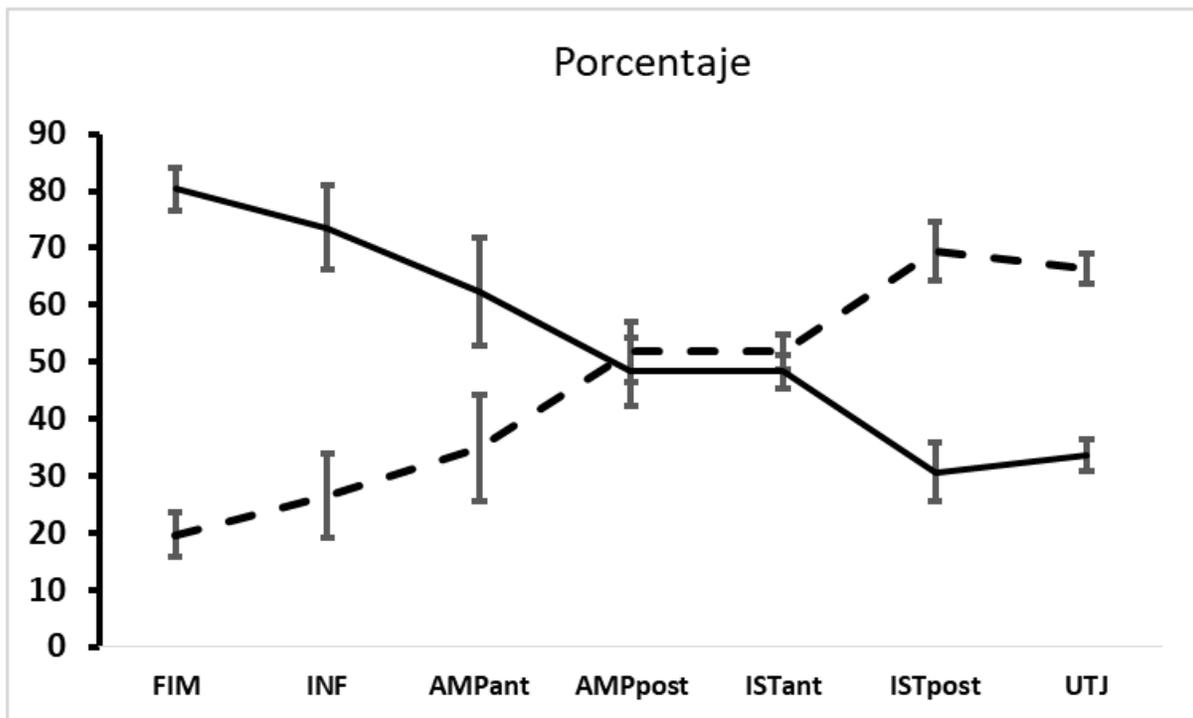


Figura 18. Porcentaje de células ciliadas y secretoras. Porcentaje de células ciliadas (línea rellena) y secretoras (línea discontinua), fimbria (FIM), infundíbulo (INF), ámpula (AMP), istmo (IST) y unión UTJ. Para la FIM e INF, se tomaron medidas solo en tres animales, por complicaciones técnicas, al igual que en el AMP posterior, IST anterior y posterior.

6.3. Receptores de estrógenos

Los resultados de la inmunohistoquímica demostraron la presencia de receptores de estrógenos en el oviducto y estructuras que lo rodean, como vasos sanguíneos y mesotubario. No hay diferencias significativas en el marcaje de RE por región, los datos observados por los dos revisores resaltaron un mayor marcaje en las zonas más cercanas al ovario, FIM e INF, sin variación entre sus capas histológicas. En la porción del AMP, el marcaje de RE es abundante, con una ligera variación en el estroma. Las regiones más caudales también presentaron marcaje, predominando en la capa muscular y epitelio el estroma nuevamente tuvo una ligera disminución en el marcaje. Las criptas de toda la estructura fueron positivas a estos receptores, al igual que las glándulas, el mesotubario tuvo un marcaje abundante (Figura 19).

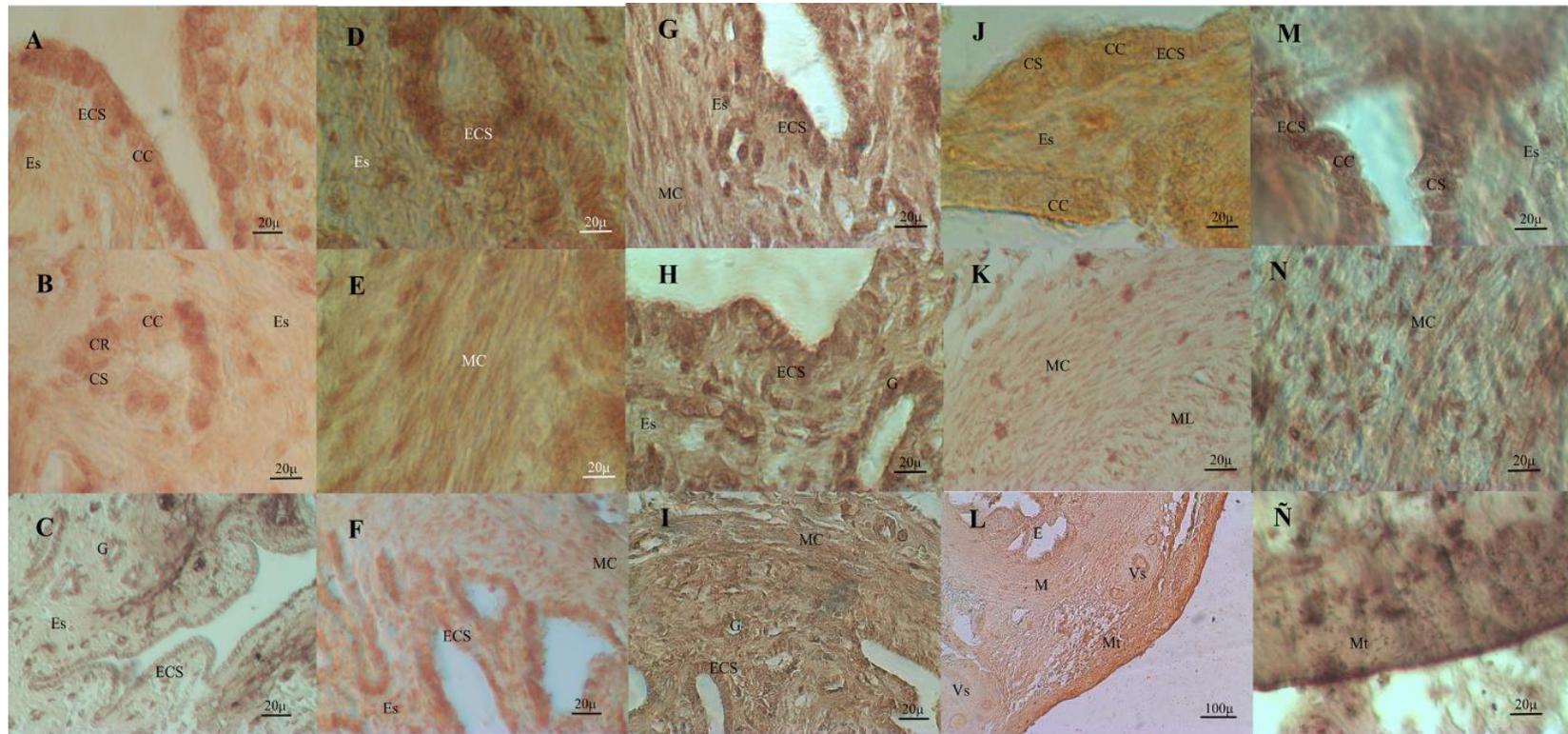


Figura 19. Inmunohistoquímica oviducto. Microfotografías tomadas por región. A) FIM objetivo 100 X, el epitelio se encuentra con un marcaje positivo se puede observar como un cilio es muy notable, el estroma también se observa teñido positivamente. B) objetivo 100X una cripta formada principalmente por células ciliadas se encuentra positiva, es evidente la tinción marrón en los núcleos de las células. C) objetivo 40X, el estroma y epitelio muestran un marcaje positivo. D) INF objetivo 100X, el epitelio y estroma presentan un abundante marcaje. E) objetivo 100X, la musculatura en orientación circular también se observa con marcaje positivo. F) objetivo 40X, las tres capas presentan un marcaje positivo. G) AMP, objetivo 100X, el epitelio, estroma y fibras musculares se observan positivas. H) objetivo 100X las glándulas también se presentan positivas. I) objetivo 40X, el marcaje es abundante. J) IST, objetivo 100X, las células ciliadas y secretoras del epitelio presentan un marcaje positivo. K) objetivo 100X, las fibras musculares en sus dos orientaciones presentan un abundante marcaje. L) objetivo 40X, los vasos sanguíneos y el mesotubarío que rodea a esta estructura presentan un marcaje positivo abundante. M) UTJ objetivo 100X, el marcaje del epitelio es abundante, el estroma se observa con una ligera disminución en el marcaje. N) objetivo 100X las fibras musculares presentan un marcaje positivo abundante. Ñ) objetivo 40X el mesotubarío es positivo al marcaje. Abreviaturas: epitelio cilíndrico simple (ECS), estroma (Es), células ciliadas (CC), células secretoras (CS), criptas (CR), glándulas (G), musculatura circular (MC), musculatura longitudinal (ML), mesotubarío (Mt), vasos sanguíneos (Vs).

6. Discusión

7.1. Regionalización del oviducto

El oviducto es una estructura importante para la reproducción de los mamíferos, es en este sitio donde se llevan a cabo algunos de los primeros eventos para la reproducción. El oviducto se encuentra dividido en diferentes regiones, las cuales cumplen funciones específicas, he aquí la importancia del estudio de cada una de sus regiones y cuales son aquellos componentes histológicos que las conforman y diferencian de las otras.

Los resultados de este estudio demuestran que el oviducto de la perra se encuentra dividido en 5 regiones y presentan características histológicas diferentes entre ellas. La FIM es una estructura independiente del infundíbulo, que rodea al ovario, ésta presenta un epitelio cilíndrico simple ciliado, así como la presencia de algunos paquetes musculares, nuestra observación coincide con los datos obtenidos por otros autores en especies como la coneja (Pedrero y cols. 2013). La FIM cumple funciones importantes, se encuentra estrechamente relacionada con el ovario y es la encargada de recoger al ovocito después de ovulación (Ng y Barker, 2015). De acuerdo con lo descrito por Garret y cols. (2008), la atresia congénita del oviducto es una patología que puede apoyar la hipótesis de que la FIM puede tener un origen embriológico diferente al resto del oviducto. Otras patologías como el síndrome de MRKH, que consiste en una malformación, donde la vagina se encuentra ausente, al igual que el útero y oviducto (o en su defecto estos últimos pueden ser rudimentarios); y los ovarios se encuentran presentes y funcionalmente normales con un remanente de FIM sin otro segmento asociado al oviducto, pueden también apoyar dicha teoría. Actualmente se ha prestado gran interés en esta región del oviducto, dado que se ha identificado como un sitio principal de formación de carcinomas serosos tempranos en humanos (Garrett y cols. 2008). Estas observaciones podrían determinar la causa de la variación tan importante que existe entre las características histológicas de esta región con las regiones que le continúan.

Continuando a la FIM encontramos al INF, éste último en la perra se presenta como una estructura circular poco dilatada, el lumen se observa muy ramificado, presenta una capa de musculatura lisa delgada que va cerrando a medida que avanza la estructura, esta capa presenta fibras musculares en orientación circular y un epitelio cilíndrico simple con presencia alta de cilios. El INF participa activamente en el transporte de gametos, los cilios son componentes importantes para el transporte de gametos, el batido ciliar transporta los ovocitos a la zona de fertilización. En estudios realizados en ratones con diversas patologías donde se identificó una disminución en el tamaño y cantidad de células ciliadas, se reportó que esto reduce la capacidad de captación de ovocitos y un aumento de la infertilidad (Hosotani y cols. 2020)

El AMP continua a la estructura previamente mencionada, tiene funciones muy importantes dentro del oviducto. En otros mamíferos, esta es la zona de fertilización. En la perra, esta zona es de gran importancia dado que es aquí donde se lleva a cabo la maduración del ovocito. En esta especie, el producto de la ovulación es un ovocito inmaduro, contrario a otros mamíferos, la reanudación de la meiosis se lleva a cabo en el oviducto 2-3 días post-ovulación, en presencia alta de P4 (Reynaud y cols. 2006; Chastant y cols. 2012). Se observó que la región del AMP presenta un lumen muy amplio y altamente ramificado, y con abundante estroma. Esto coincide con otros datos reportados en otras especies, como el ratón, donde se describe que la región presenta una mucosa con pliegues longitudinales ampliamente ramificados, que da lugar a un amplio diámetro en su superficie luminal, dicha región presenta la luz más amplia de toda la estructura (Dixon y cols. 2019). La capa muscular presenta fibras en orientación circular y se puede observar que es más gruesa en comparación con la estructura previa. En las porciones caudales más cercanas al IST, la luz se observa poco más cerrada, comienza a surgir una ligera capa de fibras musculares en la región interna en orientación longitudinal además de la capa muscular en orientación circular externa, que se observa más gruesa. Esto coincide con lo reportado por Dixon y cols. (2019), en ratones, donde describe que la capa de músculo liso en el ámpula craneal es delgada y a medida avanza hacia el IST ésta presenta una capa con dos orientaciones, a diferencia de la perra en los ratones la orientación de las fibras musculares es distinta, en esta especie se puede observar una capa longitudinal externa y una circular interna. Además, dicha orientación se ha observado en humanos, longitudinal externa y una circular media, la frecuencia de las contracciones es mayor en la capa muscular circular que en la

longitudinal (Helm y cols. 1982). La capa mucosa observada presentó un epitelio cilíndrico simple con una porción mixta de células ciliadas y secretoras.

La región caudal del IST en conjunto con la UTJ son las regiones encargadas del almacenamiento de espermatozoides (Suarez 2006). El IST está involucrado en el proceso de capacitación espermática, hecho relevante para que se lleve a cabo la hiperactivación de los gametos masculinos y solo los mejores de estos lleguen al sitio de fertilización (Coy y cols. 2012). Reynaud y cols. (2006) reportaron que las zonas más caudales del oviducto podrían ser las zonas de fertilización en la perra, contrario a lo ocurrido en otras especies, en sus observaciones describieron que la fertilización ocurre a las 90 h post ovulación en dichas zonas. En este estudio se observó que la porción craneal del IST presenta una abundante capa muscular en dos orientaciones, una circular externa predominante y otra longitudinal interna mucho menor, dichas capas hacen que la estructura se observa engrosada. Algunas fibras musculares escapan para formar el mesotubario que en la porción posterior rodea a la estructura. Por su parte, la capa muscular longitudinal interna se ve disminuida. En humanos se ha observado la presencia de tres capas musculares, una longitudinal externa, otra circular media y una longitudinal interna (Helm y cols. 1982), contrario a lo observado en la perra.

La luz del IST se observó disminuida, con un menor número de células ciliadas y mayor de células secretoras. Coincidiendo con lo mencionado por Dixon y cols. (2019) en roedores, donde las regiones más caudales se describen con una luz disminuida. Ésta además ayuda en la selección de espermatozoides y liberación paulatina de estos, ayudando a evitar la entrada de un exceso de espermatozoides, previniendo la polispermia (Coy y Aviles, 2010). La región caudal del IST conecta directamente con la UTJ, presenta una disminución significativa de la capa longitudinal interna, la luz se ve reducida por completo, con un estroma abundante. El epitelio presenta una abundante presencia de células secretoras y una disminución en las células ciliadas.

England y cols. (2013), reportaron en un estudio realizado en perras que las zonas de mayor almacenamiento espermático son la región proximal del cuerno uterino, y la UTJ. El almacenamiento espermático dentro del aparato reproductor de la hembra es fundamental para que los gametos masculinos se mantengan fertilizables durante un periodo de tiempo prolongado. Los espermatozoides permanecen durante un tiempo prolongado a espera del

momento adecuado para llevar a cabo la fertilización, por lo tanto, se deben contar con las estructuras adecuadas para llevar a cabo el mantenimiento de estos gametos a espera del momento adecuado. En esta especie, hay montas 9 días antes y 9 días después de la ovulación dando como resultado fertilizaciones exitosas. Los espermatozoides de esta especie pueden almacenarse en grupos distintos dentro de criptas y glándulas en los cuernos uterinos y en el oviducto. La supervivencia prolongada dentro de esta estructura se ve relacionada con la íntima relación entre los espermatozoides y el epitelio de estas estructuras. Las puntas de las cabezas de los espermatozoides se encuentran en constante contacto con microvellosidades en la superficie epitelial de la luz uterina y en la porción distal de la UTJ. La unión de los espermatozoides al epitelio es fundamental para la capacitación espermática. Existe un bajo número de espermatozoides capacitados en la región del útero proximal a la UTJ y alrededor de la ovulación, las señales asociadas con el líquido folicular, y la secreción oviductal parecen que pueden inducir a la capacitación de los espermatozoides y los desprende del epitelio para permitirse llegar al sitio de fertilización (Rijsselaere y cols. 2014).

La UTJ es la estructura que conecta directamente el oviducto con el cuerno del útero, la unión del oviducto al útero es variable según la especie, en rumiantes y cerdos, esta unión se da de forma gradual, en especies como los equinos, gatos y perras, la unión se describe como abrupta, el oviducto sobresale hacia el cuerno uterino formando un montículo glandular que se abre con una pequeña hendidura en el centro del montículo, esta unión sirve como barrera para el ascenso y descenso de los espermatozoides (Dyce y cols). England y cols. (2006) encontraron que la UTJ presenta dos áreas distintas, una glandular distal y una no glandular contigua al oviducto. Esta zona garantiza un reservorio adecuado que permita la liberación de espermatozoides en un periodo de tiempo apropiado en respuesta a estímulos fisiológicos específicos y a su vez proporciona un mecanismo que ayuda en la reducción de espermatozoides, ayudando así a reducir la polispermia.

La anatomía de la UTJ tiene como función restringir la entrada de organismos infecciosos, leucocitos y espermatozoides provenientes del útero. En muchas especies, los pliegues de la mucosa llenan casi por completo el lumen de esta región. Las contracciones provenientes de la capa de músculo liso y/o por congestión del líquido oviductal. En algunas

especies, incluido el humano, esta unión se encuentra llena de moco que sirve para la selección de los espermatozoides. En periodos como el estro y gracias al estímulo por el coito, la UTJ se puede volver permeable, sin embargo, se requiere de ciertas proteínas presentes en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide para que este pueda ingresar al oviducto (Suarez, 2008). Lo observado demostró una capa muscular en orientación circular gruesa, con un epitelio cilíndrico simple, con abundantes células secretoras. Lo reportado en ratones describe que el músculo longitudinal del oviducto se vuelve continuo con el miometrio, y en la punta del segmento intramural, el músculo circular forma un anillo alrededor de la abertura del oviducto similar a un esfínter (Dixon y cols. 2019).

7.2. Presencia de criptas

Nosotros observamos la presencia de criptas en todo el oviducto. En regiones como la FIM e INF se apreciaron criptas, en el AMP existe una moderada disminución en la presencia de éstas, mientras que aumentan su tamaño y presencia en las regiones del IST y UTJ. La alta presencia de criptas en la región de la UTJ coincide con los datos encontrados por Tummaruk y Tienthai (2008) realizado en cerdas. Este estudio indicó que las criptas en esta región juegan un papel importante en el almacenamiento de espermatozoides. En ovinos se ha identificado la presencia de criptas desde el INF, en el AMP se ha observado la formación de criptas más largas y con más ramas que en el INF. En el IST se puede apreciar numerosas criptas que se ven cortas y estrechas con un extremo puntiagudo, al igual que la UTJ (Yániz y cols. 2013).

Suárez en 2008 menciona que el reservorio de espermatozoides previo a la ovulación desempeña un papel fundamental para la preservación de la fertilidad de los gametos masculinos y, a su vez, reduce la incidencia de polispermia al liberar los espermatozoides de manera gradual durante el periodo periovulatorio. Específicamente en mamíferos marsupiales, los gametos se almacenan en criptas mucosas especiales, los cuales en algunos casos pueden estar retenidos mediante la supresión flagelar. En la mayoría de los mamíferos, el almacenamiento oviductal se crea con la unión del espermatozoide a la superficie epitelial, en bolsas formadas por los pliegues mucosos.

7.3. Proporción de células ciliadas y secretoras

El presente estudio muestra que la distribución de células ciliadas y secretoras varía según la región, existe una mayor proporción de células ciliadas en la estructura de la FIM. Esta proporción disminuye gradualmente hasta la región de la UTJ, el porcentaje de células secretoras es reducido en la región de la FIM, y se observa aumentado en la UTJ e IST. El AMP presenta una variedad mixta de estas células. Estos hallazgos coinciden con lo descrito por Abdelhamed y cols. (2018) en humanos, en donde se reporta una mayor distribución de células ciliadas en la región de la FIM. De igual manera Pedrero y cols. (2013) reportaron un patrón similar en conejos. La explicación de esta variación en las células ciliadas podría relacionarse con la función que tienen estas, en diversos artículos se ha comprobado la importancia de los cilios para el movimiento de los gametos y embrión, el movimiento de dichas células es en dirección al útero (Dixon y cols. 2019), eso podría explicar porque en las zonas craneales existe una mayor proporción de dichas células, ante la necesidad del transporte del gameto femenino a la zona de maduración y/o fertilización. Por su parte las zonas más caudales como el IST y la UTJ tienen funciones de capacitación espermática, almacenamiento y selección de estos (England y cols. 2006), por lo cual la presencia de estas células no participan del todo, siendo reemplazadas en mayor número por la células secretoras, las cuales aumentan para llevar a cabo las funciones previamente mencionadas, y dado el tiempo prolongado de almacenamiento espermático, se requiere de mayor secreción del epitelio oviductal para ayudar al mantenimiento de los espermatozoides; el movimiento de los gametos masculinos puede verse ayudado de su propia hiperactivación además de la contracción muscular, la cual podría además intervenir en el movimiento del embrión.

7.4. Receptores de estrógenos

La localización celular de la RE observada en este estudio mostró que no existe una variación significativa en el marcaje de RE por región. Las zonas más cercanas al oviducto como la FIM e INF son las que muestran un marcaje abundante en todas sus capas. Las regiones del AMP, IST y UTJ mostraron un marcaje abundante en las capas del músculo y epitelio. El estroma mostró menor marcaje. Las criptas, glándulas, vasos sanguíneos y el mesotubario presentaron un marcaje abundante a lo largo de todo el oviducto. Vermeirsch y cols. (2002) reportaron la presencia de los RE en el oviducto de la perra, mostrando un aumento en el marcaje de estos receptores durante el estro y una disminución en proestro temprano y metaestro. En el periodo del anestro, gestación y postparto hay una mayor expresión de ER en las capas musculares y del estroma, y menor en el epitelio.

Los estrógenos regulan cambios histológicos en el oviducto, ratones en diferente etapa del ciclo estral han demostrado que el estradiol (E2) estimula la ciliación de los epitelios. Las células secretoras se encargan de la producción del fluido oviductal, en ratones la expresión de Aqr5, encargadas de contribuir a la regulación del fluido oviductal, aumenta cuando los niveles de E2 se encuentran en su punto máximo. Además de estos efectos, el E2 regula la producción de algunas proteínas involucradas en el desarrollo embrionario (Huang y cols. 2018). La regulación de la motilidad muscular está influenciada por E2 y requiere actividad de nervios adrenérgicos, óxido nítrico, endotelina, oxitocina y prostaglandinas. Estos factores activan la señalización intracelular asociada principalmente con Ca^{2+} , cAMP o IP3 (Reuquén, y cols. 2015). En ratas, el E2 aumenta la contracción del músculo liso a través de un mecanismo no genómico, mediante la producción trifosfato de inositol (Barton y cols. 2020). En un trabajo realizado en bovinos por Huang y cols. (2018), se demostraron que las prostaglandinas sintetasas se localizan en el músculo liso del oviducto, y que estas son reguladas positivamente por el E2, aumentando la fuerza de contracción del músculo liso, facilitando así el transporte de espermatozoides. Gawronska y cols. (2000) demostraron que el oviducto humano tiene un transcrito de ARNm del receptor de LH presentes en las células epiteliales, músculo liso y vasos sanguíneos. Siendo el E2 el encargado de promover la síntesis de LHR, participando

en la relajación del oviducto. Esto podría explicar por qué en las regiones de la UTJ y el IST existe un mayor marcaje de RE en el epitelio y el músculo. Al haber una menor presencia de células ciliadas y el movimiento de dichas células ser en dirección al útero se requiere de una mayor fuerza de contracción para ayudar al movimiento de los gametos masculinos antes de ser capacitados. Lo cual se podría confirmar con la presencia de una capa más gruesa de músculo liso, y siendo las fibras orientadas circularmente las que tienen una mayor fuerza de contracción las presentes en esta zona. Al igual que por el largo periodo de almacenamiento espermático se requiere de la secreción de las células secretoras del epitelio y esta secreción se ve aumentada en presencia de E2.

Figura 20. Inmunohistoquímica oviducto. Microfotografías tomadas por región. A) FIM objetivo 100 X, el epitelio se encuentra con un marcaje positivo se puede observar como un cilio es muy notable, el estroma también se observa teñido positivamente. B) objetivo 100X una cripta formada principalmente por células ciliadas se encuentra positiva, es evidente la tinción marrón en los núcleos de las células. C) objetivo 40X, el estroma y epitelio muestran un marcaje positivo. D) INF objetivo 100X, el epitelio y estroma presentan un abundante marcaje. E) objetivo 100X, la musculatura en orientación circular también se observa con marcaje positivo. F) objetivo 40X, las tres capas presentan un marcaje positivo. G) AMP, objetivo 100X, el epitelio, estroma y fibras musculares se observan positivas. H) objetivo 100X las glándulas también se presentan positivas. I) objetivo 40X, el marcaje es abundante. J) IST, objetivo 100X, las células ciliadas y secretoras del epitelio presentan un marcaje positivo. K) objetivo 100X, las fibras musculares en sus dos orientaciones presentan un abundante marcaje. L) objetivo 40X, los vasos sanguíneos y el mesotubarío que rodea a esta estructura presentan un marcaje positivo abundante. M) UTJ objetivo 100X, el marcaje del epitelio es abundante, el estroma se observa con una ligera disminución en el marcaje. N) objetivo 100X las fibras musculares presentan un marcaje positivo abundante. Ñ) objetivo 40X el mesotubarío es positivo al marcaje. Abreviaturas: epitelio cilíndrico simple (ECS), estroma (Es), células ciliadas (CC), células secretoras (CS), criptas (CR), glándulas (G), musculatura circular (MC), musculatura longitudinal (ML), mesotubarío (Mt), vasos sanguíneos (Vs).

8. Conclusión

El oviducto en la perra presenta cinco regiones, las cuales se diferencian en su composición histológica, las más cercanas al ovario son la fimbria e infundíbulo; le continúan el ampulla, istmo y la unión uterotubal, siendo estas dos últimas las más cercanas al útero. Las diferencias en su composición histológica son desde el grosor de sus capas musculares y la orientación en sus fibras, así como la presencia de células secretoras y ciliadas, las cuales varían según la zona, siendo las zonas más cercanas al ovario las que cuentan con un mayor número de células ciliadas y las más caudales y cercanas al útero, las que cuentan con mayor presencia de células secretoras. Las hormonas regulan muchas de las actividades que se llevan a cabo en esta estructura, regulando la actividad de sus capas histológicas, el E2 induce a la proliferación celular, aumento en la secreción de las células secretoras, además de la contracción muscular. La perra presenta características muy propias en su reproducción, lo que hace que esta especie presente aún grandes incógnitas en este evento, además que no ha sido del todo estudiada y requiere de un mayor análisis en todos los eventos relacionados con su reproducción, dado que el producto de la ovulación en esta especie es un ovocito inmaduro, y dicha maduración se lleva a nivel del oviducto es fundamental realizar un estudio exhaustivo de esta estructura.

9. Referencias

1. Abdelhamed ZA, Ryan TA, Fuller M, Coulson-Gilmer C, Abdemottaleb D, Wang TL, Kaun JC, Wang P, Hutson R, Wilkinson N, Bell SM, Johnson CA. 2018. Characterization of Primary Cilia in Normal Fallopian Tube Epithelium and Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*, 28(8): 1535-1544.
2. Bacha Jr WJ, Bacha LM. 2001. Atlas color de Histología Veterinaria. Editorial Inter-Médica, Buenos Aires, República Argentina.
3. Banliat C, Tsikis G, Labas V, Teixeira-Gomes AP., Com E, Lavigne R, Pineau C, Guyonnet B, Mermillod P, Saint-Dizier M. 2020. Identification of 56 Proteins Involved in Embryo–Maternal Interactions in the Bovine Oviduct. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (2):466.
4. Barton, B. E., Herrera, G. G., Anamthathmakula, P., Rock, J. K., Willie, A. M., Harris, E. A., . . . Winuthayanon, W. (2020). Roles of steroid hormones in oviductal function. *Reproduction*, 125-137.
5. Buhi WC, Alvarez IM, Sudhipong V, Dones-Smith MM. 1990. Identification and characterization of de novo-synthesized porcine oviductal secretory proteins. *Biol of Rep* 43(6) ,929-938.
6. Caballero-Campo P, Buffone MG, Benencia F, Conejo- García JR, Rinaudo PF, Gerton GL. 2014. A Role for the Chemokine Receptor CCR6 in Mammalian Sperm Motility and Chemotaxis. *J Cell Physiol*. 229(1): 68-78.
7. Céspedes R, Pradere J, Bermudez V, Díaz T, Perozo E, Riera M. 2006. Irrigación arterial y venosa del útero y los ovarios de la perra (canis familiaris) y su relación con la actividad ovárica. *Revista Científica* 16(4): 353-363.
8. Chastant-Maillard, S., Saint-Dizier, M., Grimard, B., Chebrou, M., Thoumire, S., & Reynaud, K. (2012). Are Oocytes From the Anestrous Bitch Competent for Meiosis? *Reproduction in domestic animals*, 74-79.
9. Concannon PW. 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci.*124 (3-4): 200-210

10. Coy P, García-Vázquez FA, Visconti PE, Avilés M. 2012. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction*. 144:649-660.
11. De Los Reyes Monica; J. P. (2017). Analysis of LH receptor in canine ovarian follicles throughout the estrous cycle. *Theriogenology*, 71-77.
12. Dixon RE, Hwang SJ, Hennig GW, Ramsey KH, Schripsema JH, Sanders KM, Ward SM. 2009. Chlamydia Infection Causes Loss of Pacemaker Cells and Inhibits Oocyte Transport in the Mouse Oviduct. *Biol Reprod*. 80(4): 665-673.
13. Dixon, R. E., Hwang, S. J., Kim, B. H., Sanders, K. M., & Ward, S. M. (2019). Myosalpinx Contractions Are Essential for Egg Transport Along the Oviduct and Are Disrupted in Reproductive Tract Diseases. *Advances in experimental medicine and biology*, 265-294.
14. Dyce KM, Wensing CG, Sack WO. 2011. *Anatomia Veterinaria* (4ta ed.). Editorial El Manual Moderno. Mexico.
15. England , G., & Burgess , C. (2003). Survival of dog spermatozoa within the reproductive tract of the bitch. *Reproduction in Domestic Animals*, 325-326.
16. England G, Burgess CM, Clutterbuck A, Freeman S. 2013. Epithelial surface changes and spermatozoa storage in the reproductive tract of the bitch. *The Veterinary Journal*. 195(2): 185-191
17. Ettinger JS, Eldman CE. 2007. *Tratado de Medicina Interna Veterinaria* (6ta. Ed.). Editorial ELSEVIER. Buenos Aires, Argentina.
18. Folmes CD, Terzic A. 2014. Metabolic Determinants of Embryonic Development And Stem Cell Fate. *Reprod Fertil Dev*. 27(1): 82-88.
19. Garrett, L. A., Vargas, S. O., Drapkin, R., & Laufer, M. (2008). Does the fimbria have an embryologic origin distinct from that of the rest of the fallopian tube? *Fertility and sterility*, e5.
20. Gawronska, B., Stepien, A., & Ziecik, A. (2000). Effect of estradiol and progesterone on oviductal LH-receptors and LH-dependent relaxation of the porcine oviduct. *Theriogenology*, 659-672.

21. Gawronska, B., Stepien, A., & Ziecik, A. J. (2000). Effect of estradiol and progesterone on oviductal LH-receptors and LH-dependent relaxation of the porcine oviduct. *Theriogenology*, 659-672.
22. Georgiou, A., Sostaric, E., Wong, C., Wright, P., Moore, H., & Fazeli, A. (2005). Gametes alter the oviductal secretory proteome. *Mol Cell Proteomics*, 1785-1796.
23. Getty R, Sisson FG. 1993. *Anatomía de los Animales Domésticos* (5ta ed.). MASSON. Madrid, España.
24. Goodman M. 2002. Demystifying Ovulation Timing. *Clinical techniques in small animal practice*, 17(3): 97-1003.
25. Halter S, Reynaud K, Tahir Z, Thoumire S, Chastant- Maillard S, Saint-Dizier M. 2011. L'oviducte de mammife`re: un organe revisite. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 39(11): 625-629.
26. Helm G, Owman C, Sjöberg NO, Walles B. 1982. Motor Activity of the Human Fallopian Tube in Vitro in Relation to Plasma Concentration of Oestradiol and Progesterone, and the Influence of Noradrenaline. *J Reprod Fertil*. 64(1): 233-242.
27. Hirata M, Tanihara F, Taniguchi M, Takagi M, Terazono T, Otoi T. 2018. Follicular Development of Canine Ovaries Stimulated by a Combination Treatment of eCG and hCG. *Vet Med Sci*. 4(4): 333-340.
28. Hosotani, M., Ichii, O., Nakamura, T., Masum, A. M., Otani, Y., Ali Elewa, Y. H., & Kon, Y. (2020). Altered ciliary morphofunction in the oviductal infundibulum of systemic autoimmune disease-prone MRL/MpJ-Fas lpr/lpr mice. *Cell and tissue research*, 627-641.
29. Huang, N., Wang, C., Zhang, N., Mao, W., Liu, B., Gao, Y., . . . Cao, J. (2018). Effect of estrogen on prostaglandin synthetase in bovine oviduct smooth muscle. *European journal of pharmacology*, 287-293.
30. Hunter RH. 2012. Components of Oviduct Physiology in Eutherian Mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 87(1): 244-255.
31. Isobe T, Minoura H, Tanaka K, Shibahara T, Hayashi N, Toyoda N. 2002. The effect of RANTES on human sperm chemotaxis. *Hum Reprod*. 17(6): 1441-1446.

32. Janković SM, Varjacić M, Protic B. Relaxant Effect of Oxytocin on Isolated Human Oviduct. *Croatian medical journal*, 42(5), 511–516.
33. Jingu N, Minghui Z, Seunghoon L, Sun AO, Yoonseok N, Tai-Young H. 2018. Enhanced in vitro maturation of canine oocytes by oviduct epithelial cell co-culture. *Theriogenology*, 105: 66-74.
34. Jonge CD. 2017. Biological Basis for Human Capacitation-Revisited. *Hum Reprod Update*. 23(3): 289-299.
35. Kutzler MA. (2018). Estrous Cycle Manipulation in Dogs. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*. 48(4): 581-594.
36. Kverka MZ, Ulcova–Galova Z, Bartova J, Bibkova, Micanova Z, Tlaskalova-Hogenova H. 2012. Sperm Cells Induce Distinct Cytokine Response in Peripheral Mononuclear Cells from Infertile Women with Serum Anti-Sperm Antibodies. *PLoS one* 7(8): e441772.
37. Lamy J, Liere P, Pianos A, Aprahamian F, Mermillod P, Saint-Dizier M. 2016. Steroid hormones in bovine oviductal fluid during the estrous cycle. *Theriogenology*. 86(6): 1409-1420.
38. Lee S, Oh H, Kim MJ, Kim GA, Choi YB, Jo YK, Setyawan EMN, Lee BC. 2018. Effect of co-culture canine cumulus and oviduct cells with porcine oocytes during maturation and subsequent embryo development of parthenotes in vitro. *Theriogenology*, 106, 108-116.
39. Leese HJ, Tay JI, Reischl J, Downing SJ. 2001. Formation of Fallopian Tubal Fluid: Role of a Neglected Epithelium. *Reproduction*. 121(3): 339-346.
40. Li S, Winuthayanon W. 2017. Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *J. Endocrinology*. 232(1): R1-R26.
41. Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Ujt RM, Kushner P. 2002. Opposing Action of Estrogen Receptors α and β on Cyclin D1 Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*. 577(27): 24353-24360.

42. López, J. (2014). Reproducción veterinaria. Revisado el 23 de Junio de 2019, de <https://www.reproduccionveterinaria.com/fisiologia-y-anatomia-obstetrica/fisiologia-obstetrica2/fisiologia-reproductiva-en-la-perra/fisiologia-reproductiva-en-la-perra/>
43. Mahmood T, Saridogan E, Smutna S, Habib AM, Djahanbakhch O. 1998. The effect of ovarian steroids on epithelial ciliary beat frequency in the human Fallopian tube. *Human Reproduction*. 13(11): 2991-2994.
44. Martí AS. 2011. Reproducción y neonatología canina y felina. Editorial SERVET. España.
45. Miki K, Claphan DE. 2013. Rheotaxis Guides Mammalian Sperm. *Current Biology*. 23(6): 443-452.
46. Miller D.J. (2015). Regulation of Sperm Function by Oviduct Fluid and the Epithelium: Insight into the Role of Glycans. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 50(2), 31-39. doi:<https://doi.org/10.1111/rda.12570>
47. Nagashima, J., & Songsasen, N. (2021). Canid Reproductive Biology: Norm and Unique Aspects in Strategies and Mechanisms. *Animals*, 653.
48. Ng A, Barker N. 2015. Ovary and fimbrial stem cells: biology, niche and cancer origins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16: 625-638.
49. Nishimura A, Sakuma K, Shimamoto C, Ito S, Nakano T, Daikoku E, Ohmichi M, Ushiroyama T, Ueki M, Kuwabara H, Mori H, Nakari T. 2010. Ciliary beat frequency controlled by oestradiol and progesterone during ovarian cycle in guinea-pig Fallopian tube. *Experimental Physiology*. 95(7): 819-828.
50. Okkens AC, Kooistra HS. 2006. Anoestrus in the Dog: a Fascinating Story. *Reproduction in Domestic Animals*. 41(4): 291-296.
51. Orihuela P, Croxatto H. 2001. Acceleration of Oviductal Transport of Oocytes Induced by Estradiol in Cycling Rats is Mediated by Nongenomic Stimulation of Protein Phosphorylation in the Oviduct. *Biology of Reproduction*. 64(59): 1238-1245.

52. Pedrero Badillo F, Anaya-Hernandez A, Corona-Quintanilla D L, Castelán F, Pacheco P, Martínez- Gomez M, Cuevas E. 2013. Morphohistological Characteristics Of Rabbit Oviduct: A Proposal For A Single Regionalization. *Animal Reproduction Science*,143: 102-111.
53. Reuquén, P., Oróstica, M., Rojas, I., Díaz, P., Parada-Bustamante, A., & Orihuela, P. A. (2015). Estradiol increases IP3 by a nongenomic mechanism in the smooth muscle cells from the rat oviduct. *Reproduction*, 331-341.
54. Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Lesegno CV, Saint-Dizier M, Chastant-Maillard S. 2006. In Vivo Canine Oocyte Maturation, Fertilization and Early Embryogenesis: A Review. *Theriogenology*. 66(6-7): 1685-1693.
55. Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Thoumire S, Chebrou M, Lesegno CV, Chastant-Maillard S. 2005. In Vivo Meiotic Resumption, Fertilization and Early Embryonic Development in the Bitch. *Reproduction (Cambridge, England)*. 130(29): 193-201.
56. Rijsselaere, T., Inglatterra, G., Freeman, S., Maes, D., & Soom, U. V. (2014). Current Knowledge on the Transport and Fate of Spermatozoa in the Reproductive. *Reprod Domest Anim*, 2-7
57. Saint-Dizier , M., Renard, J., & Chastant- Maillard, S. (2001). Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *Reproduction*, 97-105.
58. Saint-Dizier M, Schoen J, Chen S, Banliat C, Mermillod P. 2019. Composing the Early Embryonic Microenvironment: Physiology and Regulation of Oviductal Secretions. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(1): 223.
59. Saint-Dizier, M., Sandra, O., Ployart, S., Chebrou, M., & Constant, F. (2012). Expression of nuclear progesterone receptor and progesterone receptor membrane components 1 and 2 in the oviduct of cyclic and pregnant cows during the post-ovulation period. *Reprod Biol Endocrinol*, 10-76.
60. Sakkas, D., Ramalingam, M., Garrido, N., & Barratt, C. (2015). Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? *Human Reproduction*, 711-726.

61. Songsasen, N., & Wildt, D. (2007). Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. *Animal Reproductive Science*, 2-22.
62. Steinhauer, N., Boos A., & Gunzel-Apel, A.-R. (2004). Morphological Changes and Proliferative Activity in the Oviductal Epithelium during Hormonally Defined Stages of the Oestrous Cycle in the Bitch. *Reprod Dom Anim*. 72(1): 110-119.
63. Stornelli MC. 2016. Ciclo estral canino. En: Manual de reproducción de animales de producción y compañía. Stornelli MC, de la Sota RL (eds.) Editorial de la Universidad de La Plata, Buenos Aires, Argentina. pp.47-63.
64. Suarez SS, Pacey AA. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update*, 12(1): 23-37.
65. Suarez, S. S. (2008). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *The International Journal Of Developmental Biology*, 455-462.
66. Tahir MZ, Reynaud K, Mawa G, Thoumire S, Chastant-Maillard S, Saint-Dizier M. 2012. Immunolocalization of Progesterone Receptors in the Canine Oviduct around Ovulation. *Reproduction in Domestic Animals*. 47(9): 35-39.
67. Teves ME, Barbano F, Guidobaldi HA, Sanchez R, Miska W, Giojalas LC. 2006. Progesterone at the Picomolar Range Is a Chemoattractant for Mammalian Spermatozoa. *Fertil Steril*. 86(3): 745-749.
68. Tummaruk P, Tienthai P. 2008. Number of Spermatozoa in the Crypts of the Sperm Reservoir at About 24h After a Low-Dose Intrauterine and Deep Intrauterine Insemination in Sows. *Reprod Domest Anim*. 45(2): 208-2013.
69. Tummaruk, P., & Tienthai, P. (2010). Number of Spermatozoa in the Crypts of the Sperm Reservoir at About 24 h After a Low-Dose Intrauterine and Deep Intrauterine Insemination in Sows. *Reproduction in Domestic Animals*, 208-213. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01205.x>
70. Urhausen C, Beineke A, Piechotta M, Karre L, Beyerbach M, Gunzel-Apel AR. 2011. Apoptosis in the Uterotubal Junction and Oviductal Isthmus during the Estrous Cycle of the Bitch. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. 294(2): 342-348.

71. Verhage HG, Abel JR, Tietz WJ, Barrau MD. 1973. Development and Maintenance of the Oviductal Epithelium during the Estrous Cycle in the Bitch. *Biology of Reproduction*. 9(5): 460-474.
72. Vermeirsch, H., Broeck, W. V., Coryn, M., & Simoens, P. (2002). Immunolocalization of sex steroid hormone receptors in the canine uterine tube and their relation to sex steroid hormone concentrations. *Reprod Fertil Dev*, 241-250.
73. Villanueva DC, Arias MJ, Bermejo ML, Vadillo OF. 1995. Progesterone Induces Human Sperm Chemotaxis. *Fertil Steril*.64(6): 1183-1188.
74. Wångren K, Stavreus-Evers A, Olsson C, Andersson E, Gemzell-Danielsson K. 2008. Regulation of muscular contractions in the human fallopian tube through Prostaglandins and Progestagens. *Hum Reprod*. 23(10): 2359-2368.
75. Xie Y, Park ES, Xiang D, Li Z. 2018. Long-term organoid culture reveals enrichment of organoid-forming epithelial cells in the fimbrial portion of mouse fallopian tube. *Stem Cell Research*. 32: 51-60.
76. Yániz, J. L., Carretero, T., Recreo, P., Arceiz, E., & Santolaria, P. (2014). Three-dimensional architecture of the ovine oviductal mucosa. *Anat Histol Embryol*, 331-340. doi:doi: 10.1111/ahe.12078.
77. Zamir N, Barkan D, Keynan N, Naor Z, Breitbart H. 1995. Atrial natriuretic peptide induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 269(2): E216-E221.