

76151

**MOGUELAR, HORACIO**

Organización bidimensional del espacio: un método funcional de la arquitectura

2017

**76151**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO.  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS y  
NATURALES.**

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas.

**“ORGANIZACIÓN TRIDIMENSIONAL DEL OVIDUCTO DE LA  
YEGUA: ASPECTOS FUNCIONALES DE LA ARQUITECTURA DE LA  
MUCOSA”.**

Méd. Vet. Horacio Mouguelar.

DIRECTOR: PhD. José Javier Aguilar Valenciano.

12157

Río Cuarto, Mayo de 2017.

70151

RAF
Class
T-1107

## COMISIÓN ASESORA

PhD. Eduardo Juan Gimeno..... Universidad Nacional de La Plata.  
Dra. Alicia Rolando.....Universidad Nacional de Río Cuarto.  
PhD. Gustavo Carlos Zielinski..... EEA- Marcos Juárez (INTA).

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha: Universidad Nacional de Río Cuarto; de de 2017.

Calificación:

## JURADO

Firma.....	Aclaración .....
Firma..... 	Aclaración Alicia Rolando.....
Firma..... 	Aclaración Gustavo Zielinski.....

## DEDICATORIA

*La presente tesis está dedicada a la memoria de mis padres, Rodolfo Juan José Mouguelar, y Esther Teresa Lépori, quienes me dieron la vida y los valores más nobles sobre ella. Deseo dedicar profundamente este trabajo, a mi esposa Georgina, quien eligió compartir conmigo sus días, regalándome en dos maravillosas ocasiones las obras más importantes de mi vida, nuestros hijos Emilio y Amelié.*

## AGRADECIMIENTOS

*Deseo comenzar agradeciendo profundamente a mi familia, quienes me han brindado su permanente e incondicional apoyo, en cada uno de los días y los años recorridos durante la elaboración de este trabajo de tesis. Un especial agradecimiento a mi esposa Georgina, quien me ha alentado de manera constante, allanándome el camino transitado en numerosas ocasiones y a lo largo de todo el doctorado.*

*Mis más sinceros agradecimientos al director de tesis, PhD. José Javier Aguilar Valenciano, quién inicialmente me impulsó a realizar el doctorado, por depositar su confianza en mí, el compromiso constante y la dedicación brindada en cada una de las etapas del presente trabajo de tesis.*

*Gracias al MV. Blas Eugenio Vaschetto, amigo y colega, por ayudarme incondicionalmente en todas las cirugías practicadas en las yeguas, por compartir conmigo toda su experiencia, enseñándome sin resguardos, todo lo que está a su alcance sobre medicina y cirugía del equino.*

*También deseo hacer llegar mis agradecimientos a todos los que de una u otra manera colaboraron de manera desinteresada en diferentes momentos de la tesis. A mis amigos y colegas, José María Raviolo, Fernando Alassia, Mailín Pastorino, Tomás Díaz, Rafael Ferraris, Viviana Poey, Fabrisio Alustiza, Andrea Bozzo, Damiana Borghi, Ramiro Martínez, Florencia González y Matías Varela.*

*Mis más sinceras retribuciones al PhD. Luis Losinno; a la MV. Catalina Casteñeira y a todos los ayudantes alumnos del Laboratorio de Reproducción Equina de nuestra FAV-UNRC, por permitirme utilizar las instalaciones, numerosos insumos durante la colecta y evaluación del semen, colaborar en las inseminaciones artificiales, como así también hacer uso de los padrillos y algunas yeguas intervenidas quirúrgicamente.*

*Agradezco también al Dr. Pablo Bosch, por sus consejos en la recuperación de espermatozoides tubáricos y brindarme el microscopio de epifluorescencia para la evaluación de algunas muestras.*

*Gracias a cada uno de mis compañeros de Cátedra de Anatomía Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto; José, Mónica, Rosana, Soledad, Cecilia y Silvana. Del mismo modo, agradezco a Darío, Guillermo y Matías, compañeros de trabajo de Anatomía General y Anatomía Topográfica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica de Córdoba.*

*A Rolando Quinteros y Facundo Bonino, por la colaboración en el análisis estadístico de los datos obtenidos en los distintos experimentos que se llevaron a cabo.*

*Agradezco a la Dra. Silvana Apichela, del Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia; de la Universidad Nacional de Tucumán; y al Dr. Fernando Saravia (Universidad de Concepción; Chile) por procesar numerosas muestras de oviducto para microscopía electrónica de barrido y transmisión, cuyas fotos son parte fundamental de la presente tesis. En este mismo sentido, mis más sentidas retribuciones a la Sra. Nelcy Schleef, por la confección de los innumerables preparados histológicos que fueron evaluados.*

*Mis sinceros agradecimientos a los jurados de tesis, médicos veterinarios PhD. Eduardo Juan Gimeno y PhD. Gustavo Carlos Zielinski, y a la Dra. Alicia Nélica Rolando, quienes de manera profesional, comprometida y desinteresada han dedicado parte de su tiempo en la revisión y supervisión de las distintas etapas de la tesis, cuyas oportunas sugerencias, me permitieron orientarme en el camino y alcanzar la meta final del trabajo de tesis.*

*Finalmente agradezco a los operarios y personal técnico del Frigorífico de Equinos General Pico S.R.L (Ex Frigorífico Aimar S.A), quienes permitieron en numerosas oportunidades hacer uso de los animales y las instalaciones de la planta.-*

# ÍNDICE

---

	Página
Índice de Tablas .....	vii.
Índice de Figuras .....	viii.
Abreviaturas.....	xii.
Resumen en castellano e inglés.....	xiii.
1. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1.
2. CAPÍTULO II: HIPÓTESIS .....	6.
3. CAPÍTULO III: OBJETIVOS .....	8.
4. CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA.....	10.
4.1. Selección de animales .....	11.
4.2. Muestreo.....	12.
4.2.1. Obtención de los oviductos.....	12.
4.3. Organización tridimensional de la mucosa oviductal .....	12.
4.3.1. Puesta a punto de la técnica de repleción-corrosión.....	14.
4.3.2. Técnica anatómica de repleción-corrosión .....	15.
4.3.3. Preparación de la resina PU4ii® .....	15.
4.3.4. Protocolo.....	15.
4.3.5. Análisis de los moldes 3D del lumen oviductal .....	19.
4.3.6. Estereoscopia .....	19.
4.3.7. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	19.
4.3.8. Registros morfométricos.....	20.
4.4. Examen histológico del tejido oviductal .....	21.
4.4.1. Microscopía óptica (MO) y morfometría .....	21.
4.4.2. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	22.
4.4.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) .....	23.
4.5. Análisis estadístico.....	24.
4.6. Reservorios de Espermatozoides (R.E) en el oviducto .....	24.
4.6.1. Recolección de semen e Inseminación Artificial (IA).....	24.
4.6.2. Inseminación artificial con semen pre-incubado con fluorocromo Hoechst 33342® .....	25.
4.6.3. Recuperación de oviductos mediante cirugía (laparotomía) .....	27.
4.6.4. Ovariectomía bilateral en estación .....	27.
4.6.5. Procesamiento de los oviductos y evaluación de las muestras .....	29.
5. CAPÍTULO V: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	32.
5.1. Breve reseña histórica .....	33.

## ÍNDICE

---

5.2. Embriología, anatomía y fisiología del oviducto .....	37.
5.3. Desarrollo embriológico (Ontogenia) .....	37.
5.4. Anatomía macroscópica .....	38.
5.4.1. Regionalización .....	38.
5.4.2. Medios de fijación y relaciones topográficas .....	40.
5.4.3. Morfometría general .....	41.
5.4.4. Irrigación sanguínea, drenaje linfático e inervación.....	41.
5.5. Anatomía microscópica.....	42.
5.5.1. Serosa y sub-serosa.....	43.
5.5.2. Muscular .....	43.
5.5.3. Mucosa.....	45.
5.6. Variaciones cíclicas.....	49.
5.7. Fisiología del oviducto .....	50.
5.7.1. Motricidad oviductal y su implicancia en el transporte de los gametos .....	50.
5.7.2. Transporte de los espermatozoides hacia el oviducto.....	51.
5.7.3. Los espermatozoides en el oviducto y la migración hacia el sitio de la fertilización .....	53.
5.7.4. Formación del Reservorio Espermático funcional en el oviducto .....	55.
5.7.5. Funciones del Reservorio Espermático en el oviducto.....	56.
5.7.6. Transporte del ovocito en el oviducto .....	57.
6. CAPÍTULO VI: RESULTADOS .....	58.
6.1. Organización de la Mucosa Oviductal .....	59.
6.2. Características morfométricas y tridimensionales de la mucosa en las diferentes regiones del oviducto .....	59.
6.2.1. Región de la Unión Útero-Tubárica (UUT).....	60.
6.2.2. Región del Istmo.....	65.
6.2.3. Región de la Unión Ámpula-Istmo.....	69.
6.2.4. Región del Ámpula.....	74.
6.2.5. Región del Infundíbulo.....	78.
6.3. Microscopía óptica .....	82.
6.4. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) .....	85.
6.5. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).....	89.
6.6. Reservorios de Espermatozoides (R.E) en el oviducto .....	98.



# ÍNDICE

---

7. CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN, CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	113.
7.1. Discusión general.....	114.
7.1.1. Organización histomorfológica, tridimensional y biométrica de la mucosa oviductal de la yegua.....	114.
7.1.2. Residencia y reservorio de los espermatozoides en el oviducto de la yegua.....	123.
7.2. Conclusiones.....	127.
7.3. Perspectivas futuras.....	128.
8. CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA.....	130.
9. CAPÍTULO IX: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	155.

## ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla		Página
1	Métodos de evaluación de las características de la mucosa oviductal en las distintas regiones del oviducto y en diferentes etapas del ciclo estral.	21.
2	Características generales de la recuperación de tejido oviductal para evaluar el reservorio espermático en el oviducto de la yegua.	26.
3	Área del lumen del istmo expresada en milímetros cuadrados ( $\text{mm}^2$ ), medida a partir de los cortes histológicos. Media ( $\pm$ D.E).	66.
4	Altura (media) de los diferentes pliegues epiteliales hallados en la región del istmo, UAI y ámpula, expresado en micras ( $\mu\text{m}$ ), medidos a partir de cortes histológicos.	66.
5	Diámetro luminal del istmo expresado en micras ( $\mu\text{m}$ ) en diferentes etapas reproductivas, medido a partir de moldes 3D. Media ( $\pm$ D.E).	66.
6	Área del lumen del UAI expresada en milímetros cuadrados ( $\text{mm}^2$ ), medida a partir de cortes histológicos. Media ( $\pm$ D.E).	70.
7	Perímetro luminal del istmo, UAI y ámpula expresado en milímetros (mm), en diferentes etapas reproductivas, obtenido a partir de cortes histológicos. Media ( $\pm$ D.E).	70.
8	Características y cronología de la recuperación de espermatozoides a partir de oviductos de yeguas inseminadas artificialmente.	98.
A	Parámetros morfométricos del oviducto en las principales etapas reproductivas. Medias ( $\pm$ D. E).	80.
B	Longitud (mm) de las diferentes regiones tubulares del oviducto, en las principales etapas reproductivas, determinada a partir de moldes de resina. Medias ( $\pm$ D. E).	80.
C	Volumen aproximado ( $\mu\text{l}$ ) de las diferentes regiones tubulares del oviducto, en las distintas etapas reproductivas, calculado a partir de las secciones histológicas. Medias ( $\pm$ D. E).	81.

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura		Página
1	Representación de los ovarios (Regnerus De Graaf, 1672. <i>De Mulierum Organis Generationi Inservientibus Tractatus Novus, Tábula Décima-Quinta</i> ).	36.
2	Regiones morfológicas del oviducto de la yegua.	40.
3	Mecanismos propuestos para la unión y liberación espermática del oviducto en el modelo bovino.	54.
4	Obtención del oviducto equino mediante disección.	13.
5	Protocolo realizado durante la repleción intraluminal (PU4ii®) y corrosión del tejido oviductal.	17.
6	Repleción retrógrada de la papila oviductal a través del canalizado del istmo.	17.
7	Repleción vascular con resina PU4ii® a través de la arteria ovárica.	18.
8	Repleción vascular con látex a través de la vena ovárica.	19.
9	Procedimiento realizado para obtener algunos registros morfométricos de las diferentes regiones de los moldes 3D del oviducto.	20.
10	Obtención de algunos registros morfométricos de las diferentes regiones tubulares del oviducto, en distintas etapas del ciclo estral, a partir de cortes histológicos (a).	22.
11	Obtención de algunos registros morfométricos de las diferentes regiones tubulares del oviducto, en distintas etapas del ciclo estral, a partir de cortes histológicos (b).	23.
12	Evaluación de una alícuota de semen equino coloreado con fluorocromo nuclear (Hoechst 33342®) previo a la inseminación artificial (IA).	26.
13	Anestesia local paravertebral, previo a la ovariectomía bilateral en estación a través de la fosa del flanco izquierdo y derecho.	28.
14	Ovariectomía bilateral en estación a través de los flancos.	28.
15	Disección del oviducto de yegua, y molde 3D correspondiente a su lumen, mostrando las diferentes regiones anatómicas en que se divide.	60.

Figura		Página
16	Disección de la unión útero-tubárica (UUT) del oviducto equino.	62.
17	Secciones histológicas transversales y longitudinales de la UUT.	63.
18	Moldes 3D del lumen de la UUT.	64.
19	Box-plot del diámetro intraluminal del istmo en diferentes etapas reproductivas, obtenido a partir de moldes 3D.	67.
20	Recta de regresión para perímetro luminal (epitelial) versus área ocupada por pliegues epiteliales de la región del istmo, obtenida a partir de cortes histológicos en diferentes etapas reproductivas.	67.
21	Secciones histológicas y moldes 3D de la región del istmo.	68.
22	Recta de regresión para perímetro luminal versus área ocupada por pliegues epiteliales de la región UAI, obtenido a partir de cortes histológicos y en diferentes etapas reproductivas.	70.
23	Perímetro luminal (mm) del istmo, UAI y ampulla en diferentes etapas reproductivas, medido a partir de cortes histológicos.	71.
24	Secciones histológicas y molde 3D de la región central de la UAI.	72.
25	Secciones histológicas, estereomicroscopía y MEB de moldes 3D de la región central de la UAI.	73.
26	Recta de regresión para perímetro luminal versus área ocupada por pliegues epiteliales de la región del ampulla, obtenido a partir de cortes histológicos en diferentes etapas reproductivas.	75.
27	Secciones histológicas y moldes tridimensionales de la región del ampulla.	76.
28	Corte histológico del ampulla, donde se observa el lumen dividido en varios compartimientos a través de trabéculas conectivo-epiteliales.	76.
29	Microfotografía de la porción craneal del ampulla y microscopía electrónica de barrido de un molde 3D del ampulla.	77.
30	Ovario y región del infundíbulo del oviducto equino: fimbria ovárica unida a la superficie y borde medial del ovario, en la fosa de ovulación.	78.
31	Molde vascular del ovario, punta del cuerno uterino y oviducto a través de la repleción de la arteria ovárica con poliuretano (PU4ii®), durante la etapa de estro.	79.

Figura		Página
32	Moldes 3D intraluminales de la región del infundíbulo.	79.
33	Longitud de las diferentes regiones tubulares del oviducto sin discriminar entre etapas reproductivas.	81.
34	Microfotografías, a partir de secciones transversales de la región central del istmo, unión ámpula-istmo (UAI) y ámpula.	83.
35	Microscopía óptica de la UAI. Pliegue epitelial con las típicas células ciliadas y secretorias. Protrusiones apicales bulbosas en el epitelio.	84.
36	Microscopía electrónica de barrido (MEB) de la superficie epitelial de la UAI y ámpula.	86.
37	Microscopía electrónica de barrido (MEB) de la superficie epitelial de la región del istmo.	87.
38	Microscopía electrónica de barrido (MEB) de la superficie epitelial de la región del ámpula.	88.
39	Microscopía electrónica de transmisión (MET) del epitelio de la región del ámpula.	90.
40	Microscopía electrónica de transmisión (MET) del epitelio oviductal: células ciliadas y diferentes uniones intercelulares.	91.
41	Microscopía electrónica de transmisión (MET) del epitelio oviductal en la región de la unión ámpula-istmo: múltiples mitocondrias y complejos de Golgi.	92.
42	Microscopía electrónica de transmisión (MET) del epitelio oviductal en la región de la unión ámpula-istmo: cuerpo basal en la base de una cilia y especialización tipo-desmosoma ( <i>punctum adherens</i> ).	93.
43	Microscopía electrónica de transmisión (MET) del epitelio oviductal en la región del istmo: organización interna de los microtúbulos de las ciliadas cortadas transversalmente, y protrusión apical en una célula secretora.	94.
44	Microscopía electrónica de transmisión (MET) del epitelio oviductal de la región de la unión ámpula-istmo: protrusión apical y gránulos de secreción de diferente electro-densidad en la matriz citoplasmática.	95.
45	Microscopía electrónica de transmisión (MET) del epitelio oviductal de la región del ámpula: protrusión citoplasmática en una célula secretoria.	96.

Figura		Página
46	Microscopía electrónica de transmisión (MET) del epitelio oviductal de la región del ámpula: estructuras vesiculares recubiertas por membranas, conteniendo pequeñas vesículas internas, y material granular disperso.	97.
47	Microfotografías de la región del ámpula durante la etapa de estro (yegua inseminada artificialmente): material amorfo en el lumen y espermatozoide junto a restos de células epiteliales.	100.
48	Microfotografías de la región del ámpula durante la etapa de estro (yegua inseminada artificialmente): espermatozoides incluidos en material amorfo.	101.
49	Microscopía electrónica de barrido (MEB) de la región del istmo, unión ámpula-istmo (UAI) y ámpula: espermatozoides adheridos a células secretorias y secreción dispersa sobre el epitelio.	103.
50	Microscopía electrónica de barrido (MEB) de la región del istmo en proximidades con la UUT (papila oviductal) durante la etapa de estro: espermatozoides parcialmente inmersos en secreción filamentosa y amorfa, adherida sobre el endosalpinx ciliado.	105.
51	Microscopía electrónica de barrido (MEB) de la región del istmo en proximidades con la UUT (papila oviductal) durante la etapa de estro: espermatozoide parcialmente incluido dentro de una sustancia amorfa y en relación a un pliegue epitelial ciliado.	106.
52	Microfotografías de improntas del endosalpinx del istmo caudal durante la etapa de estro (yegua IA): numerosos espermatozoides diseminados en forma individual y en grupos.	108.
53	Microfotografía de una impronta del endosalpinx del ámpula durante la etapa de estro (yegua IA): escasas células espermáticas dispersas e individuales en cercanía de restos de células epiteliales.	109.
54	Microscopía electrónica de barrido (MEB) del endosalpinx del istmo caudal durante la etapa de estro (yegua IA): espermatozoides interactuando estrechamente a través de sus cabezas con las células epiteliales ciliadas.	110.
55	Microscopía electrónica de barrido (MEB) del endosalpinx de la región del ámpula, durante la etapa de estro (yegua IA): espermatozoides inmersos entre las cilias de las células epiteliales a través de la parte rostral de sus cabezas.	111.
56	Microfotografía óptica invertida con epifluorescencia, a partir de una delgada lámina (squashing) de mucosa del istmo caudal, durante la etapa de estro (yegua IA con semen pre-incubado con Hoechst 33342®).	112.

## ABREVIATURAS

---

2AG	2-araquidonilglicerol
3D	Tridimensional
ABHD2	$\alpha$ - $\beta$ hidrolasa D2
AMH	Anti-Müllerian Hormone
ANOVA	Análisis de la Varianza
ART's	Assisted Reproduction Technologies
BSP1	Bovine Seminal Protein 1
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CatSper	Calcium Sperm Channell
CL	Cuerpo Lúteo
COC	Complejo Ovocito-Cúmulus
EV	Endovenosa
FIV	Fertilización <i>In Vitro</i>
H&E	Hematoxilina y Eosina
IA	Inseminación Artificial
ICSI	Intracytoplasmic Sperm Injection
IM	Intramuscular
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
MEK	Methyl-Ethyl-Ketona
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
MO	Microscopía Óptica
OT	Oocyte Transfer
P4	Progesterona
PG	Prostaglandinas
PGE	Prostaglandina E
PGF	Prostaglandina F
PGF <sub>2</sub> $\alpha$	Prostaglandina F <sub>2</sub> alfa
PMNs	Leucocitos Polimorfonucleares
RE	Reservorio Espermático
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RPGE <sub>2</sub>	Receptor de Prostaglandina E <sub>2</sub>
RPGE <sub>4</sub>	Receptor de Prostaglandina E <sub>4</sub>
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
UAI	Unión Ámpula-Istmo
UUT	Unión Útero-Tubárica
UV	Ultravioleta
VA	Vagina Artificial
ZP	Zona Pelúcida

## RESUMEN

El oviducto cumple un rol vital en las interacciones maternas con las gametas y los embriones, siendo la base del éxito de cualquier evento reproductivo. En estrecha relación al endosalpinx se cumplen estas "conversaciones privadas", proporcionando el microambiente óptimo para la maduración y transporte de los gametos, la fertilización y el desarrollo temprano del embrión. Para explicar los numerosos mecanismos involucrados en los eventos reproductivos es esencial comprender diversos aspectos morfológicos del tracto genital de la hembra. *Objetivos:* (1) describir las características tridimensionales y cuantificar parámetros morfométricos de la mucosa oviductal; (2) investigar el sitio anatómico donde se establecen los reservorios espermáticos en yeguas inseminadas artificialmente. *Métodos:* para el objetivo 1 se utilizaron microscopía óptica, electrónica de barrido, de transmisión, y moldes intraluminales 3D de oviductos de yeguas en diferentes etapas del ciclo estral. Para los reservorios espermáticos, se asignaron yeguas en estro, y mediante microscopía óptica, electrónica de barrido, y lavajes oviductales, se determinó la presencia de espermatozoides en las distintas regiones tubulares y diferentes horas post-IA. *Resultados:* el istmo presentó el menor área luminal, área de mucosa, perímetro epitelial y diámetro luminal. Los moldes 3D de esta región, mostraron algunos surcos extendidos como canales y proyecciones de escasa altura, las cuales pueden representar *cul-de-sacs* en la base de los pliegues epiteliales. La mucosa de la unión ampulla-istmo cambió gradualmente, desde el istmo relativamente liso, hacia el ampulla complejamente plegada. Gran parte del lumen del ampulla fue ocupada por las ramificaciones de los pliegues epiteliales. En el grosor de éstos, se observaron estructuras similares a glándulas y protrusiones apicales en las células epiteliales secretorias. La mayoría de los espermatozoides fueron recuperados a las 5,5 horas post-inseminación artificial en la región del istmo caudal, disminuyendo de manera comparativa a las 8, 12 y 36 hs. Finalmente, a las 72 hs post-IA no se lograron recuperar espermatozoides de ninguna yegua. *Conclusiones:* el endosalpinx de la yegua revela una organización tridimensional muy compleja, donde cada región muestra un diseño particular y específico. Los resultados obtenidos sugieren que en el istmo caudal y la unión útero-tubárica se establecen los reservorios funcionales en el oviducto de la yegua.

## ABSTRACT

The oviduct plays a vital role in maternal interactions with gametes and embryos, being the basis for the success of any reproductive event. Closely related to the endosalpinx this "privates conversations" take place, providing the optimal microenvironment for maturation and transport of gametes, fertilization and early embryo development. To explain the many mechanisms involved in reproductive events is essential to understand various morphological aspects of the female genital tract. *Objectives:* (1) describe the three-dimensional characteristics and quantify some morphometric parameters of the oviductal mucosa; and (2) investigate the tubular region where the sperm reservoirs are locate in artificially inseminated mares. *Methods:* for objective 1, optical microscopy, scanning and transmission electron microscopy, and intraoviductal molds at different reproductive stages were used. For SR experiment, and localize sperm at different tubular regions and hours post insemination from estrus mares; optical microscopy, scanning electron microscopy, and oviductal flushings were performed. *Results:* the isthmus had the lowest luminal area, mucosal area, epithelial perimeter and luminal diameter. The 3D molds from this region, showed some grooves extended like channels and low height projections, which can represent *cul-de-sacs* at the base of the epithelial folds. The mucosa of the ampulla-isthmus join gradually changed from the relatively smooth isthmus to the ampulla highly folded. Ramifications of epithelial folds occupied the most of the ampullary lumen. In the thickness of them glandular like structures and apical protrusions in secretory epithelial cells were observed. Most sperm cells were recovered at 5.5 hours post-IA from the isthmus region, decreasing comparatively at 8, 12 and 36 hours. Finally, at 72 hours post-IA, no sperm was found in any mare. *Conclusions:* the mare endosalpinx reveals a very complex three-dimensional arrangement, where each region shows a particular and specific design. These results suggest that the caudal isthmus and utero-tubal junction were the functional sperm reservoir in the mare oviduct.



---

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUCCIÓN GENERAL**

---

Aunque los primeros reportes de inseminación artificial (IA) exitosa en el equino se remontan al año 1322 (Allen, 2005), el interés en el desarrollo de las tecnologías de reproducción asistida (en inglés ART's) ocurren principalmente hacia finales del siglo XIX, con el establecimiento de las primeras preñeces equinas obtenidas mediante esta técnica (Heape, 1989).

Las ART's sufrieron un desarrollo y evolución más lenta en el equino, comparado con otras especies de mamíferos domésticos de importancia económica. Este retraso, por un lado, se debió a falta de aceptación por parte de muchos registros y asociaciones de criadores de las distintas razas equinas. Por otro lado, se presentaron (y aún se presentan) numerosas complicaciones técnicas, como por ejemplo, inconsistencia en la respuesta hormonal a los distintos tratamientos superovulatorios, o la imposibilidad de que los espermatozoides alcancen el estado de "capacitación" y logren penetrar la zona pelúcida (ZP) del óvulo en un intento de alcanzar exitosamente la *fertilización in vitro* (FIV). Estos ejemplos, son algunos de los impedimentos técnico-biológicos propios del equino, que no fueron observados en otras especies. Sin embargo, el valor económico de la industria ecuestre, junto con cambios de actitud de los distintos registros equinos, ha dado lugar a un resurgimiento del interés y a grandes avances en diferentes áreas biotecnológicas, como ser la inseminación con semen refrigerado - congelado, y la transferencia de embriones.

Sin embargo, existe un importante número de yeguas que no pueden producir embriones debido a diversos estados patológicos del tracto reproductivo. Por lo tanto, se han desarrollado otras técnicas de producción embrionaria utilizando procedimientos tanto *in vivo* como *in vitro*. Estas técnicas incluyen: (1) la transferencia de ovocitos (OT); (2) inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI); (3) fertilización *in vitro* (FIV) antes mencionada, y (4) la transferencia nuclear o clonación. Todas estas técnicas están destinadas a aumentar las posibilidades de producción de crías por parte de yeguas o sementales subfértiles. Otras ART's implican la estimulación endócrina de las gónadas y/o la manipulación *in vivo* e *in vitro* de los gametos (Alvarenga y DaCruz Landim-Alvarenga, 2009).

El avance en el conocimiento morfofuncional de los diferentes segmentos del tracto genital de la hembra, es fundamental para poder comprender varios de los mecanismos involucrados en los fenómenos reproductivos. Por lo tanto, se planteó como uno de los objetivos generales del presente trabajo de tesis, el **estudio de la organización tridimensional de la mucosa del oviducto de la yegua**, región del aparato reproductor

que ha recibido escasa atención en esta especie. Para poder comprender el estado actual del conocimiento sobre esta temática y plantear otros objetivos específicos de estudio se realizó una **revisión bibliográfica** contemplando diferentes aspectos morfológicos y funcionales del oviducto de ésta y otras especies de interés productivo.

El oviducto de los mamíferos, es un órgano clave en la fisiología reproductiva que determina en gran parte el éxito reproductivo de cada hembra. Eventos vitales como el transporte de los gametos, el reservorio y la capacitación de los espermatozoides, la fecundación del óvulo y el desarrollo temprano del embrión, ocurren todos en el lumen intraoviductal (Hunter, 1988).

Debido a su pequeño tamaño y a su topografía abdominal de difícil acceso, el oviducto, y especialmente el de la especie equina, no ha recibido la atención suficiente. Durante mucho tiempo, fue considerado como un mero conducto pasivo de conexión, entre el ovario y el útero. Sin embargo, en los últimas décadas, se ha acumulado un gran cuerpo de evidencia científica, que demuestra su compleja y especializada construcción anátomo-histológica y funcional, permitiéndole orquestar de forma delicada, numerosos y críticos fenómenos reproductivos en sus distintos microambientes (Hunter, 2005).

Cada región anatómica en que se divide, contribuye con funciones vitales específicas: la captura del óvulo a través de las fimbrias del *infundibulo*; la creación de un ambiente óptimo para el encuentro y fusión de las gametas, así como el clivaje del embrión en desarrollo en el lumen del *ámpula*; y finalmente, el pasaje selectivo y formación de un reservorio funcional de espermatozoides en la región del *istmo*; manteniéndolos viables y liberándolos de manera controlada durante el intervalo peri-ovulatorio (Suárez, 2008).

Histológicamente, se compone de tres capas concéntricas; la serosa externa, formada por células mesoteliales y musculares lisas, derivadas del ligamento ancho del útero; una capa media muscular, organizada de manera particular según las especies (Muglia y Motta, 2001); e internamente la capa mucosa; rica en vasos sanguíneos, linfáticos y nervios (Wrobel et al., 1993). Esta última, se halla revestida completamente por un epitelio columnar simple (o pseudoestratificado), con células ciliadas y secretorias (Bacha y Bacha, 2012). Además, se organiza en una extensa red de pliegues que se proyectan hacia el lumen; variando en número y complejidad, evidenciando los diferentes roles a lo largo de las distintas regiones del oviducto. Así, por ejemplo, en el

ámpula, la elevada cantidad y ramificación de los pliegues, determina una especialización principalmente secretoria en este segmento del conducto.

Numerosos estudios se han enfocado sobre la ultraestructura de la células epiteliales en las diversas regiones del oviducto y distintas especies domésticas (Abe, 1996). En algunas, como en la cabra, la actividad secretora de las células no ciliadas fue máxima en la región del ámpula durante la fase folicular del ciclo estral (Abe, 1999). La población de células epiteliales y principalmente las ciliadas, experimentan cambios morfológicos, histoquímicos, bioquímicos, ultraestructurales y funcionales, asociados a las fluctuaciones de los esteroides ováricos durante el ciclo estral (Odor, 1980; Abe y Hoshi, 2007); y determinando además, variaciones regionales cuali-cuantitativos en los componentes metabólicos del fluido oviductal (Killian, 2011).

Históricamente, las descripciones anatómicas del oviducto se han basado en el estudio de secciones bidimensionales, y se han centrado sobre el número, altura y complejidad de los pliegues de la mucosa. Sin embargo, actualmente, se ha prestado mayor atención a la estructura tridimensional del oviducto mamífero. Utilizando microscopía electrónica de barrido, Hunter et al., (1991), describieron un patrón de pliegues, surcos, y criptas en la unión útero-tubárica y la porción caudal del istmo de la vaca, postulando que dichas estructuras podrían representar un obstáculo o regular el ascenso de los espermatozoides. Recientemente, Yaniz et al., (2000) presentaron un estudio anátomo-funcional de la mucosa oviductal bovina; porcina (Yaniz et al., 2006); y ovina (Yaniz et al., 2013); donde revela que la topografía del oviducto provee un complejo sistema de regulación, el cual puede influenciar el pasaje tanto de gametas y/o embriones, así como el movimiento del fluido del canal oviductal.

Las fimbrias con sus cilias son consideradas el principal factor responsable de la captación y el transporte del(los) ovocito(s) ovulado(s) hacia el interior del oviducto, y en el ámpula el epitelio ciliado continúa con una función similar hacia porciones más distales del oviducto (Hunter, 2012). Varios estudios actuales sobre súper-estimulación folicular en la yegua demuestran que, si bien, distintos tratamientos pueden inducir múltiples ovulaciones (Squires y MacCue, 2007) es muy común que estas ovulaciones no produzcan los embriones correspondientes (Araujo et al., 2009). Una posible explicación para esta discordancia, es una falla en el mecanismo de captación de los ovocitos ovulados por parte de las fimbrias oviductales (Cramo et al., 2006).

Si bien existen reportes referidos a la arquitectura bi y tridimensional del oviducto de distintas especies de importancia doméstica, en la yegua la información es limitada en

este aspecto, así como también la microestructura de las fimbrias y los mecanismos de captación de ovocitos.

Nuestro grupo de trabajo pudo comprobar que el oviducto de la yegua presenta una serie de trabéculas que subdividen su lumen a nivel del ámpula y en la unión ámpula-istmo (Aguilar et al., 2012). La descripción de un modelo tridimensional de la arquitectura del oviducto de la yegua, facilitará el desarrollo de conceptos sobre distintos procesos, como el transporte de gametas y/o embriones; permitirá determinar la existencia de microambientes, probablemente con relevancia fisiológica; y además, aplicar los conocimientos a las diversas tecnologías de reproducción asistida.

---

# **CAPÍTULO II**

# **HIPÓTESIS**

---

➤ La arquitectura de la mucosa oviductal de la yegua presenta características anatómicas macro y microscópicas específicas de especie que probablemente tengan relevancia en las funciones del oviducto.

➤ Los eventos reproductivos que ocurren en este órgano, entre ellos la creación de un reservorio funcional de espermatozoides, como otros mecanismos clave en la etapa de fertilización, podrían estar condicionados o regulados por estas particularidades en su arquitectura.

---

**CAPÍTULO III**  
**OBJETIVOS GENERALES**  
**& ESPECÍFICOS**

---



El presente trabajo de tesis, tiene como **objetivos generales** a los siguientes:

- Describir la estructura tridimensional de la mucosa oviductal de la yegua en referencia a las distintas fases o etapas reproductivas.
- Localizar las regiones anatómicas del oviducto donde se establecen los reservorios de espermatozoides.

Para llevar a cabo los objetivos generales mencionados anteriormente, se han planteado los siguientes **objetivos específicos**:

1. Desarrollar un modelo macroscópico de organización tridimensional del oviducto de la yegua en distintas fases reproductivas, mediante técnicas anatómicas de repleción-corrosión.
2. Determinar por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB) y técnicas histológicas, los sitios anatómicos de la mucosa del oviducto en los que se establecen reservorios espermáticos en yeguas inseminadas artificialmente.
3. Determinar si los reservorios espermáticos están influenciados por el dominio hormonal en yeguas en diferentes etapas del ciclo estral (anestro versus estro).
4. Comparar cuantitativamente las poblaciones de espermatozoides que forman los reservorios, entre el oviducto ipsilateral y contralateral al ovario ovulado.
5. Comparar cuantitativamente los reservorios espermáticos entre el oviducto ipsilateral y contralateral al ovario ovulado, en yeguas inseminadas de manera convencional versus inseminación profunda.

---

**CAPÍTULO IV**  
**MATERIALES & MÉTODOS**

---

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1. Selección de animales**

De una población de animales destinados a faena en un frigorífico local situado en proximidades (3 km. aproximadamente) de la Universidad Nacional de Río Cuarto, se seleccionaron yeguas mestizas tipo criollo con buena condición corporal (4 o más en una escala de 1 a 9), y sin signos evidentes de enfermedad. La edad fue establecida mediante cronología dentaria. La fase del ciclo estral fue determinada mediante palpación rectal y ecografías transrectales, descartando aquellos individuos que presentasen alguna patología reproductiva.

Los grupos que se propusieron en el plan de tesis original, para cumplir con la totalidad de los objetivos fueron los siguientes:

**A) Yeguas adultas no preñadas** (vacías) con edades comprendidas entre los 3 y los 14 años, sacrificadas en las siguientes etapas reproductivas:

**Grupo 1.** Anovulatorias (n=5), yeguas que presentan ovarios pequeños, con folículos <15 milímetros y ningún cuerpo lúteo; seleccionadas durante el período anovulatorio profundo (junio, julio y agosto).

**Grupo 2.** En estro (n=5), yeguas que por lo menos presenten un folículo ovárico  $\geq 35$  milímetros, cierto grado de edema endometrial y tono uterino bajo.

**Grupo 3.** Post-ovulatorias (n=5), seleccionadas durante el estro, revisadas diariamente mediante ultrasonografía hasta la ovulación, y sacrificadas dentro de los 2 días post ovulación.

**Grupo 4.** En diestro (n=5), seleccionadas en estro, revisadas diariamente por ultrasonografía hasta la ovulación, y sacrificadas entre los días 7 y 9 post ovulación con al menos un cuerpo lúteo (CL), elevado tono uterino y ausencia de edema endometrial.

**B) Yeguas gestantes:** con edades comprendidas entre los 3 y los 14 años, en el último 1/3 de la gestación.

**Grupo 5** (n=5).

**C) Animales en desarrollo**

**Grupo 6.** Fetos hembra (n=5), provenientes de yeguas en el último tercio de gestación.

**Grupo 7.** Potrancas prepúberes (n=5), < 2 años<sup>1</sup>.

## **4.2. Muestreo**

### **4.2.1. Obtención de los oviductos:**

Una vez sacrificadas las yeguas sus tractos reproductivos fueron recolectados y colocados en recipientes apropiados para ser transportados al laboratorio dentro de la primera hora. Se revisaron las estructuras ováricas para contrastar y confirmar la fase reproductiva evaluada previamente mediante tacto rectal y ecografía. Se llevaron a cabo disecciones para aislar el oviducto del resto del tracto reproductivo. Una vez obtenidos, los oviductos fueron despojados del tejido conectivo circundante (mesos y ligamentos de soporte) mediante disección convencional y posteriormente bajo lupa. Para cada yegua se procesaron ambos oviductos, derecho e izquierdo. Según el objetivo planteado y las condiciones de la muestra, los oviductos fueron destinados al estudio de la arquitectura tridimensional o a la identificación de reservorios espermáticos (**Fig. 4**).

## **4.3. ORGANIZACIÓN TRIDIMENSIONAL DE LA MUCOSA OVIDUCTAL**

Para describir la arquitectura del oviducto y especialmente la organización de la mucosa, se utilizaron diferentes técnicas, entre ellas la repleción intraluminal utilizando variados compuestos naturales y sintéticos, en un intento de reproducir con el mayor detalle posible la disposición del endosalpinx.

La técnica anatómica mencionada consiste en “rellenar” estructuras huecas o que posean alguna cavidad (vísceras, conductos, vasos sanguíneos, etc.) con el objetivo de copiar su arquitectura interna a través de moldes tridimensionales; como también demostrar el recorrido de vasos y conductos dentro de órganos parenquimatosos.

Existen diferentes compuestos que pueden ser utilizados (látex natural, resinas, acrílicos, siliconas, metacrilatos, poliuretanos, etc.), para realizar repleciones. En la actualidad se han desarrollado nuevos compuestos que permiten replicar con exactitud la

---

<sup>1</sup>Con el transcurso de los años y durante las distintas etapas llevadas a cabo para cumplir con los objetivos propuestos en la tesis; el proveedor principal de las muestras utilizadas (Frigorífico General Pico S.A; ex Aimar S.R.L), se mantuvo sin actividades (año 2012), y posteriormente realizó diversos cambios reglamentarios en los procedimientos y categorías de animales destinados a faena. Por tales circunstancias tuvieron que ser descartados del plan original de tesis el **grupo 5** (preñadas, último 1/3), y el **grupo 6** (fetos hembras), acorde a las vigentes reglamentaciones de la planta frigorífica.

arquitectura 3D de estructuras anatómicas y pueden ser analizadas simultáneamente con microscopía óptica convencional o con microscopía electrónica de barrido.

Posterior al “llenado” de las estructuras anatómicas con el material elegido y transcurrido el tiempo de fraguado correspondiente, habitualmente se procede a digerir el tejido circundante al lumen, con diferentes soluciones corrosivas (ácido nítrico, clorhídrico, hidróxido de sodio, potasio, etc.) y de esa manera obtener el molde 3D mencionado.



**Figura 4:**

Obtención del oviducto equino mediante disección. **A**, oviducto *in situ* y estructuras anatómicas asociadas (*pcu*, punta cuerno uterino; *lpo*, ligamento propio del ovario; *mov*, mesovario; *msal*, mesosalpinx, *inf*, infundíbulo; *ist*, istmo); **B**, disección posterior del oviducto para liberar la unión a través de su fimbria ovárica que lo mantiene adherido al ovario; **C**, oviducto y punta de cuerno uterino; **D**, diferentes regiones del oviducto incluido en sus mesos peritoneales de soporte.

#### **4.3.1. Puesta a punto de la técnica de repleción-corrosión:**

Durante varios meses, se puso a punto la técnica de repleción-corrosión para obtener moldes tridimensionales del lumen oviductal. Se utilizaron diferentes productos para realizar la repleción, observando ciertas dificultades con algunos de los mismos. A continuación se detallan las principales dificultades según el material utilizado:

**1- Monómero acrílico autocurable, (Subitón<sup>®</sup>, Argentina):** este acrílico odontológico fue el primer material utilizado para realizar la repleción del oviducto. Las dificultades observadas al intentar la inyección fueron:

- escaso tiempo del material en estado líquido (no polimerizado).
- baja fluidez del producto.
- bajo poder de difusión-progresión a través del pequeño lumen del órgano.
- presencia de burbujas microscópicas, con formación de artefactos en los moldes.

**2- Resina poliéster:** utilizada como segunda opción debido a su bajo costo y facilidad de obtención en el mercado. Las dificultades observadas fueron:

- elevada viscosidad en estado puro.
- en altas diluciones (para bajar la viscosidad), se lograba un fraguado muy lento de la misma.
- permanencia de su aspecto cristalino, aún coloreada; dificultando la obtención de imágenes (gran refringencia del molde) bajo lupa estereoscópica.

**3- Solución de Látex Natural Amoniacal<sup>®</sup>, (Insumos Químicos Nacionales, Santiago, Chile):** a pesar de observarse muchas ventajas respecto a los materiales anteriores, también se obtuvieron ciertas dificultades:

- después de realizada la corrosión en hidróxido de potasio (KOH), el molde obtenido resultó pegajoso y difícil de manipular.

**4- Vinilpolisiloxano, Panasil<sup>®</sup> initial contact, (Kettenbach GmbH & Co. KG, Germany):** este elastómero odontológico es utilizado para realizar impresiones con alto grado de precisión de las piezas dentarias. Polimeriza por adición y presenta excelentes propiedades hidrofílicas. Debido a su diseño para actuar en lugares anatómicos con presencia de fluidos (como la saliva en la boca), permitió replicar con buen detalle el lumen oviductal, sin que interfieran las secreciones propias del mismo. Se puede mencionar como desventaja el elevado costo del producto en el mercado.

5- PU4ii<sup>®</sup> (*polyurethane for improved imaging*); vasQtec; Zurich - Switzerland): un nuevo polímero sintético fue adquirido (fines de 2010) y finalmente seleccionado como material ideal para realizar las réplicas intraluminales del oviducto. Este producto, es una resina formulada a base de poliuretanos (*4,4'-metilendiciclohexil diisocianato*) que polimeriza a temperatura ambiente mediante la adición de un catalizador. Originalmente fue diseñado para copiar con gran exactitud la arquitectura interna de los vasos sanguíneos hasta nivel capilar. Los moldes obtenidos de los microscópicos vasos pueden ser observados, analizados y cuantificados mediante diferentes técnicas como la microscopía electrónica de barrido. La única desventaja de este compuesto es su elevado costo.

#### 4.3.2. Técnica anatómica de repleción-corrosión:

#### 4.3.3. Preparación de la resina PU4ii<sup>®</sup> (*polyurethane for improved imaging*):

La viscosidad natural que presenta la resina (6500 mPas a temperatura ambiente), hace necesario que deba diluirse para lograr una solución capaz de profundir en el interior de la estructura anatómica a replicar. Para ello, se mezcló el polímero de poliuretano con MEK (methyl-ethyl-ketona [2-butanona], Taurus<sup>®</sup>, Argentina), al 30 % (v/v). Posteriormente, fue adicionado el pigmento para colorear la resina (Farbpaste DW-0113-5<sup>®</sup>, Astorit, Switzerland), 1-2% (v/v). Unos pocos minutos antes de la inyección de la resina, se agregó el catalizador (PU4ii Hardener<sup>®</sup>, vasQtec; Zurich – Switzerland) en una proporción de 16:100 v/v con la resina. El producto resultante se mezcló enérgicamente, evitando la incorporación de burbujas de aire, para luego ser transferido a una jeringa y proceder a la inyección - repleción (**Fig. 5**).

Debido a que el producto originalmente fue creado para replicar moldes tridimensionales de redes vasculares (hasta lechos capilares) la resina también fue utilizada para tal fin en la vasculatura del ovario, oviducto y cuerno uterino de algunas yeguas; a pesar de que no fue propuesto dentro de los objetivos de la presente tesis (**Fig. 7**). Adicionalmente se inyectó látex coloreado en la vena ovárica con el propósito de visualizar el drenaje venoso del oviducto y estructuras adyacentes (**Fig. 8**).

#### 4.3.4. Protocolo.

Los oviductos disecados y liberados de sus pliegues peritoneales de soporte fueron parcialmente desplegados, preservando curvaturas y el trayecto sinuoso presente a lo largo de los diferentes segmentos del órgano, principalmente la unión ámpula-istmo (UAI) y

ámpula. En la unión útero-tubárica fue disecada la papila oviductal para posteriormente canalizarla en el momento de realizar la repleción.

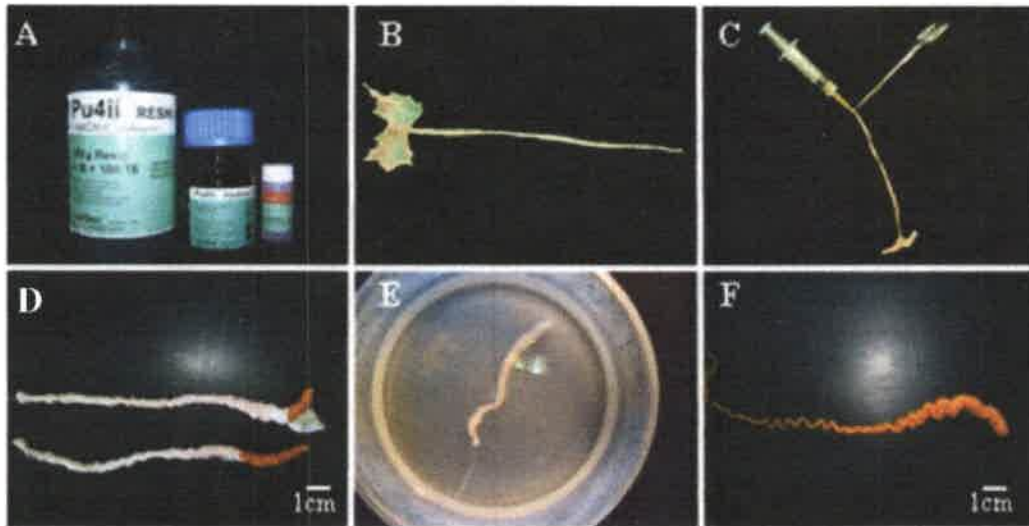
*Etapas:*

1. Canalizado de la papila oviductal con aguja descartable, calibre 16x5, con punta roma para evitar lesionar la pared del oviducto.
2. Utilizando pinza hemostática Halsted se mantuvo fija la aguja dentro del lumen de la papila.
3. Preparación de la solución de repleción:
  - a. Resina PU4ii<sup>®</sup> (1,85 ml).
  - b. Dilución con MEK (2,5 ml).
  - c. Adición del pigmento colorante (Farbpaste DW-0113-5<sup>®</sup>).
  - d. Catalizador (PU4ii<sup>®</sup> Hardener, 0,4 ml).
  - e. Homogenizado de la mezcla.
4. Cargado de la mezcla en una jeringa de 5ml.
5. Acople de la jeringa con la aguja canalizando la papila oviductal.
6. Repleción del oviducto, en forma lenta y a presión constante.
7. Cuando se observó salida de la resina por la región del infundíbulo del oviducto se detuvo la repleción.
8. Se procedió al ligado del infundíbulo para luego retirar la aguja y ligar a nivel de la papila oviductal.
9. Se colocó el oviducto “repleto” en agua tibia, para el fraguado del elastómero.
10. Transcurridas 12 hs. de la repleción, el oviducto fue sumergido en la solución de corrosión alcalina de hidróxido de potasio (KOH) al 7,5 %.
11. Cambios diarios de la solución corrosiva hasta la eliminación completa de todo el tejido oviductal.
12. Obtenido el molde del lumen oviductal, fue lavado con agua corriente para retirar restos de KOH; y posteriormente secado al aire libre.
13. Obtención y procesado de las imágenes.

Debido a que en el ítem 7 del protocolo descrito, se procede a ligar a caudal del infundíbulo (sobre el ámpula); esta región resulta sin solución de repleción. Este segmento (infundíbulo) fue aislado mediante disección y se realizaron las replicas o moldes correspondientes colocando una delgada capa de resina sobre la superficie mucosa. Para



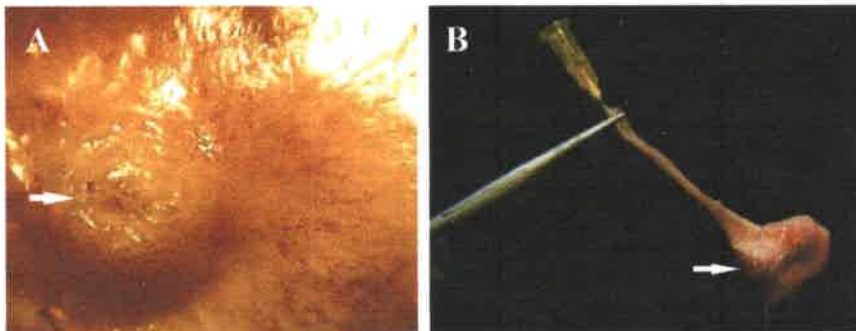
lograr la repleción de la papila oviductal (ocupada por la aguja) se procedió al llenado retrógrado de la misma canalizando a nivel del istmo (**Fig. 6A, B**).



**Figura 5:**

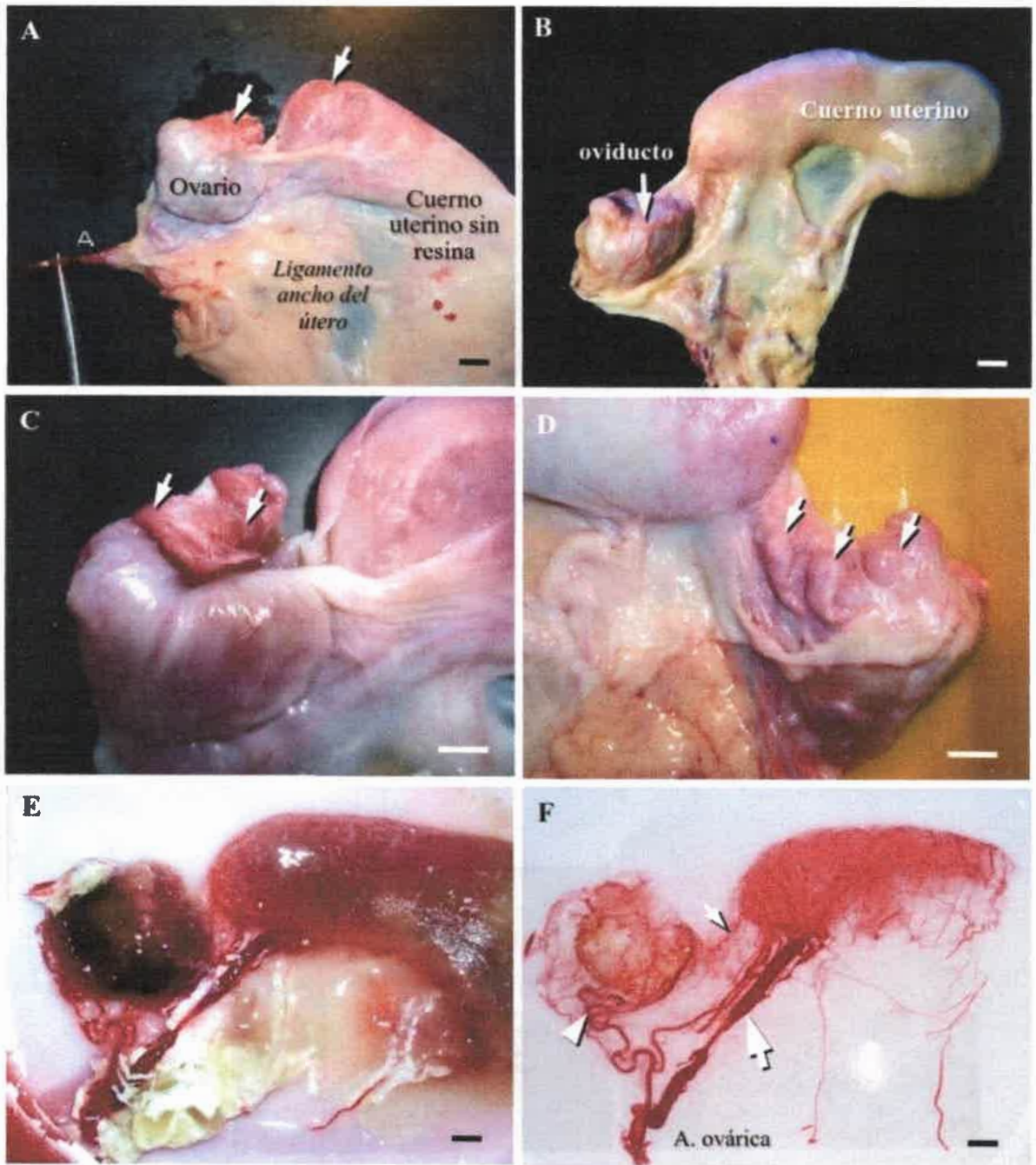
Protocolo realizado durante la repleción intraluminal y corrosión del oviducto.

**A**, resina PU4ii<sup>®</sup>, catalizador y pigmento; **B**, oviducto disecado y desplegado; **C**, oviducto canalizado a través de su papila y fijado de la aguja mediante pinza hemostática; **D**, oviductos donde se visualiza parte del molde en la región del ampulla; **E**, batea con solución corrosiva; **F**, molde del lumen del oviducto (sin infundíbulo) posterior a la corrosión completa de los tejidos.



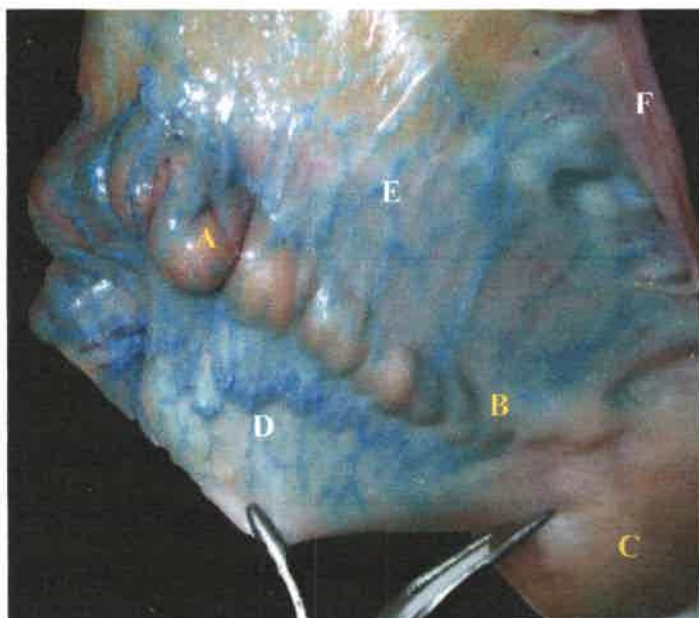
**Figura 6:**

**A**, imagen estereoscópica magnificada (40X) del interior del cuerno uterino, donde se observa la porción intraluminal (papila) de la unión útero-tubárica (UUT) protruyendo en el extremo del mismo. La flecha indica el orificio uterino de ingreso hacia el lumen de la papila. **B**, Repleción retrógrada de la papila oviductal a través del canalizado del istmo. La flecha indica la punta del cuerno uterino, que fue ligado para obtener un molde del mismo y la papila que protruye en su interior.



**Figura 7:**

Repleción vascular a través de la arteria ovárica, durante la fase de diestro. **A**, canalización de la arteria ovárica y repleción con resina PU4ii® (flechas indican la penetración del poliuretano, evidenciado por el color rojizo del pigmento); **B**, resina ocupando los pequeños vasos sobre la superficie del ovario y alcanzado el oviducto; **C**, capilares sanguíneos del infundíbulo repleto de resina (flecha); **D**, vista ventral de la región del ampulla oviductal con sus vasos repletos (flechas); **E**, ovario, oviducto y extremo del cuerno uterino, luego de una corrosión moderada de los tejidos en hidróxido de potasio (KOH); **F**, molde vascular luego de corrosión completa de los tejidos (la cabeza de la flecha marca la tortuosa arteria ovárica, en proximidades del ovario; la flecha grande indica la rama uterina de la arteria ovárica; flecha pequeña indica las ramas tubáricas para el oviducto). Barra de escala en A, B, C, D, E y F indica 1 cm.



**Figura 8:**

Repleción vascular a través de la vena ovárica izquierda con látex coloreado (azul), durante la fase de diestro. A, región del ampulla; B, istmo; C, extremo del cuerno uterino; D, mesosalpinx con pequeñas venas sub-serosas; E, mesoovario con vasos haciendo anastomosis con las vénulas y capilares venosos del mesosalpinx; F, ligamento propio del ovario.

#### **4.3.5. Análisis de los moldes 3D del lumen oviductal:**

#### **4.3.6. Estereomicroscopía.**

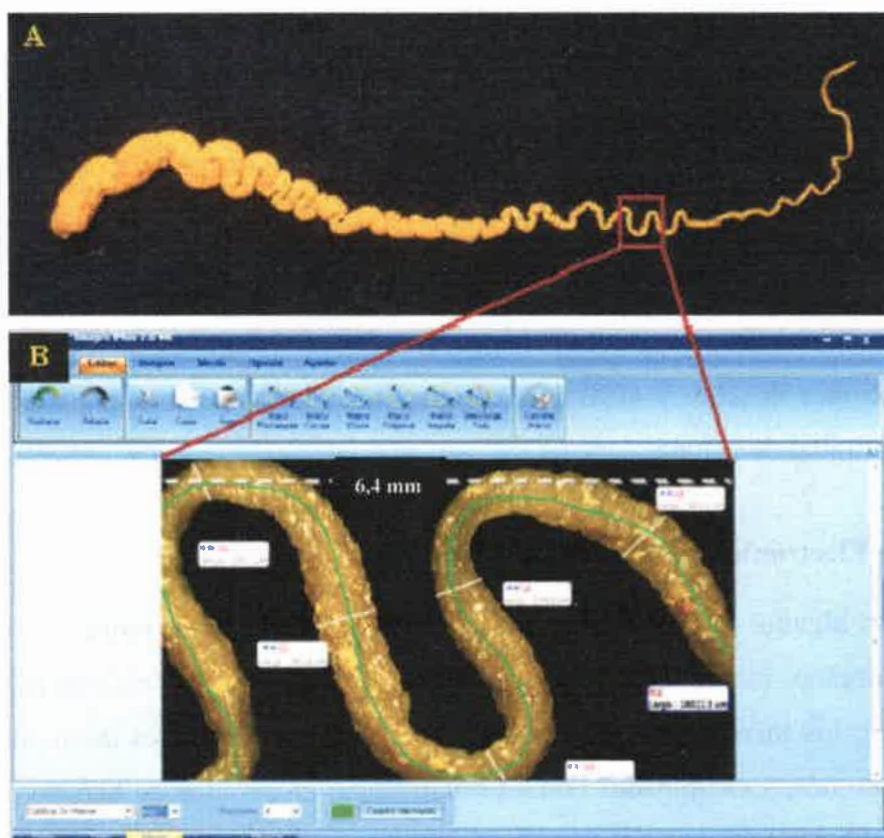
Los moldes obtenidos mediante la técnica de repleción-corrosión, fueron analizados utilizando una lupa estereoscópica (Motic Images Plus 2.0<sup>ML</sup>, Motic China Group Co., Ltd.); a magnificaciones de 20X y 40X. Los detalles visualizados fueron registrados a través de la cámara digital de la lupa.

#### **4.3.7. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).**

Adicionalmente, algunos segmentos centrales y representativos de los moldes de cada región tubular del órgano, fueron analizados mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Para tal fin, los mencionados segmentos se montaron en soportes de aluminio, fueron recubiertos de oro, y examinados con un microscopio electrónico de barrido (Carl Zeiss®, Supra - 55VP; USA), en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Noroeste Argentino (LAMENOA), perteneciente al Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), Tucumán, Argentina.

#### 4.3.8. Registros morfométricos:

A partir de los moldes intraluminales, en primera instancia y de acuerdo a las características macroscópicas, fue delimitada cada región tubular (istmo, UAI y ámpula). Cada una fue fotografiada de manera secuencial, hasta alcanzar el límite con la región adyacente. Mediante el software (Motic Images Plus 2.0<sup>ML</sup>) a cada imagen (de 6,4 mm. de longitud), se le realizaron los siguientes registros: 5 (cinco) mediciones separadas y equidistantes entre sí, para obtener el diámetro luminal ( $dl$ ), y 1 (una) medición para hallar la longitud del segmento ( $ls$ ). Para este último registro (longitud) se trazó un eje a mano alzada sobre el plano mediano, respetando las curvas presentes en cada segmento. Los valores registrados de los segmentos centrales fueron establecidos como representativos para el diámetro de cada región (istmo, UAI, ámpula) y fase reproductiva (anovulatoria, estro, diestro) evaluada (**Fig. 9**).



**Figura 9:**

Procedimiento realizado para obtener algunos registros morfométricos de las diferentes regiones de los moldes 3D del oviducto. **A**, molde del oviducto (40X, sin infundíbulo) donde se remarca un segmento del istmo craneal; **B**, foto (de 6,4 mm de longitud) del segmento del istmo craneal, registrada con la cámara de la lupa estereoscópica (Motic Images Plus 2.0<sup>ML</sup>). Análisis de la imagen con el software Motic Images Plus 2.0<sup>ML</sup>: en trazos blancos se muestran 5 mediciones para determinar el diámetro; y el trazo verde sobre el eje mediano, para obtener la longitud del segmento.

4.4. Examen histológico del tejido oviductal:

4.4.1. Microscopía óptica (MO) y morfometría.

A partir de cortes histológicos de cada región tubular (exceptuando el infundíbulo) y en diferentes etapas del ciclo estral (anovulatoria, estro, posovulatoria y diestro); a través del software (Motic Images Plus 2.0<sup>ML</sup>) se realizaron mediciones del área luminal (*al*) y perímetro epitelial (*pe*); y área mucosa (*am*) ocupada por pliegues, asumiendo como límite para los primeros parámetros al epitelio oviductal; y para el área mucosa, la capa muscular (Fig. 10 y 11). Este último dato, fue obtenido a partir de la diferencia entre el área total (*at*) y área luminal (*al*). Para realizar dichas mediciones fueron considerados únicamente los cortes histológicos obtenidos de forma transversal. Para calcular el área total (*at*), se utilizó la ecuación del área de un círculo ( $A = \pi \times D^2 / 4$ ), obteniendo previamente el diámetro mayor y menor (debido a que los cortes no representan circunferencias homogéneas). Adicionalmente se calculó el volumen aproximado (*promedio del área lumen [mm<sup>2</sup>] x promedio longitud [mm] = mm<sup>3</sup>*), convertido en microlitros ( $\mu\text{l}$ ), para cada región y fase del ciclo, considerando como representativos a los valores obtenidos de los segmentos centrales.

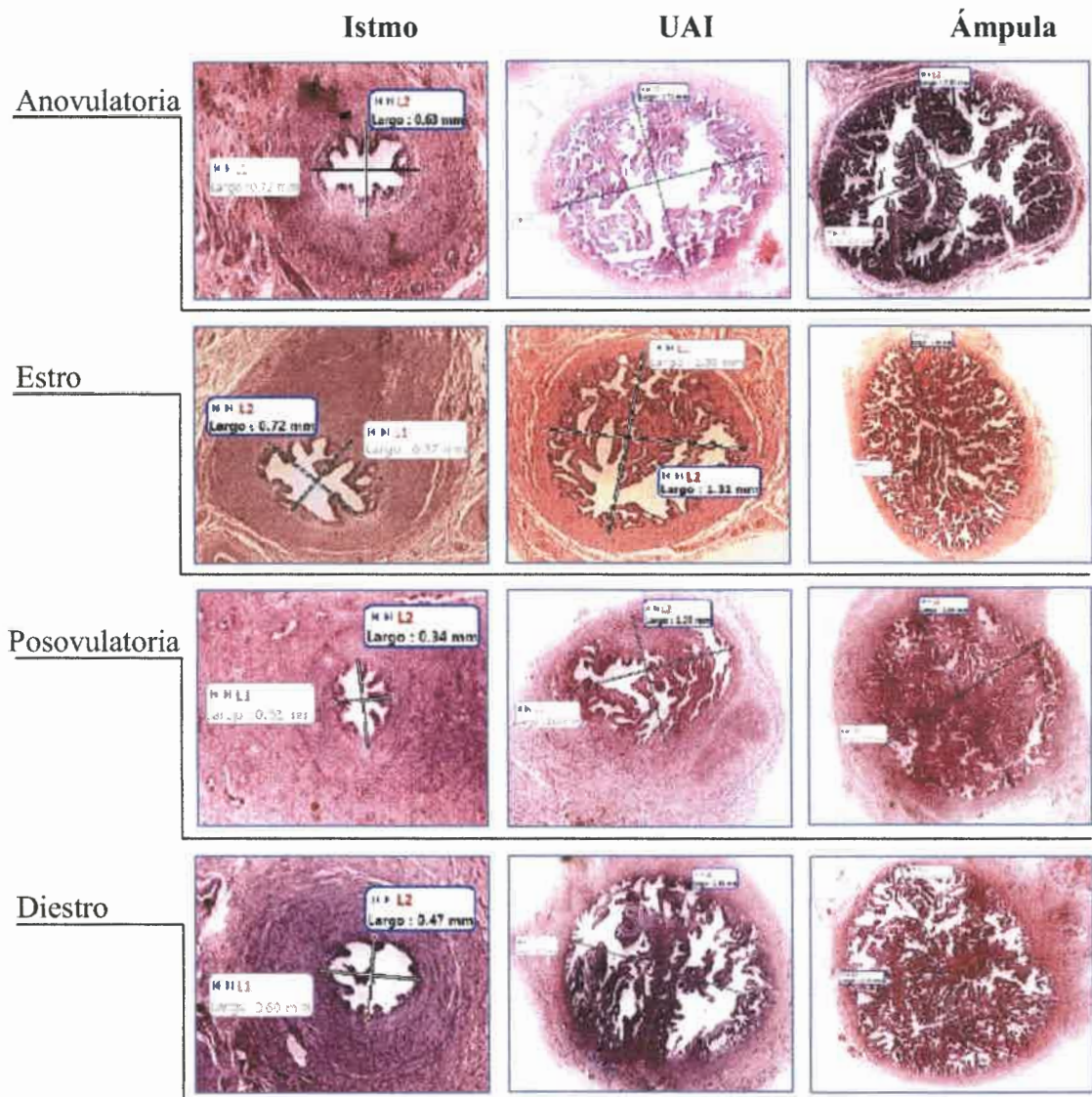
Tabla 1:

Métodos de evaluación de las características de la mucosa oviductal en las distintas regiones del oviducto y en diferentes etapas del ciclo estral.

Examen	Bidimensional (2D)		Tridimensional (3D)		
	Cortes Histológicos		Moldes intraluminales	Segmentos oviductales	
Muestra					
Método análisis	Estéreo microscopía	M.O	Estéreo microscopía	MEB	MEB
Características morfológicas	Relación pliegues epiteliales: área libre intraluminal.	Cantidad, ramificación de pliegues epiteliales. Distribución de células epiteliales. Desarrollo de capa muscular.	Surcos, criptas o fondos de saco, pliegues y ramificaciones.	Surcos, criptas o fondos de saco, pliegues y ramificaciones.	Surcos, criptas, fondos de saco, pliegues y ramificaciones. Distribución y características de células epiteliales. Ciliación
Morfometría	Área luminal, perímetro epitelial, área mucosa. Volumen aproximado	Altura de pliegues epiteliales	Longitud y diámetro de cada región. Volumen aproximado.	No determinado	No determinado

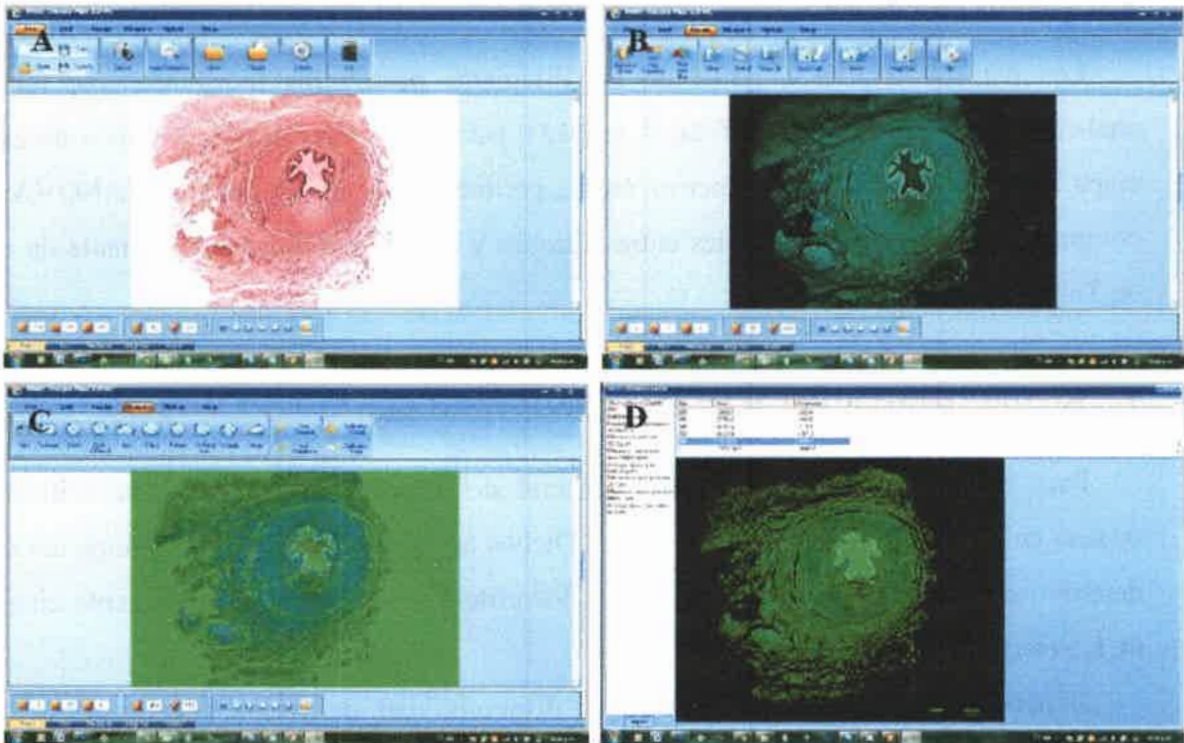
#### 4.4.2. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB):

Conjuntamente con la evaluación con microscópica convencional, las muestras de tejido oviductal provenientes de yeguas inseminadas artificialmente, fueron analizadas mediante MEB (Carl Zeiss®, Supra - 55VP; USA). Concomitantemente con la búsqueda de espermatozoides, se describieron las principales características de la mucosa y su epitelio.



**Figura 10:**

Obtención de algunos registros morfométricos de las diferentes regiones del oviducto, a partir de cortes histológicos. Las columnas representan las regiones tubulares (istmo, UAI, ámpula), en correspondencia a las distintas fases del ciclo estral evaluadas (anovulatoria, estro, posovulatoria y diestro). En cada imagen se observan los diámetros (mayor y menor) utilizados para calcular el área total y área mucosa, ocupada por los pliegues epiteliales, a través del software Motic Images Plus 2.0<sup>ML</sup>.



**Figura 11:**

Obtención de algunos registros morfométricos de las diferentes regiones tubulares del oviducto, en distintas etapas del ciclo estral, a partir de cortes histológicos. **A**, imagen de la región del istmo capturada por la cámara digital; **B**, imagen del istmo modificada (en negativo); **C**, autosegmentación de la imagen del istmo; **D**, cálculo automático del área ( $\mu\text{m}^2$ ) y perímetro ( $\mu\text{m}$ , verde sólido), a través del software Motic Images Plus 2.0<sup>ML</sup>.

#### 4.4.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET):

Posterior a la recolección, fueron cortados trozos pequeños (1x1mm) de tejido oviductal, y colocados en fijador de Karnovsky al 5%. Después de varios enjuagues con solución buffer fosfato (pH 7), las muestras fueron post-fijadas en tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ), y deshidratadas en series ascendentes de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 95% y absoluto). Las muestras deshidratadas fueron incorporadas en bloques de resina epoxi (Epon<sup>TM</sup>812, Sigma - Aldrich<sup>®</sup>). Se realizaron cortes ultrafinos (50 -70nm), recogidos en rejillas de cobre y posteriormente coloreados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las secciones fueron observadas bajo microscopio electrónico de transmisión (Carl Zeiss EM-109<sup>®</sup>, USA). Todas las muestras fueron procesadas y fotografiadas en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Noroeste Argentino (LAMENOA) del Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia; Universidad Nacional de Tucumán.

#### **4.5. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos a partir de los diferentes parámetros morfométricos, fueron analizados estadísticamente (InfoStat<sup>®</sup> v.2013), para comprobar posibles efectos de cada etapa sobre las variables (diámetro, áreas, perímetro, longitud) mediante ANOVA; y comparar a posteriori las variables entre regiones y etapas reproductivas mediante un test de Tukey.

#### **4.6. RESERVORIOS DE ESPERMATOZOIDES (R.E) EN EL OVIDUCTO**

Para cumplir el segundo objetivo general del apartado “Objetivos”, se utilizaron yeguas en diferentes fases del ciclo estral. Dichos animales fueron seleccionados durante determinados meses del año, de acuerdo a los criterios de selección previamente citados **(4.1. Selección de animales, Tabla 2)**.

Dependiendo de las oportunidades y disponibilidad de recursos entre otros; los animales seleccionados, y las muestras recuperadas, provinieron de diversas procedencias: Planta Frigorífica (64%); Centro de Transferencias Embrionarias (9%); Laboratorio de Reproducción Equina, FAV – UNRC (27%)<sup>2</sup>. Las yeguas no procedentes del frigorífico fueron intervenidas quirúrgicamente con el objetivo de realizarles una ovariectomía bilateral (castración), y concomitantemente recuperar los oviductos **(Fig. 13 y 14)**.

Todas las yeguas fueron chequeadas mediante palpación rectal y monitoreo ultrasonográfico, para verificar la fase del ciclo reproductivo. Aquellos animales compatibles con dicho estadio fueron seleccionados para ser inseminados artificialmente.

##### **4.6.1. Recolección de semen e Inseminación Artificial (IA):**

El semen extraído y utilizado para realizar las inseminaciones artificiales, provino de dos padrillos de raza criolla de fertilidad probada, ubicados en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción Equina, de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC. Para la colecta del eyaculado se utilizó una vagina artificial (VA) tipo Missouri; con presión y temperatura ajustada a las características de los padrillos.

El semen recolectado fue evaluado macroscópicamente y luego bajo microscopio, para determinar el porcentaje de motilidad progresiva y el vigor de los espermatozoides móviles.

---

<sup>2</sup>Propuesto inicialmente, la totalidad de los animales seleccionados y las muestras necesarias para cumplir los objetivos, provendrían de la planta frigorífica, aunque por impedimentos de diversa índole, tuvieron que adquirirse animales de otras procedencias.



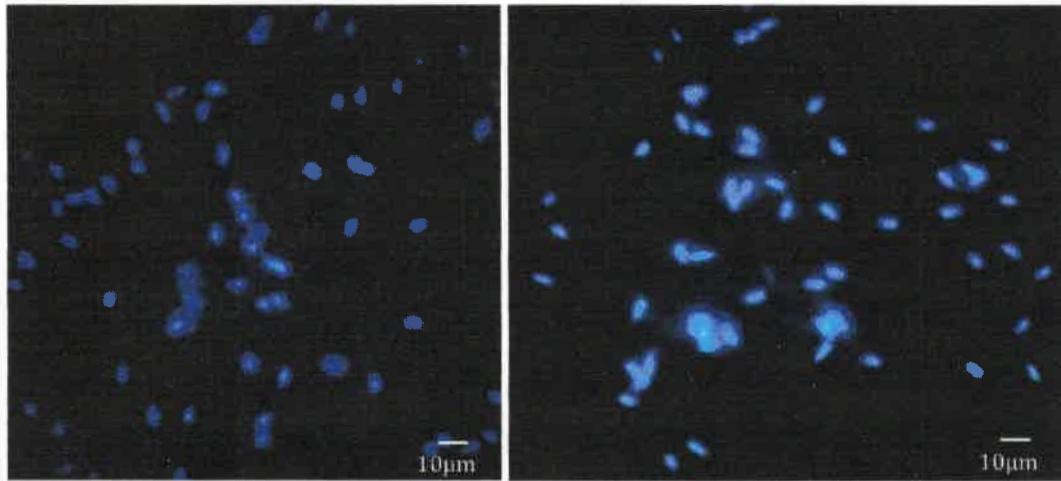
Utilizando una cámara de Neubauer (hemocitómetro) se calculó la concentración espermática del eyaculado y se procedió a su correspondiente dilución con extender tipo Kenney, para lograr dosis inseminantes con concentraciones mínimas de  $800 \times 10^6$  espermatozoides con motilidad progresiva. Estas dosis fueron utilizadas aproximadamente a las 2 horas de recolectado el eyaculado, incluyendo su procesamiento y dilución final. Las IA fueron realizadas de manera convencional, depositando cada dosis inseminante en el cuerpo uterino de las yeguas.

Mediante tacto rectal y ultrasonografía se constató la permanencia en la fase del ciclo de los animales hasta el momento de la recolección de los oviductos.

En uno de los últimos ensayos, y en un intento de facilitar la visualización y localización de los espermatozoides en el oviducto de una yegua seleccionada, el semen utilizado en la IA fue previamente incubado con el fluorocromo (*bis-benzimida*, Hoechst 33342<sup>®</sup>, Molecular Probes, USA), el cual se liga al ADN nuclear, ubicado en la cabeza del espermatozoide, sin afectar su viabilidad / motilidad.

#### **4.6.2. Inseminación Artificial con Semen Pre-incubado con Fluorocromo (Hoechst 33342<sup>®</sup>).**

El procedimiento utilizado en este caso puntual, fue el mismo que el mencionado en el punto 4.6.1; con la variante de que la dosis inseminante ( $800 \times 10^6$  espermatozoides), fue incubada (previo a la IA), con una solución stock ( $5\mu\text{g/ml.}$ ) de fluorocromo nuclear Hoechst 33342<sup>®</sup>, a temperatura ambiente, durante 10 minutos y completa oscuridad. Inmediatamente antes de la IA, fue reevaluada la viabilidad y motilidad de las células espermáticas del semen con el fluorocromo incorporado en su ADN nuclear, mediante microscopio óptico equipado con luz UV (**Fig. 12**).



**Figura 12:**

Alícuota de semen equino coloreado con fluorocromo Hoechst 33342® previo a la IA. Las cabezas espermáticas conteniendo el fluoróforo ligado al ADN espermático, emiten fluorescencia azul, en respuesta al estímulo con luz UV del microscopio de epifluorescencia.

El tiempo transcurrido entre las IA y la recolección de los oviductos de las distintas yeguas inseminadas fue variable, dependiendo en gran medida de la procedencia de los animales y el método disponible de recolección.

**Tabla 2:**

Características generales de la recuperación de tejido oviductal para evaluar el reservorio espermático en el oviducto de la yegua.

Recolección de oviductos de yeguas inseminadas artificialmente							
Mes / Año	Diciemb 2011	Agosto 2012	Diciemb 2012	Diciemb 2013	Enero 2014	Enero 2015	Febrero 2015
Yeguas (n)	n= 3	n=1	n=1	n=1	n=3	n=1	n=1
Estadio	Estro	Anovul	Estro	Estro	Estro/Po	Estro	Estro
Recup. post IA (hs)	± 36	± 18	± 20	± 8	± 72	± 5,5	± 12
Oviductos (n)	n= 6	n=2	n=2	n=2	n=5	n=1	n=1
Origen	Frigoríf.	Cirugía	Frigoríf.	Cirugía	Frigoríf.	Cirugía	Post Mortem

Anovul, anovulatoria, Po, posovulatoria.

#### **4.6.3. Recuperación de oviductos mediante cirugía (laparotomía).**

#### **4.6.4. Ovariectomía bilateral en estación:**

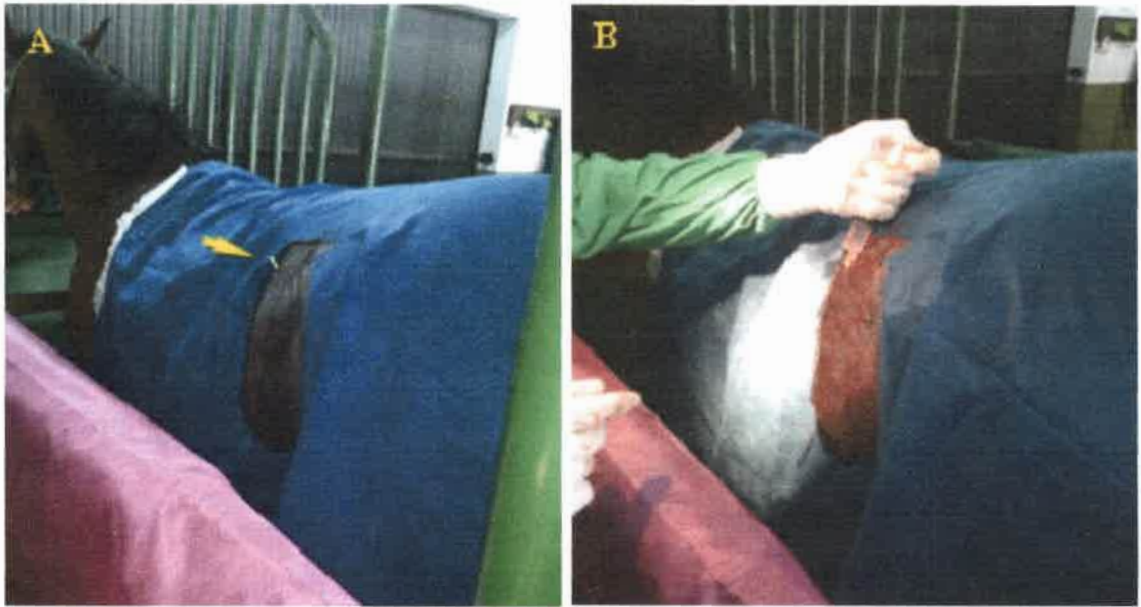
Como fue mencionado, para este procedimiento quirúrgico se utilizaron yeguas procedentes de un Centro de Transferencias Embrionarias ubicado a escasos kilómetros de la Universidad Nacional de Río Cuarto, y del Laboratorio de Reproducción Equina perteneciente a la mencionada casa de altos estudios. Mediante tacto rectal se verificó que la longitud de los ligamentos ováricos (suspensores del ovario), sea suficiente como para exponer el ovario y estructuras asociadas hacia la incisión quirúrgica, mediante un abordaje realizado a través de cada flanco.

Se realizó un examen clínico de rutina, previo a la medicación e intervención quirúrgica para chequear el estado normal de las constantes fisiológicas. Posterior a un ayuno de  $\pm 12$  horas, se procedió a realizar la cirugía en estación, bajo los efectos de sedación profunda utilizando 0,1 mg/kg. EV de maleato de acepromacina, (Acedan<sup>®</sup>, Holliday Scott SA); 1 mg/kg. IM de clorhidrato de xilazina, (Sedomin<sup>®</sup>, König, Argentina) y 0,2 mg/kg. EV de tartrato de butorfanol, (Butormin<sup>®</sup>, Holliday Scott SA), para lograr analgesia visceral acorde al procedimiento.

En una manga ginecológica (en estación), el área quirúrgica fue rasurada y preparada asépticamente para abordar la cavidad abdominal a través de cada flanco (**Fig. 13 y 14**). Se realizó anestesia local paravertebral de las ramas ventrales de los nervios espinales toracolumbares, desde T18 (torácico 18) hasta L2 (lumbar 2) para insensibilizar la piel y los músculos abdominales. Para tal fin se utilizó clorhidrato de lidocaína al 2% (Lidocaíne<sup>®</sup> Richmond Vet Pharma), de rápida acción para las ramas cutáneas; y bupivacaína al 0,5% (Bupinex Vet<sup>®</sup> Richmond Vet Pharma) de duración prolongada para las ramas musculares y de mayor calibre.

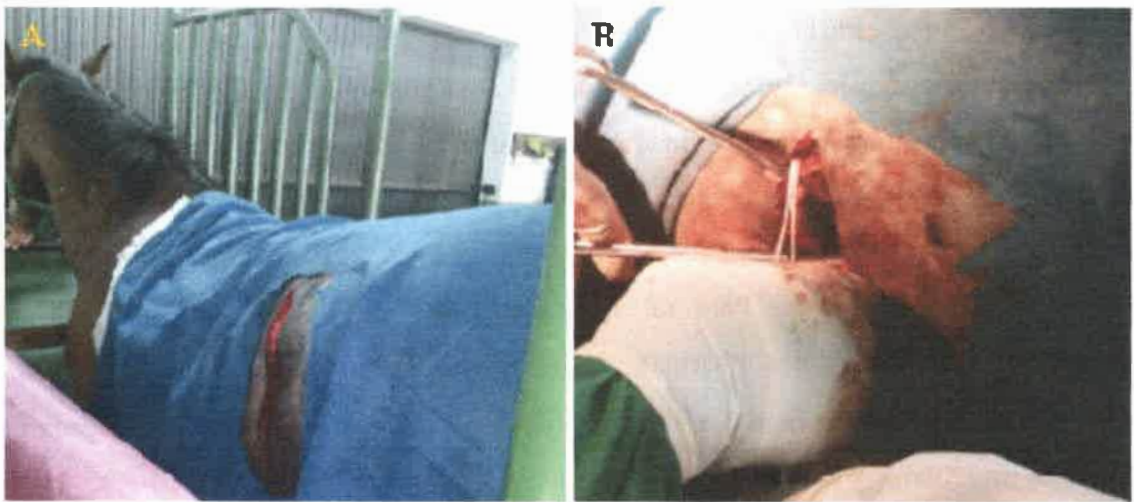
Transcurridos aproximadamente 20-30 minutos de efectuada la anestesia local, se procedió a realizar la incisión quirúrgica de todos los planos anatómicos; piel, tejido subcutáneo, fascia superficial y profunda, las capas de músculos abdominales ubicadas en el flanco (oblicuo abdominal externo, interno, transverso) y finalmente peritoneo parietal para ingresar a la cavidad abdominal.

Un operario, a través de tacto rectal aproximó el ovario correspondiente hacia cada incisión quirúrgica, para facilitar la extracción del mismo y el oviducto relacionado.



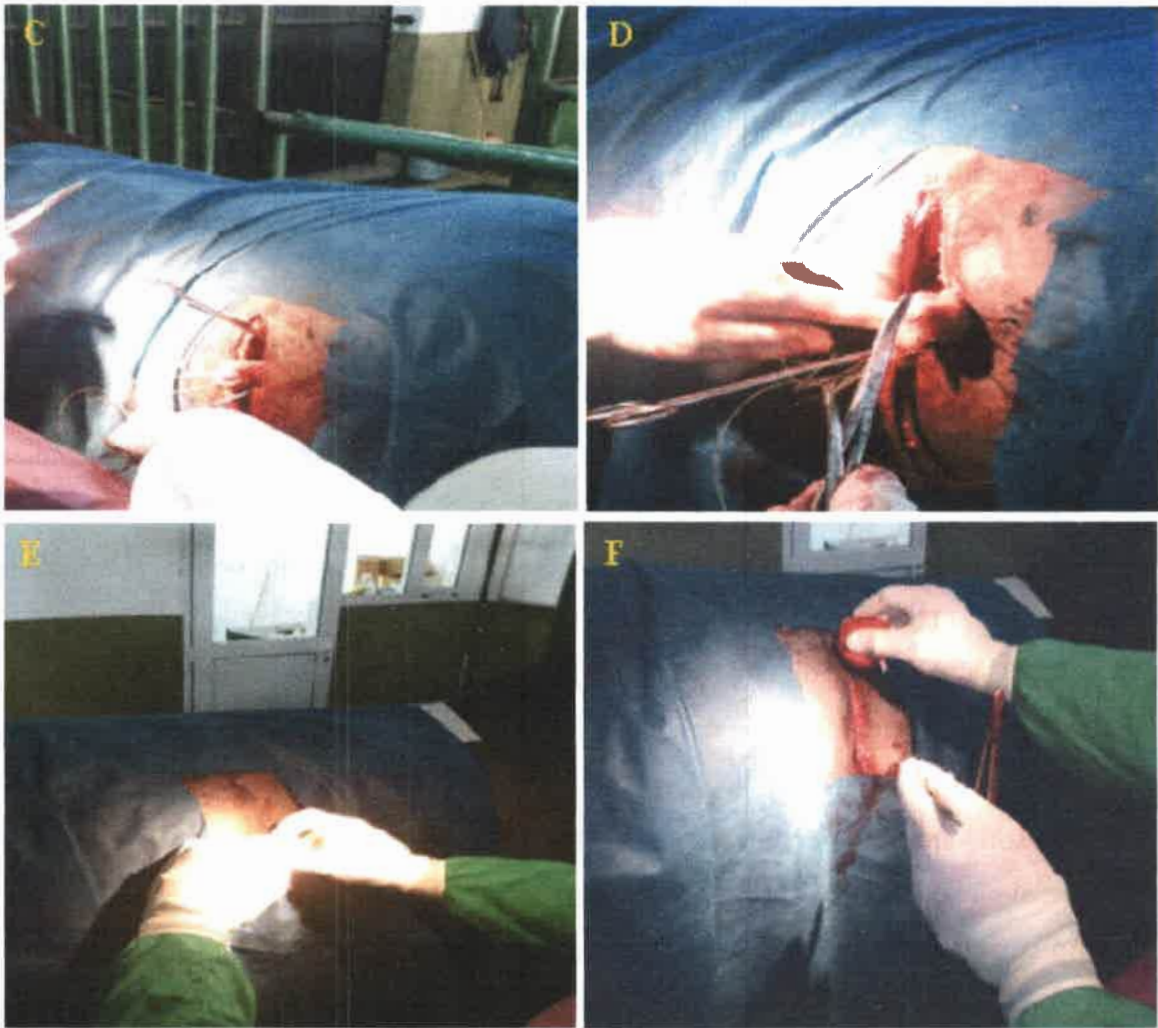
**Figura 13:**

Anestesia local paravertebral, previo a la ovariectomía bilateral en estación a través de la fosa del flanco izquierdo y derecho. **A**, aguja (*flecha*) colocada en el espacio intervertebral entre T18 y L1, 10 cm a lateral de la línea media dorsal, para bloquear la emergencia del nervio espinal T18; **B**, depósito de lidocaína para la desensibilización de la rama ventral del último nervio espinal torácico izquierdo (T18).



**Figura 14:**

Ovariectomía bilateral en estación a través de los flancos. **A**, incisión de los estratos superficiales de la pared abdominal; **B**, divulsión de los músculos abdominales.



**Figura 14 (continuación):**

Ovariectomía bilateral en estación a través de los flancos. **C**, colocación de riendas de tracción y exteriorización del ovario izquierdo a través de la herida quirúrgica; **D**, tracción del pedículo ovárico, oviducto y mesos peritoneales de soporte, **E** y **F**, incisión y abordaje del flanco derecho para realizar la ovariectomía del ovario y estructuras asociadas ipsilaterales.

#### **4.6.5. Procesamiento de los oviductos y evaluación de las muestras.**

Independientemente de la procedencia, una vez obtenidos los oviductos de las yeguas inseminadas artificialmente, se realizaron disecciones para eliminar gran parte de la serosa de soporte. Cada oviducto fue seccionado transversalmente en toda su extensión, y de acuerdo a las características macroscópicas se obtuvieron porciones de 0,5 cm. de longitud de las siguientes regiones: UUT, istmo, UAI y ámpula.

Posteriormente, una sección de cada región fue preservada en solución de formalina bufferada (SFB al 10 %) para histopatología; y otra sección del mismo segmento, fijada en solución de Karnovsky al 5% (Glutaraldehído - paraformaldehído) para evaluación con microscopía electrónica de barrido (MEB).

Todas las porciones destinadas a histopatología fueron deshidratadas en soluciones graduales ascendentes de etanol (70%, 80%, 96% y 100 %), clarificadas en xilol e incluidas en bloques de parafina. Se realizaron cortes de 7µm de cada bloque, las cuales fueron montadas en portaobjetos. Posteriormente, se desparafinaron en xilol; rehidratadas en series descendentes de alcohol y finalmente coloreadas con hematoxilina y eosina (H&E).

Las muestras reservadas para MEB, fueron procesadas y fotografiadas en el Laboratorio de Microscopia Electrónica del Noroeste Argentino (LAMENOA) del Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia; Universidad Nacional de Tucumán.

Los cortes histológicos fueron evaluados bajo microscopio óptico (Carl Zeiss®, Germany) a magnificaciones de 25X, 200X, 400X y 1000X. Las imágenes fueron registradas con cámara digital (Powershot G6, 7.1 megapixels, Canon INC., Japan) y software Axio Vision Release 4.6.3 (Carl Zeiss®, Germany). Además se fotografiaron varios cortes histológicos con la cámara de la lupa estereoscópica, para realizar mediciones con el software (Motic Images Plus 2.0<sup>ML</sup>) y aportar detalles a la organización tridimensional del órgano.

Adicionalmente al procesamiento habitual de las muestras, y excepcionalmente para el caso de una yegua IA con semen incubado con fluorocromo (Hoechst 33432®), se obtuvieron diminutas porciones de la capa mucosa (endosalpinx), las cuales fueron “aplastadas” hasta lograr finas láminas entre el portaobjetos y cubreobjetos, para ser observadas directamente bajo microscopio invertido equipado con epifluorescencia (Nikon Eclipse Ti-U®, Nikon Instruments Inc., Japan). Además, a partir de la mucosa de la UUT (papila), istmo y ampulla se prepararon improntas. Las mismas fueron coloreadas con un kit de tinción diferencial rápida (Tinción 15®, Biopur Diagnostics SRL., Argentina) con el propósito de visualizar posibles espermatozoides en cada región mencionada.

Los parámetros tenidos en cuenta en la evaluación de cada muestra histológica fueron los siguientes:

- presencia y cantidad de células espermáticas.
- región oviductal donde se hallan espermatozoides.
- espermatozoides adheridos al epitelio oviductal o libres en el lumen.
- ipsilateral, contralateral (o ambos); al ovario con folículo dominante (≥ 35 mm) o cuerpo lúteo (CL).

Para el caso de las muestras de microscopía electrónica de barrido (MEB) se observaron las características morfológicas del epitelio oviductal, enfatizando de manera adicional la posible detección de células espermáticas.

---

**CAPÍTULO V**  
**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

---



## 5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A pesar de que numerosas biotecnologías aplicadas a la reproducción, tal como la fertilización *in vitro* (FIV) ha podido demostrar, que el oviducto no es un órgano esencial para generar un nuevo individuo mamífero, actualmente se intenta imitar, en condiciones de laboratorio (*in vitro*) el ambiente intraoviductal, con el objetivo de lograr con mayor éxito, las tasas de concepción de los animales y el hombre. El estudio a lo largo de los siglos sobre la anatomía macro y microscópica, y principalmente, el gran avance en la comprensión de los procesos fisiológicos que ocurren en las trompas uterinas (oviductos) ha permitido -y lograrán- con el transcurso de los años, aplicar la mayoría de estos conocimientos, a las diversas técnicas reproductivas modernas; por ejemplo, aumentando los índices de fertilización o mejorando los métodos contraceptivos.

Sin dudas que el avance en el conocimiento morfológico y funcional de cada parte del aparato genital de la hembra (y del macho), están estrechamente vinculados al desarrollo tecnológico y al progreso de las ciencias biológicas aplicadas a la reproducción.

### 5.1. Breve reseña histórica:

El oviducto, también conocido como salpinx (del griego antiguo *σάλπιγξ* = trompeta, tuba), trompa uterina o de Falopio, lleva el epónimo de Gabriele Fallopio (1523-1562), notable anatomista italiano, quien por primera vez (1561) y un año antes de su muerte, describe de manera completa y detallada a este tramo del aparato reproductor de la hembra (Johnson y Foley, 1974; Velázquez-Cornejo y Zamora-Ramírez, 2012). Sus descubrimientos anatómicos, incluyendo la descripción de los órganos genitales, se detallan en uno de sus libros de texto titulado "*Gabrielis Fallopii medici Mutinensis Observationes anatomicae*", es decir las "Observaciones anatómicas del Médico de Módena, Gabriele Fallopio" (Andreae Vesalli, 1564).

Este órgano tubular fue ignorado durante mucho tiempo, así por ejemplo, Aristóteles (384-322 a.C) menciona con cierta precisión las características y posición del útero en diferentes especies vivíparas, ovíparas (e incluso algunos insectos), prestando escasa atención al oviducto, del que solamente menciona algunas de sus curvaturas en las especies sanguíneas.

Las teorías hipocráticas (cuestionadas parcialmente por Aristóteles) proponían en esos años, que a partir de la mezcla del semen masculino y el femenino (fluido o sangre menstrual) durante el coito, eran los responsables de la formación del embrión y posteriormente el feto (Sánchez, 1994).

Gabriele Fallopio, en realidad no fue el verdadero descubridor de las trompas uterinas que llevan actualmente su nombre. En los antiguos escritos de la medicina hindú (8 a 10 siglos a.C) se mencionan unos canales cuyas raíces u orígenes se hallan en el útero (libro del Ayurveda de Charaka y su discípulo Susruta).

Pero realmente es Herófilo de Calcedonia (340-280 años a.C), médico alejandrino, quien, con posterioridad a varias de sus descripciones anatómicas humanas (cerebro y vasos sanguíneos, corazón, ovarios, epidídimo y próstata, entre otras), hizo referencia a los oviductos. A él se atribuye la analogía entre los genitales masculinos y femeninos.

Considera que los ovarios son los “testículos femeninos” y los conductos situados lateralmente, “conductores del semen” desembocan (como en el varón), en el cuello de la vejiga. En conclusión, tanto hombres y mujeres producen semen, pero ellas lo eliminan periódicamente en forma de flujo menstrual, después de haber sufrido una digestión incompleta (Barriére et. al., 2000).

Esta analogía entre los conductos del macho y la hembra se mantuvo durante muchos siglos, a pesar de que paulatinamente se abandonaron las terribles prácticas de vivisección (humana) y comenzaron las primeras disecciones en animales (ovejas), las cuales son atribuidas a Rufus de Éfeso (siglo I a.C). Posteriormente, Galeno (130-201 d.C), basado también en disecciones animales, describe nuevamente esos “vasos o conductos espermáticos” de aspecto varicoso, que conducen el semen, desde los testículos femeninos hasta los extremos uterinos, pero no hacia la vejiga como se había mencionado con anterioridad. Estos conceptos, instalados por Galeno perdurarán durante 14 siglos.

Andreas Vesallius (1543), adopta las descripciones galénicas, perpetuando el concepto del isomorfismo sexual entre machos y hembras, considerando al “conducto seminal femenino” como una réplica del epidídimo. En su obra *“De Humani Corporis Fabrica; Tabulae Anatomicae Sex”*, describe gráficamente el útero bicornio de la vaca y la perra, dando poca importancia al de la mujer. Además, menciona e ilustra con detalle el recorrido de estos “conductos seminales”, que según sus descripciones comenzaban en los testículos femeninos. Demostró además, que estos conductos desembocaban en la cavidad uterina y no en el miometrio (Herrlinger y Feiner, 1964).

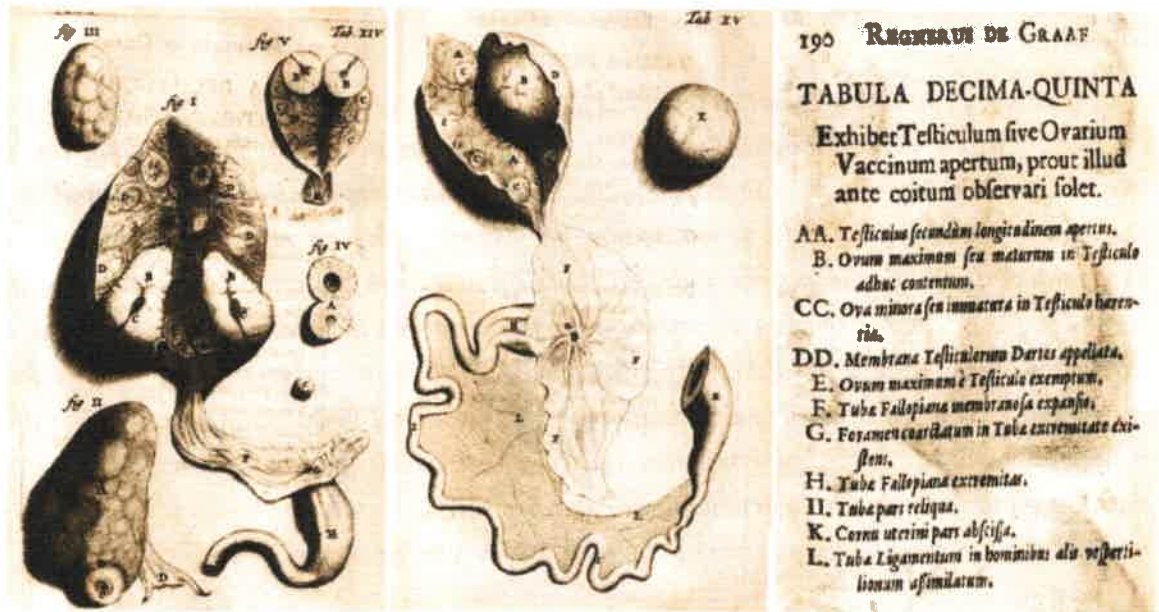
Quien corrige estas descripciones un tanto erróneas, y distingue entre los conductos sexuales del macho y la hembra fue Gabriele Fallopio. Determina que las hembras no poseen epidídimo, y el “conducto seminal femenino” conecta el extremo del útero con el ovario. Por su similitud al instrumento de viento (trompeta), este conducto fue denominado

“trompa de Fallopio”. Describe al oviducto de la siguiente manera (Fallopio, 1561 en Mevdei, 1982):

*“el conducto seminífero (meatus seminiferus) tiene su origen en los cuernos uterinos; es delgado, muy estrecho, blanquecino y posee el aspecto de un nervio. Se hacen más anchos cuando se alejan un poco del útero, se incurvan como una rama hasta la proximidad de su extremo, y separándose del cuerno como una espiral se hacen muy anchos, tienen una extremidad distinta, que parece carnosa por su color rojo, estando rasgada y mellada como los flecos de una prenda de vestir desgarrada, con un amplio orificio tapado por los extremos de los flecos y perdido entre ellos: pero si éstos son cuidadosamente separados y entreabiertos parece el orificio de una trompeta de bronce. Por consiguiente, puesto que el conducto seminal, desde su comienzo hasta su extremo final, tiene semejanza con la porción incurvada de ese instrumento clásico, ha sido llamada por mí uteri tuba. Existen no sólo en el cuerpo humano, sino también en ovejas y otros animales que he disecado”*

De todos modos, las funciones del oviducto se mantuvieron desconocidas durante 150 años desde su descripción inicial. La idea de que las trompas uterinas cumplían con alguna función secretora, comenzó en torno a los hallazgos de Girolamo Fabrizi d'Acquapendente (1537-1619), discípulo de Fallopio. A partir de sus experimentos en gallinas, observó que el oviducto captaba los huevos producidos en el “*ovarium*” y posteriormente eran recubiertos con varias capas.

Probablemente, el primero en comprender y describir alguna función del oviducto fue el holandés Regnier De Graaf (1641-1673), quien describe además, los folículos ováricos (terciarios) que llevan su nombre (Jay, 2000). A través de estudios en conejas, observa como esos folículos desaparecen posterior a la cópula, y descubre pocos días después, blastocitos en el interior del oviducto. Reconoce con cierta claridad varias condiciones patológicas de las trompas uterinas, entre ellas el hidrosalpinx y la preñez tubárica (Ankum et al., 1996). De todas formas, no podía descifrar la manera en que esos folículos maduros, de importante tamaño, lograban pasar por el estrecho diámetro del oviducto. En la *Tabula Decimo-Quarta y Decimo-Quinta*, de su obra “*De Mulierum Organis Generationi Inservientibus Tractatus Novus, 1672*” (**Fig. 1**), grafica algunos de los folículos en desarrollo en vacas y ovejas, además de las diferentes partes de la tuba de Fallopio.



**Figura 1:**

A, Representación gráfica de los ovarios (testículos femeninos) de la vaca (figs. I y II, con el extremo de la trompa de Fallopio) y la oveja (figs. III, IV, y V) Tabula Decima-Quarta. B y C, Ovario bovino abierto longitudinalmente con un folículo maduro junto a la trompa uterina; con sus referencias explicativas (Tabula Decima-Quinta) de los esquemas presentados en la figura anterior. *De Mulierum Organis Generationi Inservientibus Tractatus Novus, Tábula Décima-Quinta*, Regnerus De Graaf, 1672.

Hasta finales del 1600, se pensaba que la fecundación ocurría en los ovarios, y que el oviducto transportaba el embrión hasta el útero. Se desconocía por completo de la existencia de los espermatozoides en los fluidos seminales, hasta que otro holandés, Anton van Leeuwenhoek (1679), descubrió, en el esperma humano minúsculas criaturas, “*animalculi*”, dotados de movimiento activo, y no tan diferentes de los animales microscópicos que había descubierto en el agua de lluvia (Capana, 1999). Posteriormente Lázaro Spallanzani, (1780) sostiene la hipótesis de que los espermatozoides son los agentes de la fertilización, y logra con éxito inseminar una perra. Cuarenta y cinco años después, Dumas (1825), logra comprobar que los espermatozoides efectivamente son los responsables de la fertilización (Senger, 2005). Casi en el mismo momento, Karl Ernst von Baer (1826), observó por primera vez bajo microscopio óptico, el ovocito de un folículo antral en ovario mamífero. Finalmente, a partir de ese momento se logró determinar la diferencia entre folículos y ovocitos.

Todos estos hallazgos incentivaron estudios posteriores respecto al rol funcional del oviducto. En un intento de observar el óvulo en la trompa uterina de una coneja fertilizada; Purkinje y Valentin (1835), describen de manera accidental, la presencia de cilias en el oviducto y el útero, desviando su atención al maravilloso y rápido movimiento que se

producía sobre la superficie mucosa (Todd, 1836; Satir y Christensen, 2008). Bischoff, en el siglo XIX es el creador de la popular “teoría de contacto” en la fertilización. En su publicación de 1842, sobre fertilización en conejas “*Entwicklungsgeschichte des Kaninchen-Eies*” (*historia del cigoto del conejo*), postula que la esencia de la fecundación, radica en la interacción química entre el óvulo y el semen (Bischoff 1842, en Farley, 1982).

El prolongado debate sobre rol de los espermatozoides y los óvulos en la fertilización vio su fin en 1876, cuando Oskar Hertwig publica sus observaciones de fusión pronuclear entre las gametas del erizo de mar (Briggs y Wessell, 2006).

Una de las descripciones y revisiones más minuciosas del oviducto mamífero, surge con el trabajo publicado por Hafez y Blandau en 1969. Desde ese entonces, se han realizado numerosos estudios, sustentados por los mayores avances tecnológicos, abarcando una vasta cantidad de aspectos morfológicos, histológicos, ultraestructurales y moleculares, así como también, se han demostrado una enorme diversidad de procesos fisiológicos orquestados en el lumen de este órgano, y que muchos de ellos representan eventos críticos y vitales de la biología reproductiva.

El creciente e incesante interés sobre los diversos aspectos morfológicos y funcionales de este órgano clave de la reproducción es, de algún modo, el origen del presente estudio y en el cual intentaremos situar este trabajo de tesis.

## **5.2. EMBRIOLOGÍA, ANATOMÍA y FISIOLOGÍA DEL OVIDUCTO**

---

### **5.3. Desarrollo embriológico (Ontogenia)**

El sistema reproductor embrionario, presenta un par de gónadas sexualmente indiferenciadas, dos pares de conductos, el seno urogenital, un tubérculo genital y los pliegues vestibulares. Durante esta etapa (indiferenciada) los embriones poseen los primordios del aparato reproductor del macho y la hembra. El sistema de conductos (también indiferenciados) consiste en un par de conductos mesonéfricos (o de Wolff) y un par de conductos paramesonéfricos (o de Müller) situados bilateralmente a los anteriores (Latshaw, 1987; Noden y DeLahunta, 1985; Hafez y Hafez, 2000).

La ausencia de AMH (anti-müllerian hormone) permitirá, para el caso de la hembra, la permanencia, proliferación y diferenciación de las células del conducto paramesonéfrico (Müller) con la consiguiente formación de sus principales porciones: *oviductos*, *útero*, *cérvix* y *vagina*. Inicialmente, en cada conducto se reconocen tres porciones: a) una

porción craneal que abre hacia la cavidad peritoneal; b) una porción transversa, que cruza al conducto mesonéfrico, y c) una porción caudal, que se fusiona con el conducto paramesonéfrico contralateral. Con el posterior desplazamiento de la gónada (ovario), las dos primeras porciones desarrollan al oviducto, y la tercera forma al útero y región craneal de la vagina (Sinowatz, 2010).

#### 5.4. ANATOMÍA MACROSCÓPICA

El oviducto es un conducto par, estrecho, que constituye la parte inicial de las vías genitales de la hembra. Según las especies es más o menos flexuoso. En las conejas presenta un recorrido escasamente tortuoso y es prácticamente rectilíneo en proximidad al útero (Pedrero-Badillo et al., 2013). El oviducto de la vaca, oveja y cabra presenta un grado intermedio de enrollamiento, y por último, en las cerdas y yeguas es muy tortuoso. En virtud a las flexuosidades que presenta a lo largo de su recorrido, la longitud total del oviducto es mayor a la distancia que separa el ovario y la extremidad craneal del cuerno uterino. En gran medida, el grado de enrollamiento y cantidad de circunvoluciones que presenta depende de la longitud del oviducto de cada especie (Hunter, 1988).

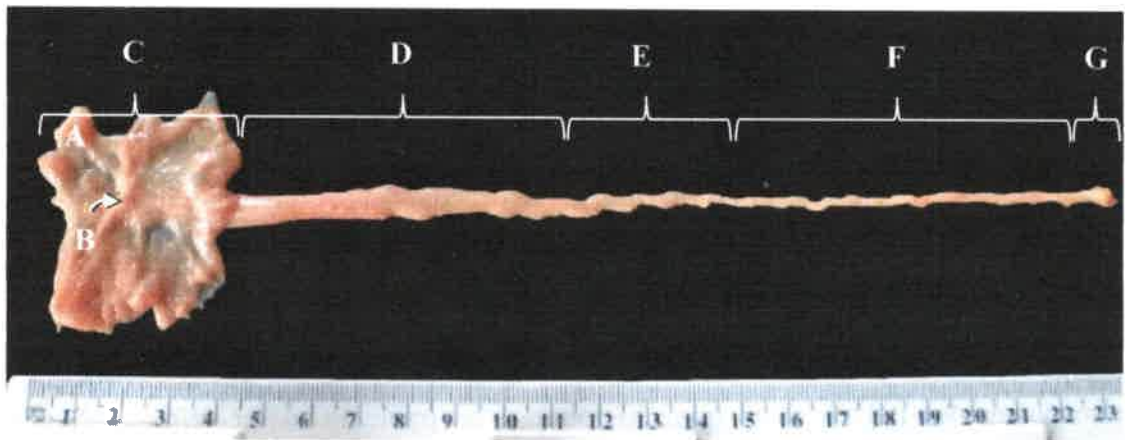
##### 5.4.1. Regionalización:

Con propósitos descriptivos, el oviducto se divide tradicionalmente en cuatro regiones o segmentos diferentes. Esta clasificación se basa principalmente en el aspecto morfohistológico, aunque desde el punto de vista funcional, cada región cumple con roles particulares y específicos. La **unión útero-tubárica (UUT, *Pars uterina*)**, es la zona de transición entre el oviducto y el cuerno del útero adyacente. Esta unión, presenta características morfológicas externas e internas variables en las diferentes especies estudiadas. La organización básica de esta región ha sido caracterizada en diversos patrones morfológicos de acuerdo a las especies estudiadas (Hook y Hafez, 1968; Hafez y Black, 1969; Beck y Boots, 1974). Wrobel et al., 1993; describieron de manera detallada la organización general y la superficie epitelial de esta región en los bovinos. En la yegua, la transición entre ambos órganos es muy evidente, debido al escaso diámetro del oviducto en dicha región y el comienzo abrupto y dilatado del cuerno uterino (Barone, 2001; König y Liebich, 2004; Dyce et al., 2010). Esta zona del oviducto equino, se proyecta internamente en el fondo de la cavidad uterina como un pequeño tubérculo muscular y mucoso, en forma de **papila** sobresaliente, en cuya parte central se observa el diminuto orificio uterino de la trompa (*Ostium uterinum tubae*).

El **istmo** (*Isthmus tubae uterinae*), es la región adyacente y craneal a la UUT. Este segmento de estrecho diámetro, presenta una pared densa, consistente y muscular, con escasos pliegues mucosos de baja altura. Comprende aproximadamente un tercio (o la mitad) de la longitud total del órgano.

La **ampolla** (*Ampulla tubae uterinae*), bien reconocida y diferente del istmo por el incremento del diámetro externo (e interno) a partir de la **unión ámpula-ístmica** (UAI). A diferencia de otras especies domésticas, en la yegua no se observa un límite o demarcación muy exacta entre la parte craneal del istmo y la porción caudal de la UAI. La ampolla presenta paredes delgadas, un trayecto tortuoso en parte de su recorrido y abundante cantidad de pliegues mucosos que se proyectan hacia el lumen. A medida que avanza en dirección al ovario describe un arco o curvatura sobre la cara lateral del mismo.

El **infundíbulo** (*Infundibulum tubae uterinae*) antiguamente “el pabellón de la trompa”, constituye la parte más craneal y en forma de embudo del oviducto. Su superficie externa se halla tapizada por el peritoneo, y la interna, al igual que el resto de los segmentos oviductales, por la mucosa tubárica la cual se presenta fuertemente plegada. Los pliegues irradian a partir de un orificio situado en una depresión central: el orificio abdominal de la trompa uterina (*ostium abdominale tubae uterinae*) que conecta la cavidad peritoneal con el exterior, a través del útero y la vagina. Estos pliegues terminan en el borde del infundíbulo formando pequeñas proyecciones digitiformes, las **fimbrias tubáricas** (*fimbriae tubae*). La mayoría de ellas son libres o flotantes, con la excepción de una, la fimbria ovárica, que se adhiere firmemente al extremo craneal del ovario (Barone, 2001). Dicha disposición le confiere cierta libertad de movimiento para poder captar el ovocito durante la ovulación, momento donde se produce una aposición del infundíbulo sobre la gónada, y en caso particular de la yegua sobre la fosa de ovulación del ovario (Kainer, 2011).



**Figura 2:**

Regiones morfológicas del oviducto de la yegua. **A**, fimbrias; **B**, orificio abdominal de la trompa uterina; **C**, infundíbulo; **D**, ámpula; **E**, unión ámpula-istmo; **F**, istmo; **G**, unión útero-tubárica (papila oviductal).

#### 5.4.2. Medios de fijación y relaciones topográficas:

Ubicado lateralmente al ovario, el oviducto y la gónada, comparten los medios de fijación y sus relaciones anatómicas. Como fue mencionado, el infundíbulo se une al ovario a través de la fimbria ovárica, siendo ésta un medio de fijación adicional. Las diferentes porciones internas del aparato reproductor están soportadas por un doble pliegue de peritoneo: el *ligamento ancho del útero*, que contiene músculo liso y conduce los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios hacia las diferentes estructuras anatómicas.

A lo largo de su recorrido, la trompa uterina, queda sostenida por el mesosalpinx, porción constitutiva del ligamento previamente mencionado. El borde proximal del *mesosalpinx* se continúa hacia craneal con el *mesovario*, que suspende a la gónada desde el techo de la cavidad abdominal, ventralmente a la IV o V vértebra lumbar; y hacia caudal se fusiona sin límite aparente con el *mesometrio* (Barone, 2001; Bergfelt, 2009; Dyce et al., 2010). Su borde distal es libre, se extiende desde la fimbria ovárica hasta el cuerno del útero, donde se reúne con el ligamento propio del ovario. Este último, junto con el *mesosalpinx* y el *mesovario distal* constituye la bolsa ovárica (*bursa ovárica*), que en la yegua presenta un grado moderado de desarrollo.

Como ocurre en la mayoría de los mamíferos, el oviducto de la yegua, no se encuentra en este borde libre (o distal), sino más bien en el propio espesor del mesosalpinx.

Del mismo modo que los ovarios, los oviductos están situados en vecindad a la extremidad caudal de los riñones. Las relaciones topográficas, aunque algo variables, ocurren principalmente con diferentes porciones del intestino. El ovario y oviducto derecho



contactan con la base del ciego; y la gónada y trompa uterina izquierda, con el colon descendente (colon menor) y partes del yeyuno (Barone, 2001).

#### 5.4.3. Morfometría general:

Existe un consenso general de que el oviducto de la yegua es uno de los más largos y tortuosos dentro de las especies domésticas. Presenta una longitud aproximada de 20 a 30 cm, pero la existencia del gran número de curvaturas reducen su recorrido a una decena de centímetros cuando se mantiene *in-situ* e inmerso en su mesosalpinx (Barone, 2001; Suzuki y Tsutsumi, 1979; Staples et al., 1982; Sack, 1991; Ginther, 1992; Schatten y Constantinescu, 2007; Dyce et al., 2010). El ámpula representa aproximadamente un tercio a la mitad de la longitud total del órgano, y como en otras especies de mamíferos, esta región posee el mayor calibre externo (~5 a 9 mm), e interno, con cierta variación entre los individuos. El orificio abdominal, ubicado en el centro del infundíbulo presenta un diámetro promedio de 6 mm (Bergfelt, 2009). Como ya fue mencionado, en el oviducto de la yegua, no se observa una demarcación externa muy precisa con la región del istmo, y este último posee junto con la unión útero-tubárica (UUT) el menor diámetro externo (~2 a 3 mm).

#### 5.4.4. Irrigación sanguínea, drenaje linfático e inervación:

Las **arterias** del oviducto forman en general tres grupos; el infundíbulo y parte adyacente del ámpula, reciben sangre a partir de la *rama tubárica (craneal)* de la tortuosa **arteria ovárica**, emitida por ésta justo antes de ingresar en el mesovario distal. Las otras ramas tubáricas (media y caudal), irrigan respectivamente la parte media del ámpula, istmo y extremidad adyacente al útero (unión útero-tubárica ó UUT). Proviene de una arcada arterial formada por la *rama uterina* de la arteria ovárica y la división correspondiente de la **arteria uterina**. Estos vasos tubáricos, forman en el mesosalpinx, arcadas anastomóticas, procedentes de múltiples arteriolas que se dividen en la capa sub-serosa. De esta manera, se forma un receso vascular sub-seroso que alimenta sucesivamente a otro receso vascular ubicado entre las capas musculares, para finalmente, en la mucosa formar un receso sub-epitelial (Barone, 2001).

Las **venas tubáricas** se constituyen a partir de recesos vasculares que duplican en número a los arteriales. Ellos son satélites de las arterias, drenando en la **vena uteroovárica** y finalmente en la vena cava caudal (Barone, 2001). En el caso particular de la yegua, y a diferencia de otras especies (ej. bovinos, cerdos), no hay una estrecha

aposición entre la vena uteroovárica y la arteria ovárica. Las implicancias funcionales de esta disposición vascular están ampliamente documentadas y determina un sistema a contracorriente para el pasaje de prostaglandinas, péptidos, gases inertes y principalmente hormonas esteroidales (Einer-Jensen, 1988; Einer-Jensen y Hunter, 2000). De todas maneras, este mecanismo no es del todo imposible en la yegua, debido a que una vena ovárica accesoria establece contacto con la arteria tubárica craneal y otras venas (rama ovárica de la vena ovárica) constituyendo una vía posible de transferencia (tal vez menos efectiva) a contracorriente (Ginther, 1992; Samper, 2010; Einer-Jensen y Hunter, 2005; Ginther, 2007; Nelis et al., 2015).

Los **vasos linfáticos** son extremadamente numerosos y complejos, particularmente en los pliegues de la mucosa y en la capa serosa del oviducto. Al igual que el ovario, los vasos drenan la linfa en los linfonódulos lumbo-aórticos (Staples et al., 1982; Barone, 2001).

Los **nervios** (autónomos) se mezclan en principio, con los del plexo ovárico, para luego alcanzar el mesosalpinx y distribuir sus ramas tubáricas. Las fibras son principalmente amielínicas y forman un plexo sub-seroso, desde el que se originan filetes profundos. La mayoría de estos filamentos nerviosos son motores para la musculatura oviductal y los vasos sanguíneos, encontrándose fibras de tipo colinérgicas, adrenérgicas y peptidérgicas (Wrobel y Kujat, 1993). Estudios en bovinos (Flieger et al., 1984; Welento et al., 1987a), ovinos (Flieger, 1978) y cerdos (Welento et al., 1984, 1987a; Boratynski et al., 1988; Flieger et al., 1988a,b; Czaja, 2000) han demostrado que el oviducto también recibe inervación aferente (sensitiva) desde los ganglios dorsales ubicados principalmente en el segmento toracolumbar de la médula espinal, con cierta variación topográfica de acuerdo a la especie.

## **5.5. ANATOMÍA MICROSCÓPICA**

La organización histológica del oviducto se halla ampliamente documentada en numerosas especies de mamíferos domésticos. Básicamente, este órgano tubular se compone de tres capas o túnicas concéntricas: la serosa (mesosalpinx) que incluye a la sub-serosa; la capa muscular (miosalpinx) y la mucosa (endosalpinx) ordenadas desde el exterior al interior del conducto.

### 5.5.1. Serosa y sub-serosa:

La túnica serosa está representada por las dos láminas peritoneales que constituyen el *mesosalpinx*, entre las cuales se aloja el conducto. Tapiza todas las caras del oviducto, formando un revestimiento completo. Ella se continúa con la capa mucosa a nivel del borde libre del infundíbulo fimbriado con ciertas diferencias en esta transición en algunas especies estudiadas. Por ejemplo, en los bovinos, existe una estrecha banda de células epiteliales multiciliadas (características de la mucosa) proyectándose hasta aproximadamente 10 mm desde el borde libre del infundíbulo. De manera similar, ocurre en la cerda, determinando que la transición entre ambas capas (serosa y mucosa) no sea exactamente precisa a nivel del borde libre infundibular (Yaniz et al., 2000; Yaniz et al., 2007).

Las células mesoteliales típicas de la serosa peritoneal, han sido ampliamente documentadas y caracterizadas en relación al tracto genital de la hembra, demostrando una intensa actividad biosintética en las diferentes fases del ciclo estral (Bird, 2004; Michailova y Usonoff, 2006). La sub-serosa contiene tejido conjuntivo rico en fibras colágenas, mezcladas con pequeñas fibras musculares lisas, que irradian desde la capa muscular del mesosalpinx. Esta capa, aloja a los principales vasos y nervios, y envía delicadas prolongaciones entre curvaturas vecinas del conducto, adosándolas entre sí, principalmente como se observa en la región del ámpula de la yegua.

### 5.5.2. Muscular:

De la misma manera que las demás porciones tubulares derivadas de los conductos paramesonéfricos, el oviducto presenta su túnica muscular (*miosalpinx*) dispuesta por una capa longitudinal externa y una circular interna. Los patrones de organización de ambas capas varían a lo largo de las regiones del conducto y entre las especies estudiadas (Beck y Boots, 1974). En todas las especies existe una disminución gradual del grosor de la túnica muscular desde la unión útero-tubárica hacia el infundíbulo.

Bignardi (1948) describe por primera vez la musculatura de la UUT, istmo y ámpula del oviducto de la yegua, constituida por las capas antes mencionadas. Posteriormente Schilling (1962) sugiere que, en los ungulados, existe una disposición espiralada del miosalpinx en la profundidad de los pliegues mucosos. Sisson (1973) observa las clásicas capas (longitudinal y circular) adicionando un esfínter muscular para la UUT.

Las descripciones actuales del miosalpinx han re-clasificado los patrones de disposición muscular, basándose en la observación 3D de especímenes. De esta manera

surgen numerosas publicaciones donde se caracteriza una *musculatura extrínseca* (derivada del mesosalpinx) y una *musculatura intrínseca* (propia del miosalpinx) con diversos tipos de distribución para las diferentes regiones del órgano y especies (Vizza et al., 1991; Muglia et al., 1991a,b; Muglia et al., 1992; Vizza et al., 1995; Muglia et al., 1996a,b; Muglia et al., 1997a,b; Muglia y Motta, 2001).

Germaná et al. 2002, describieron con detalle la arquitectura tridimensional del miosalpinx de la yegua a través de microscopía electrónica de barrido. En esta especie, las capas extrínseca e intrínseca están representadas por una única estructura muscular, que transita desde el mesosalpinx hasta la base de los pliegues de la mucosa. La organización es principalmente plexiforme, donde fascículos musculares de longitudes y direcciones variables, cruzan diferentes planos de células musculares. En relación a esta nueva clasificación, la UUT de la yegua es un esfínter donde la musculatura extrínseca e intrínseca se unifica en forma de plexo. Del mismo modo se organiza el músculo liso del istmo y el ámpula (Muglia y Motta, 2001).

El miosalpinx recibe invasión de ambas porciones del sistema nervioso autónomo (SNA): simpático y parasimpático. Como fue mencionado con anterioridad fueron aisladas fibras adrenérgicas, colinérgicas y peptidérgicas en el oviducto bovino (Wrobel y Kujat, 1993).

La invasión adrenérgica involucra fibras cortas y largas. Las primeras, emanan de ganglios ubicados a proximal o en el órgano efector, y se distribuyen en la musculatura no vascular; mientras que las fibras largas, se ubican a mayor distancia (ganglios prevertebrales) distribuyéndose en la musculatura vascular y no vascular. Los receptores  $\alpha$  adrenérgicos son potenciados por los estrógenos, mientras que los  $\beta$  adrenérgicos por progesterona. La densa invasión adrenérgica del istmo le permitiría funcionar como un esfínter fisiológico regulando el movimiento de las gametas y el embrión. En términos de frecuencia y amplitud, las contracciones experimentan *-in vitro-* cambios cíclicos (Rodríguez-Martínez et al., 1982a) y alcanzan un pico durante el estro y próximo al momento de la ovulación en el oviducto de la cerda (Seckinger, 1923; Wislocki y Guttmacher, 1924) y la mujer (Wanggren et al., 2006; Wanggren et al., 2008).

Experimentos *in vivo* han demostrado diferentes patrones de motilidad en el istmo de las cerdas, presentando ondas regulares en el estro e irregulares peri y post-ovulatorias, atribuidos a los niveles de estradiol y progesterona cíclicas respectivamente (Rodríguez-Martínez et al., 1982b; Rodríguez-Martínez et al., 1984; Stanchev et al., 1985; Pettersson, 1991; Mwanza et al., 2000).

La inervación noradrenérgica ha sido identificada en diferentes especies como en la rata (Brundin et al., 1969; Anderson et al., 1993); perro (Owman y Sjoberg, 1972); conejo (Chernaeva y Milenov, 1978; Kannisto et al., 1986); bovino (Czaja et al., 1993), cerdos (Majewski et al., 1995; Czaja et al., 1996; Czaja et al., 2001a,b). Las catecolaminas ejercen su efecto fisiológico modulando las contracciones del oviducto (Ohkawa, 1982; Sorger et al., 1983) así como el control neurogénico de los vasos sanguíneos (Appenzeller et al., 1984; Zochodne y Low, 1990).

La predominante inervación adrenérgica de los vasos sanguíneos posee un efecto tónico vasoconstrictor, influenciando de este modo la producción del fluido y el micro ambiente oviductal. La inervación colinérgica del oviducto es escasa, aunque la acetilcolina tiene un efecto vasodilatador, posiblemente actuando sobre receptores endoteliales, provocando liberación de óxido nítrico, el cual relaja las arterias oviductales (Leese et al., 2001). La amplitud, tono y frecuencia de las ondas de contracción son reguladas por diferentes hormonas y factores, como el óxido nítrico y las endotelinas (Priyadarsana et al., 2004).

La coordinación de las diferentes fases de contracción del miosalpinx parece estar bajo el control de un tipo de células marcapaso especializadas (Interstitial Cells of Cajal) distribuidas entre las células musculares del miosalpinx (Dixon et al., 2009).

### 5.5.3. Mucosa:

La estructura histológica de la túnica mucosa (endosalpinx) se halla ampliamente reportada en la bibliografía. Esta capa, ricamente vascularizada e inervada, se caracteriza por presentar pliegues que se proyectan hacia el lumen, cuyo número, altura, complejidad y organización tridimensional, varía a lo largo del conducto y las diferentes especies estudiadas. Estos pliegues se clasifican según las características mencionadas en, primarios, secundarios y terciarios (Lombard et al., 1950; Trautman y Fiebiger, 1952; Hafez y Blandau, 1969; Johnson y Foley, 1974; Mejia et al., 1984; Hunter, 1988; Yaniz et al., 2000; Barone, 2001; Yaniz et al., 2006; Yaniz et al., 2013). Esta túnica, se compone de una lámina propia (tejido conectivo laxo), sobre la cual se dispone el epitelio oviductal; y que en conjunto, constituyen los pliegues tubáricos (*Plicae tubaricae*). La lámina propia posee una vasta cantidad de capilares sanguíneos y linfáticos, que en gran medida son los responsables de los cambios de grosor de los pliegues, en respuesta a las variaciones cíclicas de los esteroides ováricos. Está ampliamente aceptado que los pliegues son más pronunciados en el infundíbulo y el ámpula, donde muestran extrema complejidad en su

organización y numerosas ramificaciones, para luego, gradualmente hacerse más simples, de escasa altura y menor número en dirección al istmo y su unión uterina.

Las características morfo-histológicas y algunos registros morfométricos obtenidos de la mucosa oviductal de la yegua serán descritos con detalle en el apartado correspondiente a los “Resultados”. De igual manera, a continuación se describirán las características más relevantes del endosalpinx de los mamíferos domésticos de mayor importancia. Numerosas publicaciones describen la morfología de la mucosa oviductal, basadas en observaciones directas o con microscopía óptica de secciones histológicas.

Han sido publicadas varias revisiones detalladas del oviducto de las vacas (Hafez y Blandau, 1969; Hafez y Kanakawa, 1973; Johnson y Foley, 1974; Hunter, 1977a; Nayak y Ellington, 1977; Hunter, 1988; Hunter, 1991; Abe y Oikawa, 1993b), cabras (Abe et al., 1993c), cerdas (Yaniz et al., 2006), ovejas (Nayak et al., 1976), cerdas Meishan (Abe y Oikawa, 1992), monos (Odor et al., 1980) y perras (Steinhauer et al., 2004).

Los reportes más recientes y en algunas especies mamíferas, describen de forma tridimensional las características de la mucosa a partir de observaciones con microscopía electrónica de barrido (MEB), aportando detalles morfológicos relevantes, más concluyentes y relacionados a variados aspectos funcionales de la compleja organización en cada región del órgano.

La organización de la mucosa de cada una de las regiones del oviducto presenta características particulares. En el **infundíbulo** de la vaca (Lombard et al., 1950; Yaniz et al., 2000), oveja (Lewis y Berardinelli, 2001; Yaniz et al., 2013); y cerda (Yaniz et al., 2006) se observa un complejo patrón de foliación caracterizado por la formación de cordones mucosos que se fusionan formando pliegues longitudinales altos, ondulados y ramificados, asemejando estructuras foliares. A partir de las paredes laterales de los pliegues primarios, se originan pliegues secundarios, orientados de manera oblicua y transversal, creando un sistema de bolsillos (*cul-de-sacs*) en las áreas basales, cuyas aberturas se dirigen en sentido al ovario. En la base de los pliegues primarios se observan numerosos y pequeños surcos determinando una apariencia arrugada. Desde los abundantes pliegues secundarios, se desprenden con cierta frecuencia pliegues terciarios.

La mucosa del **ámpula**, se organiza de manera similar al patrón observado en el infundíbulo. En el orificio abdominal, convergen los pliegues ondulados que recorren el infundíbulo para formar de 4 a 10 pliegues primarios altos, alternados con otros de menor altura. En la parte media del ámpula, numerosos pliegues primarios longitudinales, se ramifican sucesivamente en pliegues secundarios de mayor grosor, que se conectan entre sí

de manera perpendicular u oblicua. Los pliegues secundarios se extienden lateralmente desde los primarios, formando bolsillos ovales en la región basal, similares a los observados en el infundíbulo. A partir de estos últimos, surgen pliegues terciarios de menor altura y complejidad (Yaniz et al., 2000; Yaniz et al., 2006; Yaniz et al., 2013).

Hacia el límite con la región del istmo (UAI) la ramificación y dimensiones de todas las categorías de pliegues disminuye paulatinamente. La compleja organización de la mucosa del ámpula ocupa casi por completo el lumen del órgano, cuya amplitud depende del grosor de los pliegues epiteliales, condicionado a su vez, por la congestión vascular y el edema intersticial de la lámina propia subyacente, en concordancia con la fase folicular y los estrógenos circulantes (Hunter et al., 1983).

La mayoría de los reportes consideran a la **unión ámpula-istmo (UAI)** como una región algo diferente de las adyacentes, principalmente desde un enfoque macroanatómico, aunque no funcionalmente distinta al ámpula (Hunter, 1977a; Yaniz et al., 2000; Hunter, 2005). Se describe a este segmento, como una zona de transición entre el ámpula y el istmo, donde ambas regiones experimentan ciertos cambios macroscópicos externos y además transicionales en la conformación del endosalpinx (Abe, 1996; Yaniz et al., 2006; Desantis et al., 2010).

La mucosa de esta región en los bovinos, ovinos y cerdos, presenta pliegues primarios longitudinales de moderado tamaño, interconectados con ramificaciones laterales relativamente cortas y con bifurcaciones perpendiculares de pliegues secundarios. Los espacios entre pliegues, están ocupados por surcos, bolsillos y criptas irregulares, sin un patrón de orientación definido.

La mucosa del **istmo** se presenta escasamente plegada, donde en las vacas y ovejas se observan alrededor de 4 a 6 pliegues primarios, regularmente distribuidos, de baja altura, anchos, rectos o ligeramente tortuosos (Yaniz et al., 2000; Yaniz et al., 2013). En las cerdas presenta aproximadamente 5 a 8 pliegues primarios con las mismas características mencionadas (Yaniz et al., 2006). En estas especies, la divergencia y convergencia de los pliegues es menos frecuente que en las partes craneales del oviducto. Los pliegues secundarios se orientan oblicuamente en dirección hacia la unión útero-tubárica (Wrobel et al., 1993), y entre ellos se forman bolsillos estrechos, en cuya base se ubican criptas epiteliales pequeñas y apretadas.

La **unión útero-tubárica (UUT)** ha sido descripta desde un punto de vista macroscópico en el apartado "*Regionalización*". Esta región presenta marcadas diferencias anatómicas especie-específicas. Hook y Hafez, (1968), caracterizaron cuatro patrones

morfológicos distintos; Hafez y Black, (1969), determinaron cinco patrones, en tanto que Beck y Boots, (1974), demostraron diez clases morfológicas básicas de organización de esta unión del oviducto y el útero. Wrobel et al., (1993), describen detalladamente la túnica mucosa y la superficie epitelial de esta región del oviducto bovino. En esta especie la UUT presenta un lumen en forma de “U”, con escasos pliegues primarios bajos y ramificaciones secundarias interconectadas, creando bolsillos epiteliales estrechos y ovalados, orientados hacia el útero. En la parte caudal los pliegues se hacen más planos y entre ellos aparecen criptas y las primeras glándulas endometriales (Yaniz et al., 2000). En la cerda, además de las criptas (Brandt et al., 2006), la presencia de “procesos polipoides” en la mucosa y en la terminación de los pliegues, es otra característica morfológica de esta porción caudal de la UUT, principalmente evidente durante el estro (Fléchon y Hunter, 1981; Yaniz et al., 2006).

La información sobre esta zona de transición entre el oviducto y útero (UUT) en la yegua es muy limitada en varios aspectos, principalmente en la organización de la mucosa. No hay reportes sobre la caracterización dentro de alguno de los patrones descritos para otras especies. Suzuki y Tsutsumi (1979) destacan escasamente la presencia de criptas epiteliales en la porción intramural (UUT) del oviducto de la yegua. Liu y Scott (1995) y Scott (2000) describen las asociaciones entre los espermatozoides equinos y las células epiteliales en esta región del oviducto equino en la profundidad de sus pliegues y en las criptas epiteliales.

El **epitelio** es de tipo columnar simple y consiste en dos clases de células; ciliadas y secretoras no ciliadas (Dellmann, 1994; Banks, 1996; Bacha y Bacha, 2012). Los primeros reportes distinguían dentro del grupo de células no ciliadas, a las células secretorias, las basales o indiferenciadas y otras células de aspecto alargado (*peg cells*) (Johnson y Foley, 1974). Las células ciliadas intervienen principalmente en el transporte de las gametas y el embrión (Chang, 1966; Odor y Blandau, 1973; Teilmann et al., 2006, Kölle et al., 2009); en tanto que las células secretoras, sintetizan diferentes productos que se combinan con el trasudado derivado del plasma sanguíneo para formar el fluido oviductal (Oliphant et al., 1986; Willis et al., 1994; Leese et al., 2001). Su volumen y composición fluctúan en relación al dominio hormonal que caracteriza a cada fase del ciclo estral, y en concordancia a las variaciones cuantitativas, morfométricas, ultraestructurales, histoquímicas y bioquímicas que experimentan las células epiteliales (Abe, 1996; Murray, 1996; Nayak y Ellington, 1997; Steinhauer et al., 2004; Aguilar y Reyley, 2005; Abe y



Hoshi, 2007). De todas maneras, gran parte del significado biológico de las mencionadas variaciones celulares en las diferentes regiones del órgano todavía no se comprenden de manera muy detallada. Del mismo modo, la presencia de las gametas y posteriormente del embrión, provocan la síntesis *de novo* de diversos componentes proteicos que constituyen el fluido oviductal.

En el oviducto bovino (Abe y Oikawa, 1993b); de la cabra (Abe et al., 1993c), y hámster dorado (Abe y Oikawa, 1990a) no hay una regularidad discernible en la distribución de las células epiteliales, pero las células ciliadas son más abundantes en las regiones craneales (infundíbulo y ámpula), mientras que las secretorias predominan en el istmo.

### 5.6. Variaciones cíclicas:

Como se ha mencionado, existen diversas variaciones cíclicas en las células del epitelio oviductal a lo largo del ciclo estral, en respuesta a los esteroides ováricos. En la vaca (Wrobel et al., 1993); la cerda (Abe y Oikawa, 1992) y la perra (Steinhauer et al., 2004), durante la fase folicular se observa un claro predominio ciliar en el infundíbulo y ámpula; mientras que en la fase luteal (diestro), las células secretorias representan la mayor proporción de la población celular. Es precisamente en estas zonas craneales del oviducto, donde los cambios son más marcados, en comparación con las escasas variaciones observadas en el istmo y UUT. En el oviducto de los primates se observan cambios cíclicos similares, con formación de gran cantidad de cilias durante la fase folicular; y subsecuente deciliación y atrofia en la fase luteal del ciclo menstrual (Brenner, 1969). Del mismo modo, en la yegua, las variaciones de la superficie epitelial se manifiestan principalmente en la región de las fimbrias y ámpula, siendo las células ciliadas la población dominante durante la fase estrogénica folicular (Desantis et al., 2011; Aguilar et al., 2012). En las especies de ciclos estrales largos (hámster, ratas) no se observan de manera manifiesta estas variaciones cíclicas en la proporción de células ciliadas - secretorias a lo largo del ciclo estral (Abe, 1994).

Adicionalmente, se modifica la altura de las células epiteliales, determinando ciclos de hipertrofia y atrofia en las células ciliadas, bajo la influencia de los estrógenos y progesterona respectivamente. Este fenómeno se observa en el epitelio oviductal de las perras (Sawyer et al., 1984; England et al., 2013); camellas (Skidmore et al., 2011; Accogli et al., 2014); gatas (West et al., 1976); vacas, cabras y cerdas (Abe, 1996). Nuevamente,

estas variaciones celulares se presentan predominantemente en las fimbrias y región del ampulla, donde el epitelio en ambas regiones refleja la función primordial de las cilias en la captación, transporte del complejo ovocito-cúmulus (COC) recién ovulado y del fluido intraluminal (Odor y Blandau, 1973).

También han sido demostradas variaciones regionales en la ultraestructura en las células secretorias del oviducto en diversas especies de mamíferos tales como, la cabra (Abe et al., 1999); cerdas (Abe y Hoshi, 2007); mujeres (Verhage et al., 1979); ratones (Nilsson y Reinius, 1969; Kapur y Johnson, 1988); hámster (Abe y Oikawa, 1991b); conejos (Jansen y Bajpai, 1982); bovinos (Eriksen et al., 1994); ratas (Abe, 1994) y marsupiales (Odor y Augustine, 1995). Desantis et al., (2011), describen este aspecto ultraestructural del epitelio oviductal en la yegua, demostrando y caracterizando diversos tipos de gránulos secretorios en las células no ciliadas del ampulla y el istmo, durante la fase folicular del ciclo estral.

## **5.7. FISIOLÓGÍA DEL OVIDUCTO**

### **5.7.1. Motricidad oviductal y su implicancia en el transporte de los gametos**

Numerosos reportes han destacado la importancia de la contracción muscular del oviducto, (junto con el movimiento ciliar) en el transporte de los espermatozoides, ovocito y el embrión en desarrollo, durante su estadía transitoria en este órgano (Croxatto 2002; Hunter, 2011). Como ya fue mencionado en apartados anteriores (Anatomía Macroscópica: capa muscular) los patrones de contracción muscular están bajo control hormonal, siendo los esteroides ováricos los que ocupan un lugar preponderante. La mayor actividad motriz ocurre durante la fase folicular, bajo efecto de los estrógenos; mientras que durante la fase luteal y dominio progéstacional, se observa un efecto relajante en el miosalpinx (Chang, 1966; Hunter, 1988; Mahmood et al., 1998; Orihuela y Croxatto, 2001; Orihuela et al., 2003; Nakahari et al., 2011). Los estrógenos circulantes, además de aumentar la cantidad de receptores adrenérgicos, parecen incrementar el número de uniones intercelulares (*gap junctions*) entre los miocitos oviductales (Garfield et al., 1980). De igual manera, los receptores para oxitocina se incrementan como resultado de los citados esteroides (Gilbert et al., 1992). Los receptores para progesterona se expresan en ambas células epiteliales (ciliadas y secretoras); y en las células musculares del oviducto de las ratas (Ismail et al., 2002; Teilman et al., 2006), y en las vacas (Ulbrich et al., 2003; Valle et al., 2007; Kenngott et al., 2011; Saruhan et al., 2011, Saint-Dizier et al., 2012). Las prostaglandinas (PG), principalmente las del grupo F (PGF) y E (PGE), juegan un rol importante en la

contractibilidad, actividad ciliar, y secreciones del oviducto, con el subsecuente efecto sobre la fertilización, desarrollo embrionario temprano y el transporte de las gametas y el cigoto (Verdugo et al., 1980; Hermoso et al., 2001).

Se han detectado receptores para ambas prostaglandinas en las células epiteliales, pared muscular y vasos sanguíneos en las trompas uterinas del humano (Wangreen et al., 2006). Recientemente, en la yegua, fueron caracterizados receptores para PGE, los cuales se expresan en el epitelio, cilias, endotelio vascular, miosalpinx y serosa. A diferencia de los bovinos (Gabler et al., 2008), estos receptores, en el oviducto equino, parecen expresarse de manera independiente a las concentraciones de esteroides ováricos. Los efectos de la PGE y sus receptores (RPGE<sub>2</sub> y RPGE<sub>4</sub>), en la capa muscular del oviducto de la yegua, sugieren un efecto miorrelajante, principalmente en el istmo, facilitando el tránsito secundario del embrión, que durante algunos días produce PGE<sub>2</sub>, permitiendo de este modo relajar esta región del oviducto e ingresar en la cavidad uterina (Weber et al., 1991a,b; Weber et al., 1995; Ball et al., 2013).

### **5.7.2. Transporte de los espermatozoides hacia el oviducto:**

Dependiendo de las especies, los espermatozoides son depositados en diferentes porciones del tracto genital de la hembra. En un gran número de mamíferos, el semen es eyaculado en la parte craneal de la vagina, como ocurre en la vaca, oveja, cabra, gata, primates y conejos. Otros, como los porcinos y los equinos, son considerados inseminadores intra-uterinos, ya que la eyaculación se produce en el cuello uterino, o directamente en el cuerpo del útero respectivamente (Coy et al., 2012). En el caso particular del caballo, el semen ingresa directamente en la cavidad uterina, debido a que el eyaculado ocurre en forma de potentes impulsos (jets) que logran atravesar el dilatado cérvix de la yegua durante el celo, y como complemento, el proceso uretral del glande se adapta completamente al cérvix durante la erección del pene (Pickett, et al., 1989).

Independientemente de la especie y lugar de eyaculación, los espermatozoides, en su viaje hacia el encuentro con el(los) ovocito(s), intentan sobrepasar múltiples barreras anatómicas (cérvix, útero, UUT) y fisiológicas, que determinan el arribo y finalmente el ingreso al oviducto. En este camino al sitio de la fecundación, tienen lugar fascinantes fenómenos que involucran múltiples señales entre el espermatozoide y el ambiente del tracto reproductivo, el rol de las distintas regiones del aparato genital de la hembra en la migración de las células espermáticas, la implacable selección de los más aptos, y la participación del sistema inmunológico en ella, además de las señales de atracción

(quimiotaxis), cambios en la membrana espermática (capacitación) y en los patrones de motilidad espermática (hiperactivación), entre otros (Palma y Miceli, 2000; Rodríguez-Martínez, 2007).

Como en numerosas especies, en el equino, seguido al depósito intrauterino de semen, por monta natural o inseminación artificial (IA), los espermatozoides son rápidamente transportados al oviducto, donde se almacenan formando un **reservorio espermático (RE)**, y culminan los procesos mediante los cuales, por diversos cambios bioquímicos, adquieren el potencial para poder interactuar con las envolturas del ovocito, penetrarlo y finalmente fusionar su núcleo con el oolema ovocitario en la unión ámpula-istmo del oviducto (Suárez, 2007).

El transporte y migración espermática, ocurre como consecuencia de un trabajo combinado y orquestado, entre la contracción del miometrio (Katila et al., 2000), motilidad espermática y la actividad ciliar en los diferentes tramos del tracto genital de la yegua (Bader y Krause, 1980; Scott et al., 1994). Comprende una sucesión de fases: (a) una rápida, de transporte trans-uterino, inmediatamente posterior al depósito de semen; (b) la colonización de los RE, presuntamente en las partes caudales del oviducto; y (c) la liberación lenta y coordinada desde los RE hacia el sitio de la fertilización (UAI) durante el período peri-ovulatorio (Barrat y Cooke, 1991).

Una fracción muy pequeña, (menor al 1%) de los millones o billones de espermatozoides depositados (por monta o IA) son transportados exitosamente al lumen del oviducto. En un reporte en yeguas, mediante flushing (lavaje) intraoviductal, fueron recuperados solamente el 0,0006% – 0,0007% del total de espermatozoides inseminados (Rigby et al., 2000). La mayoría de los espermatozoides (70 – 99%), junto con el plasma seminal y las bacterias contaminantes inoculadas durante la cópula o IA, son eliminados efectivamente del útero; por flujo retrógrado a través del cérvix, y fagocitosis leucocitaria intrauterina, poco tiempo después de completarse el transporte al oviducto.

Las fases de contracción miometrial (para el transporte y eliminación espermática) ocurren inmediatamente al depósito del semen y durante algunas horas posteriores, debido a la liberación de oxitocina en respuesta a la dilatación vaginal (reflejo de Fergusson) y a la presencia de estrógenos y prostaglandinas en el plasma seminal respectivamente (Alexander et al., 1995; Troedsson et al., 1998; Madill et al., 2000).

De todas maneras el exceso de células espermáticas no es removido exclusivamente por este efecto mecánico del útero. El semen del equino, induce una reacción inflamatoria

fisiológica y transitoria intra-útero, activando una cascada de eventos que incluyen la activación del complemento (C3b) e influjo de polimorfonucleares (PMNs) en el lumen uterino, con la consiguiente fagocitosis de espermatozoides y bacterias; y liberación de  $\text{PGF}_2\alpha$  que estimula al miometrio (Kotilainen et al., 1994; Katila, 1995; Troedsson et al., 1995a; Troedsson et al., 1995b, Troedsson et al., 2002).

### 5.7.3. Los espermatozoides en el oviducto y la migración hacia el sitio de la fertilización:

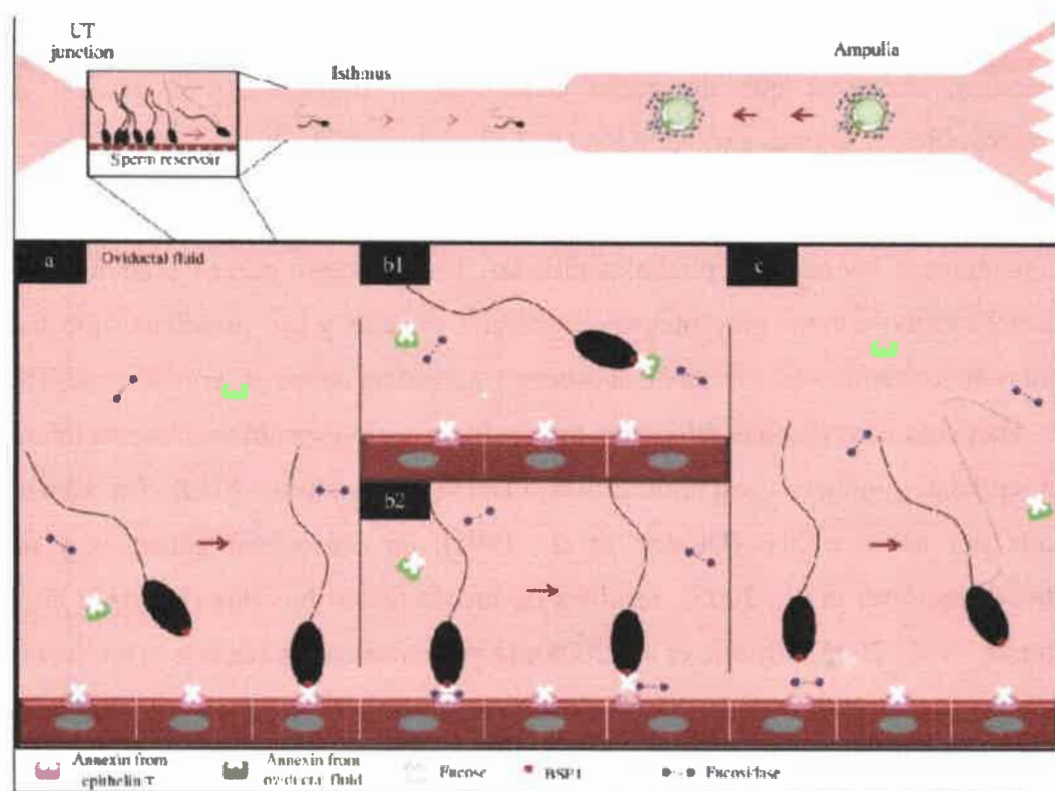
Los espermatozoides que lograron su ascenso y fueron transportados en la fase uterina inicial, colonizan rápidamente (en minutos a un par de horas) la UUT en la segunda fase del transporte espermático. Posteriormente, si logran atravesar esta barrera anatómo-fisiológica, se establecen en el segmento tubárico adyacente (istmo caudal) en un número muy reducido aunque significativo (de miles a  $1-2 \times 10^9$ ), comparado con la población original presente en la dosis inseminante o el eyaculado, y con cierta variación entre especies (Rodríguez-Martínez, 2007). Un estudio reciente, con ratones genéticamente modificados, demostró que un punto crítico en el transporte y migración de los espermatozoides es su paso a través de la UUT (Tokuhira et al., 2012).

Una vez alcanzada la región del istmo, los espermatozoides competentes se unen principalmente a las células epiteliales ciliadas. Este proceso, parece estar mediado por residuos de carbohidratos presentes en las células ciliadas y por proteínas (tipo lectinas) presentes en la membrana externa de la cabeza y acrosoma de los espermatozoides (Suárez, 2002). Han sido identificadas diferentes moléculas especie-específicas, en esta interacción célula epitelial oviductal –espermatozoide (Talevi y Gualtieri, 2010). En hámster, es mediada por ácido siálico (DeMott et al., 1995); en cerdos por galactosa y manosa (Ekhlasi-Hundrieser et al., 2005); residuos de fucosa en los bovinos (Ignotz et al., 2001, Gwathmey et al., 2003, Sostaric et al., 2008), D-galactosa en los equinos (Dobrinski et al., 1996a), y en las llamas, la N-acetilgalactosamina y la galactosa parecen inhibir esta unión ligando – receptor (Apichela et al., 2010). Estudios recientes en la yegua, utilizando modelos *in vitro* (con explantes oviductales) no lograron identificar a la molécula de galactosa como molécula clave en la interacción entre los espermatozoides y células epiteliales del oviducto (Leemans et al., 2016).

El reconocimiento de carbohidratos, también está implicado en la interacción espermatozoide y célula de Sertoli durante la espermatogénesis (Raychoudhury y Millette,

1997) y en la unión con la zona pelúcida durante la fertilización (Geng et al., 1997; Tulsiani et al., 1997).

En los espermatozoides, se identificaron diferentes proteínas capaces de interactuar con los residuos de carbohidratos de las células epiteliales. Denominadas colectivamente “espermadhesinas”, son variables entre especies de mamíferos domésticos estudiados. En los espermatozoides bovinos, las espermadhesinas (por ejemplo BSP1) han sido estudiadas ampliamente y utilizadas como modelo de interacción celular (**Fig. 3**). Este vínculo bioquímico, y otros que se describirán a continuación, tiene por finalidad la construcción de un reservorio espermático pre-ovulatorio, donde los espermatozoides se mantienen viables y potencialmente fértiles, liberándose de manera controlada hacia la UAI, y cumpliendo con diversas funciones, entre ellas colaborar con la prevención de la fertilización polispermica, completamente inviable en los mamíferos euterios (Hunter, 1996).



**Figura 3:**

Mecanismos propuestos para la unión y liberación espermática desde el oviducto en el modelo bovino. (a) La unión de los espermatozoides es mediada por proteínas tipo lectina como la BSP1, presente en la membrana plasmática de los espermatozoides, que reconocen los residuos de fucosa contenidos en la molécula de anexina unida a la membrana de la célula epitelial. (b) La unión de los espermatozoides al oviducto puede ser modulada mediante dos mecanismos diferentes que ejercen su acción al mismo momento. (b1) Las anexinas presentes en el fluido oviductal compiten por el sitio de unión para las BSP1 de los espermatozoides, y (b2) las fucosidasas enzimáticas presentes en el fluido oviductal, remueven los residuos de fucosa contenidos en las anexinas del epitelio oviductal. (c) Estos diferentes mecanismos y los cambios de motilidad espermática (hipermotilidad) permiten a los espermatozoides liberarse desde el reservorio espermático hacia la región de la fecundación. (Coy et al., 2012).

#### **5.7.4. Formación del Reservorio Espermático funcional en el oviducto:**

Este reservorio pre-ovulatorio de espermatozoides (RE), ha sido demostrado en diversas especies de laboratorio; reptiles; anfibios (Sever et al., 1996; Sever et al., 1999; Sever, 2002); peces (Pratt, 1993); aves (Birkhead y Moller, 1993) y numerosos mamíferos domésticos, como la oveja (Hunter y Nichol, 1983); vaca (Hunter et al., 1991; Lefebvre et al., 1995b; Suárez, 2002); cerda (Hunter, 1981; Suárez, 1991; Mburu et al., 1996; Suárez, 2002; Rodríguez-Martínez et al., 2005; Tummaruk y Tienthai, 2010; Wallgren et al., 2010); humanos, (Baillie et al., 1997) y gata (Chatdarong et al., 2004). Recientemente se ha postulado a las glándulas endometriales de la perra, como posible reservorio pre-tubárico de espermatozoides (Freeman y England, 2013), permitiendo reemplazar a las células espermáticas que son eliminadas del reservorio oviductal previamente establecido (Pacey et al., 2000; Kawakami et al., 2001; Rijsselaere et al., 2004).

La creación de este reservorio funcional, es el resultado de una serie de fenómenos delicadamente orquestados, donde intervienen y coexisten numerosos mecanismos: la permeabilidad del lumen del oviducto en la UUT, la secreción y retención espermática en mucus, el fluido oviductal, gradientes de temperatura, supresión de la motilidad flagelar, cambios en el flujo sanguíneo, interacciones ligando – receptor, contracción del miosalpinx, y edema de la lámina mucosa, que en mayor medida responden a los estrógenos circulantes durante el período peri-ovulatorio.

El constreñido lumen y la arquitectura laberíntica del endosalpinx de la UUT, representan una barrera física formidable para el progreso de los espermatozoides. Además del estrecho espacio luminal, la presencia de mucus, durante la fase estrogénica en el oviducto de los bovinos (Suárez, 1998); cerdos (Hunter, 1995; Rodríguez-Martínez, 2001); y conejos (Jansen y Bajpai, 1982), es otro obstáculo para el ascenso espermático. Esta sustancia viscosa y el reducido tamaño del istmo, aseguran un tránsito lento y mayor contacto de los espermatozoides (más competentes) con el epitelio oviductal (Suárez, 2002). Se ha sugerido que este material viscoso también colabora con la supresión de la motilidad espermática (Overstreet et al., 1980). Del mismo modo, las características viscoelásticas de los fluidos secretados en el tracto genital de la hembra, permiten un movimiento preferencial de los espermatozoides en relación estrecha a los surcos microscópicos de la superficie interna de aparato reproductor (Tung, et al., 2015).

Diferentes gradientes de temperatura han sido registrados dentro del lumen del oviducto de conejos, ovejas y cerdos; y estas variaciones son más pronunciadas durante el

estro y en el periodo peri-ovulatorio. Posiblemente, la influencia hormonal ovárica nuevamente debe ser considerada en esta fluctuación térmica. Diferencias de  $\sim 0.2\text{--}1.6^\circ\text{C}$ , se obtuvieron entre el istmo caudal y la región del ampulla de la cerda. Estas variaciones pueden ser el reflejo del incremento de la actividad vascular y linfática, generando edema de la mucosa; y junto a la contracción del miosálpinx y el microambiente químico apropiado en el istmo caudal, podrían contribuir a la permanencia de los espermatozoides creando el reservorio oviductal funcional (Hunter y Nichol, 1986).

En la hembra equina existen limitados reportes, la mayoría *in vitro* y con evidencia presuntiva, que expliquen en forma detallada la formación y localización anatómica en el tracto reproductor de la yegua donde se establecen los reservorios funcionales de espermatozoides (Boyle et al., 1987; Thomas et al., 1994a; Troedson et al., 1998; Scott et al., 1994; Scott et al., 2000; Fiala et al., 2007b; Fiala et al., 2008; Fiala et al., 2010).

#### 5.7.5. Funciones del Reservorio Espermático en el oviducto:

Desde el punto de fisiológico, al reservorio espermático se le atribuyen diversas funciones:

1) Colabora (junto con otros mecanismos ovocitarios), reduciendo la incidencia de fertilizaciones polispérmicas, permitiendo que solo una mínima cantidad de espermatozoides y en un momento determinado, alcancen al ovocito en la región de la UAI. El incremento de este tipo de fertilización inviable, ha resultado como consecuencia de inseminaciones quirúrgicas en el ampulla (Polge et al., 1970; Hunter, 1973); resecciones de parte del oviducto (istmo) creando un *by pass* en el reservorio espermático (Hunter y Leglise, 1971); o administrando micro-inyecciones de progesterona en la capa muscular (Day y Polge, 1968; Hunter, 1972).

2) Mantiene el potencial fertilizante de los espermatozoides hasta que el óvulo es expulsado del ovario e ingresa el oviducto. Por ejemplo, los espermatozoides bovinos conservan su capacidad fertilizante y la motilidad *in vitro* durante más tiempo, cuando son co-incubados con células epiteliales oviductales, comparado con otros tipos de epitelio, o con medio de cultivo sólo (Pollard et al., 1991; Chian y Sirard, 1994). Posiblemente, la viabilidad de los espermatozoides unidos al epitelio se prolonga evitando la reorganización de la membrana espermática (capacitación), el concomitante aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y una reacción acrosómica prematura (Dobrinski et al., 1996).



3) El estado fisiológico de las células espermáticas, específicamente los procesos de capacitación y motilidad hiper-activada (hipermotilidad), pueden ser regulados dentro del reservorio oviductal para garantizar que los espermatozoides se encuentren en el estado apropiado cuando la ovulación ocurre. Experimentos *in vitro*, demostraron que los espermatozoides con membranas y acrosoma intactos, y no capacitados; son los que logran unirse al epitelio oviductal, tanto en explantes de tejido oviductal como en cultivos en monocapas (Smith y Yanagimachi, 1991; Lefebvre et al., 1996; Suárez, 1998; Leemans et al., 2014).

#### **5.7.6. Transporte del ovocito en el oviducto:**

El ovocito, expulsado desde el folículo maduro (de DeGraaf) durante la ovulación junto con sus envolturas celulares (*cúmulus ooforus*) es desplazado activamente hacia el interior del orificio abdominal del oviducto. Esto ocurre principalmente como consecuencia de la acción conjunta y sincronizada, del rápido batido ciliar y las contracciones rítmicas del extremo fimbriado del oviducto. La actividad contráctil del músculo liso del mesoovario y mesosalpinx aporta un rol significativo y adicional en este transporte ovocitario. Las células del cúmulus y la matriz extracelular que acompañan al ovocito, son componentes claves para la adhesión inicial del complejo ovocito-cúmulus (COC) en la superficie ciliada de las fimbrias. Debido a la influencia combinada del batido ciliar en dirección ad-ovárica, y las potentes ondas de contracción del miosalpinx, el pasaje del COC hacia el sitio de fertilización en la UAI es relativamente rápido; de 9-15 minutos en los conejos y 30-45 minutos en los cerdos (Hunter, 1988).

En el momento que el COC alcanza región del ámpula, se une al epitelio oviductal durante variable cantidad de tiempo según las especies, y comienzan una serie de modificaciones moleculares en las envolturas y la propia superficie del ovocito (Hunter, 1994, Hunter, 2003; Coy et al., 2008; Coy y Avilés, 2010). En algunas especies (ovinos, bovinos), el ovocito rápidamente se despoja de la mayoría de las células del cúmulus, mientras que en los cerdos, primates y equinos, el ovocito se encuentra inmerso en una masa celular densa y pegajosa (Hunter, 1989).

---

# **CAPÍTULO VI**

# **RESULTADOS**

---

## 6. RESULTADOS

### 6.1. ORGANIZACIÓN DE LA MUCOSA OVIDUCTAL

---

#### 6.2. Características morfométricas y tridimensionales de la mucosa en las diferentes regiones del oviducto.

La totalidad de los moldes obtenidos a través de la técnica anatómica de repleción intraluminal, mostraron una impronta compleja que representó tridimensionalmente la organización de la mucosa del órgano. Además, se lograron demostrar con mayor detalle las complejas curvaturas y el trayecto tortuoso que adopta el lumen del oviducto en los diferentes segmentos que lo constituyen.

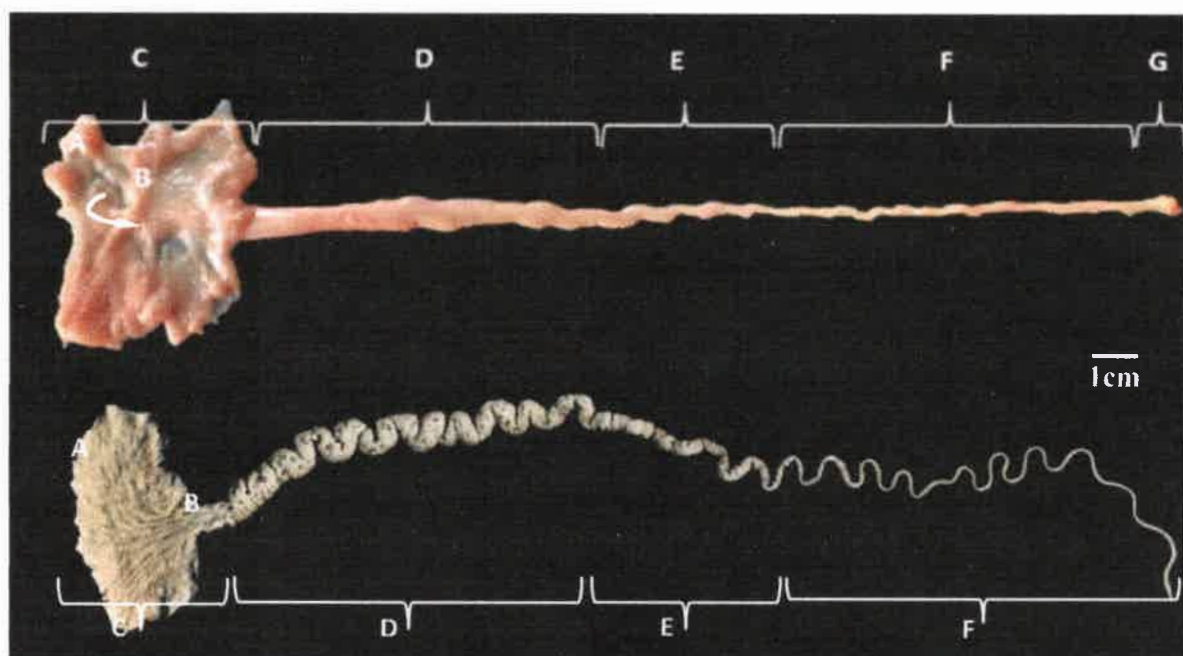
Es necesario tener presente, que el material utilizado (resina) para producir los moldes, copia o replica (de manera invertida) el diseño interno de la mucosa. En este sentido, los surcos sobre la superficie de los mismos, corresponden a las marcas o improntas creadas por los diferentes pliegues epiteliales del endosalpinx; y los pliegues observados sobre los moldes son réplicas de los surcos presentes en la mucosa, donde cada espacio es ocupado por la resina, generando estas formaciones tridimensionales. De igual forma, la presencia de saculaciones o fondos de saco, pequeñas cavidades y/o espacios, son ocupados por el material de repleción, y los posibles tabiques o trabéculas internas se ven reflejados en los moldes intraoviductales.

Todos los oviductos recuperados marcaron sobre la superficie de los moldes resultantes, diversidad de surcos y pliegues; siendo muy manifiesto el incremento en número, la creciente complejidad y las diferentes direcciones tridimensionales que adoptaron, desde la región del istmo, relativamente poco plegada y simple, hacia la zona del ampulla e infundíbulo, donde la mucosa se organizó de manera compleja y marcadamente plegada.

En la **Figura 15**, se muestra un oviducto equino disecado con sus diferentes regiones, liberado de sus mesos de soporte, y parcialmente desplegado. En correspondencia al mismo, se presenta un molde tridimensional de su lumen, posterior a la repleción intraluminal y a la corrosión en solución alcalina de todos los tejidos circundantes.

Como fue mencionado en el apartado “Materiales y Métodos”, a partir de secciones histológicas, la preparación de moldes intraluminales 3D, y microfotografías; se obtuvieron diferentes registros morfométricos de las principales regiones tubulares del órgano,

correspondientes al istmo, unión ámpula-istmo (UAI) y ámpula. Para la región del infundíbulo, solamente se observaron las características del endosalpinx sin determinar los registros morfométricos del mismo.



**Figura 15:**

Oviducto de yegua aislado del resto del aparato reproductor y desplegado parcialmente (*imagen superior*), y molde tridimensional correspondiente a su lumen (*imagen inferior*) mostrando las diferentes regiones anatómicas en cada uno de ellos.

A, fimbrias; B, orificio abdominal; C, región del infundíbulo; D, región del ámpula; E, unión ámpula-istmo (UAI); F, región del istmo; G, unión útero-tubárica (UUT) o papila oviductal.

*Nota: En el molde tridimensional, la papila no está representada, debido a que la misma se canaliza con una aguja, y a través de ella se procede a realizar la repleción intraluminal del oviducto para la obtención de los moldes.*

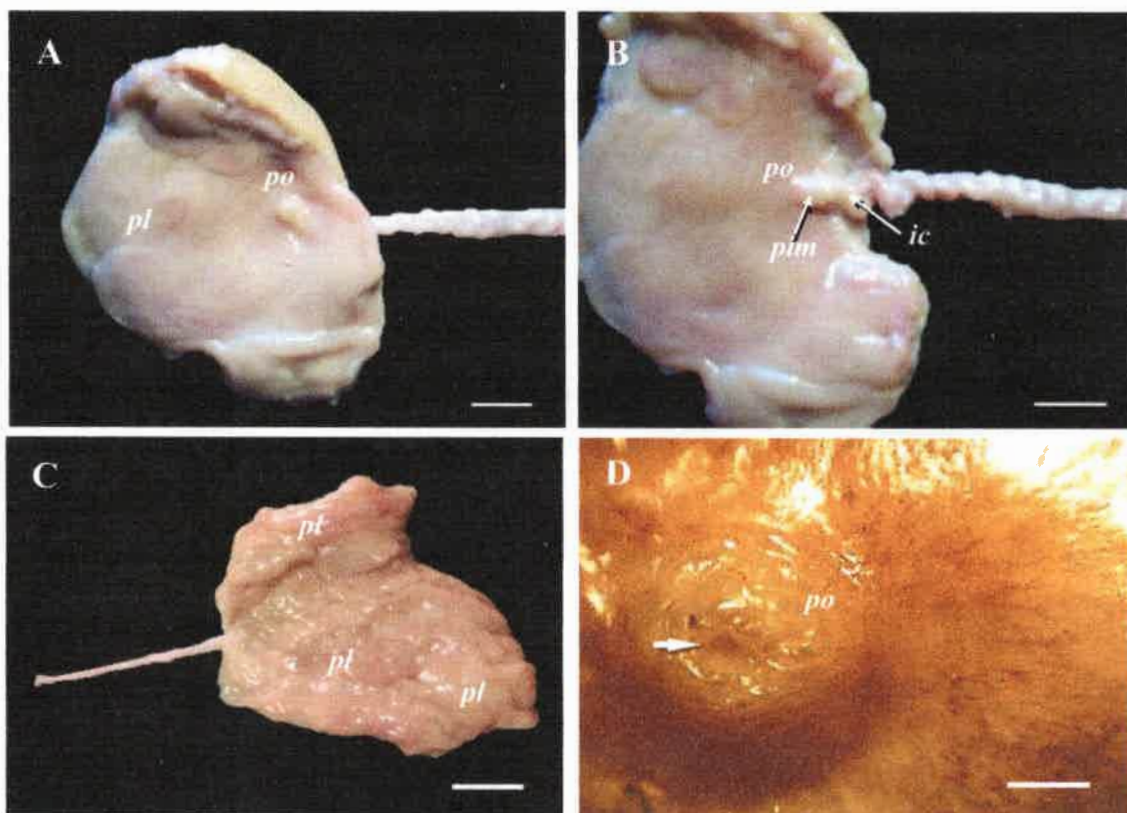
### 6.2.1. Región de la Unión Útero-Tubárica (UUT):

La transición útero-tubárica fue muy manifiesta, observándose un cambio abrupto en el diámetro externo (e interno) entre ambos órganos. El oviducto, en su parte inicial, presentó una *porción intraluminal* protruyendo en forma de “**papila**” hacia el interior del extremo craneal (punta) del cuerno uterino. Posteriormente, y dirigiéndose hacia craneal, se continuó con una *porción intramural* durante su recorrido en el espesor de la pared del útero (**Fig. 16**). Desde esta última porción, se originaron de manera insensible y sin demarcación precisa, las primeras curvaturas del istmo caudal. La protrusión del oviducto en forma de papila, fue un hallazgo (macro y microscópico) constante en todas las muestras disecadas, y en las diferentes etapas reproductivas evaluadas.

A partir de las microfotografías obtenidas de los cortes histológicos transversales se pudo observar un marcado predominio de la capa muscular (miosalpinx), en contraste al escaso desarrollo de la mucosa, cuyos pliegues epiteliales de baja altura y escasamente ramificados, superaron en pocas ocasiones la decena. A pesar de que no fue realizado un análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de las muestras de las diferentes etapas reproductivas, los valores hallados para el área ( $\sim 0.12\text{mm}^2$ ) y perímetro luminal ( $\sim 2.95\text{mm}$ ) fueron los parámetros morfométricos más pequeños, en comparación con las restantes regiones tubulares del oviducto.

En los cortes histológicos longitudinales de esta región, la transición entre el endometrio – endosalpinx fue gradual, hallándose numerosas glándulas uterinas invadiendo la periferia de la porción intraluminal (papila). Las mencionadas estructuras glandulares fueron muy evidentes durante la etapa de diestro del ciclo reproductivo, y en varias de ellas se pudo observar un aspecto tortuoso en el recorrido de su lumen. En la parte basal de varios pliegues se observaron criptas epiteliales ramificadas, simulando estructuras glandulares de tipo túbulo-alveolar (**Fig. 17**).

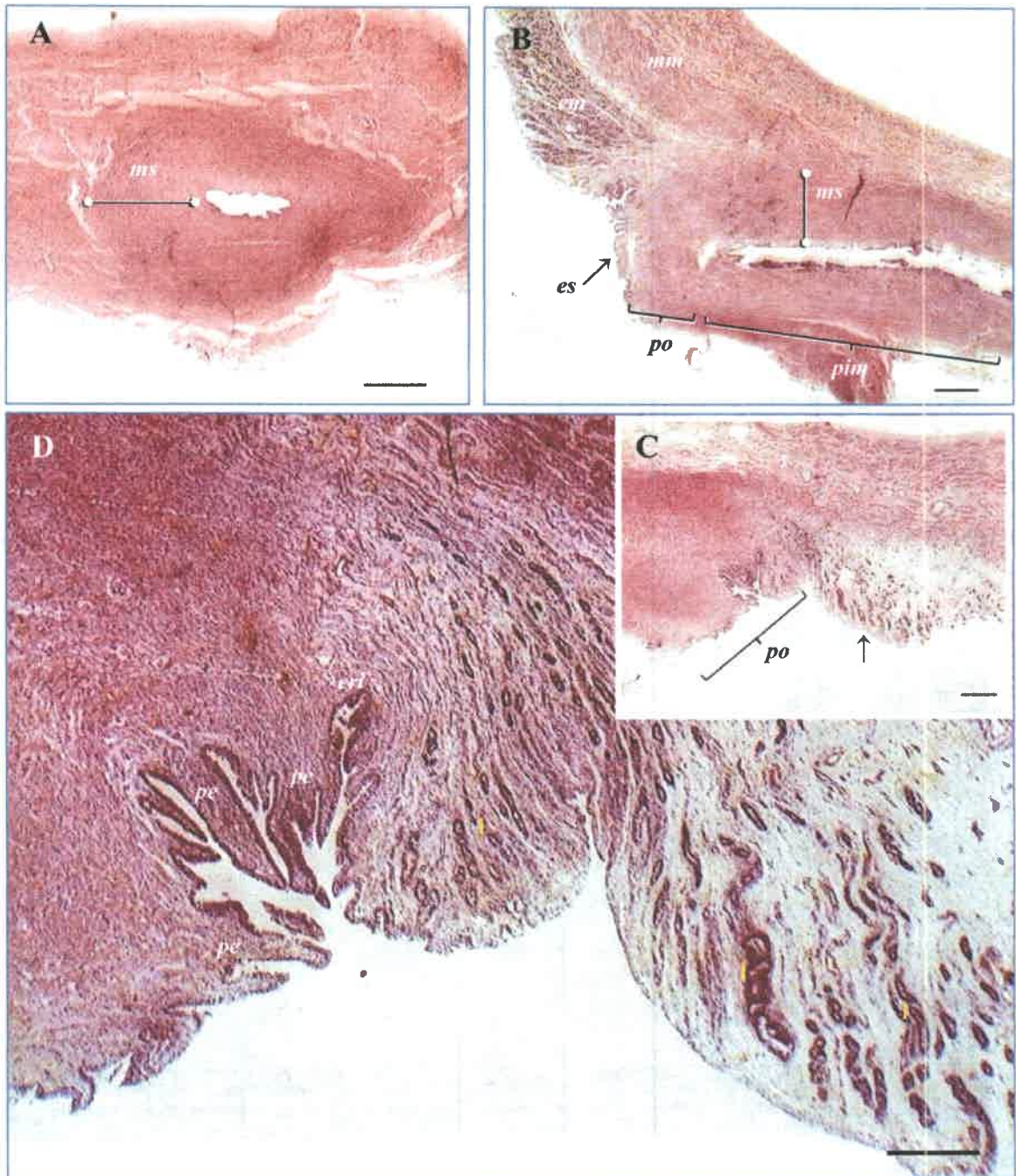
La porción intraluminal de la UUT, produjo sobre los moldes tridimensionales (a manera de impronta), un surco de aspecto anular, que circunscribió, en forma de corona, el orificio de entrada e inicio de la región caudal del istmo. La protrusión (papila), fue más evidente durante la fase de estro, del mismo modo que la prominencia de los pliegues endometriales del útero durante esta fase del ciclo estral. Los pliegues del endometrio, también dejaron sus improntas sobre la superficie de los moldes, formando pequeños surcos, que parecen confluir hacia el surco anular antes mencionado (**Fig. 18**).



**Figura 16:**

Extremos de cuernos uterinos abiertos longitudinalmente durante la etapa anovulatoria (A, B) y en estro (C), donde se expone la superficie endometrial y la unión útero-tubárica. En A, se observa la porción intraluminal del oviducto protruyendo en forma de papila dentro del cuerno uterino, y un surco anular tenue rodeando la misma.

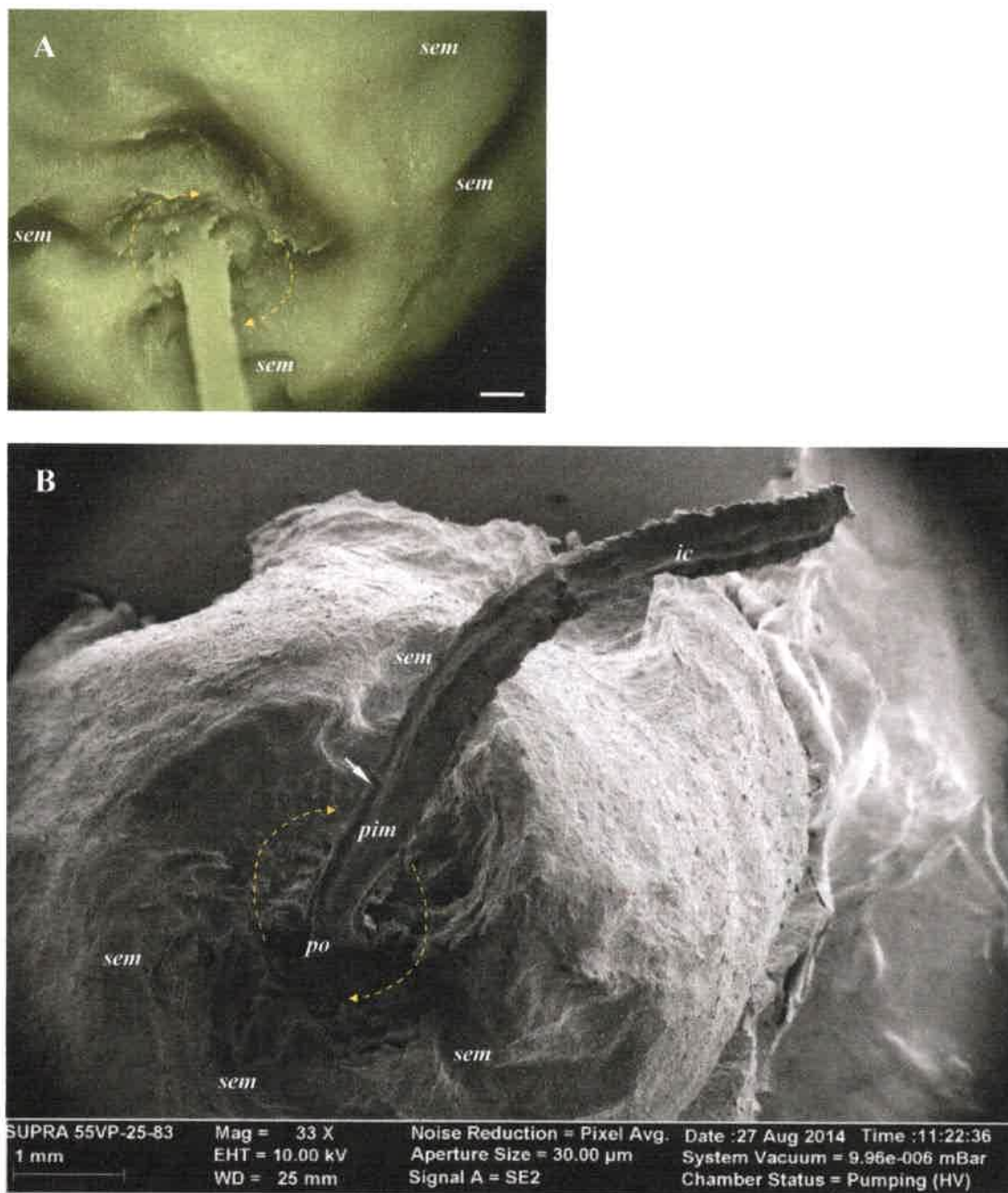
En B, fue disecada y aislada la porción intramural del oviducto, la cual se continúa hacia craneal, de manera insensible, con las primeras curvaturas de la región del istmo caudal. En ambas imágenes (A y B) la superficie endometrial se caracterizó por presentar pliegues endometriales de escaso desarrollo, aspecto típico durante esta fase del ciclo reproductivo. En C, los pliegues del endometrio fueron muy manifiestos, presentándose engrosados, edematosos y de aspecto cerebroide. D, imagen magnificada de la porción intraluminal de la UUT, donde se ha dilatado artificialmente el *ostium uterino* (flecha). *po*, papila oviductal (porción intraluminal); *pl*, pliegues endometriales; *pim*, porción intramural de la unión útero-tubárica; *ic*, región del istmo caudal. Barra de escala en A, B, y C indica 1cm. En D indica 1mm.



**Figura 17:**

Corte transversal (A) y longitudinal (B, C y D) de la UUT durante la etapa de diestro.

En A se observa el gran desarrollo de la capa muscular (miosalpinx, *ms*), y escasos pliegues epiteliales de baja altura. En B, se muestra la porción intramural (*pim*) e intraluminal (papila, *po*) de la UUT, y las distintas capas de la pared uterina adyacente. En C y D (magnificación de C) se observa la superficie endometrial (**flecha**) diseminada de glándulas, muchas de ellas de aspecto tortuoso (1). El endometrio glandular parece invadir la papila oviductal, cuyo ingreso está parcialmente ocupado por pliegues epiteliales (*pe*) y algunos forman en su parte basal una cripta epitelial (*cri*). *mm*, miometrio; *em*, endometrio; *ms*, miosalpinx; *es*, endosalpinx. Barra de escala en A, B, C y D, indica 500 $\mu$ m.



**Figura 18:**

Moldes 3D del lumen de la UUT y extremo craneal del útero durante la etapa anovulatoria. En **A** (estereomicroscopía) y **B**, (MEB) se aprecian algunos surcos débilmente marcados por pliegues del endometrio. Se observa un surco irregularmente anular (*flechas punteada*) formado en torno de la porción intraluminal (papila, *po*) de la UUT. Algunos surcos tenues, correspondientes a pliegues endometriales (*sem*) parecen confluir sobre éste desde distintas direcciones. En **B** se observa un surco longitudinal (*flecha*) recorriendo las diferentes partes de la UUT, transitando por la porción intramural (*pim*) y continuando hacia craneal, para alcanzar la región del istmo caudal (*ic*). Barra de escala en A, indica 500μm; en B indica 1mm.



### 6.2.2. Región del Istmo:

En todas las secciones histológicas de los segmentos centrales de esta región, se halló una estrecha área luminal (*al*), que no superó los  $0,5\text{mm}^2$  (**Tabla 3**), sin observarse diferencias significativas en los valores hallados entre las etapas reproductivas evaluadas ( $p > 0,05$ ). En las microfotografías, se presentaron, en promedio, de ocho a diez pliegues (8-10) primarios de base amplia y ápices redondeados, separados por surcos poco profundos y organizados en forma radial (**Fig. 21A**). En las partes basales de los pliegues, se pudieron observar pequeños fondos de sacos (*cul-de-sacs*) o criptas epiteliales (**Fig. 21A**). El escaso número de pliegues primarios, sin ramificar y la baja altura de los mismos, determinaron en los cortes histológicos, un perímetro epitelial (*pe*) de pocos milímetros. En la **Tabla 4** se detallan de manera resumida, las diferentes categorías y alturas de los pliegues epiteliales hallados en las distintas regiones tubulares del oviducto.

Se pudo observar, que las secciones histológicas con mayor área ocupada por los pliegues epiteliales (*ap*), presentaron en gran medida, un incremento lineal en el perímetro (**Fig. 20**). Sin embargo, en este segmento fue hallado el menor perímetro epitelial (*pe*), en comparación con las otras regiones tubulares, aunque sin apreciarse diferencias significativas entre las etapas reproductivas (**Tabla General A**).

Al igual que en las secciones histológicas, los moldes tridimensionales mostraron que el istmo caudal y la UUT (papila oviductal, datos no mostrados) presentaron el menor diámetro luminal, sin diferencias significativas entre las fases del ciclo estral ( $p > 0,05$ , **Tabla 5, Fig. 19**). En las superficies de moldes, tres o cuatro surcos (correspondientes a pliegues primarios), se extendieron en forma de canales longitudinales continuos, reduciendo su profundidad a medida que se aproximaron hacia la UAI (**Fig. 21B, C y D**). En todas las etapas del ciclo estral, se hallaron múltiples proyecciones de baja altura, dispuestas en hileras y separadas por surcos secundarios más pequeños e interconectados, algunos en posición oblicua y dirigidos hacia UUT (**Fig. 21D**). Estas formaciones pueden representar los moldes o improntas de las criptas epiteliales en la mucosa ístmica, conformando bolsillos o *cul-de-sacs*.

El lumen del istmo caudal, en proximidad a la UTT, se dispuso de manera más rectilínea, y en el resto del segmento, se pudieron observar curvas sigmoideas, cada vez más cerradas y en forma de "U" o "V" en dirección hacia la UAI (**Figs. 15 y 21C**). Las múltiples curvas halladas, determinaron que la longitud de esta región (istmo) sea una de

los más extensas (junto con el ámpula), sin observarse diferencias significativas entre las etapas evaluadas ( $p > 0,05$ ; **Tabla General B, Fig. 33**).

**Tabla 3:**

Área del lumen del istmo expresada en milímetros cuadrados ( $\text{mm}^2$ ), medida a partir de los cortes histológicos. Media ( $\pm$  D.E).

Etapa	Área	Mín	Máx
Anovulatoria	0,21 (0,11)	0,11	0,38
Diestro	0,24 (0,19)	0,08	0,65
Estro	0,25 (0,09)	0,10	0,44
Posovulatoria	0,21(0,16)	0,05	0,45

**Tabla 4:**

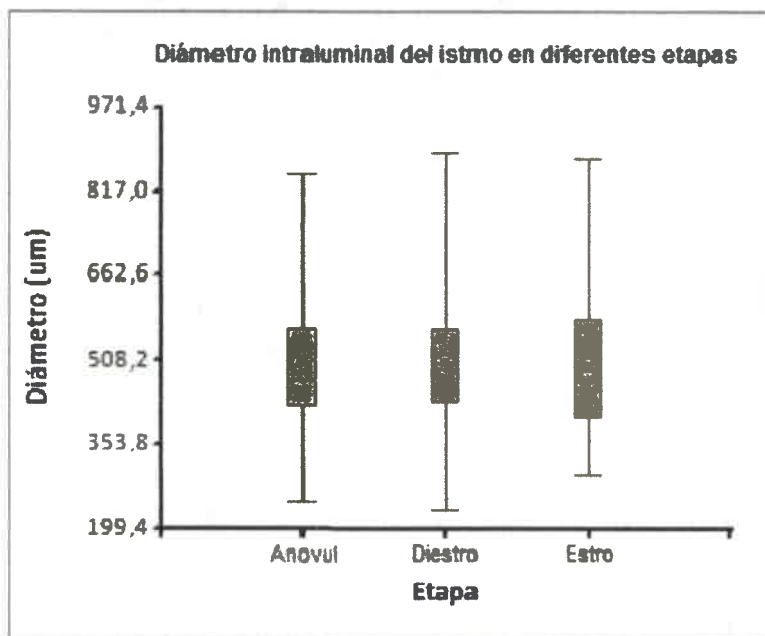
Altura (media) de los diferentes pliegues epiteliales hallados en la región del istmo, UAI y ámpula, expresado en micras ( $\mu\text{m}$ ), medidos a partir de cortes histológicos.

Región	Istmo				Unión Ámpula-Istmo				Ámpula			
	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°
<b>Categoría</b>	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°
<b>Mediciones</b>	80	-	-	-	20	20	20	10	40	40	40	30
<b>Media</b>	193,3	-	-	-	594,4	320,8	165,6	160,3	702,1	363,1	209,8	128,5
<b>D.E</b>	76,8	-	-	-	260,1	132,5	60,8	43,9	209,8	144,9	59,1	31,6
<b>Mín</b>	53,5	-	-	-	256,7	142,5	83,3	87,4	455,8	160,7	123,3	76,6
<b>Máx</b>	418,6	-	-	-	1113,9	721,1	348,3	251,0	1122,1	760,3	331,6	179,3

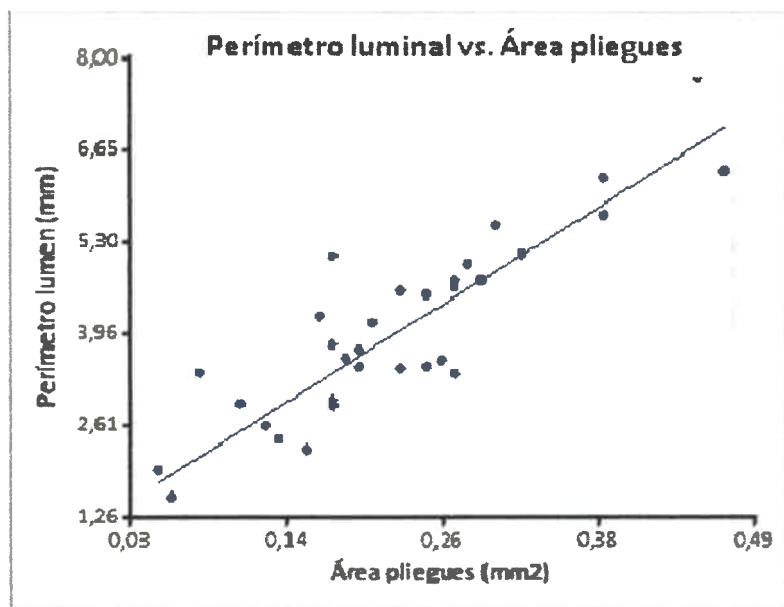
**Tabla 5:**

Diámetro luminal del istmo expresado en micras ( $\mu\text{m}$ ) en diferentes etapas reproductivas, medido a partir de moldes 3D. Media ( $\pm$  D.E).

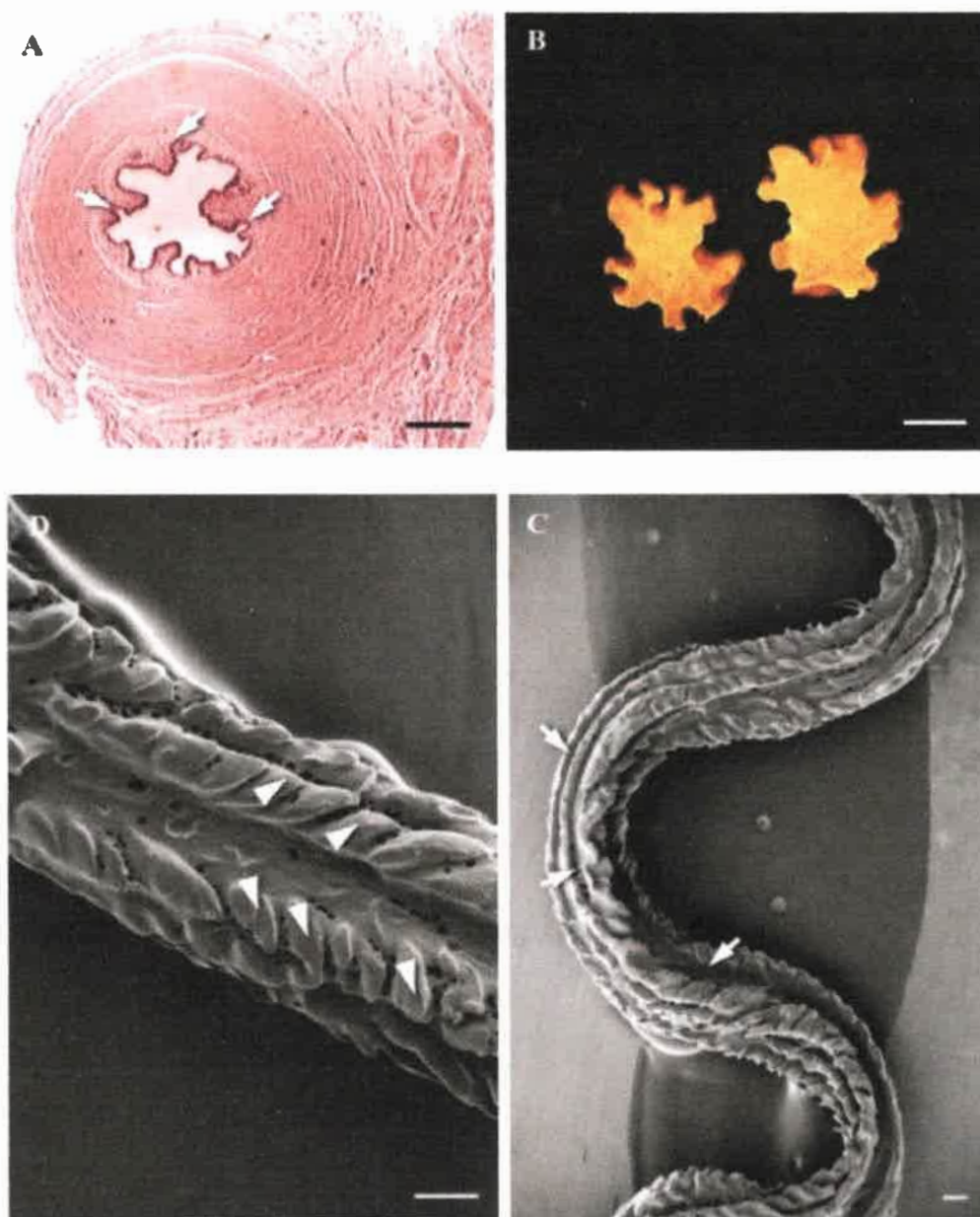
Etapa	Mediciones	Diámetro
Anovulatoria	536	499,64 (4,87)
Diestro	254	500,83 (7,04)
Estro	186	491,87 (7,97)



**Figura 19:** Box-plot del diámetro intraluminal del istmo, en diferentes etapas reproductivas, obtenido a partir de moldes 3D.



**Figura 20:** Recta de regresión para perímetro luminal (epitelial) versus área ocupada por pliegues epiteliales de la región del istmo, obtenida a partir de cortes histológicos en diferentes etapas reproductivas.  $r^2=0,78$ .



**Figura 21:**

**A**, Sección histológica de la porción central del istmo (H&E), mostrando pliegues primarios de base ancha, surcos dispuestos en forma radial, y algunas criptas epiteliales (*cul-de-sacs*) en las áreas basales de los pliegues (*flechas*); **B**, sección transversal de un molde intraluminal del istmo, donde se observan de 8 a 10 surcos y pliegues (estereomicroscopía, 40X); **C**, microscopía electrónica de barrido (MEB, 45X) de un molde 3D del istmo, mostrando surcos similares a canales longitudinales a lo largo de su recorrido (*flechas*); **D**, proyecciones de baja altura (correspondientes a fondos de saco o *cul-de-sacs*), dispuestos en filas (*cabezas de flechas*) separados por pequeños surcos secundarios interconectados, algunos orientados oblicuamente hacia la unión útero-tubárica, MEB, 125X. Se observan algunas burbujas pequeñas localizadas en la profundidad de los surcos primarios y secundarios. Barra de escala en A y B indica 250µm, en C y D, 200µm. *Adaptado de: Morphometric study of the mare oviductal mucosa at different reproductive stages. Mouguelar H, Díaz T, Borghi D, Quinteros R, Bonino F, Apichela S, Aguilar J. Anatomical Record. 2015, 298(11): 1950-1959.*

### 6.2.3. Región de la Unión Ámpula-Istmo (UAI):

El área luminal (**Tabla 6**) y el perímetro del epitelio (**Tabla 7, Fig. 23**), de la UAI determinados a partir de los cortes histológicos, evidenciaron un incremento sustancial en comparación con la región ístmica, mostrando además, algunas diferencias significativas entre etapas reproductivas ( $p < 0,05$ ). Los pliegues epiteliales aumentaron en número, ramificaciones y direcciones. Fueron identificados pliegues terciarios y con menor frecuencia cuaternarios, principalmente en la parte craneal, hacia el límite con la región del ámpula (**Tabla 4**). De la misma manera que en la región del istmo, se observaron criptas epiteliales en las áreas basales de los pliegues primarios (**Fig. 25A**). En la UAI, así como en el istmo, se halló una relación lineal entre el perímetro y el área de la mucosa epitelial ( $r^2 = 0,80$ ; **Fig. 22**).

La morfología del endosalpinx de la UAI cambió gradualmente, desde el istmo hacia la región ampular. Este hallazgo también fue observado sobre la superficie de los moldes de resina, los cuales mostraron una moderada complejidad en sus pliegues y surcos, en comparación con el istmo (relativamente liso), y el ámpula fuertemente plegada. La mayoría de los pliegues primarios se ramificaron y dividieron longitudinalmente, con una posición perpendicular u oblicua, creando un patrón de pliegues y surcos sin un orden claro y definido sobre la superficie de los moldes (**Fig. 25C, D**). Esta región mostró un ligero incremento en el diámetro luminal, desde su unión con el istmo y hacia ámpula, con ciertas diferencias entre las etapas reproductivas estudiadas (**Tabla General A**).

En los moldes intraluminales de esta región, fueron observadas múltiples curvas dispuestas en forma de “W” continuas (**Fig. 24A, B, C; Fig. 25B**). Estas curvas muy pronunciadas, se produjeron por pliegues transversales de tejido conectivo sub-seroso penetrando desde los lados opuestos de la pared del conducto (*mesosalpinx* y *antimesosalpinx*), creando de ese modo un trayecto sinuoso y en zigzag en el lumen oviductal (**Fig. 24, 25B**). A pesar de las numerosas curvaturas identificadas en este segmento, la longitud total fue aproximadamente 2,5 veces inferior a la observada en el istmo (**Tabla General B; Fig. 33**).

**Tabla 6:**

Área del lumen del UAI expresada en milímetros cuadrados ( $\text{mm}^2$ ), medida a partir de cortes histológicos. Media ( $\pm$  D.E).

Etapa	Área
Anovulatoria	2,19 (0,92) <sup>ab</sup>
Diestro	2,51 (1,35) <sup>b</sup>
Estro	1,07 (0,69) <sup>a</sup>
Posovulatoria	1,20 (0,12) <sup>ab</sup>

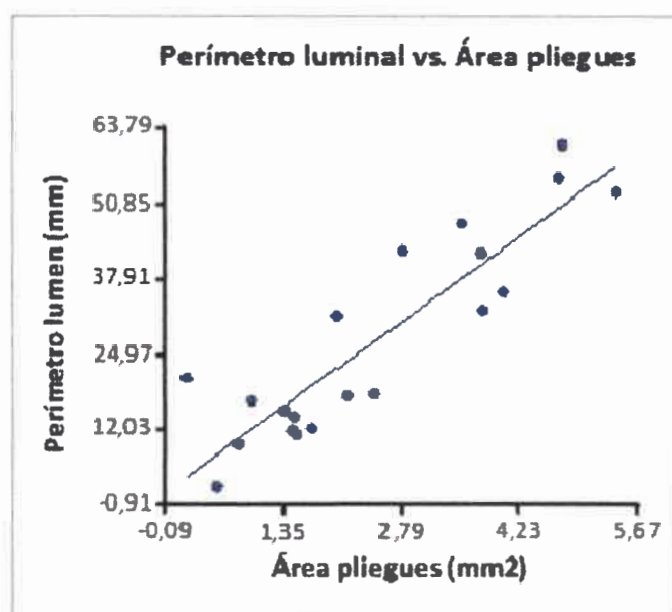
Diferentes superíndices indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 7:**

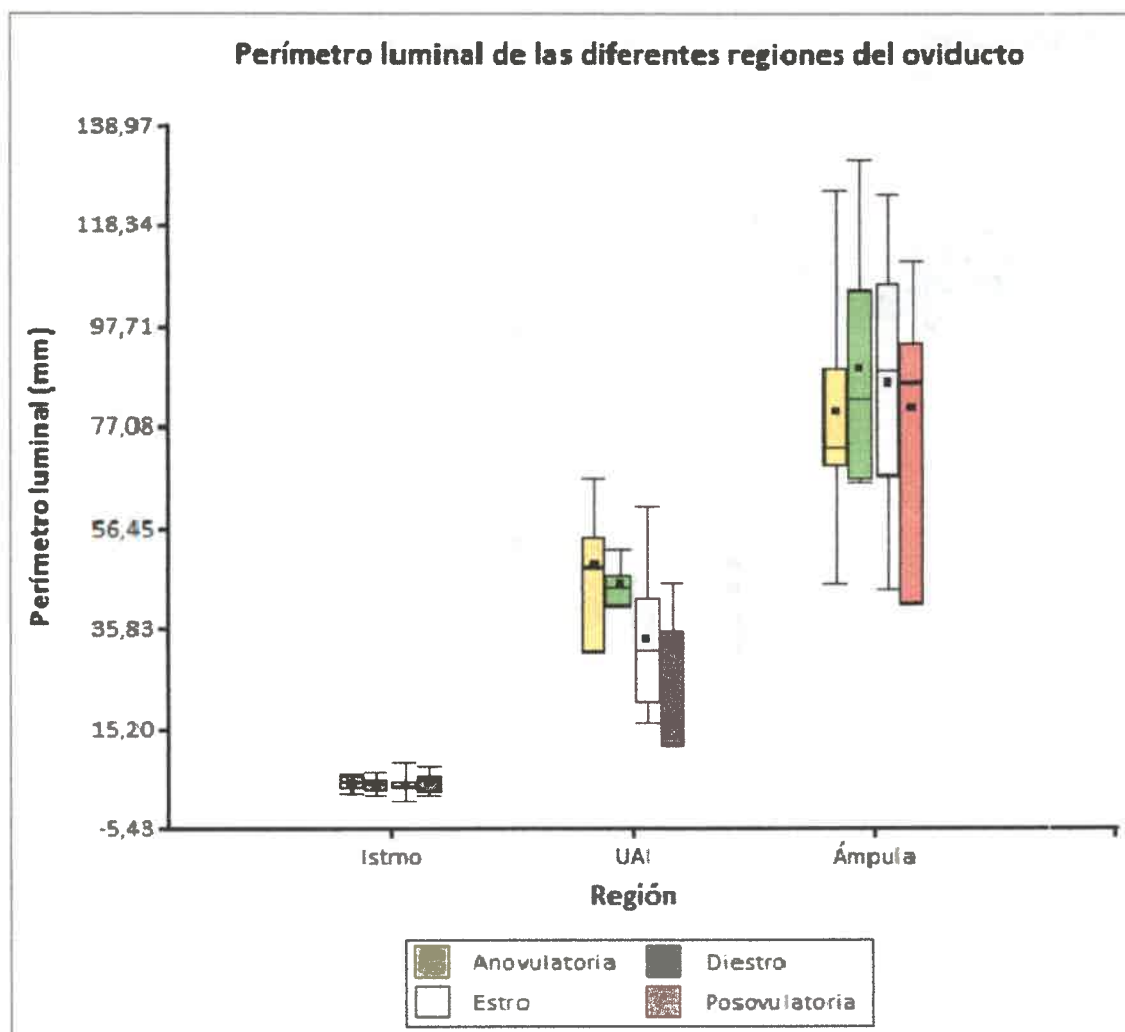
Perímetro luminal del istmo, UAI y ámpula expresado en milímetros (mm), en diferentes etapas reproductivas, obtenido a partir de cortes histológicos. Media ( $\pm$  D.E).

Región	Etapa (cortes histológicos)			
	Anovulatoria (n=12)	Diestro (n=14)	Estro (n=23)	Posovulatoria (n=10)
Istmo	4,15 (1,64)	3,75 (1,53)	3,61 (1,82)	4,19 (2,24)
UAI	48,79 (15,52) <sup>a</sup>	45,50 (5,43) <sup>a</sup>	17,80 (14,92) <sup>b</sup>	31,18 (14,17) <sup>ab</sup>
Ámpula	80,58 (29,87)	89,48 (25,49)	86,61 (23,10)	81,28 (30,12)

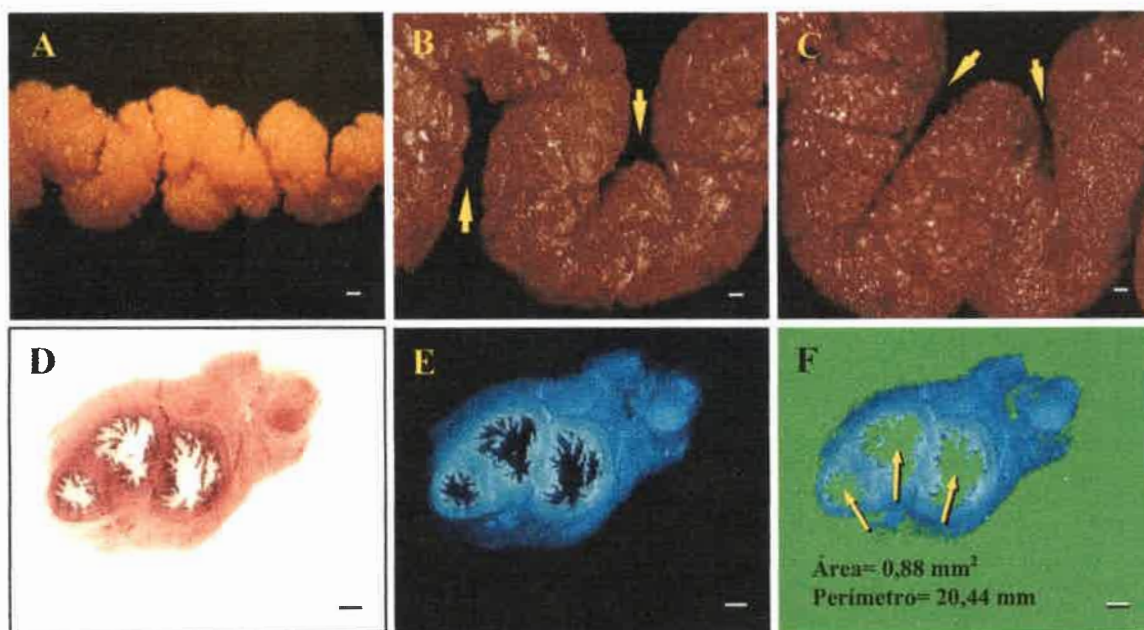
Diferentes superíndices indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ).

**Figura 22:**

Recta de regresión para perímetro luminal versus área ocupada por pliegues epiteliales de la región UAI, obtenido a partir de cortes histológicos y en diferentes etapas reproductivas.  $r^2=0,80$ .



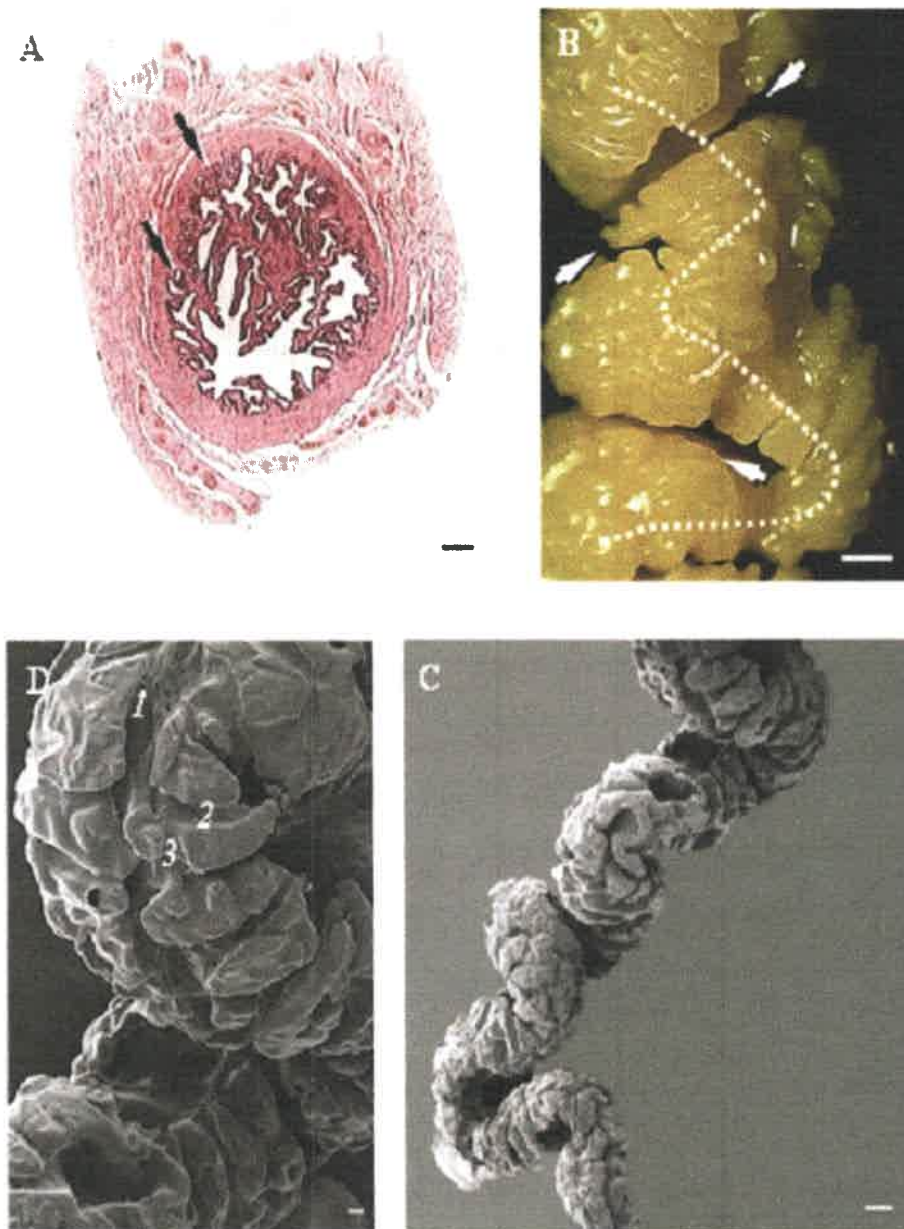
**Figura 23:** Perímetro luminal (mm) del istmo, UAI y ampulla en diferentes etapas reproductivas, medido a partir de cortes histológicos.



**Figura 24:**

Imágenes obtenidas a partir de moldes tridimensionales y cortes histológicos de la unión ampulla-istmo. **A**, molde de la UAI proveniente de una yegua en estro donde se aprecia el trayecto sinuoso del lumen; **B** y **C**, surcos transversos penetrando desde lados opuestos de la pared (*generados por el mesosalpinx y antimesosalpinx*) durante la fase anovulatoria y diestro respectivamente (*flechas*); **D**, corte histológico transversal de la UAI, donde se aprecian segmentos continuos de la región, debido a la presencia de numerosas curvas cerradas y adheridas entre ellas, 20X (tinción H&E); **E** y **F**, transformaciones de la imagen mostrada en **D** para realizar algunas determinaciones morfométricas del lumen oviductal (área y perímetro luminal) a través del software Motic Images Plus 2.0 ML. Barra de escala en **A**, **B** y **C** indica 250 $\mu$ m, en **D**, **E** y **F** indica 500 $\mu$ m.





**Figura 25:**

A, Corte histológico de la porción central de la unión ámpula-istmo (UAI), coloreado con hematoxilina y eosina (H&E), mostrando diferentes categorías de pliegues y algunas criptas epiteliales (estructuras similares a glándulas) en las áreas basales de los pliegues (*flechas*); B, estereomicroscopía de un molde de la UAI, donde surcos profundos y desde lados opuestos (*flechas*) producen curvas en forma de "W" (*línea punteada*) y un trayecto sinuoso en el lumen (40X); C, Microscopía electrónica de barrido (MEB, 21X) de un molde de resina de la UAI mostrando un trayecto tortuoso y un sistema complejo de pliegues y surcos sin una organización específica; D, estrecho surco primario(1), secundario(2) y terciario(3) sobre la superficie del molde, producidos por los pliegues epiteliales, MEB, 70X. Barra de escala en A y D, indica 100  $\mu\text{m}$ , en B 500 $\mu\text{m}$  y C, 1mm. *Adaptado de: Morphometric study of the mare oviductal mucosa at different reproductive stages. Mouguelar H, Díaz T, Borghi D, Quinteros R, Bonino F, Apichela S, Aguilar J. Anatomical Record. 2015, 298(11): 1950-1959.*

#### 6.2.4. Región del Ámpula:

En los cortes histológicos y en todas las etapas reproductivas, se encontraron múltiples pliegues epiteliales de diferente altura y complejidad, siendo ésta la característica más conspicua y sobresaliente de esta región tubular del oviducto. La vasta cantidad y ramificación de todos los pliegues epiteliales (primarios, secundarios, terciarios, y con elevada frecuencia cuaternarios de baja altura) (**Tabla 4**), ocuparon la mayor parte del lumen del ámpula, dejando solamente una escasa área luminal libre e irregularmente central (**Fig. 27**). En relación a este parámetro (área del lumen) no se observaron diferencias significativas entre las etapas reproductivas evaluadas ( $p > 0,05$ , **Tabla General A**). De la misma manera que en la región de la UAI, se pudieron observar numerosas criptas epiteliales o *cul-de-sacs* (similares a estructuras glandulares) ubicadas principalmente en la región basal de los pliegues primarios (**Fig. 29A**). En algunas ocasiones se pudieron hallar trabéculas de tejido conectivo, revestidas por endosalpinx, y dividiendo el lumen en dos o más compartimientos (**Fig. 28**).

Los numerosos y complejos pliegues epiteliales, indujeron un incremento sustancial en el perímetro epitelial, en comparación con los valores determinados en la región ístmica y la unión ámpula-istmo (UAI). Este hallazgo, fue observado en todas las etapas reproductivas del ciclo estral (**Tabla General A**). De manera similar a la región de la UAI y el istmo, en esta región ampular, se halló una relación prácticamente lineal y significativa, entre el perímetro epitelial y el área de la mucosa ( $r^2 = 0,79$ , **Fig. 26**).

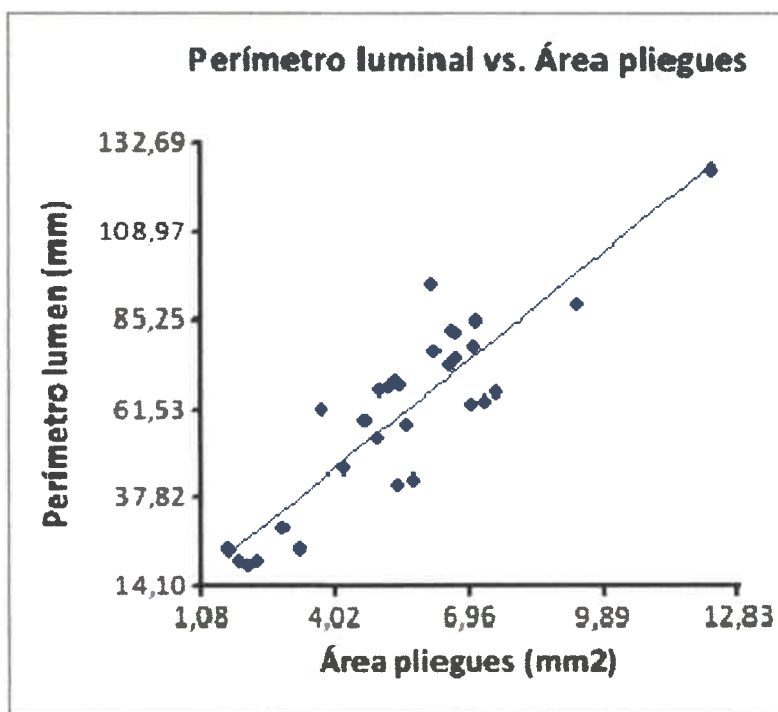
En este segmento tubular del oviducto, se halló el máximo diámetro intraluminal, en comparación con las demás regiones tubulares, y pudiéndose observar algunas diferencias estadísticas significativas entre las principales etapas reproductivas (**Tabla General A**).

Sobre la superficie de los moldes tridimensionales, se apreciaron numerosos surcos irregulares de diferente profundidad y grosor, orientados de maneras muy diversas; demostrando y coincidiendo con la disposición compleja e intrincada de los pliegues del endosalpinx ampular. Algunos surcos profundos, asimétricos y dispuestos de manera longitudinal (generados por los pliegues epiteliales primarios) se orientaron hacia la región del infundíbulo, separándose o uniéndose con otros múltiples surcos laterales, más pequeños, tenues y de escasa profundidad (**Fig. 29**).

Los moldes 3D además pusieron en evidencia varias curvas y un trayecto sinuoso en el recorrido del lumen, principalmente en la porción media y caudal (próxima a la UAI).

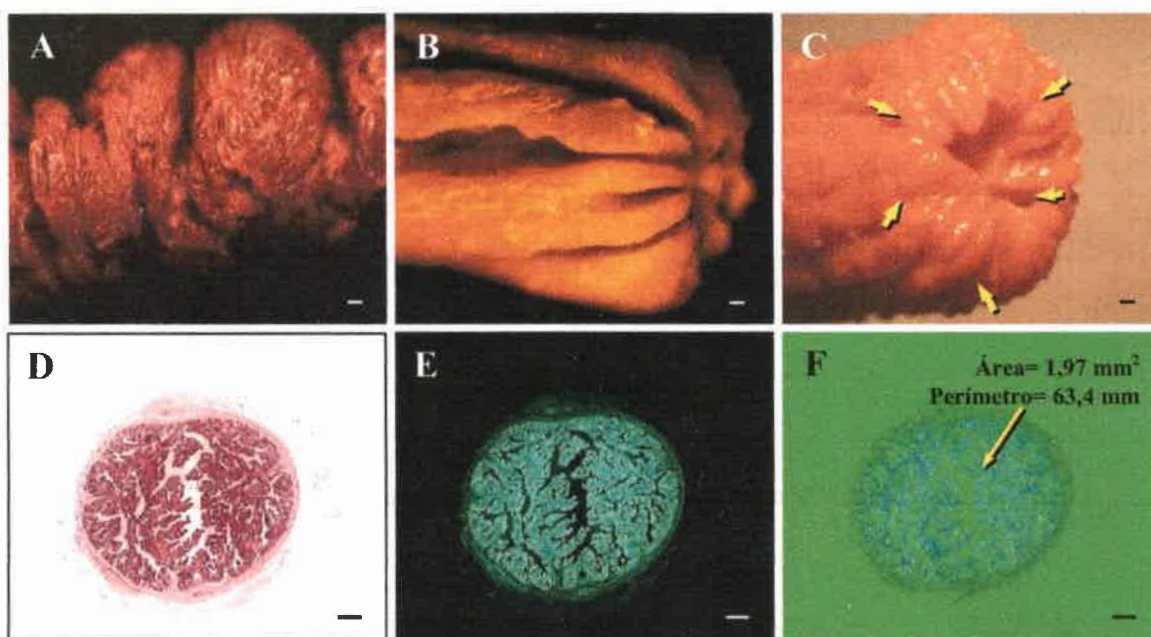
Estas curvas fueron desapareciendo gradualmente en la región más craneal y hacia el infundíbulo, donde el lumen adoptó un trayecto principalmente rectilíneo (**Fig. 29B**). En esta zona de transición con la región infundibular, algunos pliegues primarios se dispusieron de forma radial en torno a la periferia del conducto (**Fig. 27**).

La longitud del segmento, fue similar a la observada para la región del istmo, siendo ambas significativamente diferentes respecto de la UAI ( $p < 0,05$ , **Tabla General B**; **Fig. 33**).



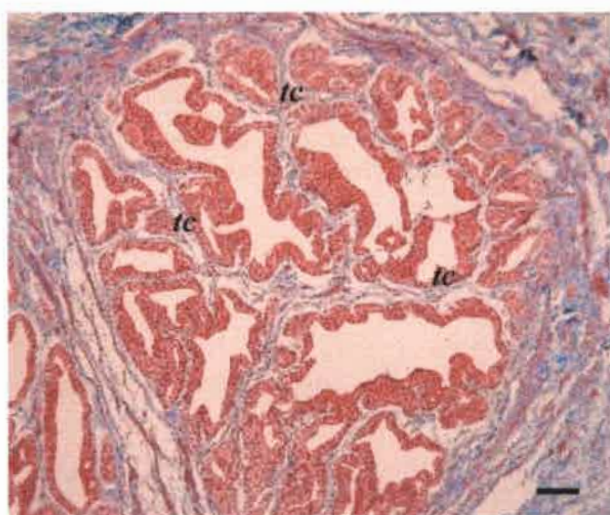
**Figura 26:**

Recta de regresión para perímetro luminal versus área ocupada por pliegues epiteliales de la región del ampulla, obtenido a partir de cortes histológicos y en diferentes etapas reproductivas.  $r^2 = 0,79$ .



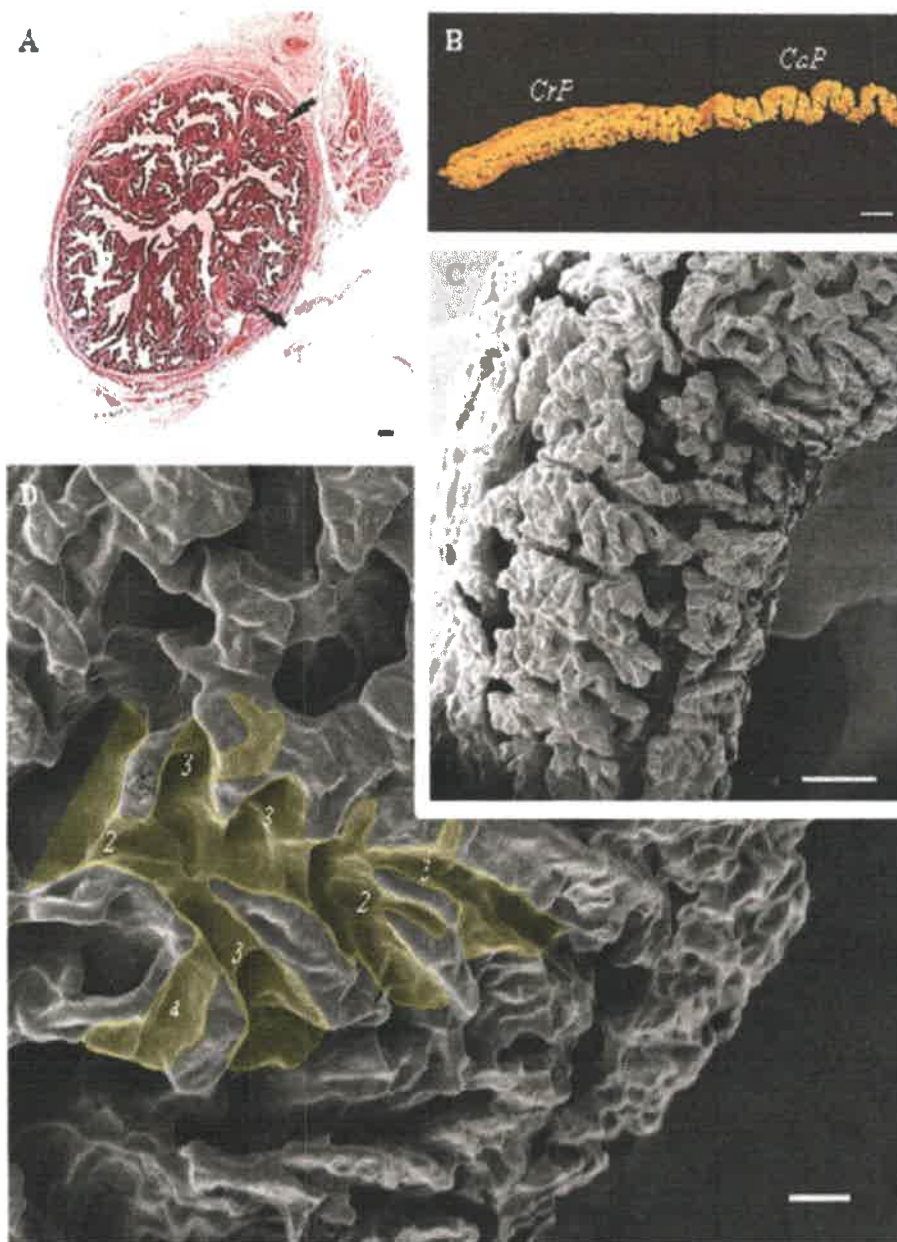
**Figura 27:**

Imágenes obtenidas a partir de moldes tridimensionales y cortes histológicos del ámpula. **A**, molde del ámpula caudal junto a la UAI, proveniente de una yegua en estro donde se aprecian curvaturas tenues y un trayecto algo sinuoso del lumen; **B**, surcos marcados por pliegues primarios en la región craneal; **C**, surcos dispuestos radialmente (*flechas*) en la parte craneal del ámpula en vecindad con el infundíbulo; **D**, corte histológico (tinción H&E) del ámpula craneal registrado con la cámara de la lupa con una magnificación de 20X; donde se observa gran cantidad de pliegues epiteliales, dejando un área estrecha e irregular en el lumen; **E** y **F**, transformaciones de la imagen mostrada en **D** para realizar las mediciones del lumen oviductal (área y perímetro) con el software Motic Images Plus 2.0 ML. Barra de escala en **A**, **B** y **C** indica 250 $\mu$ m, en **D**, **E** y **F** indica 500 $\mu$ m.



**Figura 28:**

Corte histológico del ámpula, donde se observa el lumen dividido en varios compartimientos a través de trabéculas conectivo-epiteliales (*tc*). Tinción Tricrómica de Masson, (100X). Barra de escala indica 50 $\mu$ m.



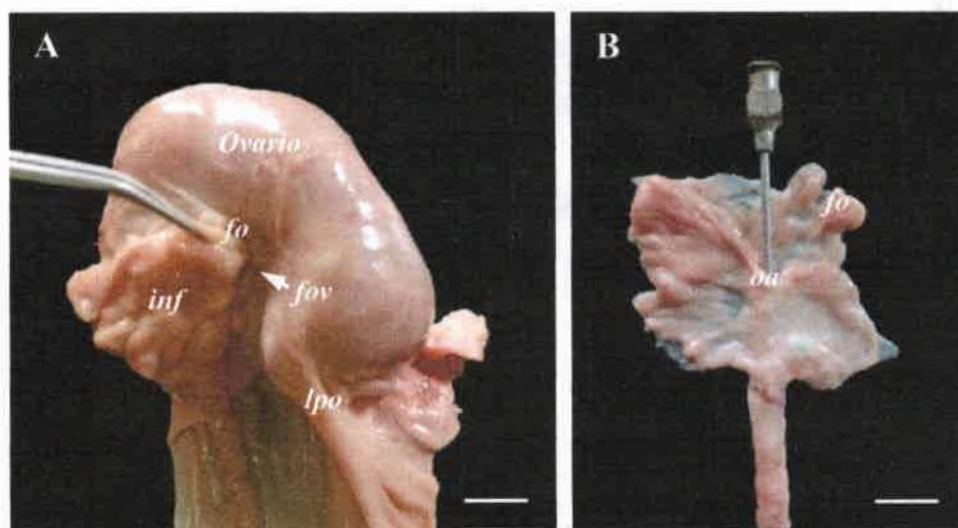
**Figura 29:**

A, Microfotografía de la porción craneal del ámpula (H&E), donde se observan pliegues epiteliales primarios, secundarios, terciarios y cuaternarios, ocupando la mayor parte de su lumen. Se muestran numerosas criptas epiteliales (estructuras similares a glándulas) en la parte basal de los pliegues (*flechas*); B, estereomicroscopía de un molde del ámpula observado a baja magnificación (7.5X), mostrando algunas curvas en la porción caudal (*CaP*), que gradualmente desaparecen hacia su porción craneal (*CrP*), donde el lumen del ámpula se dispone en forma rectilínea; C, Microscopía electrónica de barrido (MEB, 33X) de un molde intraluminal del ámpula, mostrando la disposición intrincada del endosalpinx; D, ramificación de surcos primarios, secundarios (2), terciarios (3) y cuaternarios (4) (remarcados), correspondientes a diferentes categorías de pliegues epiteliales, MEB, 65X. Barra de escala en A, indica 100 $\mu$ m, en B, 5mm; C, 1mm y D, 200 $\mu$ m. *Adaptado de: Morphometric study of the mare oviductal mucosa at different reproductive stages. Mouguelar H, Díaz T, Borghi D, Quinteros R, Bonino F, Apichela S, Aguilar J. Anatomical Record. 2015, 298(11): 1950-1959.*

### 6.2.5. Infundíbulo:

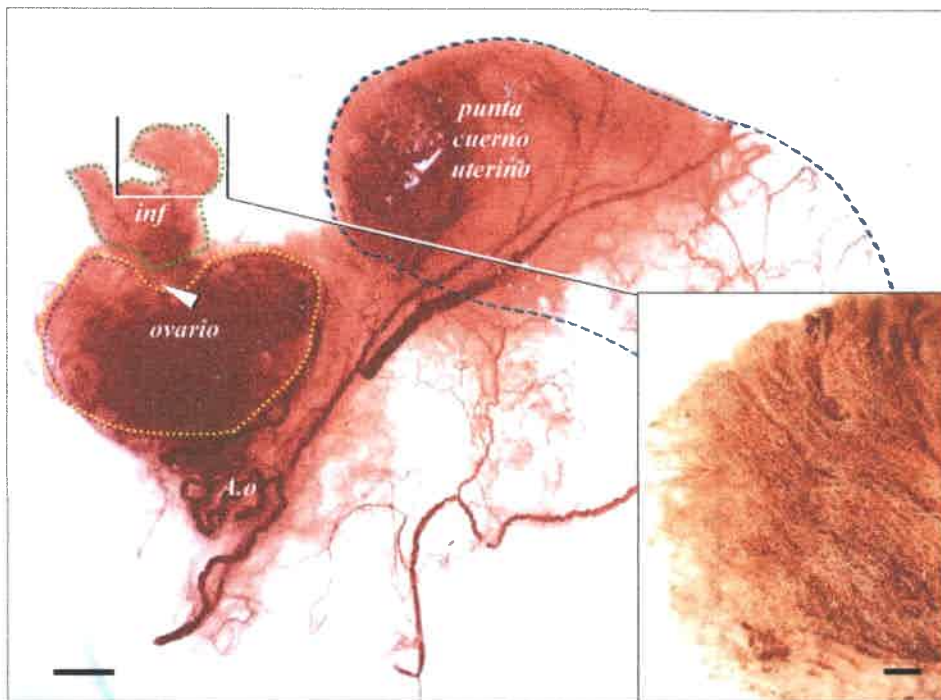
Algunas fimbrias se proyectaron a partir de uno de los extremos del borde libre del infundíbulo, en forma de prolongaciones digitiformes, adheriéndose firmemente sobre el borde medial y superficie mesotelial (peritoneo) del ovario, en estrecha relación con la fosa de ovulación. Estas fimbrias ováricas, se observaron en todas las muestras y etapas reproductivas evaluadas (**Fig. 30A**). En los oviductos provenientes de yeguas en estro pudo apreciarse (macroscópicamente y en los moldes vasculares; **Fig. 31**) un aumento evidente de la densidad capilar, manifestada además por rubor (congestión vascular) y edema en los pliegues de mucosa de ésta y otras regiones del oviducto.

El endosalpinx de este segmento (observado a través de las réplicas de resina y microscopía óptica) mostró numerosos pliegues y surcos de aspecto foliado, de dimensiones variables e interconectados; muchos de ellos orientados de manera longitudinal, formando arcos paralelos y dirigidos hacia el ámpula (**Fig. 32A, B**). En esta transición (infundíbulo-ampular) los pliegues y surcos mostraron cierta convergencia hacia el *ostium abdominale* (**Figs. 30B, 32A**), para posteriormente, continuarse con el endosalpinx de la región del ámpula. En ninguna ocasión se realizaron determinaciones morfométricas para este segmento del oviducto.



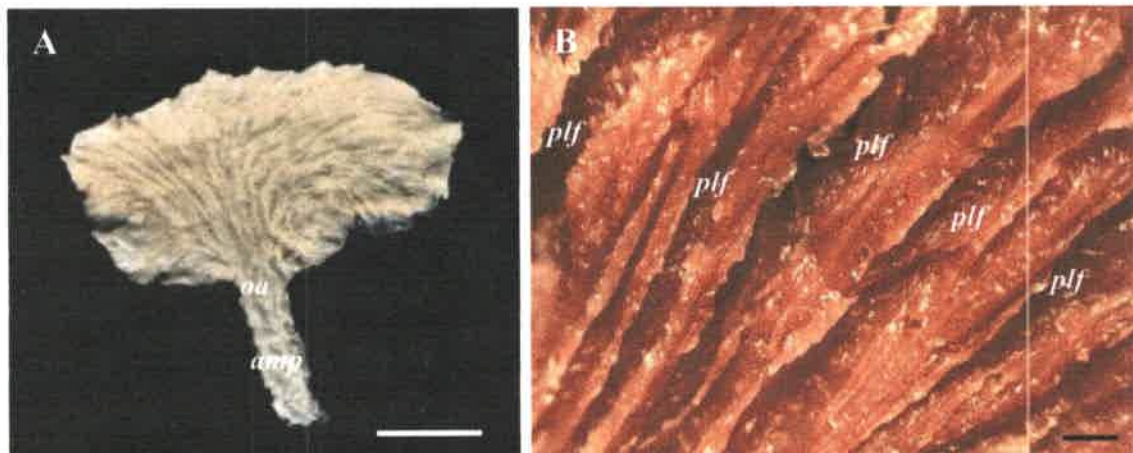
**Figura 30:**

**A**, Ovario y región del infundíbulo del oviducto equino, durante la etapa transicional (primavera). Se observa la fimbria ovárica (sostenida por la pinza) unida a la superficie y borde medial del ovario, en la fosa de ovulación. *fo*, fimbria ovárica; *fov*, fosa de ovulación; *inf*, infundíbulo; *lpo*, ligamento propio del ovario. **B**, Oviducto aislado donde se observa el infundíbulo y la parte craneal del ámpula. Se aprecian las fimbrias en el borde del mismo, y pliegues de mucosa formando arcos, dirigidos hacia el *ostium abdominale* (*oa*, ocupado por la aguja hipodérmica). Barra de escala indica 1cm.



**Figura 31:**

Molde vascular del ovario, punta del cuerno uterino y oviducto a través de la repleción de la arteria ovárica con poliuretano (PU4ii®), durante la etapa de estro. En líneas punteadas están contorneados el ovario (amarillo); punta del cuerno uterino (celeste); e infundíbulo (verde). La punta de flecha señala la fosa de ovulación. En la imagen ampliada de la derecha, se observa una porción del lecho capilar del molde vascular del infundíbulo. *A.o.*, arteria ovárica (tortuosa); *inf*, infundíbulo. Barra de escala indica 1cm en la imagen general y 1mm en la imagen ampliada.



**Figura 32:**

Moldes 3D intraluminales de la región del infundíbulo, durante la etapa de estro. **A**, se observa la disposición de los surcos y pliegues en forma foliada, haciendo convergencia en el *ostium abdominale*, en la transición con el ampulla. *oa*, posición del *ostium abdominale*, *amp*, región del ampulla; **B**, se observan pliegues (y surcos) foliados primarios ubicados de manera paralela (*plf*), interconectados por pliegues secundarios. Barra de escala en A y B, indica 1cm.

**Tabla General A:**Parámetros morfométricos del oviducto en las principales etapas reproductivas. Medias ( $\pm$  D. E).

Región	Istmo				Unión Ámpula-Istmo (UAI)				Ámpula			
Etapa	Al (mm <sup>2</sup> )	Pe (mm)	Am (mm <sup>2</sup> )	DI (mm)	Al (mm <sup>2</sup> )	Pe (mm)	Am (mm <sup>2</sup> )	DI (mm)	Al (mm <sup>2</sup> )	Pe (mm)	Am (mm <sup>2</sup> )	DI (mm)
Anestro	0.21 (0.11)	4.15 (1.64)	0.42 (0.24)	499.64 (4.87)	2.19 (0.92) <sup>ab</sup>	48.79 (15.52) <sup>a</sup>	3.47 (1.28) <sup>ab</sup>	1850.09 (55.09) <sup>a</sup>	2.10 (0.35)	80.58 (29.87)	6.46 (1.93)	3902.52 (916.20) <sup>a</sup>
Estro	0.25 (0.09)	3.61 (1.82)	0.36 (0.15)	491.87 (7.97)	1.07 (0.69) <sup>a</sup>	17.80 (14.92) <sup>b</sup>	1.52 (1.19) <sup>a</sup>	1716.07 (63.79) <sup>a</sup>	2.43 (1.51)	51.83 (26.49)	5.71 (2.85)	3737.93 (984.44) <sup>a</sup>
Diestro	0.24 (0.19)	3.75 (1.47)	0.41 (0.30)	500.83 (7.04)	2.51 (1.35) <sup>b</sup>	45.50 (5.43) <sup>a</sup>	4.80 (1.41) <sup>b</sup>	2549.34 (78.99) <sup>b</sup>	2.72 (0.73)	89.48 (25.49)	6.81 (1.63)	4903.94 (933.95) <sup>b</sup>
valor p					<0.01	<0.001	<0.002	<0.001				<0.001

Al, área luminal; Pe, perímetro epitelial; Am, área mucosa; DI, diámetro luminal.

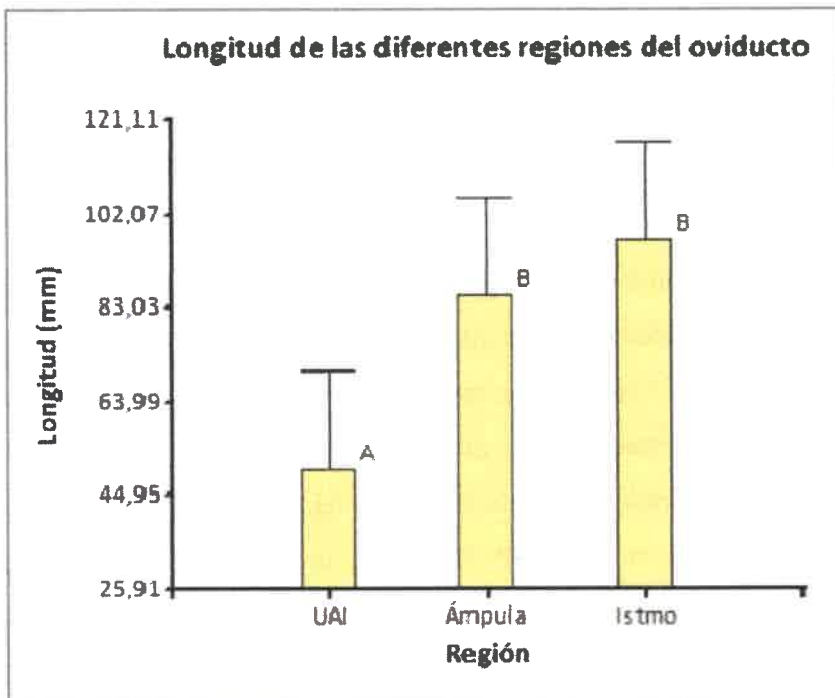
Diferentes superíndices indican diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ).**Tabla General B:**Longitud (mm) de las diferentes regiones tubulares del oviducto, en las principales etapas reproductivas, determinada a partir de moldes de resina. Medias ( $\pm$  D. E).

Región	Anestro	Estro	Diestro	valor p	Longitud en todas las etapas
Istmo	96.36 (4.31)	108.02 (7.14)	88.71 (6.39)	>.05	96.78 (3.32) <sup>a</sup>
UAI	48.03 (3.63)	45.89 (6.02)	58.57 (5.38)	>.05	50.24 (3.62) <sup>b</sup>
Ámpula	89.44 (4.86)	89.71 (8.06)	74.12 (7.21)	>.05	85.66 (4.34) <sup>a</sup>
LTO	205.53 (9.99)	236.32 (16.57)	194.21 (14.82)	>.05	
valor p					<0.001

Diferentes superíndices indican diferencias estadísticas entre regiones del oviducto ( $p < 0.05$ ).

UAI, unión ámpula-istmo; LTO, longitud total de los oviductos.





**Figura 33:**

Longitud de las diferentes regiones tubulares del oviducto sin discriminar entre etapas reproductivas. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

**Tabla General C:**

Volumen aproximado ( $\mu\text{l}$ ) de las diferentes regiones tubulares del oviducto, en las distintas etapas reproductivas, calculado a partir de las secciones histológicas. Medias ( $\pm$  D. E.).

Etapa	Istmo	UAI	Ámpula
<b>Anestro</b>	21.54 (9.09)	125.05 (36.93) <sup>a</sup>	504.46 (38.73) <sup>a</sup>
<b>Estro</b>	37.16 (5.03)	46.08 (18.03) <sup>b</sup>	283.63 (53.63) <sup>ab</sup>
<b>Diestro</b>	21.84 (7.04)	108.02 (7.14) <sup>a</sup>	203.92 (51.90) <sup>b</sup>
<i>valor p</i>	>.05	<0.005	<0.01

Diferentes superíndices indican diferencias estadísticas entre regiones del oviducto ( $p < 0.05$ ).

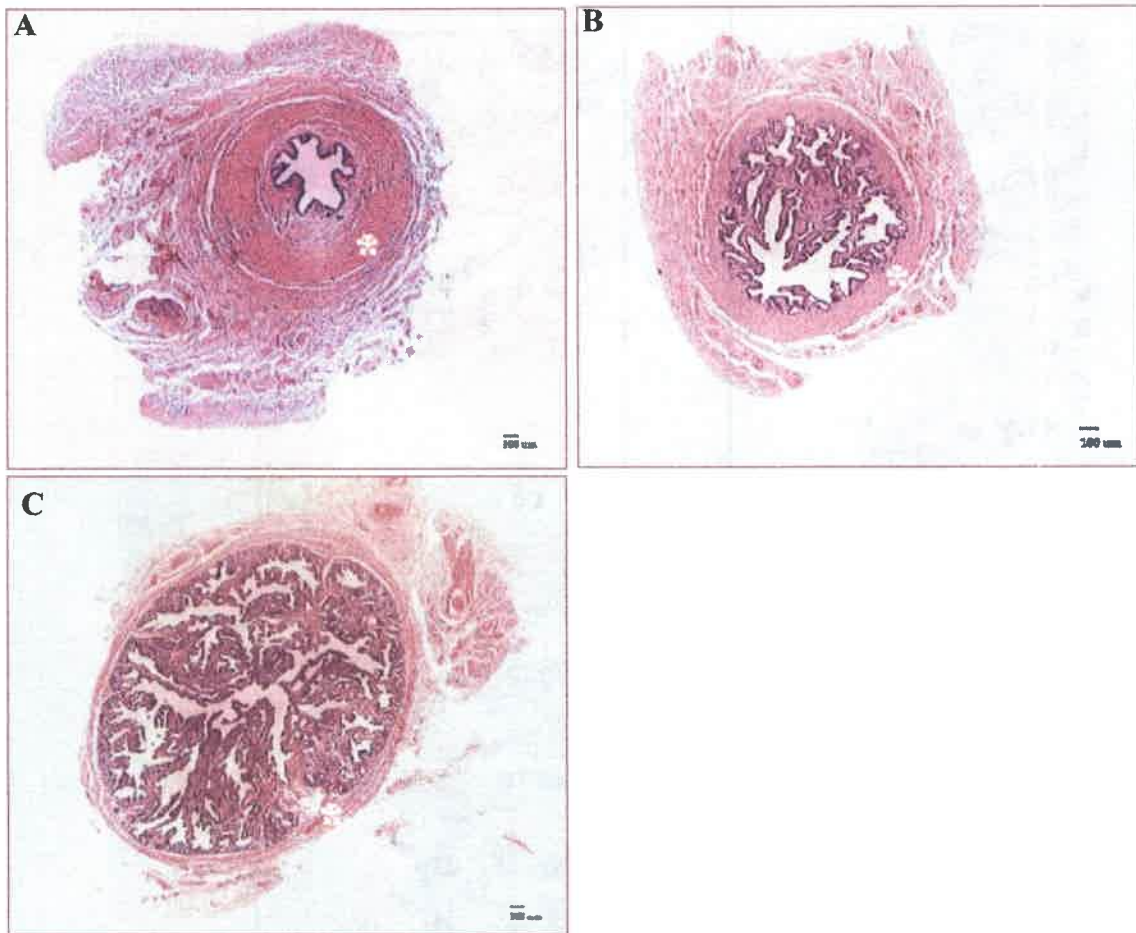
UAI: unión ámpula-istmo.

### **6.3. Microscopía óptica.**

A través del estudio mediante microscopía óptica de las secciones transversales de diferentes regiones tubulares del oviducto, se observó la organización bidimensional del endosalpinx. Una revisión detallada de las características histológicas del epitelio oviductal, en diferentes etapas del ciclo estral fue reportada previamente por nuestro equipo de investigación (Aguilar et al., 2012).

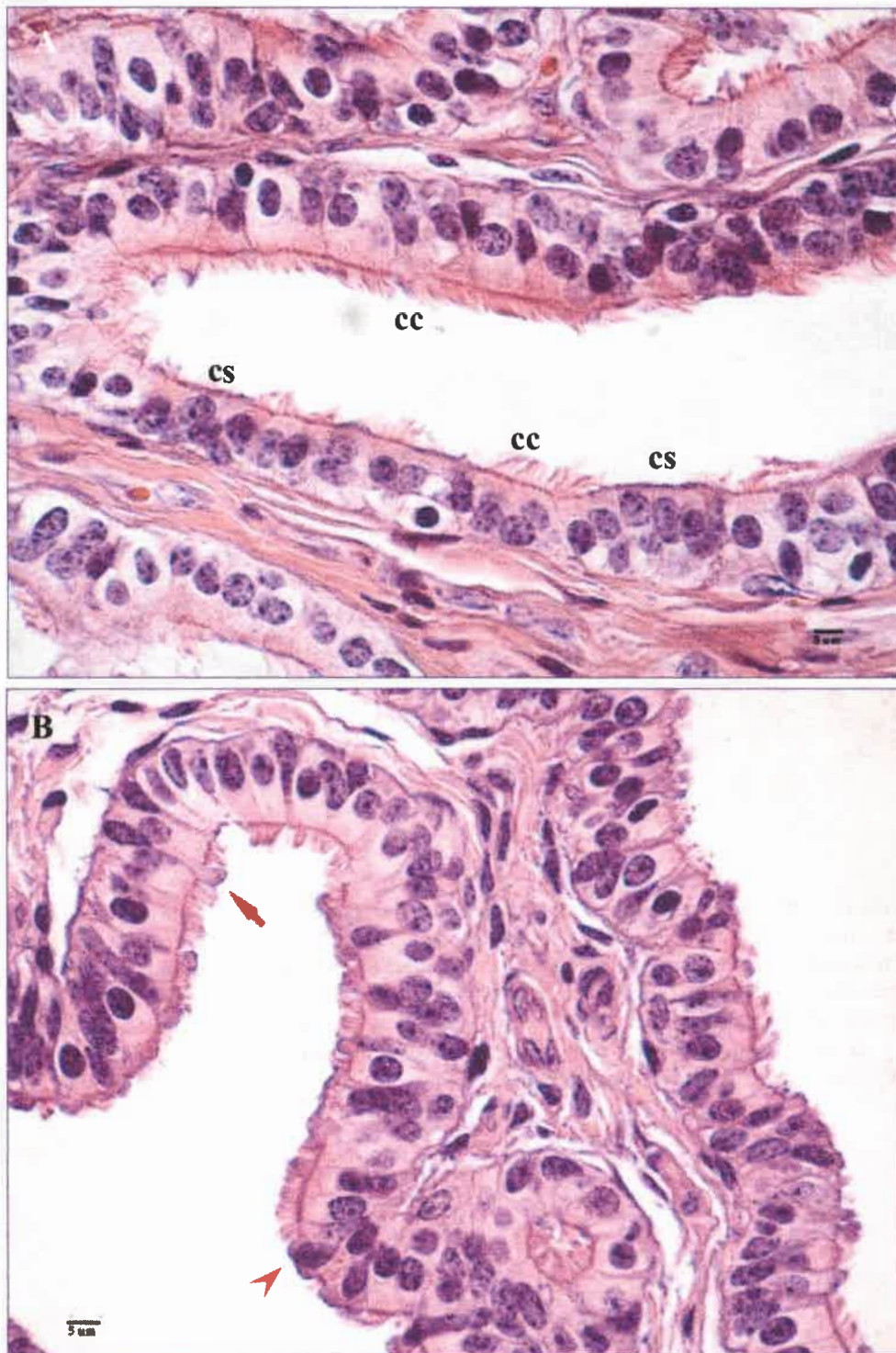
En términos generales, la cantidad, complejidad y grado de ramificación (categorías) de los pliegues de la mucosa, mostró importantes variaciones, desde la región menos plegada representada por el istmo; hacia el ampulla e infundíbulo, donde numerosos y ramificados pliegues fueron la característica más sobresaliente de estas dos últimas regiones. Frecuentemente en el ampulla, la cuantiosa y compleja disposición de los pliegues epiteliales, ocupó gran parte del lumen (**Fig. 34A, B y C**). El epitelio oviductal presentó, de la manera habitual, las dos poblaciones celulares típicas (ciliadas y secretorias) en todas las regiones tubulares del órgano y en las diferentes fases reproductivas analizadas (**Fig. 35A, B**). En los diversos segmentos (y principalmente en el ampulla) se pudieron observar criptas epiteliales “estructuras similares a glándulas túbulo-alveolares” dispersas en el grosor y en la base de los pliegues del endosalpinx. De la misma manera, fueron halladas protrusiones bulbosas epiteliales, que consistieron en proyecciones celulares dirigidas hacia el lumen del órgano, algunas de las cuales contenían al núcleo o sólo el citoplasma (**Fig. 35B**).

Del mismo modo que en la mucosa, la capa muscular (miosalpinx) mostró variaciones, principalmente en su grado de desarrollo. La unión útero-tubárica (papila) y la región del istmo presentaron el mayor espesor de la capa muscular, la cual fue decreciendo paulatinamente hacia la unión ampulla-istmo (UAI), para finalmente, en el ampulla observarse un miosalpinx escasamente desarrollado (**Fig. 34A, B y C**).



**Figura 34:**

Imágenes de microscopía óptica, a partir de secciones transversales de la región central (media) del istmo, unión ampulla-istmo (UAI) y ampulla: **A**, escasos pliegues epiteliales primarios de baja altura se proyectan hacia el lumen del istmo, y gran desarrollo de la capa muscular; **B**, incremento en el número, ramificación y altura de los pliegues epiteliales en la UAI, con reducción en el espesor del miosalpinx; **C**, región del ampulla, donde se aprecia un pequeño lumen ocupado por múltiples pliegues epiteliales de diferente altura, complejidad y categoría. Capa muscular (miosalpinx, \*). Magnificación de las imágenes 25X. Tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E). Barra de escala indica 100 $\mu$ m.



**Figura 35:**

Microscopía óptica de la UAI. **A**, pliegue epitelial con las típicas células ciliadas (**cc**) y secretorias (**cs**); **B**, protrusiones apicales bulbosas en el epitelio de la UAI (protrusión nuclear, *punta de flecha*; protrusión citoplasmática, *fecha*). Magnificación 400X. Tinción de Hematoxilina y Eosina. Barra de escala indica 5 μm.

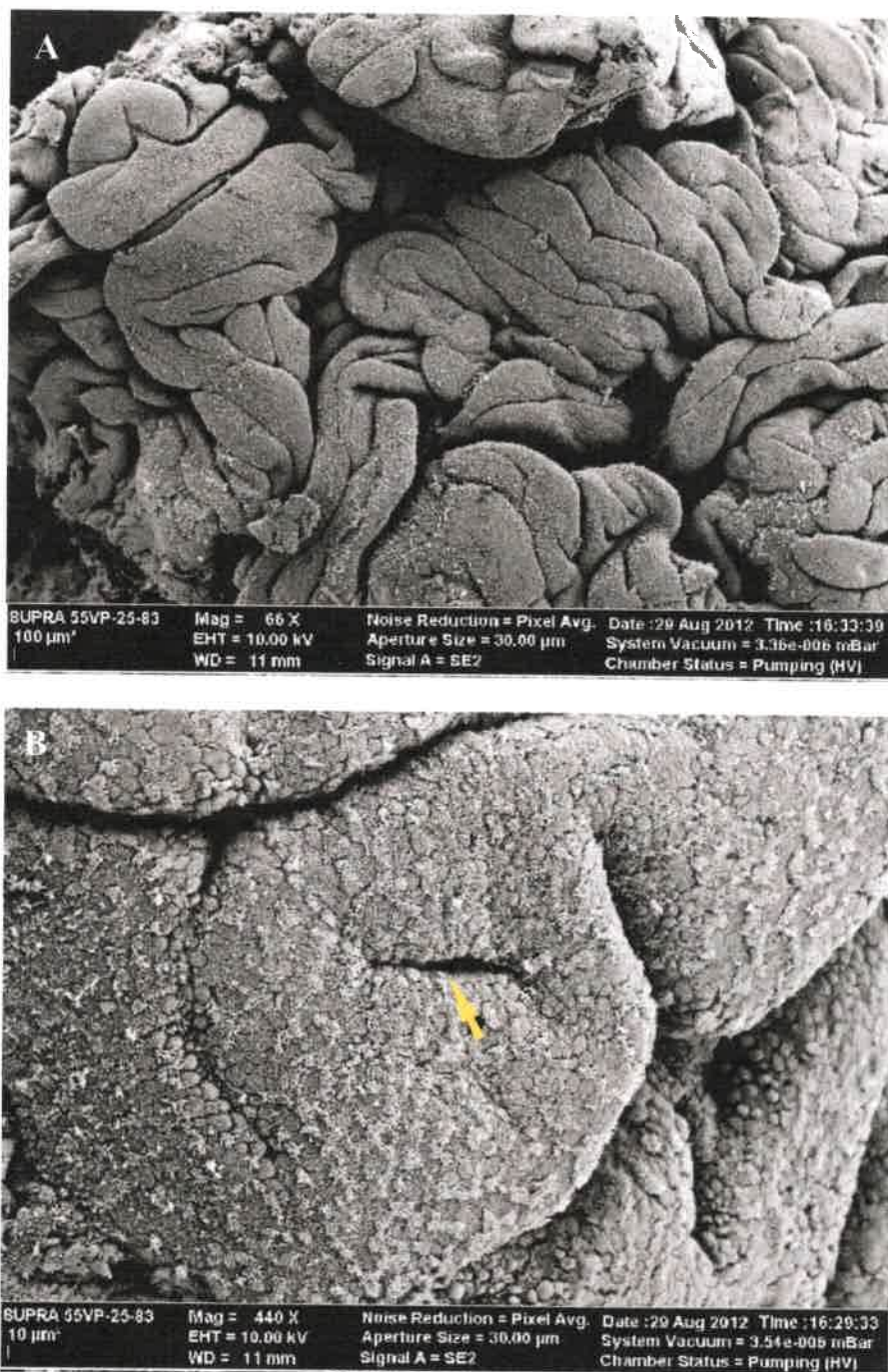
#### **6.4. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).**

Las características generales de la mucosa y principalmente la superficie epitelial del oviducto, pudo ser observada con suficiente detalle a través de MEB. Los diferentes pliegues de la mucosa presentaron aspectos morfológicos variados, y en algunas regiones fueron muy manifiestos e intrincados, careciendo de un patrón regular de organización (**Fig. 36A**).

El epitelio con sus dos poblaciones celulares típicas se diferenció notablemente, mostrando características morfológicas particulares, principalmente sobre la superficie apical de las mismas. En las células secretorias, se hallaron microvellosidades de baja altura, sin alcanzar en ningún caso la longitud de las cilias, las cuales se agruparon formando paquetes o manojos, dirigidas hacia diferentes posiciones (**Fig. 37A, B**). Se pudieron visualizar surcos intercelulares, delimitando con cierta precisión a células secretorias vecinas, hecho poco evidente entre las células ciliadas; así como entre las últimas y las secretorias. En algunas regiones tubulares, se hallaron depresiones profundas, correspondientes a criptas epiteliales, cuyo aspecto morfológico recuerda a glándulas túbulo-alveolares (**Fig. 36B**). En la transición entre el epitelio oviductal, en la región de la UUT y el endometrio uterino, se hallaron algunas aperturas en forma de pequeños poros, pertenecientes a la desembocadura de las glándulas endometriales.

Sobre la superficie epitelial y en la profundidad de algunos surcos de diferentes regiones y etapas reproductivas, se halló secreción celular, que en variadas ocasiones presentó un aspecto muco-filamentoso (**Fig. 38A**).

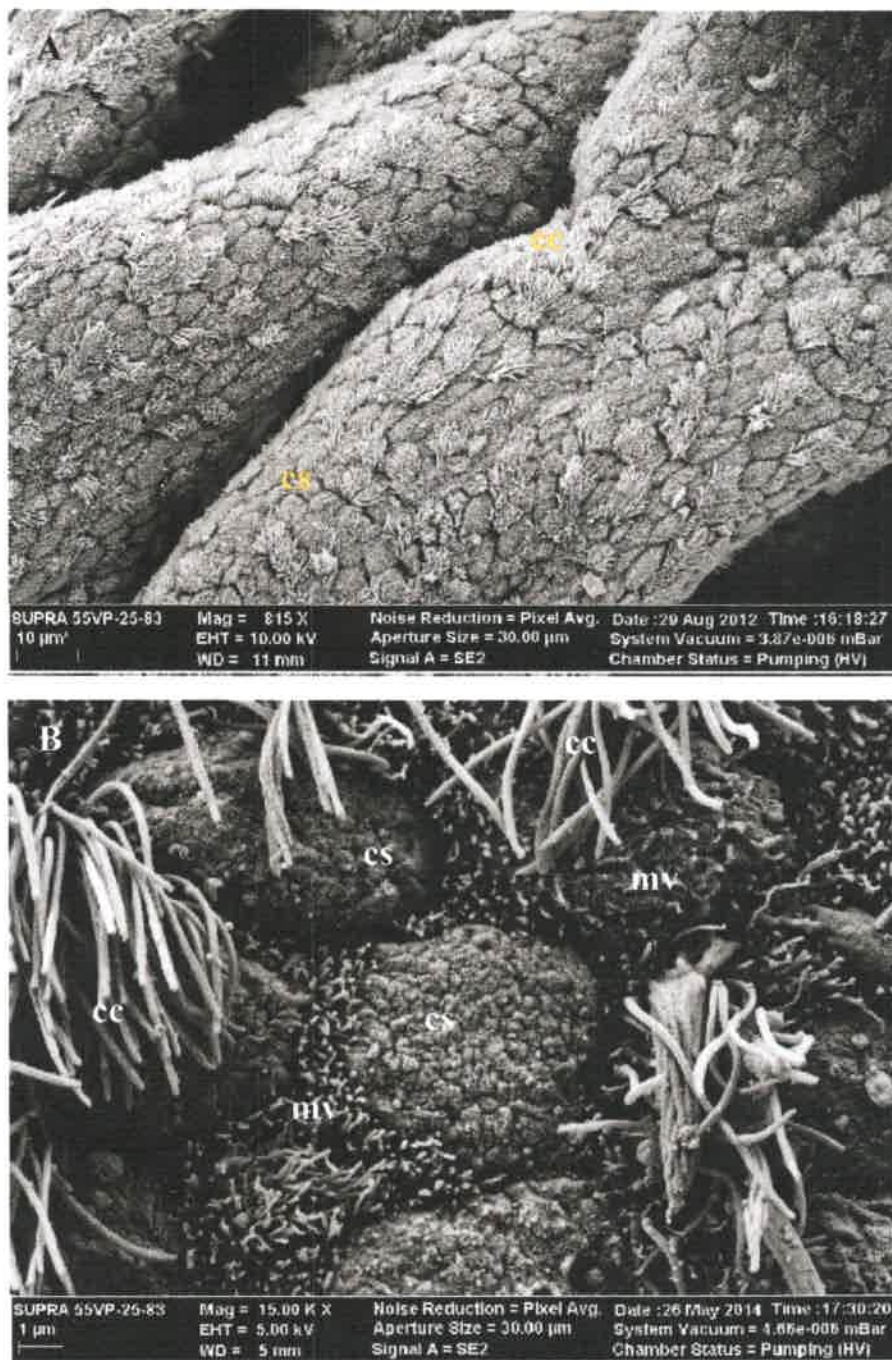
Las protrusiones celulares, presentes en las células secretorias, fueron observadas en los cortes histológicos, MEB, y microscopía electrónica de transmisión (MET) conteniendo en ciertas ocasiones al núcleo celular. Además, diversas estructuras vesiculares y globosas alojadas entre las cilias y sobre las células secretorias, fue otro hallazgo observado en diversas regiones (**Fig. 38B**). Dicha existencia, junto con la presencia de secreción filamentosa, implica cierta actividad secretoria en las diferentes fases del ciclo estral.



**Figura 36:**

Microscopía electrónica de barrido (MEB) de la superficie epitelial de la UAI y ampulla.

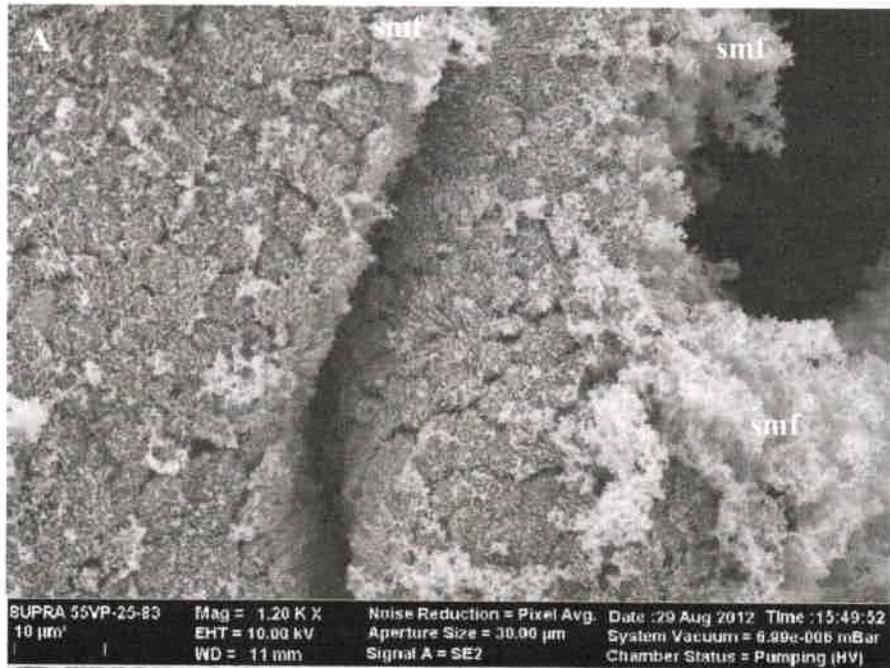
**A**, pliegues epiteliales de diferente tamaño y categoría, y sin un patrón de organización definido, en la mucosa de la UAI; **B**, cripta epitelial (*flecha*) en forma de ranura en el centro de un pliegue epitelial del ampulla. En los cortes histológicos, estas formaciones se asemejan a estructuras similares a glándulas túbulo-alveolares, como las halladas sobre la superficie endometrial.



**Figura 37:**

Microscopía electrónica de barrido (MEB) de la superficie epitelial de la región del istmo.

**A**, pliegues epiteliales primarios de baja altura, donde se aprecian las dos poblaciones de células epiteliales típicas (ciliadas y secretorias) dispersas sobre la superficie mucosa y separadas entre sí mediante surcos intercelulares; **B**, células ciliadas (**cc**) y células secretorias (**cs**), donde se observan microvellosidades (**mv**) sobre la superficie apical de estas últimas.



**Figura 38:**

Microscopía electrónica de barrido (MEB) de la superficie epitelial región del ámpula.

**A**, abundante secreción muco-filamentosa (**smf**) acumulada sobre un pliegue epitelial y dispersa en pequeñas cantidades sobre la superficie mucosa; **B**, protrusiones apicales (**pa**) y múltiples vesículas globosas (**vg**) entre las cilias y en la profundidad de un pliegue epitelial.



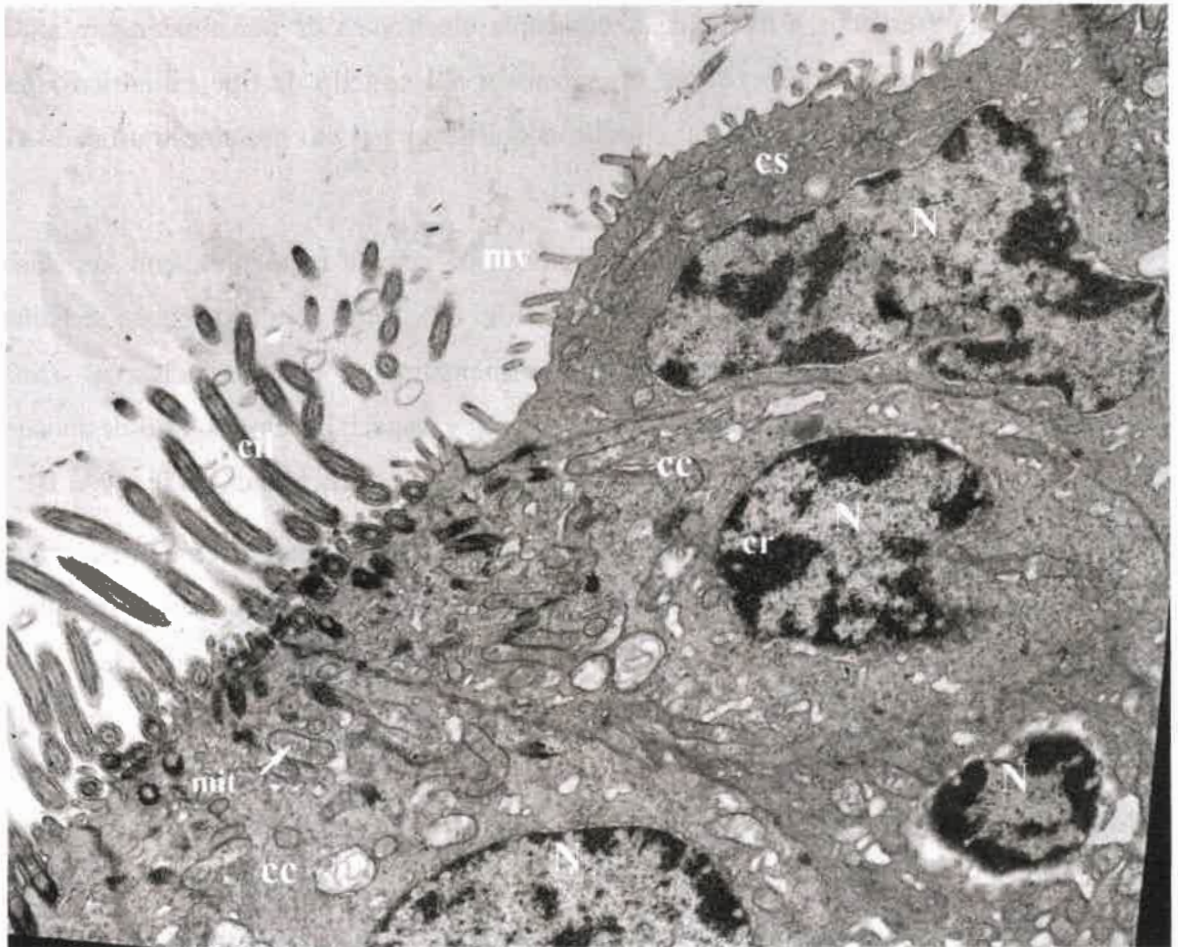
### 6.5. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

Las características generales y algunos detalles ultraestructurales del epitelio oviductal pudieron ser observados a través de microscopía electrónica de transmisión. En algunas muestras evaluadas, se observó una organización del epitelio de tipo cilíndrico simple, aunque en otras, la disposición del epitelio adquirió un aspecto pseudoestratificado (**Fig. 39**).

Claramente se distinguieron las poblaciones de células epiteliales, con las clásicas células ciliadas y las secretorias -no ciliadas- (**Fig. 39**). Entre células vecinas, se hallaron diferentes tipos de uniones intercelulares, principalmente uniones oclusivas (*zonula occludens*) en proximidades de la región apical, y especializaciones tipo-desmosomas (*punctum adherens*) en la profundidad de las uniones antes mencionadas (**Fig. 40A, B**).

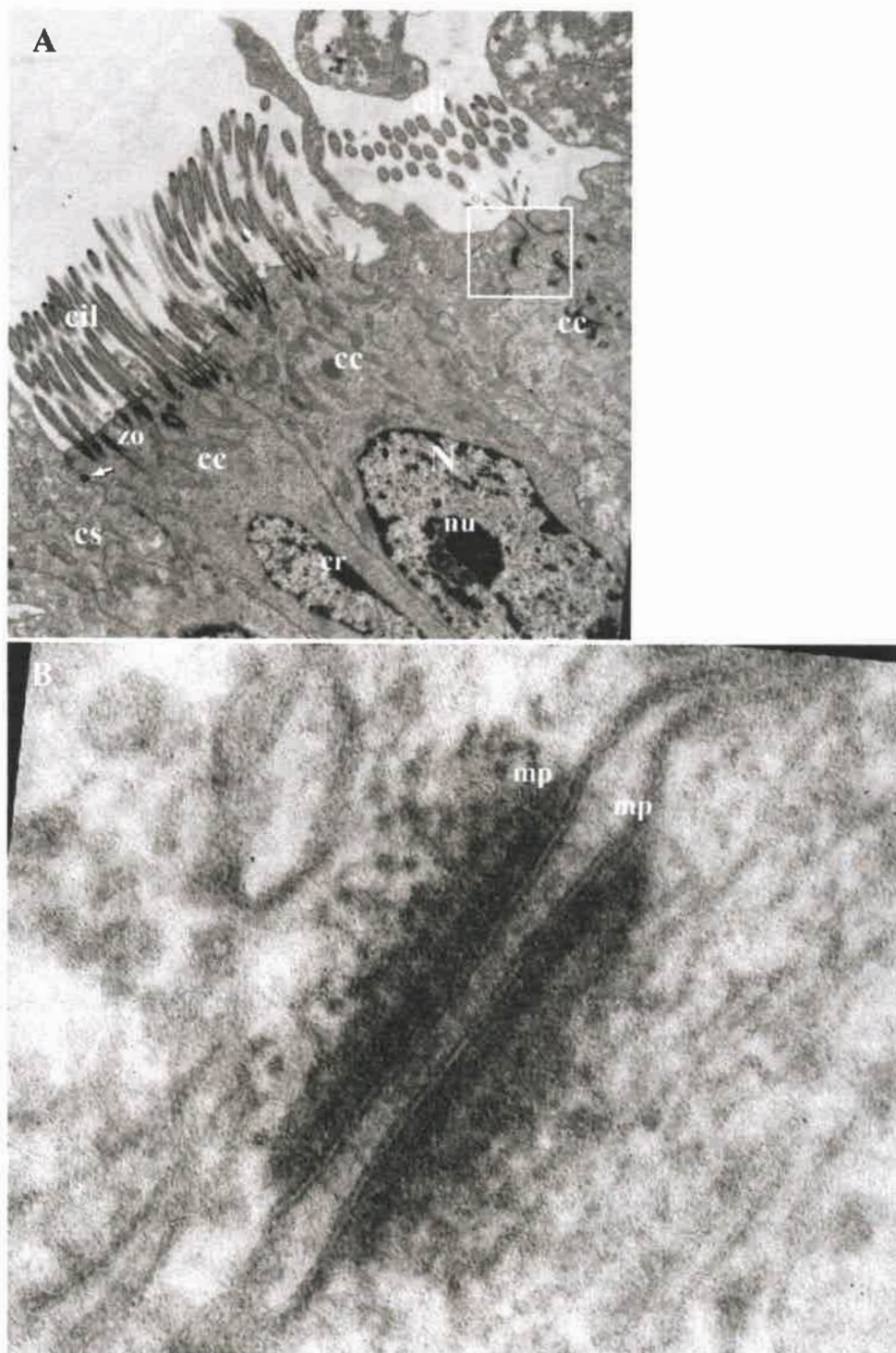
Las células ciliadas presentaron, en su mayoría un citoplasma electro-denso, núcleos ovalados y en ciertas ocasiones nucléolos manifiestos. Se observó abundante cantidad de mitocondrias (redondeadas u ovaladas), ubicadas en las regiones juxtenucleares y en cercanías de las zonas apicales celulares (**Fig. 41**). De la misma manera, se hallaron retículos endoplásmicos en forma de cisternas alargadas esparcidas por el citoplasma. Algunos complejos de Golgi, con sus típicas cisternas apiladas, fueron hallados en vecindad de las mitocondrias y a cierta distancia del núcleo (**Fig. 41 y 42**). La característica más conspicua de este tipo celular, fue la presencia de cilias sobre el borde apical protruyendo hacia el lumen. En aquellas cilias cortadas transversalmente, se observó la típica organización de sus microtúbulos, dispuestos en nueve pares periféricos y dos centrales (**Fig. 43**). En la raíz de las cilias, los cuerpos basales formaron bandas electro-densas (oscuras) evidentes (**Fig. 41**).

Las células secretorias se caracterizaron por presentar microvellosidades muy cortas y esparcidas sobre la superficie apical de la célula. Tapizando las microvellosidades se halló un glicocálix difuso. Frecuentemente, en estas células, se observaron protrusiones bulbosas citoplasmáticas apicales (**Fig. 45**), conteniendo diversos gránulos de secreción, algunos con una matriz oscura (electro-densa), y otros más claros. Fueron halladas algunas vesículas redondeadas, electro-lúcidas, de aspecto vacuolado o vacío, en proximidades de los gránulos secretorios y algunas mitocondrias (**Fig. 44**). Otro hallazgo, fueron los cuerpos multivesiculares, de formas variadas, recubiertas por membranas, conteniendo pequeñas vesículas internas, y material granular disperso (**Fig. 46**).



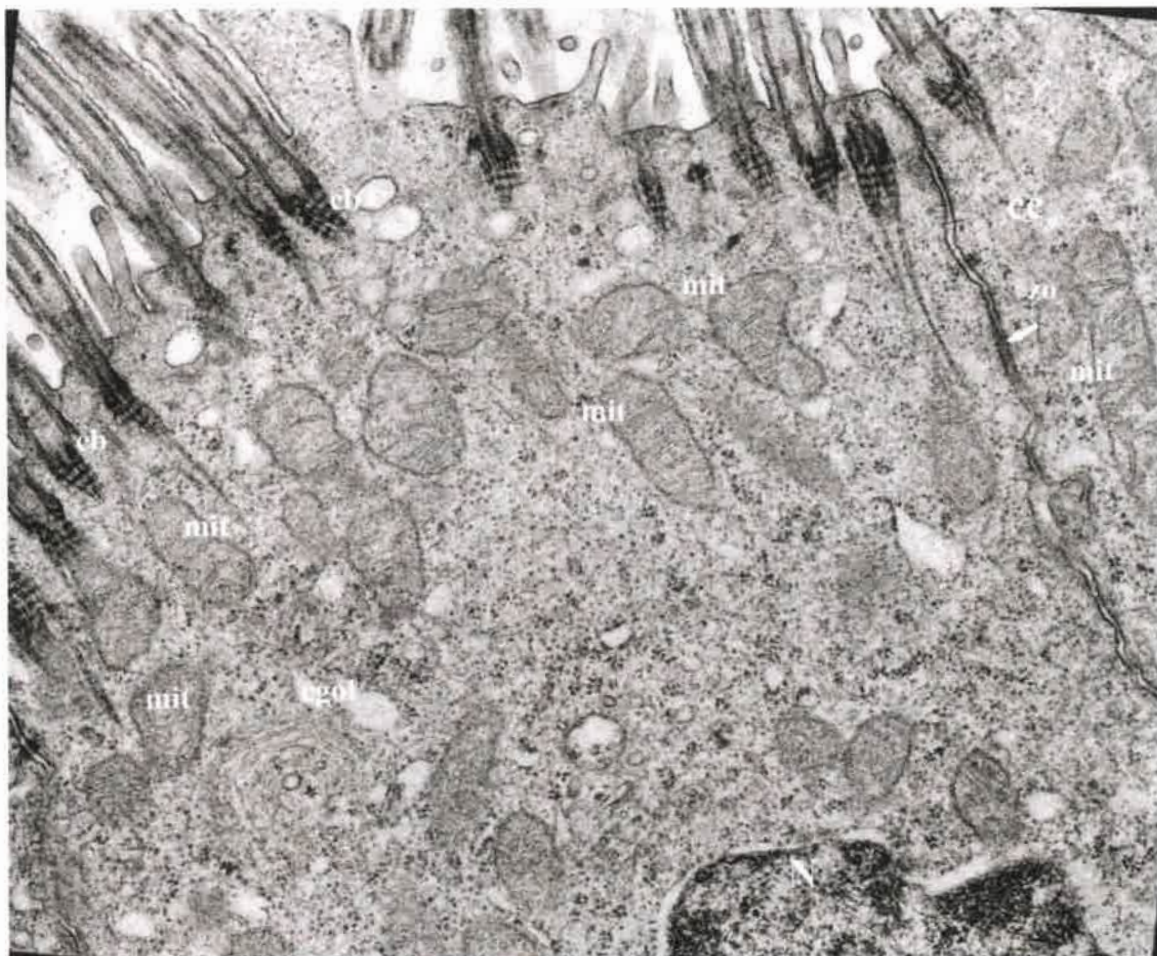
**Figura 39:**

Microscopía electrónica de transmisión (MET) del epitelio de la región del ámpula. Se observan los dos tipos de células típicas, ciliadas y secretorias. La apariencia pseudoestratificada del epitelio podría sugerirse por la disposición en diferentes estratos de los núcleos celulares, principalmente el ubicado en la esquina inferior derecha de la imagen. **cc**, célula ciliada; **cil**, cilias; **cs**, célula secretoria; **mv**, microvellosidades; **N**, núcleo; **cr**, heterocromatina; **mit**, mitocondria. Magnificación 4800X.



**Figura 40:**

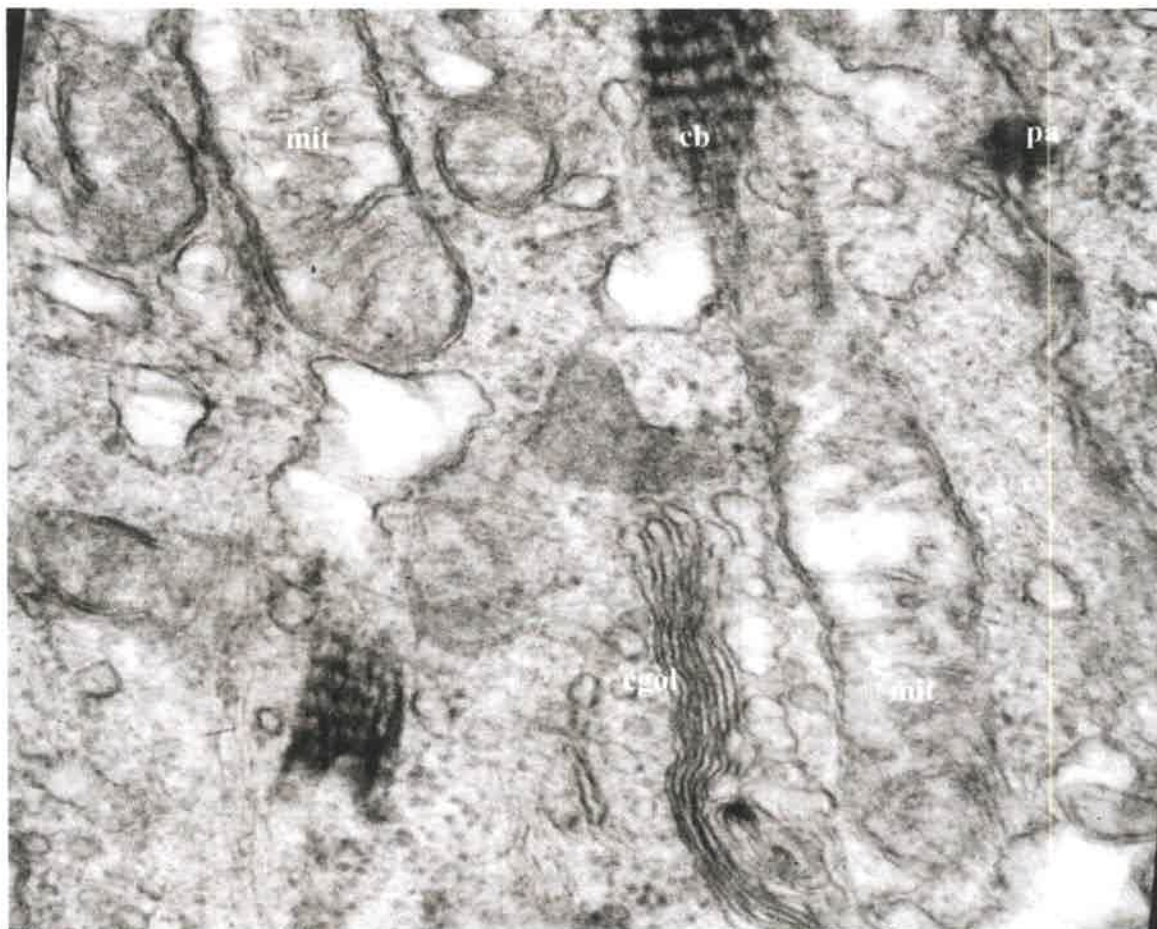
Microscopía electrónica de transmisión (MET) del epitelio oviductal durante la etapa de estro. **A**, se observan tres células ciliadas adyacentes, y diferentes uniones intercelulares. En el núcleo de una de ellas se visualiza nítidamente el nucléolo. **B**, imagen a mayor magnificación de una especialización tipo-desmosoma, *punctum adherens* (recuadro en A), donde se aprecia la zona de unión, y el estrecho espacio intercelular entre ambas membranas plasmáticas (**mp**). **cc**, célula ciliada; **cil**, cilias; **cs**, célula secretoria; **zo**, *zonula occludens*; **N**, núcleo; **cr**, heterocromatina; **nu**, nucléolo. Magnificación en A 3400X; en B 160500X.



**Figura 41:**

Microscopía electrónica de transmisión (MET) del epitelio oviductal en la región de la UAI en la etapa de estro.

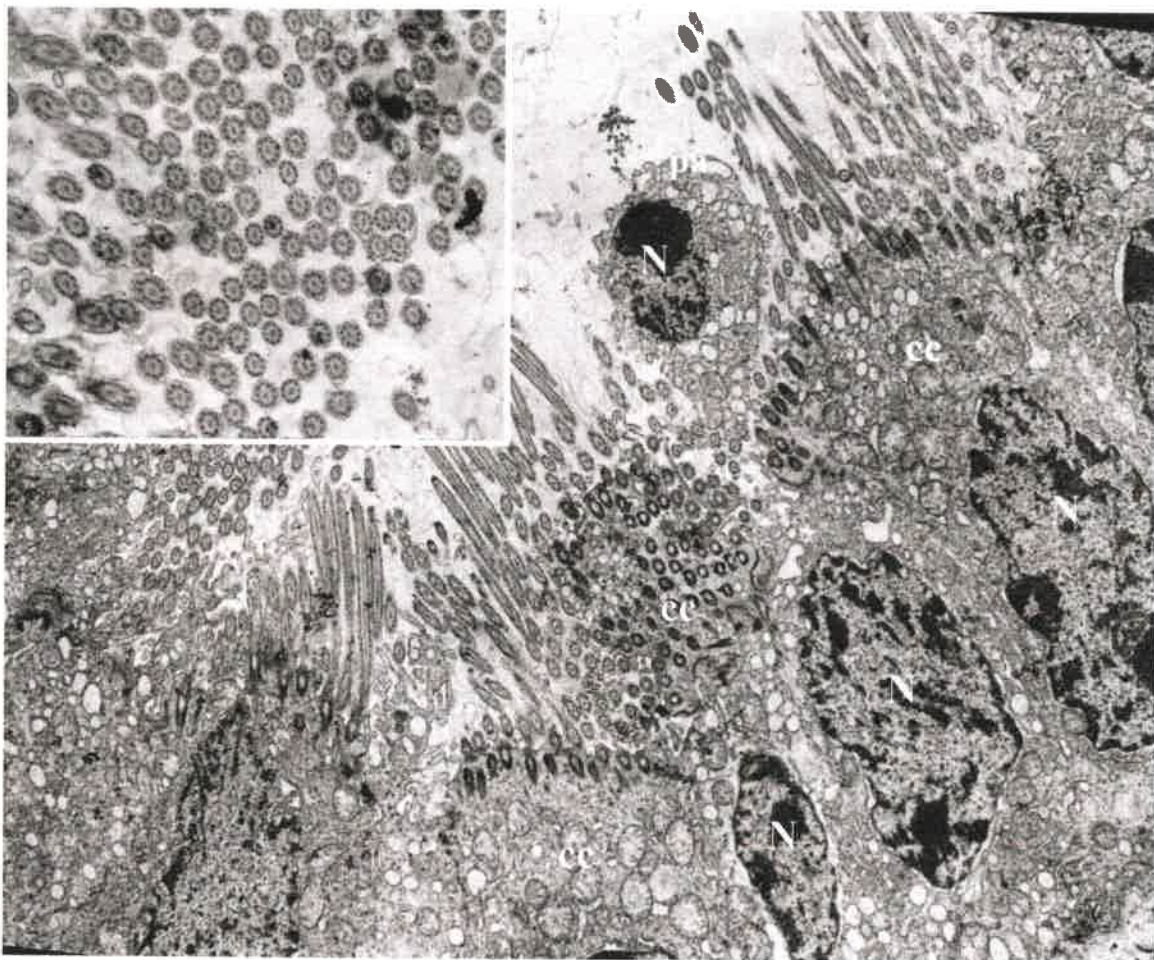
Múltiples mitocondrias ovoides y redondeadas ubicadas en la región supranuclear de una célula ciliada. La mayoría se orienta en sentido longitudinal, siguiendo el eje mayor de la célula. Se observa un complejo de Golgi con sus cisternas alargadas y curvadas, a cierta distancia del núcleo. En el origen de las ciliadas los cuerpos basales se observan como bandas transversales electro-densas. En la unión intercelular con la célula ciliada vecina se observan zonas oclusivas. **cc**, célula ciliada; **cil**, ciliadas; **zo**, *zonula occludens*; **mit**, mitocondrias; **N**, núcleo; **cgol**, complejo de Golgi; **cb**, cuerpo basal. Magnificación 12800X.



**Figura 42:**

Microscopía electrónica de transmisión (MET) del epitelio oviductal en la región de la UAI en la etapa de estro.

Un par de mitocondrias ovoides y elongadas dispersas en la matriz citoplasmática. Se observa un complejo de Golgi con sus cisternas apiladas, alargadas y onduladas en cercanía de una mitocondria. Un cuerpo basal, en forma de estrías transversales electro-densas, ocupa la base de una cilia. En la parte superior derecha se aprecia una especialización tipo-desmosoma (*punctum adherens*). **cgol**, complejo de Golgi; **mit**, mitocondria, **cb**, cuerpo basal; **pa**, *punctum adherens*. Magnificación 34300X.



**Figura 43:**

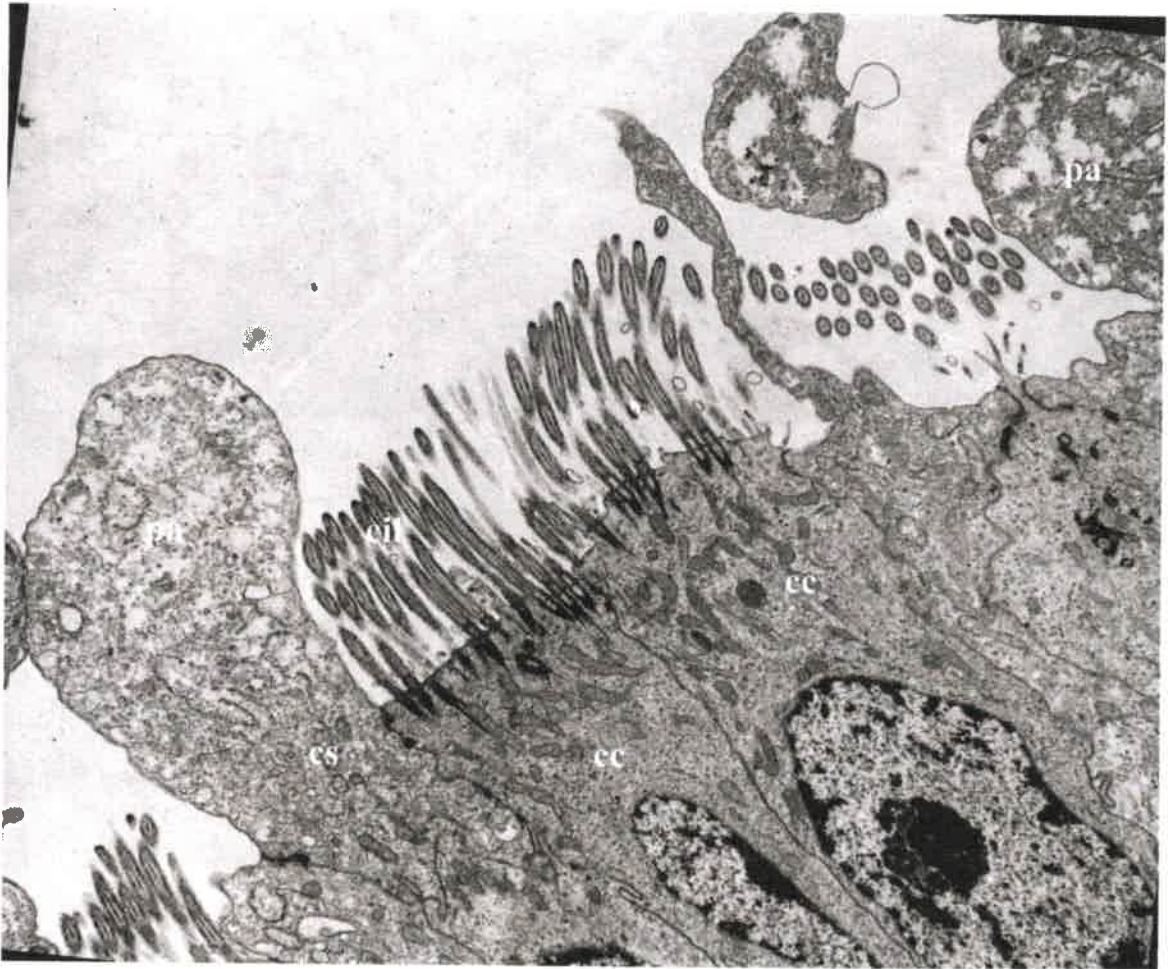
Microscopía electrónica de transmisión (MET) del epitelio oviductal en la región del istmo. Células ciliadas presentando abundantes ciliadas sobre sus superficies apicales. En el recuadro superior izquierdo, se visualiza a mayor aumento, la organización interna de los microtúbulos de las ciliadas cortadas transversalmente, ordenados en nueve pares periféricos y dos centrales (configuración 9+2). Se observa además, una célula secretoria protruyendo hacia el lumen entre dos células ciliadas, conteniendo el núcleo condensado, en proceso de degeneración, y con escaso citoplasma vacuolado. **cc**, célula ciliada; **cs**, célula secretoria; **N**, núcleo, **pa**, protrusión apical. Magnificación 3400X.



**Figura 44:**

Microscopía electrónica de transmisión (MET) del epitelio oviductal de la región de la UAI durante la etapa de estro.

Protrusión apical de una célula secretoria, sobrepasando la altura de la cilia adyacente (ubicada en la parte superior izquierda de la imagen). Se observan las pequeñas microvellosidades típicas sobre la superficie apical. Evidente presencia de gránulos de secreción dispersos en la matriz citoplasmática, con diferente electro-densidad, y contenido finamente granular. Algunas estructuras vesiculares se hallan agrupadas en el citosol celular. **mv**, microvellosidad; **cil**, cilia; **gs**, gránulo de secreción; **v**, vesícula. Magnificación 12800X.

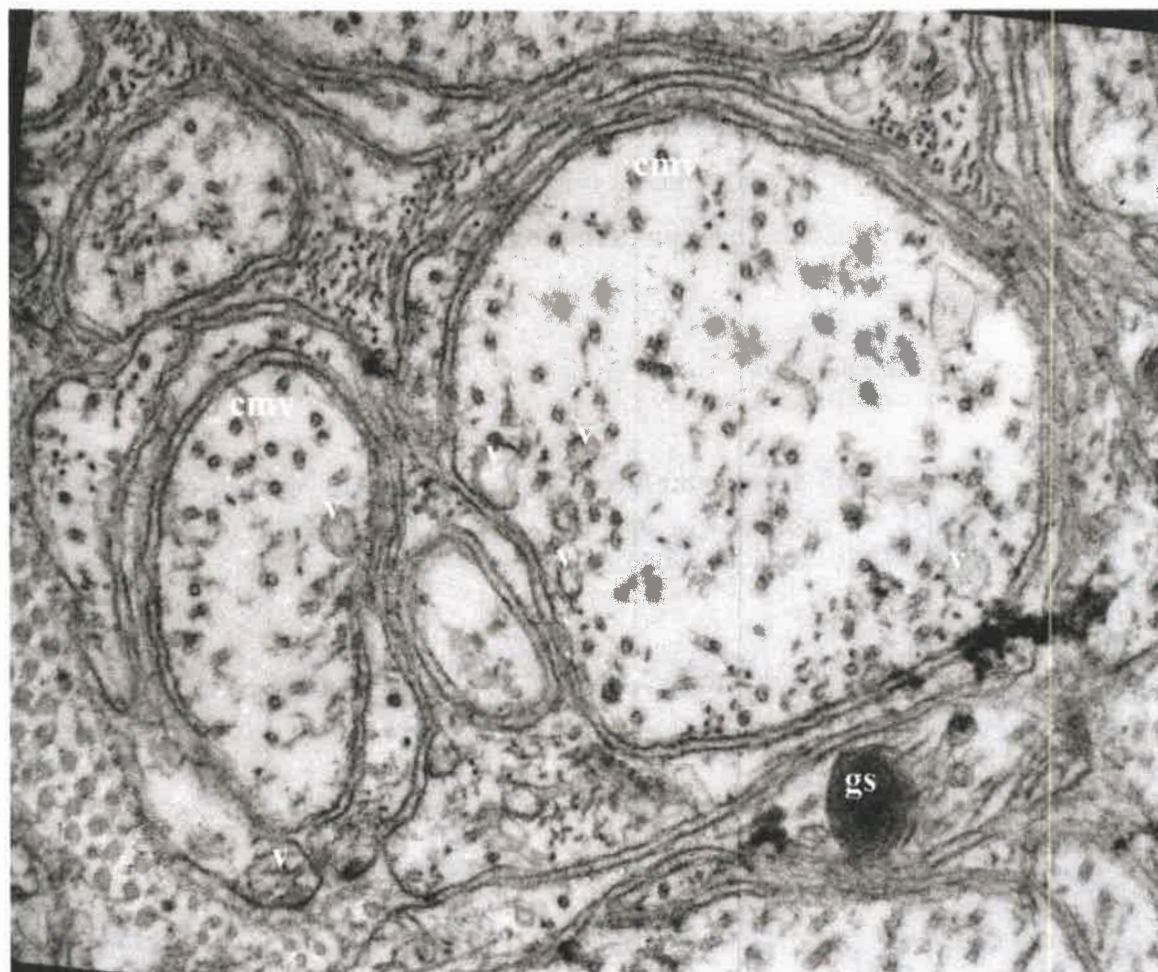


**Figura 45:**

Microscopía electrónica de transmisión (MET) del epitelio oviductal de la región del ámpula durante la etapa de estro.

Protrusión citoplasmática en una célula secretoria, donde la superficie apical sobrepasa notablemente la altura de las ciliadas adyacentes. Algunas estructuras vesiculares se hallan agrupadas en el citoplasma celular. **cs**, célula secretora; **cc**, célula ciliada; **cil**, cilia; **pa**, protrusión apical; **v**, vesícula. Magnificación 3400X.





**Figura 46:**

Microscopía electrónica de transmisión (MET) del epitelio oviductal de la región del ámpula durante la etapa de estro.

Estructuras vesiculares de gran tamaño recubiertas por membranas, conteniendo pequeñas vesículas internas, y material de aspecto granular disperso, posiblemente de tipo secretorio. Dichas formaciones son compatibles con los denominados cuerpos multivesiculares. **cmv**, cuerpo multivesicular; **gs**, gránulo de secreción; **v**, vesícula. Magnificación 34300X.

## 6.6. RESERVORIOS DE ESPERMATOZOIDES EN EL OVIDUCTO

En el apartado “Materiales y Métodos”, **Recolección de semen e Inseminación Artificial**, (punto 4.6.1), **Tabla 2**, se presentan de manera resumida, las características generales de la recuperación de tejido oviductal con el objetivo de evaluar el reservorio espermático (RE) en el oviducto de la yegua. En relación directa a la información brindada en el mencionado apartado (y tabla) correspondiente, los hallazgos observados respecto a las células espermáticas fueron variables e inconstantes, principalmente debido al tiempo de recuperación y evaluación de las muestras obtenidas post-IA (**Tabla 8**).

**Tabla 8**

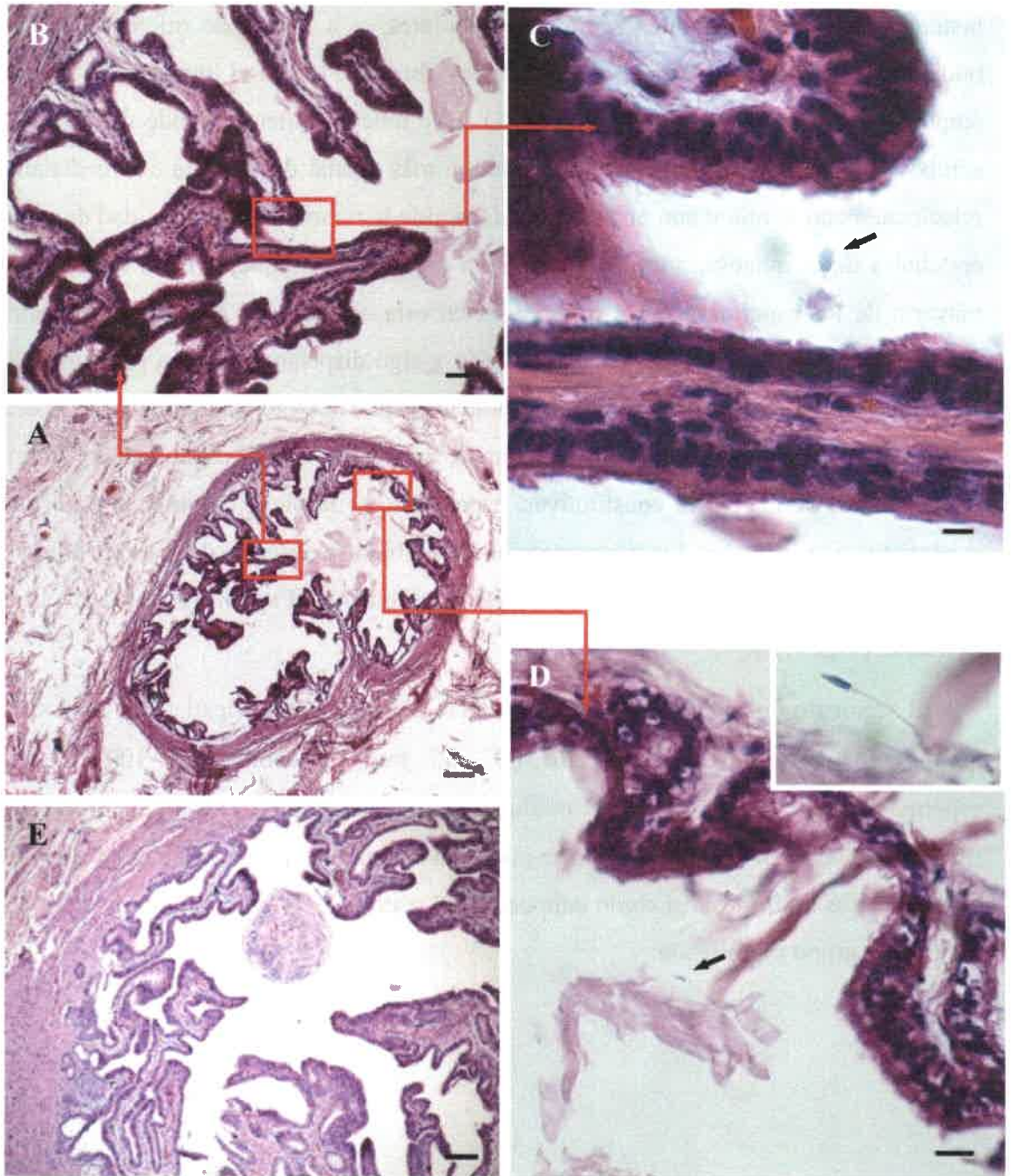
Características y cronología de la recuperación de espermatozoides a partir de oviductos de yeguas inseminadas artificialmente (IA).

Recuperación de espermatozoides en oviductos de yeguas post-IA							
Mes / Año	Diciemb 2011	Agosto 2012	Diciemb 2012	Diciemb 2013	Enero 2014	Enero 2015	Febrero 2015
Yeguas IA (n)	n= 3	n=1	n=1	n=1	n=3	n=1	n=1
Etapa	Estro	Anov	Estro	Estro	Estro/ Po	Estro	Estro
Muestreo post-IA (hs)	± 36	± 18	± 20	± 8	± 72	± 5,5	± 12
Oviductos recup.(n)	n= 6	n=2	n=2	n=2	n=2	n=1	n=1
Origen muestra	Frigoríf.	Cirugía	Frigoríf.	Cirugía	Frigoríf.	Cirugía	Post Mortem.
Lado muestreo	Bi	Bi	Bi	Bi	Bi	Ipsi	Cont
Resultado recup. spz	+	-	-	++	-	+++	++
Lado / Región con spz	Ipsi U	-	-	Ipsi-Cont I-U-A	-	Ipsi I/A	Cont I/A
Método visualización	MO	MO MEB	MO MEB	MO MEB	MO LAV	IMP MFI MEB	MEB
Relación spz y céls epit	L	-	-	Adh	-	Adh	Adh

**Anov**, anovulatoria; **Po**, posovulatoria; **Bi**, bilateral, **Ipsi**, ipsilateral al folículo dominante preovulatorio; **Cont**, contralateral al folículo dominante preovulatorio; **A**, región del ampulla; **I**, región del istmo; **U**, región de la unión ampulla-istmo; **MO**, microscopía óptica; **MEB**, microscopía electrónica de barrido; **LAV**, lavaje intraluminal; **IMP**, impronta; **MFI**, microscopía de fluorescencia; **L**, espermatozoides (spz) libres en el lumen (sin contacto con el epitelio); **Adh**; espermatozoides en contacto con las cilias o microvellosidades de las células epiteliales del oviducto, **+**, escasos espermatozoides; **+++**, abundante cantidad de espermatozoides; **-**, sin espermatozoides.

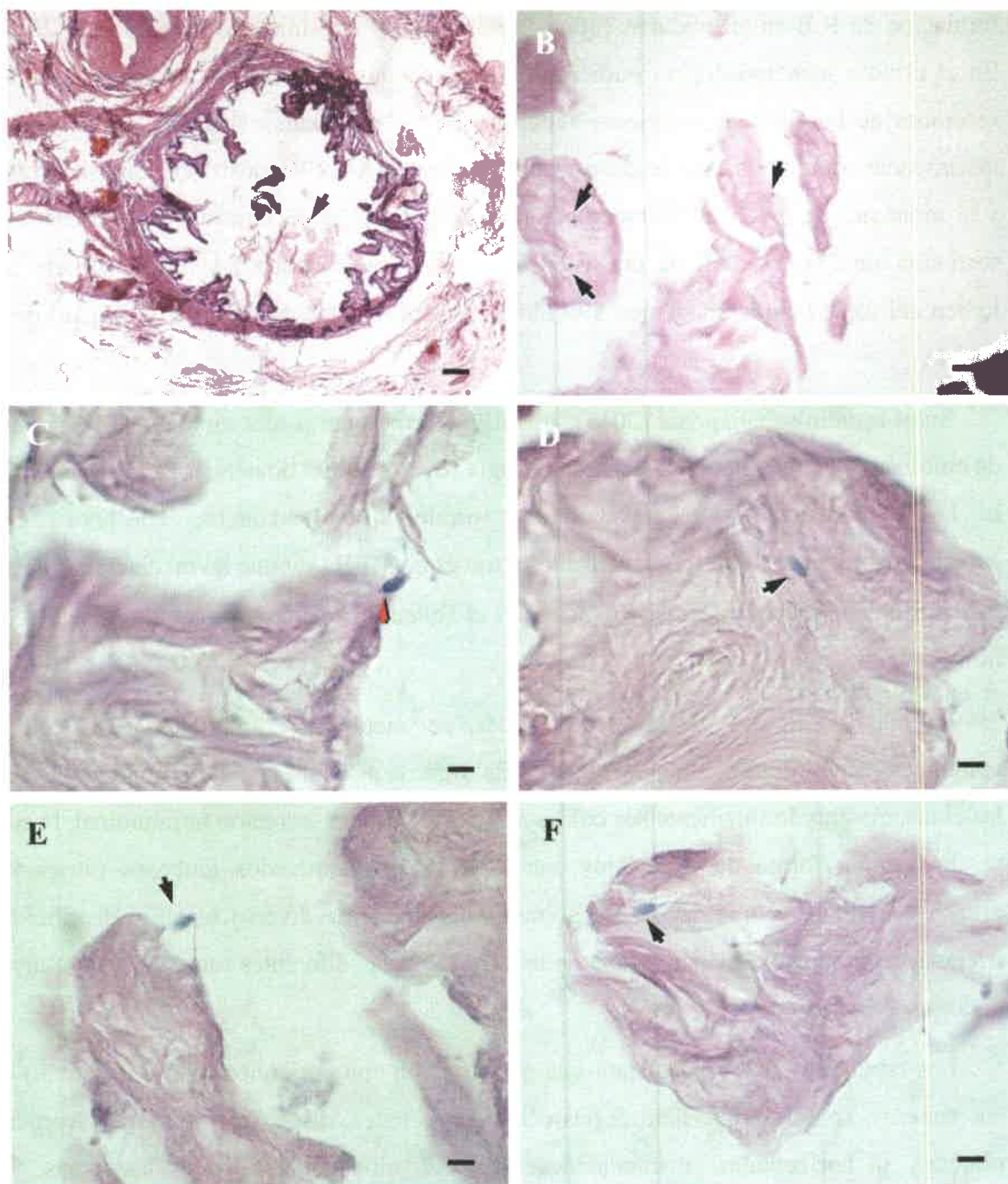
Durante los primeros muestreos (año 2011), mediante la evaluación de secciones histológicas de los diferentes segmentos tubulares, y a través de microscopía óptica, pudieron identificarse escasos espermatozoides libres ( $n=12$ ) en el lumen de la región del ámpula de un solo oviducto ( $1/6 = 16,7 \%$ ). Este único segmento, donde fueron halladas células espermáticas, correspondía a la porción más caudal del ámpula e inmediatamente relacionada con la unión con el istmo (UAI), donde la ramificación y cantidad de pliegues epiteliales de la mucosa, aún no se mostraba demasiado compleja (**Figs. 47 y 48A**). La mayoría de los espermatozoides observados en esta oportunidad (92 %), se encontraron relacionados con un material amorfo, acidófilo y algo disperso; o junto a restos de células epiteliales libres presentes en la luz del oviducto (**Fig. 47**). Prácticamente todas las células espermáticas se encontraron inmersas en la sustancia mencionada, siendo difícil la identificación de las partes constitutivas, especialmente la pieza intermedia y la cola del espermatozoide (**Fig. 48**). En ciertas ocasiones, también se observó, de manera indirecta, la presencia de masas colágeno-celulares en estrecha relación al epitelio o libres en el lumen oviductal (**Fig. 47E**).

El segmento indicado pertenecía al oviducto del mismo lado (ipsilateral) al ovario con el folículo dominante preovulatorio ( $\emptyset \geq 35$  mm) y contuvo el 100 % de los espermatozoides observados. En el oviducto contralateral de la misma yegua inseminada (evaluada a las  $\pm 36$  hs. post-IA), no se pudieron encontrar espermatozoides en ninguno de los segmentos revisados; así como tampoco en el resto de oviductos de las restantes yeguas del mismo grupo muestreado.



**Figura 47:**

Microfotografías de la región del ampulla durante la etapa de estro (yegua IA). A, sección histológica del ampulla (craneal a su unión con el istmo), mostrando escasos pliegues epiteliales y material amorfo en el lumen (flecha); B y C imágenes magnificadas de A, donde se observa un espermatozoide (flecha) junto a restos de células y entre dos pliegues epiteliales; D, porción magnificada de imagen A, donde se observa un espermatozoide cortado longitudinalmente (flecha) en proximidades de material amorfo. En el recuadro superior derecho se presenta a mayor aumento; E, masa colágeno-celular en el lumen del ampulla cercana al endosalpinx (100X). Barra de escala en A y D indica 100 $\mu$ m; en B, 20 $\mu$ m; C, 5 $\mu$ m; D, 100 $\mu$ m; y E, 10 $\mu$ m. Tinción de hematoxilina y eosina. Magnificación en A, 25X; B y E, 100X; C, 1000X; y D, 400X.



**Figura 48:**

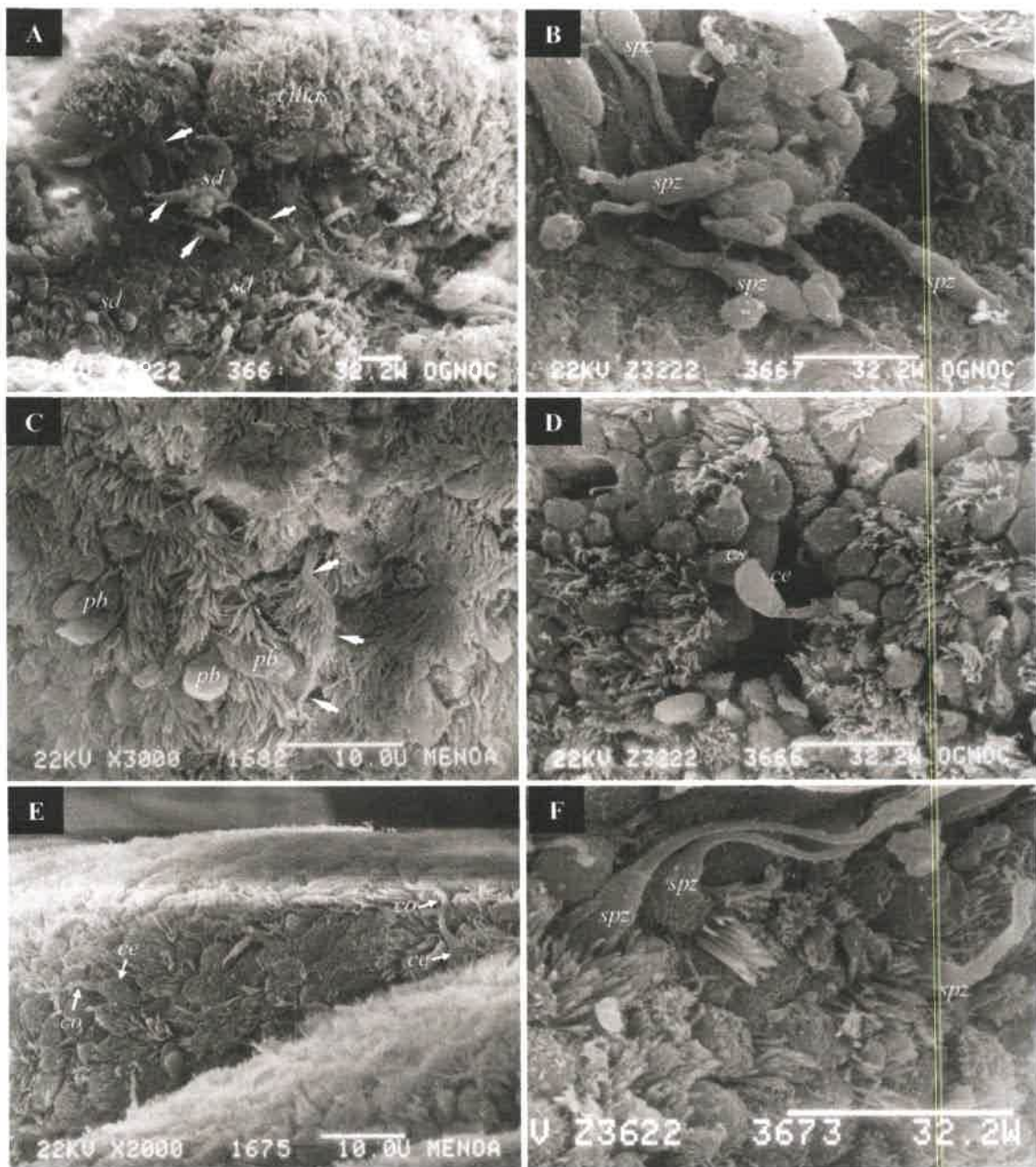
Microfotografías de la región del ámpula durante la etapa de estro (yegua IA). **A**, sección del ámpula (craneal a su unión con el istmo), con material amorfo en su lumen (flecha); **B**, espermatozoides incluidos en las masas (flechas indican las cabezas espermáticas); **C**, espermatozoide donde se aprecia su pieza intermedia (cabeza de flecha); **D**, cabeza de un espermatozoide; **E**, célula espermática con su cola doblada, en contacto con una masa colágena; **F**, imagen donde muestra un espermatozoide completo (cabeza, pieza intermedia y cola), inmerso en material amorfo. Barra de escala en A indica 100 $\mu$ m; en B, 20 $\mu$ m, en C, D, E y F indica 5 $\mu$ m. Tinción de hematoxilina y eosina. Magnificación en A, 25X; B, 400X, C, D, E y F, 1000X.

Con el propósito de continuar investigando la ubicación de los espermatozoides y la formación de R.E en el oviducto equino, se realizaron muestreos posteriores (año 2012). En el estudio mencionado, no pudieron hallarse células espermáticas en ninguna de las secciones de las diferentes regiones tubulares de los oviductos evaluados de las yeguas inseminadas (durante la fase de estro y anovulatoria, ~18 – 20hs post-IA). En esta última, y al momento de practicar la intervención quirúrgica, se pudo observar una descarga de secreción muco-purulenta, de consistencia filante, que ocupaba además una parte del lumen del útero (fluido ecogénico a la ultrasonografía) y una porción de la cavidad de la vagina.

En el estudio subsiguiente (2013), se hallaron espermatozoides en algunos segmentos de ambos oviductos obtenidos mediante cirugía (ovariectomía bilateral). El intervalo entre la IA–recuperación de tejido oviductal, osciló aproximadamente  $\pm 8$  horas. Los espermatozoides pudieron ser visualizados a través de MEB (aunque no mediante MO), del lado ipsilateral y contralateral al ovario con el folículo dominante preovulatorio ( $\emptyset \geq 35$  mm).

La mayoría de las células espermáticas, se encontraron adheridas a las células epiteliales, tanto ciliadas como secretorias. En algunas ocasiones se hallaron ocultos entre las ciliadas, mostrando solamente sus colas, y/o mezclados con secreción intraluminal, la cual se dispuso en forma de filamentos entrelazados; conglomerados globosos (atrapando grupos de ciliadas); u organizados en gránulos dispersos, de diverso tamaño, distribuidos irregularmente por toda la superficie epitelial y sobre las diferentes regiones constitutivas de los espermatozoides (**Fig. 49**).

Los espermatozoides visualizados se posicionaron con la porción rostral (o lateral) de sus cabezas, sobre la superficie de las células epiteliales, dispuestos de manera vertical, oblicuos u horizontales, manteniéndose de ese modo adheridos a las ciliadas y/o microvellosidades de las células secretoras (**Fig. 49**). Debido a la escasa cantidad de células espermáticas observadas mediante MEB, no se realizó un análisis estadístico para determinar diferencias entre ambos oviductos.



**Figura 49:**

Microscopía electrónica de barrido (MEB) de la región del istmo, unión ámpula-istmo (UAI) y ámpula.

**A**, región del istmo donde se observan algunos espermatozoides (*flechas*) adheridos a células secretorias y secreción dispersa (*sd*); **B**, imagen a mayor magnificación de A (istmo), donde se aprecian espermatozoides (*spz*) incompletos (cortados); **C**, región de la UAI con un espermatozoides inmerso y rodeado por las ciliadas de varias células epiteliales. Se puede observar su cola libre (*flecha*) y algunas protrusiones bulbosas (*pb*) proyectándose hacia el lumen; **D**, contacto lateral de la cabeza espermática (*ce*) con una célula secretora (*cs*) en el epitelio del istmo; **E**, espermatozoides (completos) adheridos a las células ciliadas del endosalpinx de la UAI. Se observan la región de la cabeza espermática (*ce*), y colas completas (*co*) en ambos espermatozoides; **F**, región del ámpula con espermatozoides (*spz*) adheridos íntimamente al epitelio a través de la porción rostral de la cabeza. Magnificación en A, 1000X; B, C y D 3000X; E, 2000X; F 6000X, respectivamente.

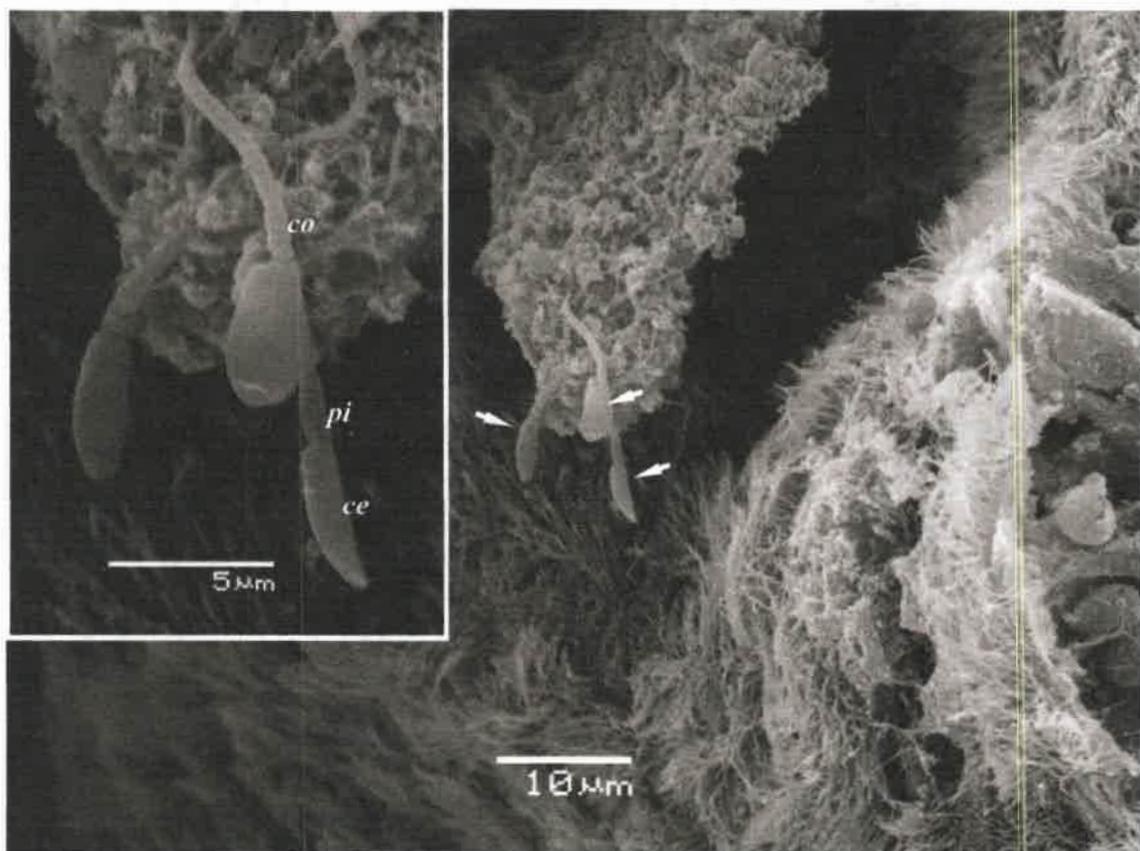
A posteriori de nuevos intentos fallidos y resultados negativos (año 2014); en el año 2015 se hallaron células espermáticas en diferentes regiones tubulares del oviducto. En esta oportunidad, el tejido obtenido de las yeguas muestreadas correspondió, en un caso al oviducto ipsilateral y en otro al oviducto opuesto (contralateral) en relación al folículo dominante preovulatorio. Las yeguas fueron muestreadas mediante diferentes métodos y tiempos de recuperación; y las técnicas empleadas para la visualización de los espermatozoides, en cada caso y según las disponibilidades, no fueron las mismas (ver **Tabla 8**).

A partir de la muestra obtenida (oviducto contralateral, *post mortem*) de una yegua pudieron observarse escasos espermatozoides a través de MEB, pero no mediante microscopía óptica convencional. Todos los espermatozoides se mostraron de forma íntegra, observándose de manera clara y detallada cada una de sus partes constitutivas.

En esta oportunidad, pudo apreciarse nuevamente abundante cantidad de secreción amorfa, de aspecto filamentosos, vinculada estrechamente con las células espermáticas, formando en muchas oportunidades un entrelazado, principalmente con las colas de las células espermáticas. Las cabezas de los escasos espermatozoides hallados, en todos los casos se orientaron hacia la superficie ciliada del epitelio oviductal. A pesar de ello, no pudo ser visualizado un contacto íntimo entre estas proyecciones especializadas (cilias y microvellosidades) del endosalpinx (**Fig. 50 y 51**).

El segmento del oviducto que contuvo todas las células espermáticas, fue únicamente la región del istmo caudal, próximo a la UUT. En las restantes regiones tubulares evaluadas (unión ampulla-istmo, y ampulla) no se encontraron espermatozoides a través de las técnicas empleadas propuestas.

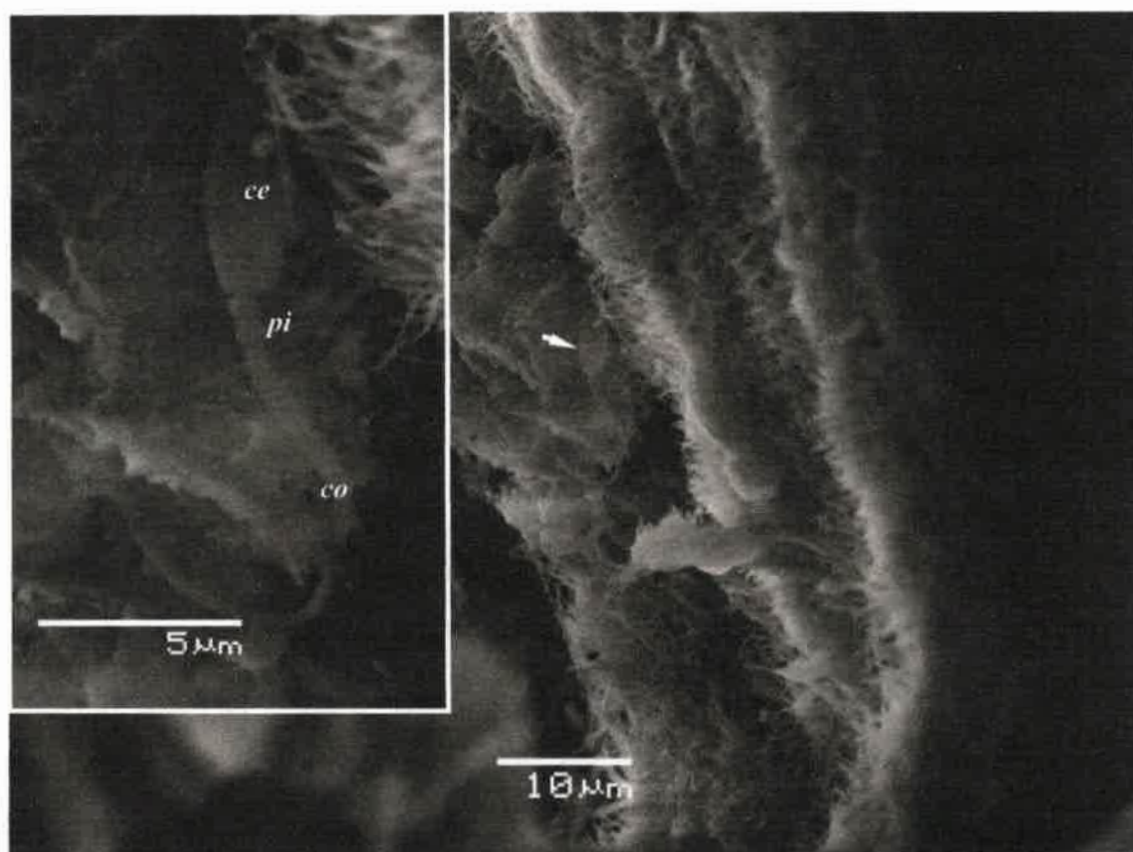




**Figura 50:**

Microscopía electrónica de barrido (MEB) de la región del istmo en proximidades con la UUT (papila oviductal) durante la etapa de estro. La imagen muestra espermatozoides (*flechas*) suspendidos desde sus colas, y parcialmente inmersos en una secreción filamentososa y amorfa, adherida sobre el endosalpinx ciliado. En la imagen magnificada (superior izquierda) se observan con detalle las diferentes partes constitutivas de los espermatozoides. (*ce*) cabeza espermática; (*pi*) pieza intermedia; (*co*) cola del espermatozoide.

*Nota: la imagen corresponde a una muestra obtenida de una yegua post-mortem (aproximadamente 12hs) después de realizada la IA. La muerte súbita del animal, impidió llevar a cabo la intervención quirúrgica programada (Transferencia intraoviductal de ovocitos madurados in vitro). Muestra cedida por la MV. Casteñeira C.*



**Figura 51:**

Microscopía electrónica de barrido (MEB) de la región del istmo en proximidades con la UUT (papila oviductal) durante la etapa de estro. Se observa un espermatozoide (*flechas*) parcialmente incluido dentro de una sustancia amorfa, en relación a un pliegue epitelial ciliado. En la imagen magnificada (superior izquierda) se observan con detalle las diferentes partes constitutivas de los espermatozoides. (*ce*) cabeza espermática; (*pi*) pieza intermedia; (*co*) cola del espermatozoide.

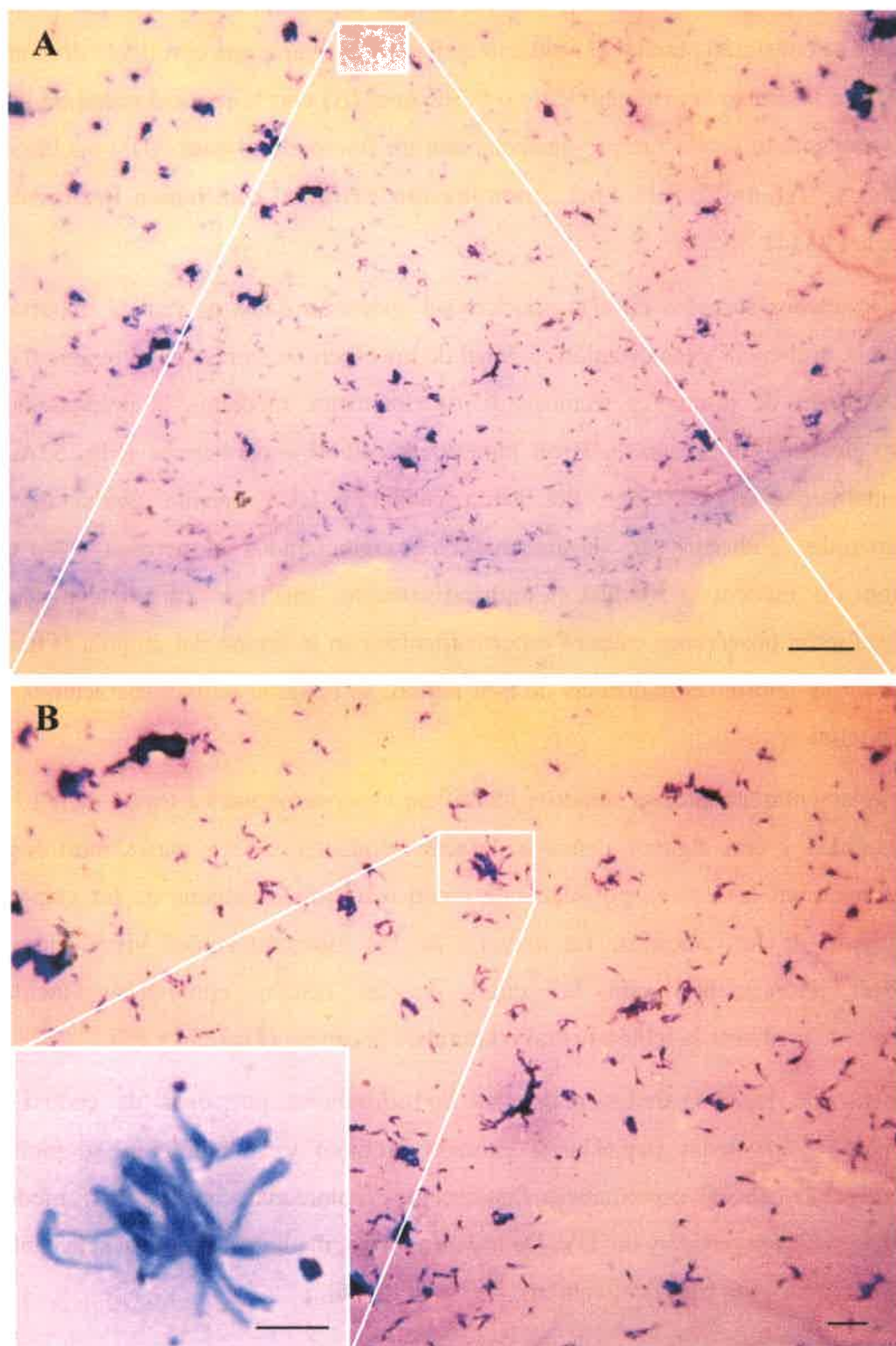
*Nota: la imagen corresponde a una muestra obtenida de una yegua post-mortem (aproximadamente 12hs) después de realizada la IA. La muerte súbita del animal, impidió llevar a cabo la intervención quirúrgica programada (Transferencia intraoviductal de ovocitos madurados in vitro). Muestra cedida por la MV. Casteñeira C.*

En el último muestreo realizado, a través de una laparotomía efectuada por el flanco (unilateral), se consiguió obtener el oviducto ipsilateral al ovario con el folículo dominante, de una yegua inseminada artificialmente (~5,5hs post IA) con la particularidad de que la dosis inseminante utilizada fue pre-incubada con un fluorocromo para ADN nuclear (**ver Materiales y Métodos, punto 4.6.2. Inseminación Artificial con Semen Pre-incubado con Hoechst 33342<sup>®</sup>**).

Los resultados surgidos en esta oportunidad aportaron datos de radical importancia respecto a la residencia y localización regional de los espermatozoides en el oviducto de la yegua. A través de diferentes técnicas, y principalmente mediante la preparación de improntas de endosalpinx, se hallaron numerosas células espermáticas (**Fig. 52A, B**), fundamentalmente en la región del istmo caudal y UUT (papila oviductal). Los espermatozoides pudieron ser visualizados en conglomerados numerosos y en gran proporción de manera individual. Comparativamente, mediante esta nueva técnica empleada, fueron observados escasos espermatozoides en la región del ampulla (**Fig. 53**). Además, en las improntas realizadas de esta región, se hallaron numerosos acúmulos de células epiteliales.

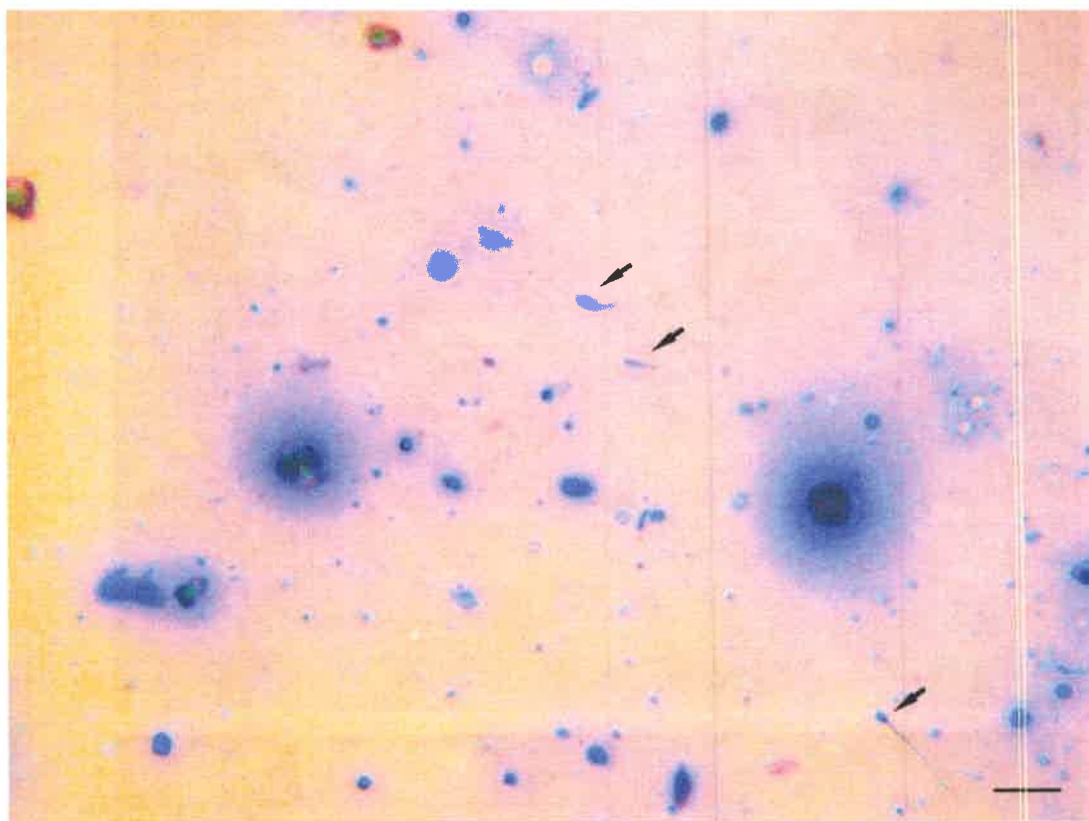
Complementariamente, se pudieron identificar espermatozoides a través de MEB, en menor cantidad y con algunos daños o defectos evidentes en sus partes morfológicas (principalmente en las colas), posiblemente como resultado de alguna de las etapas del procesamiento de las muestras. La mayoría de los espermatozoides visualizados, se encontraron interactuando con las cilias de las células epiteliales, vinculados principalmente mediante la región rostral o lateral de la cabeza (**Figs. 54 y 55**).

A partir de los preparados realizados con diminutas porciones de endosalpinx comprimidas o aplastadas (squashing) entre portaobjeto y cubreobjetos, se pudieron observar algunas cabezas espermáticas fluorescentes (coloreadas con Hoechst), mediante microscopía óptica invertida y luz UV. De todas maneras, mediante esta técnica la cantidad de espermatozoides fue significativamente menor (**Fig. 56**).



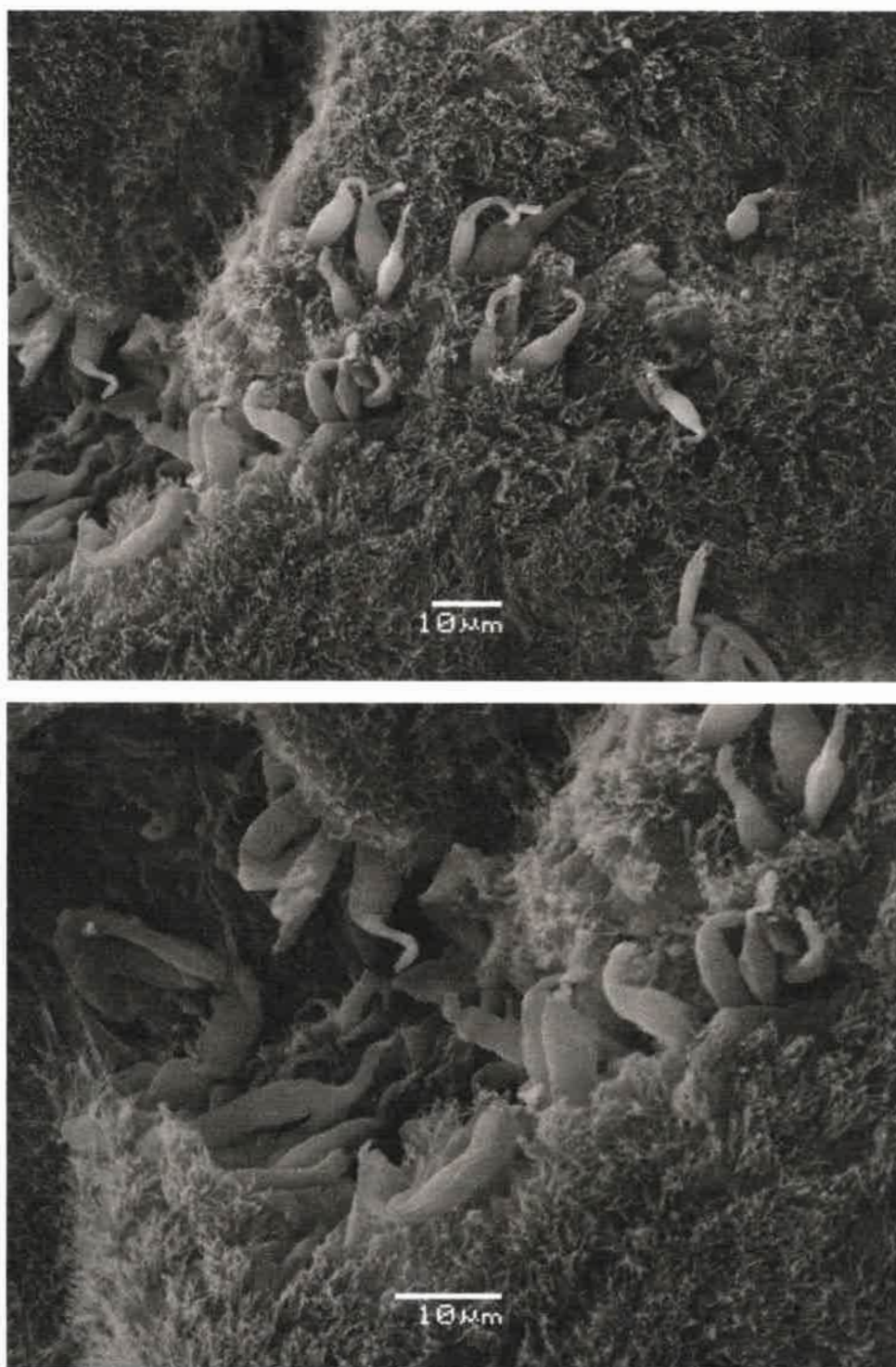
**Figura 52:**

Microfotografías de improntas del endosalpinx del istmo durante la etapa de estro (yegua 1A). **A**, numerosos espermatozoides diseminados en forma individual y en grupos (recuadro) en el istmo caudal; **B**, imagen magnificada de la misma porción del oviducto, donde se observa aproximadamente una quincena de espermatozoides aglomerados (recuadro inferior izquierdo). Barra de escala en A, indica 50 $\mu$ m; en B, 20 $\mu$ m, en recuadro (inferior izquierdo) de B, indica 5 $\mu$ m. Tinción 15 (Biopur<sup>®</sup>). Magnificación en A, 25X; B, 100X, y recuadro inferior izquierdo de B, 1000X.



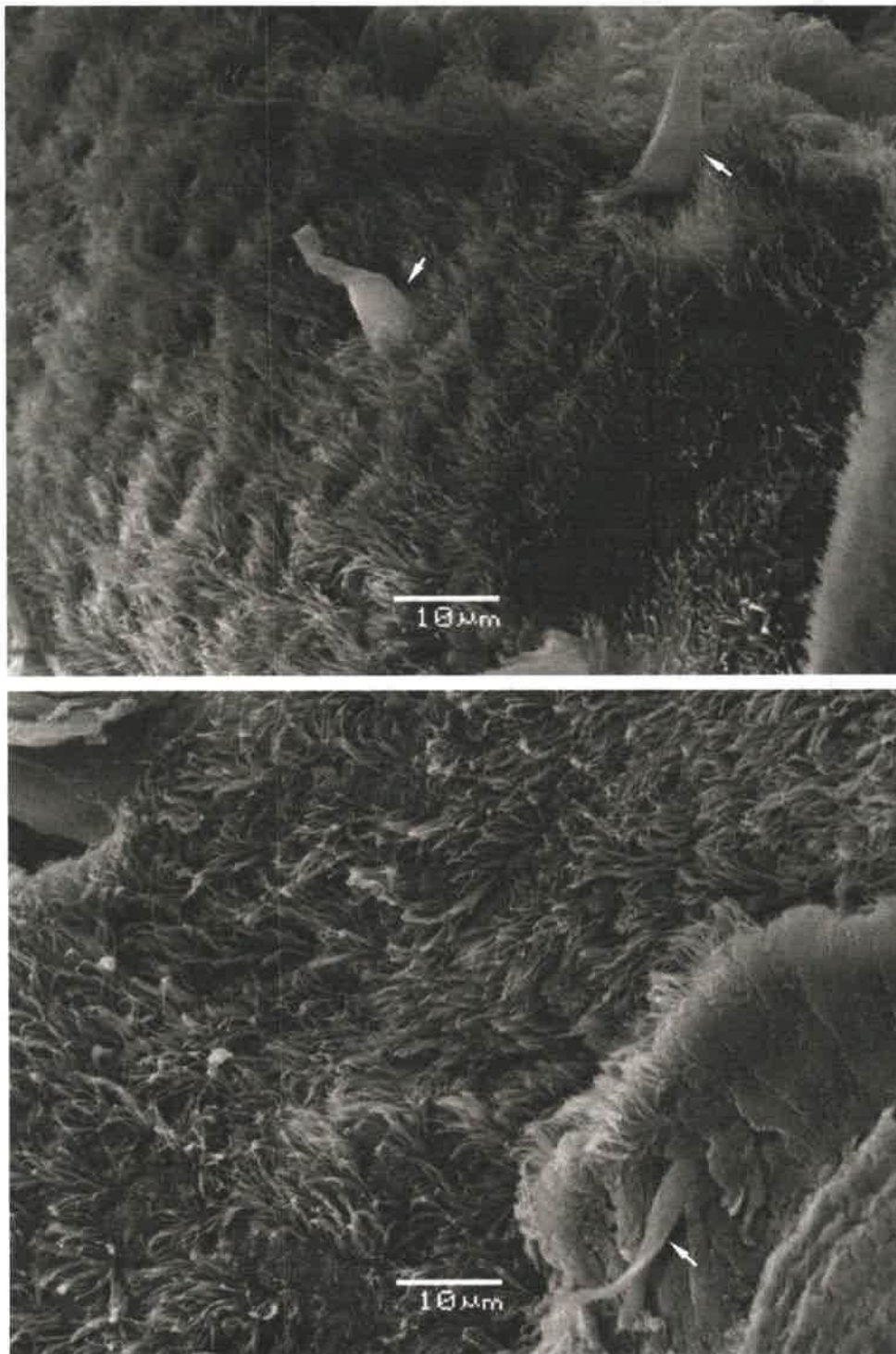
**Figura 53:**

Microfotografía de una impronta del endosalpinx del ámpula durante la etapa de estro (yegua IA). Se observan escasas células espermáticas dispersas e individuales (flechas) en cercanía de restos de células epiteliales. Barra de escala indica 20 $\mu$ m. Magnificación 400X. Tinción 15 (Biopur<sup>®</sup>).



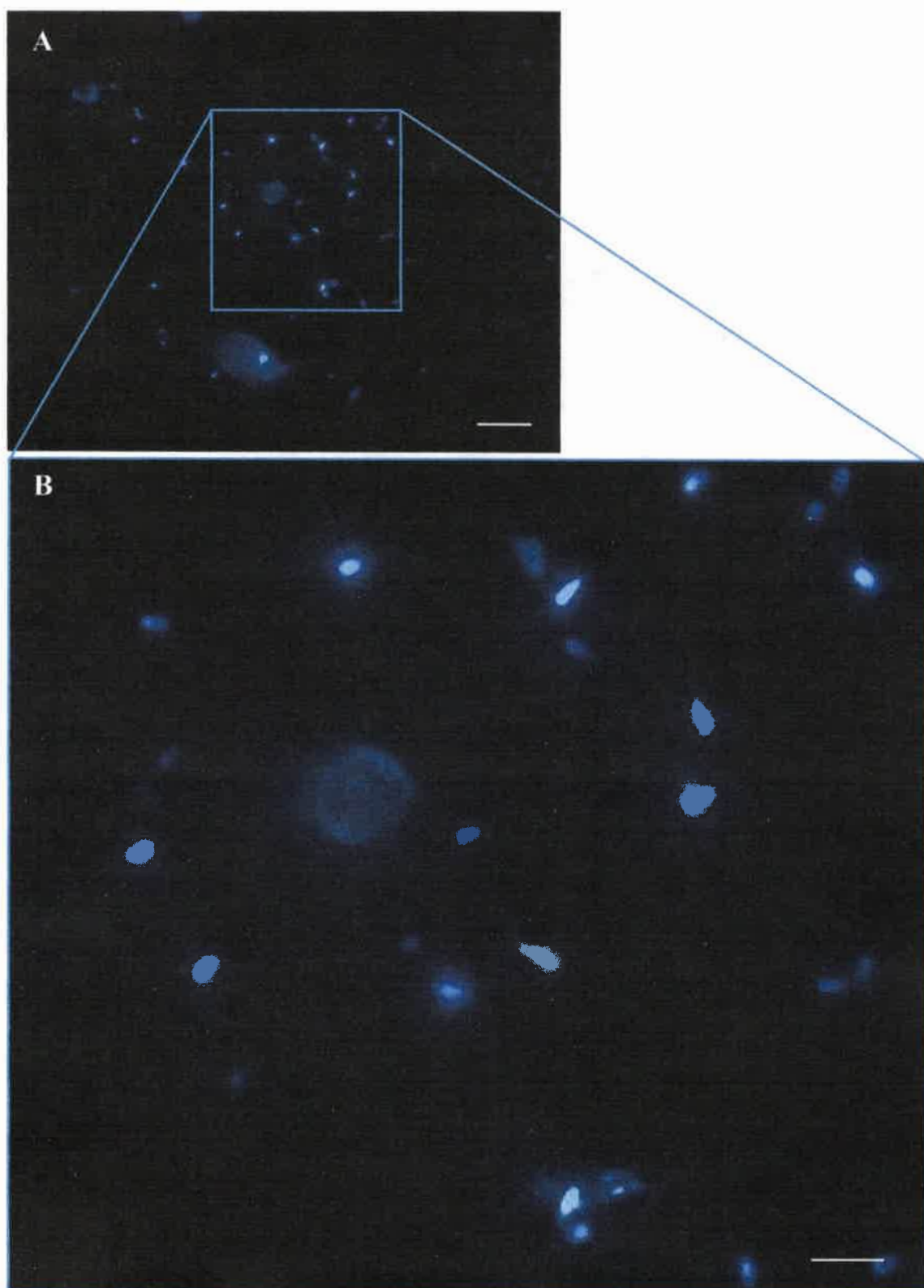
**Figura 54:**

Microscopía electrónica de barrido (MEB) del endosalpinx del istmo caudal durante la etapa de estro (yegua IA). Se observan numerosos espermatozoides interactuando estrechamente a través de sus cabezas con las células epiteliales ciliadas. La mayoría de las células espermáticas presentaron la cola incompleta o dañada, posiblemente durante alguna etapa del procesamiento de las muestras de tejido oviductal.



**Figura 55:**

Microscopía electrónica de barrido (MEB) del endosalpinx de la región del ámpula, durante la etapa de estro (yegua IA). En la imagen superior, se observan dos espermatozoides (flechas; uno con la cola incompleta), inmersos entre las ciliadas de las células epiteliales a través de la parte rostral de sus cabezas. La imagen inferior muestra un espermatozoides (flecha) posicionado lateralmente con su cabeza sobre el endosalpinx.



**Figura 56:**

Microfotografía óptica invertida con epifluorescencia, a partir de una delgada lámina (squashing) de mucosa del istmo caudal, durante la etapa de estro (yegua IA con semen pre-incubado con Hoechst 33342<sup>®</sup>). A. Se observan numerosas cabezas espermáticas dispersas y fluorescentes cuando son excitadas con luz UV. B, muestra a mayor magnificación de las cabezas de los espermatozoides, cuyo ADN incorporó previamente el fluorocromo nuclear. Barra de escala en A, indica 50 $\mu$ m., en B, 10 $\mu$ m.



---

**CAPÍTULO VII**  
**DISCUSIÓN, CONCLUSIONES**  
**y PERSPECTIVAS FUTURAS**

---

## **7.1. DISCUSIÓN GENERAL**

---

### **7.1.1. Organización histomorfológica, tridimensional y biométrica de la mucosa oviductal de la yegua.**

El ambiente más adecuado para que ocurra el desarrollo embrionario temprano, y otros eventos reproductivos críticos y de vital importancia, como el transporte y maduración de gametos, capacitación espermática, fertilización y la comunicación materno-embionaria inicial, es el lumen oviductal. Para lograr comprender la complejidad de este microambiente dinámico, donde múltiples señales endócrinas, parácrinas, autócrinas y vías biosintéticas, orquestan todos estos fenómenos reproductivos de manera delicada, es imperioso y fundamental entender diversas características morfofuncionales del órgano, entre ellas las vinculadas a su arquitectura macro y microscópica, así como la ultraestructura de sus diferentes porciones constitutivas, las cuales, finalmente, cumplen roles específicos en cada uno de estos acontecimientos. De la misma manera, para poder recrear modelos de estudio *in vitro* y comprender minuciosamente las diversas funciones de este órgano, es esencial conocer en detalle sus aspectos morfológicos.

Principalmente y en estrecha relación a la mucosa oviductal, que delimita el sofisticado microambiente luminal, se llevan a cabo los mencionados eventos reproductivos, y es por ello, que el presente trabajo de tesis se ha enfocado en el estudio morfológico (y en parte funcional) de esta capa o túnica del oviducto de la yegua, a lo largo de sus diferentes regiones y en diversas etapas reproductivas.

Como fue detallado en los “Resultados”, a través de microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido y de transmisión, como así también la preparación de moldes tridimensionales (3D) del lumen, se lograron describir los detalles más conspicuos relativos a la organización –bi y tridimensional– de la mucosa oviductal de la yegua.

La anatomía macroscópica del oviducto de numerosas especies de mamíferos domésticos ha sido ampliamente documentada (Barone, 2001). De manera similar a lo que ocurre en la cerda, vaca, oveja, cabra y otros mamíferos, el oviducto de la yegua presenta, a lo largo de su recorrido, diferentes curvaturas o circunvoluciones, que varían en número, magnitud y forma, de acuerdo a las regiones morfológicas en que se divide. El grado de enrollamiento del recorrido, depende en gran medida con la longitud total del órgano (Hunter, 1988), como por ejemplo, en la coneja, que presenta oviductos cortos y prácticamente rectilíneos (Pedrero-Badillo et al., 2013). En la cerda, la longitud (y

concomitantemente el grado de enrollamiento) se incrementan notablemente después del primer estro posterior al destete (Rigby, 1968); y en la vaca, el crecimiento se completa posterior a la pubertad (Hunter, 1988). Este último acontecimiento aún no ha sido reportado en la especie equina.

Algunos estudios han reportado ciertos cambios morfométricos de los órganos tubulares del tracto genital, en relación a las etapas del desarrollo y actividad reproductiva. En las ovejas (Kennedy et al., 1974) y vacas (Desjardins y Hafs, 1969) se mencionan algunos cambios morfológicos, en el comienzo de la pubertad; así como en conejas y vaquillonas durante la fase pospuberal (El-Banna y Hafez, 1969). Al nacimiento la longitud del oviducto de la vaca oscila los 12,5 cm; 20,9 cm en el momento del inicio de la actividad sexual (Bielanski, 1972); y hasta 25 cm en vacas adultas maduras. Štastná et al., (2013) reportaron cambios en la longitud del oviducto de la vaca en las diferentes fases del ciclo estral; presentando un acortamiento gradual desde el estro hacia el diestro. De manera similar, Bello et al., (2012), describieron en el cebú africano longitudes semejantes al oviducto del bovino doméstico europeo, demostrando diferencias entre vaquillonas y vacas adultas.

En algunas especies, es probable que el aumento de la longitud en relación a la edad y ciertas etapas (pubertad) tenga un efecto sobre la fertilidad. Un reporte referido al oviducto de la coneja, pudo demostrar una disminución de la fertilidad al aumentar quirúrgicamente la longitud del istmo (Bateman et al., 1983).

Numerosas descripciones anatómicas describen al oviducto de la yegua como uno de los más largos entre todas las especies de mamíferos domésticos, oscilando los 20 cm (Dyce et al., 2010), y alcanzando en muchas ocasiones 30 cm de longitud (Barone, 2001). Un reporte describe algunos detalles morfométricos, a través de la observación directa de oviductos disecados de yeguas (Suzuki y Tsutsumi, 1979). Los autores hallaron una longitud de  $20,9 \pm 1,2$  cm en los especímenes evaluados. En coincidencia con este reporte y la descripción señalada; en el presente trabajo de tesis se registraron longitudes similares a partir de las mediciones de los moldes tridimensionales, sin observarse diferencias significativas entre las etapas reproductivas.

Se debe tener en consideración, que en las determinaciones biométricas no se incluyeron las dimensiones de la región del infundíbulo, que indudablemente adiciona algunos centímetros a la longitud total del oviducto.

De las diferentes regiones tubulares del oviducto, el istmo en todas las etapas reproductivas evaluadas, presentó abundante cantidad de curvaturas a lo largo de su

trayecto. Posiblemente ello haya sido el determinante de que este segmento sea uno de los más largos de todas las regiones observadas. De todas maneras, la longitud registrada no presentó diferencias importantes con la región del ámpula, coincidiendo con los reportes de Suzuki y Tsutsumi (1979) y Dyce et al., 2010.

En la bibliografía consultada, se han encontrado estudios limitados que describan la longitud de las diferentes regiones del órgano en respuesta a los dominios hormonales o en cada fase del ciclo estral. Lewis y Berardinelli (2001) comparan las variaciones de longitud (y demás parámetros morfométricos) del ámpula, istmo y las principales porciones del útero en ovejas, al comienzo de la pubertad y en sucesivos estros. Los autores hallaron algunas diferencias entre ovejas maduras y las prepúberes. En el presente trabajo de tesis, no se identificaron diferencias significativas para este parámetro (longitud) entre las etapas reproductivas en las distintas regiones del oviducto equino. A pesar de que fueron halladas múltiples circunvoluciones (o curvaturas) en la UAI, la longitud de esta región fue aproximadamente 2,5 veces inferior en comparación con el istmo y ámpula.

Existen escasos estudios en los mamíferos domésticos, que describan la morfometría interna de las diferentes regiones del oviducto tales como, el diámetro, área y perímetro del lumen, así como el área ocupada por los pliegues epiteliales, en las diversas fases reproductivas.

En concordancia con algunos reportes descriptos en la vaca (Yaniz et al., 2000); cerda (Suárez, 2008); coneja (Pedrero-Badillo et al., 2013); oveja (Yaniz et al., 2013), y perra (England et al., 2013), el istmo del oviducto equino, presenta el lumen más constreñido de todas las porciones del órgano. Los datos obtenidos a partir de nuestro estudio, muestran y confirman que el istmo es la región tubular más estrecha. Fueron hallados valores cercanos a 300µm en proximidades de la unión útero-tubárica (papila); alrededor de 500µm en la parte media del istmo, y aproximadamente un milímetro (1mm) en el límite con la UAI.

En este trabajo no se lograron identificar diferencias significativas en el diámetro interno de este segmento (istmo) entre las diversas fases reproductivas; sin embargo, en el endosalpinx de la cerda (Hunter, 1973; Hunter, 1977; Polge, 1978; Hunter, 1982a, 1982b, Hunter, 2012) y de la vaca (Suárez, 2002) fue observado una reducción del lumen del istmo (debido a edema, congestión vascular en la mucosa, y contracción muscular) durante el estro. Está ampliamente documentado que la estructura del oviducto es influenciada por los niveles circulantes de esteroides ováricos, la cual se manifiesta principalmente por

cambios en la capa mucosa durante las diferentes etapas del ciclo estral (Hackett y Hafs, 1969; Shirley y Reeder, 1996; Abughrien y Dore, 2000; Ulbrich et al., 2010).

Posteriormente, el diámetro luminal del órgano se incrementó paulatinamente hacia la región del ampulla, segmento que presentó el mayor diámetro externo e interno (4 a 6 mm. aproximadamente) en su parte media. Este hallazgo, coincide con los datos morfométricos reportados por Suzuki y Tsutsumi (1979). Del mismo modo, y en concordancia con Sisson (1973), en este estudio hallamos, en el *ostium abdominale* (del infundíbulo) un diámetro interno similar a los registros de la región craneal del ampulla (datos no mostrados).

El perímetro luminal, delimitado por el epitelio de los pliegues, mostró importantes modificaciones entre las regiones tubulares del órgano. El escaso número y la baja altura de los pliegues epiteliales primarios del istmo, determinaron el menor perímetro luminal en esta región, comparado con la UAI y el ampulla, región extremadamente plegada. England et al., (2013) obtuvieron resultados similares a partir de mediciones realizadas sobre el epitelio del oviducto de la perra en diferentes estadios del ciclo estral.

Los hallazgos obtenidos en nuestros estudios, explican en gran medida, que las regiones del órgano con áreas más plegadas como sucede en el ampulla (donde cada pliegue epitelial experimenta más ramificaciones), presenten una superficie epitelial de mayor extensión y contacto, donde se pueden ocurrir diversos eventos biológicos críticos como es el desarrollo embrionario temprano. Esto posiblemente se relacione al hecho de que el ampulla, aparenta ser la región de mayor secreción, donde las células epiteliales sintetizan suficiente cantidad de fluido y abastecen con los nutrientes necesarios para la reunión de las gametas, fertilización y el clivaje temprano del embrión. Leese (1983), obtuvo resultados similares a partir de oviductos de conejas, hallando mayor cantidad de fluido formado en el ampulla en comparación con el istmo, reflejando en gran parte, la mayor superficie epitelial de la primera.

Aunque el istmo presentó un área ocupada por pliegues relativamente pequeña, y una superficie de contacto (perímetro epitelial) muy escasa para que los espermatozoides se adhieran, las células espermáticas presentan mayor afinidad por esta región tubular tanto *in vivo* como *in vitro*, en comparación con el ampulla. Este hecho ha sido documentado en la cerda (Suárez et al., 1991); yegua (Thomas et al., 1994a); mujer (Baillie et al., 1997); rata (Orihuela et al., 1999) y vaca (Suárez et al., 1998; Sostaric et al., 2008).

En contraste a los hallazgos registrados en el trabajo de England et al., (2013) con oviductos de perra; en el presente trabajo de tesis no se observaron diferencias

significativas en el perímetro luminal entre las distintas fases reproductivas para cada región tubular analizada. Únicamente en la UAI y durante la etapa de estro, se observó una reducción del área luminal respecto a las demás fases reproductivas. En esta región y en la etapa mencionada, también se pudo hallar el menor diámetro luminal, posiblemente como resultado del engrosamiento, edema, hiperplasia o hipertrofia de los pliegues de la túnica mucosa, a consecuencia de los estrógenos circulantes. En el mismo reporte de England et al., (2013), detallan algunas diferencias en el contorno de la superficie epitelial (perímetro) de las regiones principales del oviducto entre diferentes etapas reproductivas. Las perras durante el metaestro y diestro presentaron el perímetro más pequeño comparado con hembras en estro y proestro. Yaniz (1999) describe un área superficial de 20 a 30 cm<sup>2</sup> en el oviducto de la vaca. En el presente trabajo, las secciones histológicas de cada región con una mayor área ocupada por pliegues, presentaron un incremento prácticamente lineal en los valores correspondientes para el perímetro epitelial.

El endosalpinx del oviducto equino presenta diferente grado de plegamiento y la diversidad morfológica de los pliegues epiteliales que se proyectan hacia el lumen, se organizan de manera muy compleja en la región del ámpula (Trautman y Fiebiger, 1952; Barone, 2001; Bacha y Bacha, 2012). Nuestros resultados mostraron que las ramificaciones y el número de pliegues epiteliales se incrementaron notablemente desde el istmo hacia el ámpula. En esta última región fueron observados (con elevada frecuencia) pliegues terciarios y cuaternarios en los cortes histológicos de todas las etapas reproductivas evaluadas. Este hallazgo no pudo manifestarse con la misma magnitud y precisión en los moldes 3D intraluminales, debido al aplastamiento parcial de los pliegues epiteliales durante el proceso de repleción o llenado del lumen con la resina poliuretánica. Sin embargo, a través de los moldes se logró replicar con suficiente detalle la complejidad en la organización tridimensional del endosalpinx en las diferentes regiones tubulares del oviducto de la yegua.

De igual manera, a partir de las réplicas intraluminales fueron visualizados algunos surcos (longitudinales) extendidos prácticamente en todo el recorrido del istmo, sin diferencias morfológicas significativas entre los estadios reproductivos evaluados. Podríamos sugerir que algunos surcos (y pliegues) son continuos a lo largo de esta región, así como en ciertas partes de la UAI y ámpula.

La disposición particular de estos surcos y posiblemente la existencia de microcanales internos podría tener cierta relación con el movimiento y progreso de los espermatozoides a lo largo del conducto. Dichos surcos microscópicos (10-20µm) han sido revelados

mediante histología del cérvix como así también en cortes congelados de la unión útero-tubárica del bovino, proponiendo a éstos como un pasaje preferencial entre el útero y el oviducto (Miki y Claphan, 2013). Denissenko et al., (2012) demostraron a partir de modelos *in vitro*, que los espermatozoides humanos navegan o migran preferencialmente en relación a los ángulos de las paredes de estos microsuros en vez de hacerlo por la parte central de los mismos. En el presente trabajo de tesis, a través de las diversas técnicas empleadas, estas estructuras del endosalpinx de la yegua no pudieron ser observadas.

Otros surcos dispuestos transversalmente se presentaron de manera constante en todos los moldes de la UAI y etapas reproductivas evaluadas. Este hallazgo concuerda y confirma estos detalles observados con nuestros estudios histológicos previos (Aguilar et al., 2012).

Nuestro equipo de trabajo, publicó un artículo detallado sobre las características histológicas básicas y algunos hallazgos particulares del epitelio oviductal en las distintas fases del ciclo reproductivo de la yegua (Aguilar et al., 2012). En el mencionado artículo, y en coincidencia con reportes para otras especies, el epitelio oviductal de la yegua (de tipo columnar simple) experimentó cambios en función del dominio hormonal característico de cada etapa del ciclo estral. Además, un hallazgo constante y destacado fue la existencia de estructuras “similares a glándulas”, incluidas en el espesor y parte basal de los pliegues epiteliales.

Existe un consenso general de la ausencia de glándulas en el oviducto de la mayoría de los mamíferos domésticos (Dellmann, 1994; Banks, 1996; Bacha y Bacha, 2012). A pesar de ello, se hallaron criptas epiteliales, que por su organización se asemejan a estructuras glandulares, similares a las halladas en el endometrio uterino. En el presente trabajo de tesis, la mayor cantidad fue observada en la región del ampulla de todos los cortes evaluados y en diferentes estadios reproductivos, reforzando los reportes histológicos previos (Aguilar et al., 2010).

El hallazgo de estas criptas epiteliales concuerda con reportes documentados en otras especies, como el conejo (Jansen y Bajpai, 1982; Pedrero-Badillo et al., 2013); vaca (Yaniz et al., 2000); perra (Chatdarong et al., 2004; Steinhauer et al., 2004); cerda (Ekhlasi-Hundrieser et al., 2005; Tummaruk y Tienthai, 2010); oveja (Yaniz et al., 2013) y en la yegua (Mouguelar et al., 2015). En el estudio tridimensional del endosalpinx de la oveja (Yaniz et al., 2013), pudieron observar mediante MEB, pequeñas proyecciones en los moldes de resina, coincidiendo de manera similar a nuestros hallazgos observados en varios moldes intraluminales, principalmente en la región del istmo del oviducto equino.

Suzuki y Tsutsumi (1979) mediante MEB, mencionan unas formaciones en forma de pequeños fondos de saco en la mucosa de la yegua, posiblemente compatibles con estas criptas epiteliales.

En coincidencia con el trabajo publicado por el equipo de Desantis (2011); en el presente trabajo de tesis, se pudieron observar frecuentes proyecciones en las células epiteliales. Estas “protrusiones apicales” proyectándose hacia el lumen del oviducto equino fueron halladas con frecuencia en los cortes histológicos, mediante MEB y MET. De esta manera, este hallazgo confirma nuestros estudios realizados previamente mediante microscopía óptica del epitelio oviductal en diferentes etapas del ciclo estral de la yegua (Aguilar et al., 2012).

Este fenómeno que experimentan las células epiteliales, ha sido ampliamente documentado en otras especies domésticas, incluyendo la cerda (Wu et al., 1976; Walter y Bavdek, 1997; Jiwakanon et al., 2005); oveja (Abdala, 1968; Desantis et al., 2015); cabra (Morita et al., 1995; Abe et al., 1999; Sharma et al., 2013; Sharma et al., 2015); vaca (Wrobel et al., 1993; Nayak y Ellington, 1997); llama (Apichela et al., 2009); perra (Steffl et al., 2008) y camella (Acogli et al., 2014).

Recientemente, se pudieron observar estas protrusiones epiteliales en las células del oviducto de la cerda cultivadas *in vitro*, simulando el ciclo estral mediante la adición de hormonas al medio de cultivo (Chen et al., 2013). Múltiples aspectos de estos eventos fisiológicos, que en principio estarían asociados a fenómenos de recambio celular, se desconocen casi completamente. Investigando el oviducto de ovejas, Murray (1995) y Hollis et al., (1984); sugirieron que la expulsión de células epiteliales que están siendo extruidas hacia el lumen oviductal forman parte de un proceso de muerte celular.

En la unión útero-tubárica y el istmo del oviducto de la perra, se pudieron demostrar eventos apoptóticos en las células epiteliales y de la lámina propia, marcados mediante Tunel y caspasa-3 (Urhausen et al., 2011). Hasta la fecha no se han reportado estudios en referencia a este tipo de muerte celular programada en el epitelio oviductal de la yegua.

A diferencia de otros mamíferos domésticos, en la yegua se han realizado escasos estudios morfológicos de la mucosa oviductal mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). En coincidencia con los reportes de Suzuki y Tsutsumi, (1979); y Desantis et al., (2011), logramos apreciar a través de MEB, algunos aspectos tridimensionales de la organización de la mucosa, entre ellos la diferente complejidad que adquieren los pliegues



epiteliales de las principales porciones tubulares del oviducto. La ramificación, número y complejidad de los mismos se incrementó desde la región del istmo hacia el ampulla.

La superficie del endosalpinx y de cada pliegue se halló tapizada de manera completa por las típicas células ciliadas y secretorias a lo largo de todo el conducto. A pesar de que la proporción de ambas células (ciliadas y secretorias) en las diferentes regiones y etapas reproductivas no fue evaluada mediante esta técnica, una revisión de estos y otros cambios epiteliales, fue publicado por nuestro equipo de trabajo (Aguilar et al., 2012) y concuerdan con el reporte previo de Desantis et al., (2011).

En coincidencia con los estudios descriptos en relación al epitelio oviductal de otras especies, entre ellas el búfalo (Tienthai et al., 2009); vaca, (Yaniz et al., 2000); rata albina (Nabil, 2015); marsupial (Krees y Morson, 2007); coneja (Özen et al., 2010); cerda (Yaniz et al., 2006); y la oveja (Yaniz et al., 2013); en el oviducto de la yegua, las cilias se extendieron más allá de las porciones apicales de las células secretoras, las cuales se observaron parcialmente ocultas entre las primeras. Los cilios presentaron cierta uniformidad en su longitud y distribución sobre las células ciliadas. En tanto que las células secretoras, presentaron numerosas microvellosidades cortas, sobresaliendo desde la superficie apical, y esparcidas de manera regular sobre ellas.

Como complemento, y en concordancia con el reporte de Yaniz et al., (2013) en oviductos ovinos; la observación mediante MEB de los moldes 3D del lumen oviductal de la yegua, aportó detalles adicionales sobre la arquitectura tridimensional del endosalpinx equino. La existencia de sub-compartimentos, *cul-de-sacs* y criptas en la mucosa está ampliamente descrita en el oviducto de la cerda (Wu et al., 1976; Yaniz et al., 2006), vaca (Yaniz et al., 2000), y recientemente en la oveja (Yaniz et al., 2013). Nuestros hallazgos a través de histología y microscopía electrónica de barrido de los moldes, sugiere que el endosalpinx de la yegua se dispone de una manera muy compleja y similar a las demás especies; presentando compartimientos, surcos y saculaciones en las diferentes regiones, donde cada segmento posee funciones particulares.

La evaluación a través de microscopía electrónica de transmisión (MET), nos permitió observar algunos detalles intracelulares, y ciertas características ultraestructurales de las células epiteliales del oviducto de la yegua. En concordancia con Desantis et al., (2011), se distinguieron claramente las dos poblaciones de células epiteliales, ciliadas y secretorias. Las primeras, presentaron un citoplasma electro-denso, en comparación a las células secretorias, principalmente en la región del istmo. En todas las regiones tubulares

evaluadas, una de las organelas más prominentes de las células ciliadas fueron las mitocondrias, ubicadas en cercanías del núcleo, y junto a retículos endoplasmáticos rugosos y complejos de Golgi. En coincidencia con otros reportes (Suzuki y Tsutsumi, 1979; Desantis et al., 2011), en el citoplasma de estas células epiteliales ciliadas no se hallaron gránulos secretorios.

Las células no ciliadas –secretorias– del ámpula, UAI e istmo, contuvieron numerosos gránulos de secreción. Nuestras observaciones coinciden con los reportes para otras especies (Odor et al, 1983; Hollis et al, 1984; Abe y Oikawa, 1991b; Abe et al., 1993b; Odor y Agustín, 1995; Abe, 1996; Abe y Hoshi, 2007; Desantis et al., 2011); donde se hallaron gránulos electro-densos y electro-lúcidos dispersos en el citoplasma de esta población de células epiteliales del oviducto de la yegua. Adicionalmente, en algunas células pudieron visualizarse vesículas de aspecto vacuolado con un contenido finamente granular. Los numerosos RER cargados de ribosomas, y la estrecha relación con el Golgi bien desarrollado sugieren intensa actividad secretoria en estas células, tal como fue observado en el epitelio oviductal de la cerda (Rodríguez-Martínez et al., 1990).

Aunque la diferencia en el aspecto morfológico de los gránulos secretorios podría depender del estado de maduración de los mismos; nuestro reporte concuerda con el estudio de Desantis et al., (2011), sugiriendo que existen diferencias en la actividad secretoria y en el contenido de estos gránulos en las diversas regiones del oviducto equino. Según estudios inmunohistoquímicos, los gránulos más densos son proteináceos, mientras que los gránulos electro-lúcidos son de tipo mucinosos. Las diferencias regionales ultraestructurales, cuantitativas y morfológicas de los gránulos secretores en estas células epiteliales, podría reflejar el hecho de que la naturaleza de la secreción del epitelio oviductal y sus actividades secretoras, difieren entre los diversos segmentos del conducto (Abe, 1996).

Otro rasgo conspicuo en las células secretorias, que también fue observado mediante MET, reconfirmando los hallazgos histológicos y a través de MEB, fue la presencia de “protrusiones bulbosas apicales”, conteniendo gránulos secretorios, y en ciertos casos, al núcleo celular. Como ya fue mencionado, este fenómeno ha sido ampliamente reportado en otras especies domésticas, y en principio estarían asociados a mecanismos de recambio celular, posiblemente mediante procesos apoptóticos. La apoptosis es un requisito previo en la regeneración tisular regulada. Es un mecanismo esencial para mantener la homeostasis celular mediante la eliminación de células dañadas, mutadas, o infectadas de forma selectiva, sin desencadenar una respuesta inflamatoria del tejido circundante. Las

células que sufren apoptosis muestran cambios morfológicos variados, que se caracterizan por el encogimiento citoplasmático, condensación nuclear, formación de protrusiones membranosas, y la fragmentación del contenido celular en el interior de cuerpos apoptóticos (Kerr et al., 1972).

En concordancia con Abe y Hoshi (2007), y debido a que las protrusiones apicales observadas en las células epiteliales del oviducto de la yegua contenían gránulos secretorios, podría sugerirse que estos gránulos intracitoplasmáticos son liberados o expulsados hacia el lumen mediante un proceso de exocitosis celular.

#### **7.1.2. Residencia y reservorio de los espermatozoides en el oviducto de la yegua.**

Aunque los modelos *in vivo* son el “*gold standard*”, es muy difícil investigar los procesos moleculares que ocurren dentro de un vasto y considerable espacio, como es el lumen del oviducto equino. Por lo tanto, resulta complejo localizar las gametas (y/o embriones) en el ambiente intratubárico, para poder desentrañar los numerosos eventos locales, tanto autócrinos como parácrinos, que son esenciales para poder vislumbrar los diferentes procesos intra y extracelulares. Por otra parte, al oviducto equino sólo se puede acceder mediante intervención quirúrgica, fibro/video endoscopia o *post mortem*. Algunos experimentos con caballos *in vivo* generan ciertos conflictos de bioética y bienestar animal, además de ser costosos e insumir un tiempo considerable.

Durante el apareamiento, miles de millones de espermatozoides se liberan en el tracto genital de la hembra, ofreciendo elevadas oportunidades para que ocurra una fertilización exitosa. El transporte de los espermatozoides a través del aparato reproductor de la hembra hacia el/los ovocito(s) se encuentra altamente controlado, en parte por los diferentes compartimientos y la micro-arquitectura del tracto genital, a través de algunas barreras físicas que se interponen en el camino de las células espermáticas. El aparato reproductor de la hembra, regula el acceso y permite el paso de una pequeña minoría de los espermatozoides de los millones contenidos en el eyaculado; aunque los criterios mediante los cuales realiza tal selección aún son controversiales (Holt y Fazelli, 2015). Finalmente, sólo unos pocos espermatozoides arriban al sitio de la fertilización; la unión ámpula-istmo del lumen oviductal (Suárez, 2002).

En yeguas inseminadas artificialmente de manera convencional (en el cuerpo uterino) se han reportado tasas de preñez aceptables, con un volumen mínimo de 0,6ml (Allen et al., 1976) y un máximo de 120ml de semen (Bedford y Hinrichs, 1994), si las dosis

inseminantes contienen una concentración suficiente de espermatozoides móviles y viables. De hecho, Jasko et al., (1992), demostraron que la concentración espermática es más importante que el volumen inseminado. Se ha demostrado también, que las tasas de preñez (Allen et al., 1976; Rowley et al., 1990) y de supervivencia de los espermatozoides *in vitro* se optimizan cuando las células espermáticas se mantienen a una concentración de  $25 \times 10^6$ - $50 \times 10^6$  / ml (Varner et al., 1987).

A pesar del número elevado y las concentraciones específicas de espermatozoides necesarios para lograr una tasa óptima de fertilización, Katila et al., (2000) demostraron que la mayor parte del eyaculado del padrillo es evacuado de manera rápida desde el útero de la yegua, a través del cérvix relajado durante el estro. Algo similar ocurre en las cerdas, donde, después de la monta natural, entre el 70 a 99% de los espermatozoides son eliminados del lumen uterino, y alrededor del 35% se lleva a cabo mediante flujo retrógrado a través de la vagina (Rodríguez-Martínez et al., 2005). De hecho, y como fue mencionado con anterioridad, sólo una pequeña proporción de la eyaculación sigue permaneciendo del lado uterino de la unión útero-tubárica (Scott et al., 2000), y solamente se observaron escasos espermatozoides en el oviducto de la yegua (Parker et al., 1975; Boyle et al., 1987).

Por otro lado, el complejo ovocito-cúmulus (COC) ingresa al oviducto desde el extremo opuesto al arribo de los espermatozoides, desplazándose alrededor de 12 horas para alcanzar finalmente la unión ampulla-istmo. Aproximadamente después de 6 días, el embrión equino pasa hacia el ambiente intrauterino. En sincronía con la contracción del miosalpinx y el flujo de secreciones del oviducto, el transporte de estos gametos y del embrión se establece por la actividad ciliar (Buhi et al., 1997; Jansen 1984; Killian 2004; Lyons et al., 2006).

A lo largo de los diferentes ensayos llevados a cabo, se lograron detectar espermatozoides en el lumen oviductal de algunas yeguas inseminadas artificialmente. Como fue expresado previamente (apartado **Materiales & Métodos**), el intervalo de tiempo entre la inseminación artificial y la recuperación de los oviductos fue variable, transcurriendo desde  $\pm$  72 hs; 36; 20; 18; 12 y hasta 5,5 horas aproximadamente en el último muestreo realizado. Nuestros hallazgos concuerdan con los reportes publicados en las últimas décadas sobre el transporte espermático en el tracto genital de la yegua. En concordancia con los estudios de Bader y Krause (1980), la oportunidad de encontrar espermatozoides en el oviducto, se redujeron de manera sustancial a medida que aumentó

el intervalo de tiempo entre la inseminación artificial y el muestreo. De la misma manera, Fiala et al., 2007b, hallaron espermatozoides en ambos oviductos a partir de los 30 minutos posteriores a la inseminación artificial; y Bader, (1982) encontró células espermáticas a las 2 horas en yeguas inseminadas post-ovulación. También fue observado un marcado descenso de la cantidad de espermatozoides en los oviductos equinos cuando transcurrieron más de 10 horas de la inseminación artificial (Fiala et al., 2008). En un estudio, sólo el 0,0006% a 0,0007% de los espermatozoides depositados, fueron recuperados a través de lavajes o flushing del oviducto de yeguas a las 18 horas después de la inseminación intrauterina (Rigby et al., 2000).

En el presente trabajo de tesis, la mayor cantidad de células espermáticas halladas en el oviducto, correspondieron a las muestras obtenidas a las 5,5 horas post-IA, disminuyendo cuantitativamente y de modo comparativo con la población de espermatozoides hallados a las 8 hs, 12 hs y 36 horas. Finalmente, en el muestreo realizado a los 3 días (72 hs) posteriores a la inseminación no se observaron espermatozoides en ninguna de las yeguas.

Aunque no fue realizado un análisis estadístico, y en varias oportunidades no se logró recuperar el par de oviductos; nuestro estudio concuerda con el reporte de Fiala et al., 2010; donde la distribución de células espermáticas entre ambos oviductos fue similar, independientemente de las influencias por parte del ovario con el folículo dominante. Posiblemente las señales quimiotácticas no afecten selectivamente la migración de los espermatozoides hacia el oviducto ipsilateral al folículo dominante, a pesar de que se ha demostrado que los niveles de esteroides locales difieren entre ambos oviductos.

Las concentraciones de progesterona (P4) en el oviducto ipsilateral pos-ovulación son 37 veces mayor cuando se compara con el oviducto pre-ovulatorio, donde este aumento es sólo de tres veces en el lado contralateral. La misma tendencia fue observada en el fluido colectado de oviductos ipsilaterales. La explicación más probable de esta concentración elevada de P4 del lado ipsilateral es una combinación de: 1) una transferencia local entre el ovario/cuerpo lúteo y el oviducto, 2) la contribución ipsilateral de P4 producida por las células de la granulosa del COC cuando reside en el oviducto, y 3) la producción oviductal local de P4 (Nelis, 2015).

Una vez dentro del oviducto, la población de espermatozoides potencialmente fertilizantes, puede ser protegida de la fagocitosis mediada por las células inflamatorias asociadas con la endometritis post-servicio/inseminación (Bader, 1982).

Las investigaciones respecto a los mecanismos quimiotácticos que guían a los espermatozoides tubáricos hacia el/los ovocito(s) han identificado a la progesterona (P4) como una señal molecular significativa que modifica la actividad flagelar de los espermatozoides (Oren-Benaroya et al., 2008; Teves et al., 2009; Armon y Eisenbach, 2011; Blengini et al., 2011; Guidobaldi et al., 2012). La acción de la progesterona (mediante una vía no-genómica) se produce a través de su receptor CatSper (Arnoult et al., 2011; Lishko et al., 2011; Strunkeret al., 2011), y la consiguiente modulación de las concentraciones de calcio intracelular que cambian la actividad flagelar del espermatozoide (Kaupp et al., 2008).

Recientemente se ha demostrado (Miller et al., 2016) que una enzima (ABHD2;  $\alpha$ - $\beta$  hidrolasa D2) expresada en los espermatozoides (humanos, ratones), se une a la progesterona, y actúa como hidrolasa lipídica dependiente de progesterona, disminuyendo el endocannabinoide 2-araquidonilglicerol (2AG) de la membrana plasmática del espermatozoide. El 2AG inhibe los canales de calcio CatSper, y la eliminación de 2AG conduce a la entrada de calcio a través de CatSper, asegurando de esta manera la activación de los espermatozoides. Este estudio revela que la progesterona, activada por el agotamiento del endocannabinoide mediada por la enzima ABHD2, es un mecanismo general por el cual la progesterona ejerce su acción genoma-independiente y activa a los espermatozoides para la fecundación.

Por otro lado, prácticamente en todos los oviductos donde fueron hallados espermatozoides, éstos se pudieron observar en diferentes segmentos tubulares del órgano. Cabe destacar un hallazgo trascendental que, en el muestreo realizado a escasas horas post-IA (5,5 hs), fue observada una diferencia notable entre la cantidad de espermatozoides residentes hallados en la unión útero-tubárica (papila) y el istmo caudal, comparado a las escasas células espermáticas ubicadas en la región del ámpula.

Cuando la inseminación se efectúa antes de la ovulación, se puede observar una considerable cantidad de espermatozoides en el oviducto a las 4 horas (Scott et al., 1994). Sobre la base de otros estudios, y mediante flushing uterino, algunos autores consideran que este tiempo es suficiente para que se complete el transporte espermático, desde el útero hacia los oviductos, ya que las tasas de concepción se reducen sustancialmente si se realizan lavajes uterinos a las 0,5-2 horas, pero la fertilidad no se ve afectada cuando los lavajes se hacen a las 4 horas post inseminación (Brinsko et al., 1990; Brinsko et al., 1991).

De todas maneras, los espermatozoides pueden persistir por varios días en el útero de la yegua (Kotilainen et al., 1994; Katila, 1995; Watson y Nikolakopoulos, 1996), a pesar de que la endometritis fisiológica post servicio, elimina gran parte de los espermatozoides, de plasma seminal y posibles contaminantes antes de la entrada del embrión al útero (Troedsson et al., 1995b; Troedsson et al., 1997). Además, está bien documentado que una única monta natural realizada al inicio del estro, resulta en una fertilización exitosa lo que significa que los espermatozoides pueden mantenerse viables unos 5 - 6 días en el oviducto (Day, 1942).

El reservorio preovulatorio de espermatozoides ha sido ampliamente documentado en roedores de laboratorio, tales como ratones (Suárez, 1987) y hámsteres dorados (Smith y Yanagamachi, 1989); conejos (Overstreet y Cooper, 1975); y en animales de granja como ovejas (Hunter y Nichol, 1983); cerdos (Hunter, 1984) y vacas (Hunter y Wilmut, 1984).

En la hembra equina y otras (canina, porcina), donde el intervalo entre la monta y la ovulación es prolongado, podría esperarse que las reservas espermáticas en el oviducto sufran depleción constante con el transcurso de los días. Sin embargo, se ha demostrado que la tasa de concepción declina levemente en estas especies (Burkhardt, 1949; England et al., 2006). Según algunos autores, en la yegua (Fiala et al., 2010), perra (England et al., 2013) y cerda (Pursel et al., 1978; Taylor et al., 2008), el útero podría actuar como un reservorio pre-tubárico, permitiendo (presumiblemente), el reemplazo de los espermatozoides que son perdidos desde las reservas oviductales, y manteniendo un número determinado de células espermáticas en el oviducto.

Aunque no se encontró evidencia concluyente de un depósito de espermatozoides en el istmo caudal de las yeguas (Boyle et al., 1987), los informes posteriores han apoyado firmemente tal afirmación (Thomas et al., 1994a,b; Dobrinski et al., 1996). Los argumentos a favor de esta propuesta son: (1) los reservorios de espermatozoides funcionales generalmente no están ubicados en o dentro del sitio de la eyaculación (es decir, en este caso el útero equino), pero en general se localizan en un compartimiento posterior del aparato reproductor (Hafez y Thibault, 1973); (2) durante el tiempo preovulatorio y relativamente largo de las yeguas, una población de espermatozoides con capacidad de fertilización necesitan ser almacenados lejos de las influencias estimulantes de ambos fluidos luminales; el uterino y el ampular; (3) al parecer el almacenamiento se consigue dentro de una secreción glicoprotéica que se acumula en el istmo caudal del oviducto (Rodríguez-Martínez et al., 1998); y (4) el secuestro de espermatozoides durante el

intervalo preovulatorio y la formación del reservorio espermático funcional se ve facilitado por la adhesión de las células espermáticas al endosalpinx, a través de la unión entre la parte apical de la cabeza del espermatozoide y orgánulos específicos en las células epiteliales, tal como ya se ha demostrado en cultivos *in vitro* de espermatozoides y células epiteliales del endosalpinx (Thomas et al., 1994a; Dobrinski et al., 1996).

## **7.2. CONCLUSIONES**

---

La combinación de diversas técnicas empleadas, entre ellas microscopía óptica, electrónica de barrido, de transmisión y la preparación de moldes intraluminales, nos ha permitido describir la morfología de la superficie del endosalpinx; como así también caracterizar numerosos parámetros histomorfométricos del lumen del oviducto de la yegua en diferentes etapas reproductivas.

Los resultados surgidos del trabajo de tesis y presentados aquí, proporcionan información útil para construir un modelo más completo de la organización tridimensional de la mucosa del oviducto de la yegua. El conocimiento de la anatomía, histología, y ultraestructura; además de la complejidad fisiológica de este órgano, puede ser relevante para mejorar la aplicación de técnicas de reproducción asistida en los equinos.

A partir del análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis en relación a la residencia de células espermáticas; y en correspondencia con los diversos argumentos citados párrafos anteriores, sugieren e indican en conjunto, la probabilidad de que en la parte caudal de la región del istmo y unión útero-tubárica (papila) se establezcan los reservorios de espermatozoides funcionales en el oviducto de la yegua.

## **7.3. PERSPECTIVAS FUTURAS**

---

Como en numerosos proyectos de investigación, y tal es el caso de los resultados arrojados por el presente trabajo de tesis, surgen diversos interrogantes y algunas respuestas concluyentes. A pesar de que en los últimos años, se ha generado un vasto cuerpo de información científica en la literatura, todavía son necesarios numerosos estudios relacionados a la biología espermática en el tracto genital de la yegua. Por lo tanto y para poder comprender con mayor profundidad estos procesos, es imperiosa la necesidad de continuar con estas líneas de investigación, en un intento de alcanzar una evidencia todavía más concluyente respecto al establecimiento y la valoración del estado de los espermatozoides recuperados del oviducto de yeguas inseminadas artificialmente. En este



mismo sentido, son necesarias otras técnicas de recuperación de células espermáticas y a intervalos controlados, tal como ha ocurrido en numerosas especies de animales.-

---

**CAPÍTULO VIII**  
**BIBLIOGRAFÍA**

---

---

**8. BIBLIOGRAFÍA**

---

1. Abdala O. Observations on the morphology and histochemistry of the oviducts of the sheep. *J Anat.* 1968, 102: 333-344.
2. Abe H, Oikawa T. Study of the differentiation of secretory cells in the golden hamster oviductal epithelium by use of a monoclonal antibody. *J Exp Zool.* 1990a, 254: 97-106.
3. Abe H, Oikawa T. Regional differences in the ultrastructural features of secretory cells in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) oviductal epithelium. *J Anat.* 1991b, 175: 147-58.
4. Abe H, Oikawa T. Examination by scanning electron-microscopy of oviductal epithelium of the prolific Chinese Meishan pig at follicular and luteal phases. *Anat Rec.* 1992, 233: 399-408.
5. Abe H, Oikawa T. Observations by scanning electron-microscopy of oviductal epithelial cells from cows at follicular and luteal phases. *Anat Rec.* 1993b, 235: 399-410.
6. Abe H, Numazawa C, Abe M, Onodera M, Katsumi A. Immunocytochemical localization of oviduct-specific glycoproteins in the bovine oviductal epithelium at follicular and luteal phases. *Cell Tissue Res.* 1993b, 247: 41-47.
7. Abe H, Onodera M, Sugawara S. Scanning electron microscopy of goat oviductal epithelial cells at the follicular and luteal phases of the estrous cycle. *J Anat.* 1993c, 183: 415-421.
8. Abe H. Regional variations in the ultrastructural features of secretory cells in the rat oviductal epithelium. *Anat Rec.* 1994, 240: 77-85.
9. Abe H. The mammalian oviductal epithelium: regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. *Histol Histopathol.* 1996, 11: 743-768.
10. Abe H. Immunocytochemical evidence that a specialized region of the rat oviduct secretes an oviduct-specific glycoprotein. *J Anat.* 1996, 188: 333-339.
11. Abe H, Onodera M, Sugawara S, Satoh T, Hoshi H. Ultrastructural features of goat oviductal secretory cells at follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *J Anat* 1999, 195: 515-21.
12. Abe H, Hoshi H. Regional and cyclic variations in the ultrastructural features of secretory cells in the oviductal epithelium of the Chinese Meishan pig. *Reprod Domest Anim.* 2007, 42: 292-298.
13. Abughrien BM, Dore MA. Ciliogenesis in the uterine tube of control and superovulated heifers. *Cell Tissue Org.* 2000, 166(4): 338-348.

14. Accogli G, Monaco D, El Bahrawy KA, El-Halim El-Sayed AA, Ciannarella F, Bencult B, Lacalandra GM, Desantis S. Morphological and glycan features of the camel oviduct epithelium. *A Anat.* 2014, 196: 197–205.
15. Aguilar JJ, Reyley M. The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects. *Anim Reprod.* 2005, 2: 91-105.
16. Aguilar JJ, Cuervo-Arango J, Mas C; Reyley M, Rodriguez MB, Mouguelar H. Glands in the oviductal mucosa of the mare. *Reprod Fert Dev.* 2010, 22(1): 226.
17. Aguilar JJ, Cuervo-Arango J, Mouguelar H, Losinno L. Histological characteristics of the equine oviductal mucosa at different reproductive stages. *J Equine Vet Sci.* 2012, 32 (2): 99-105.
18. Alexander SL, Irvine CGH, Shand N, Evans MJ. Is luteinizing hormone secretion modulated by endogenous oxytocin in the mare? Studies on the role of oxytocin and factors affecting its secretion in estrous mares. *Equine Reprod.* 1995, 6: 361-371.
19. Allen WR, Bowen JM, Frank CJ, Jeffcott LB, Rosedale PD. The current position of AI in horse breeding. *Equine Vet J.* 1976, 8: 72–74.
20. Allen WR. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reprod Domest Anim.* 2005, 40: 310–29.
21. Alvarenga M, DaCruz Landim-Alvarenga. New assisted reproductive techniques for horse industry. In: *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, 2<sup>nd</sup>. Ed. Saunders-Elsevier. 2009, 209-220.
22. Anderson CR, Edwards SL, Furness JB, Bredt DS, Snyder SH. The distribution of nitric oxide synthase containing autonomic preganglionic terminals in the rat. *Brain Res.* 1993, 614:78–85.
23. Andreae Vesalii. *Anatomicarum Gabrielis Fallopii Observationum Examen, Venetiis: apud Franciscum de Franciscis, Senesem*, 1564. A Dutch translation was published in 1994 by the Royal Belgian Medical Academy.
24. Ankum WM, Houtzager HL, and Bleker OP. Reinier De Graaf (1641–1673) and the Fallopian tube. *Hum Reprod Update.* 1996, 2(4):365–369.
25. Apichela S, Jimenez-Diaz MA, Roldan-Olarte M, Valz-Gianinet JN, Miceli DC. *In Vivo* and *In Vitro* Sperm Interaction with Oviductal Epithelial Cells of Llama. *Reprod Domest Anim.* 2009, 44: 943–951.
26. Apichela SA, Valz-Gianinet JN, Schuster S, Jiménez-Díaz MA, Roldán-Olarte EM, Miceli DC. Lectin binding patterns and carbohydrate mediation of sperm binding to llama oviductal cells in vitro. *Anim Reprod Sci.* 2010. 118: 344–353.

27. Appenzeller O, Dhital KK, Cowen T, Burnstock G. The nerves to blood vessels supplying blood to nerves: the innervation of *vasa nervorum*. *Brain Res.* 1984, 304: 383–386.
28. Araujo GH, Rocha Filho AN, Lopes EP, Moya CF, Alvarenga MA. Use of a low dose of equine purified FSH to induce multiple ovulations in mares. *Reprod Domest Anim.* 2009, 44(3): 380-383.
29. Armon L, Eisenbach M. Behavioral mechanism during human sperm chemotaxis: involvement of hyperactivation. *PloS One.* 2011, 6:e28359.
30. Arnoult C, Pierre V, Ray PF. Chemotaxis of spermatozoa is regulated by progesterone binding on calcium channel CATSPER. *Med Sci (Paris).* 2011, 27: 702–704.
31. Bacha WJ, Bacha LM. Chapter 18: Female reproductive system, In *Color atlas of veterinary histology*, 3<sup>rd</sup> Ed, Wiley-Blackwell, 2012.
32. Bader H. An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. *J Reprod Fertil Suppl.* 1982, 32: 59–64.
33. Bader H, Krause A. Investigations about the transport, distribution and the fate of the spermatozoa in the genital tract of the mare. In: *Proceedings of Ninth International Congress on Animal Reproduction AI*, 1980, vol. 5; 197–205.
34. Baillie HS, Pacey AA, Warren MA, Scudamore IW, Barratt CLR. Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampulla. *Human Reprod.* 1997, 12: 1985–1992.
35. Ball BA, Scoggin KE, Troedsson MHT, Squires EL. Characterization of prostaglandin E receptors (EP2, EP4) in the horse oviduct. *Anim Reprod Sci.* 2013, 142: 35–41.
36. Banks WJ. Epitelios. En “*Histología Veterinaria Aplicada*” 2da edición. (Ed. MVZ Antonio Lemus Gamboa, El Manual Moderno, S. A. de C. V. México-Santa Fe de Bogotá), 1996, 79.
37. Barone R. Appareil Uro-genital. En “*Anatomie comparée des Mammifères Domestiques*”. Tome Quatre, Splachnologie, Fascicule I, (Imprimeri Des Meaux-Arts, J.Tixier & Fils. S.A, Lyon, France), 2001.
38. Barratt CLR, Cooke ID. Sperm transport in the human female reproductive tract—a dynamic interaction. *Int J Androl* 1991, 14:394–411.
39. Barrière P, Mirallie S, Jean M. Embryologie de l'appareil génital féminin. *Encycl Méd Chir.* Editions Scientifiques et Médicales. Paris: Elsevier SAS, Gynécologie, 2000, 10-A-08-12.
40. Bateman BG, Eddy CA, Kitchin JE. Effect of lengthening the fallopian tube on fertility in the rabbit. *Am J Obstet Gynecol.* 1983, 142: 569-573.

41. Beck LR, Boots LR. The comparative anatomy, histology and morphology of the mammalian oviduct. In: Johnson AD, Foley CW, eds. *The Oviduct and its Functions*. New York-London: Academic Press. 1974, 14-16.
42. Bedford SJ, Hinrichs K. The effect of insemination volume on pregnancy rates of pony mares. *Theriogenol.* 1994, 42: 571-578.
43. Bello A., Adamub YA, Umaruc MA, Garbad S, Abdullahid AU, Adamud MK, Saidue B, Ukashatuf S, Henaa SA, Mahmuda A. Morphometric analysis of the reproductive system of African zebu cattle. *Sci J Zool.* 2012, 1(2): 31-36.
44. Bergfelt DR. Chapter 11, "Anatomy and Physiology of the Mare" In: *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, 2<sup>nd</sup> Ed. Saunders-Elsevier, USA, 2009.
45. Bielanski A. (1972). *Rozrod zwierat*. Warszawa: Panstwowe wydawnictwo rolnicze i lesne.
46. Bignardi C. Sull'anatomia microscopica della tuba uterina dei mammiferi domestici. *Biol Lat.* 1948, 1(4): 651-687.
47. Bird SD. Mesothelial primary cilia of peritoneal and other serosal surfaces. *Cell Biol Int.* 2004, 28: 151-159.
48. Birkhead TR, Moller AP. Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. *Biol J Linn Soc.* 1993, 50: 295 - 311.
49. Blengini CS, Teves ME, Unates DR, Guidobaldi HA, Gatica LV, Giojalas LC. Human sperm pattern of movement during chemotactic re-orientation towards a progesterone source. *Asian J Androl.* 2011, 13: 769-773.
50. Boratynski Z, Flieger S, Welento J, Krzyzanowski J, Sławomirski J. Sources of autonomic and afferent fibers to the uterine cervix in pig. *Folia Morphol (Warsz).* 1988, 47: 71-76.
51. Boyle MS, Cran DG, Allen WR, Hunter RHF. Distribution of spermatozoa in the mare's oviduct. *J Reprod Fertil Suppl.* 1987, 35: 79-86.
52. Brandt Y, Lang A, Rodriguez-Martinez H, Madej A, Einarsson S. Impact of ACTH during oestrus on the ultrastructure of the spermatozoa and their environment in the a tubal reservoir of the postovulatory sow. *Anim Reprod Sci.* 2006, 93: 231-245.
53. Brenner RM. Renewal of oviduct cilia during the menstrual cycle of the *Rhesus* monkey. *Fertil Steril.* 1969, 20: 599-611.
54. Briggs E and Wessell GM. In the beginning... Animal fertilization and sea urchin development. *Develop Biol.* 2006, 300: 15-26.

55. Brinsko SP, Varner DD, Blanchard TL, Meyers SA. The effect of post-breeding uterine lavage on pregnancy rate in mares. *Theriogenol.* 1990, 33: 465-475.
56. Brinsko SP, Varner DD, Blanchard TL. The effect of uterine lavage performed four hours post-insemination on pregnancy rates in mares. *Theriogenol.* 1991, 35: 1111-1191.
57. Brundin J, Fredricsson B, Norberg KA, Swedin G. The sympathetic innervation of the oviduct in the rat. *Acta Physiol Scand.* 1969, 75: 69-72.
58. Buhi, WC, Alvarez IM, Kouba AJ. Oviductal regulation of fertilization and early embryonic development. *J Reprod Fert.* 1997, 285-30.
59. Burkhardt J. Sperm survival in the genital tract of the mare. *J Agric Sci.* 1949, 39: 201-203.
60. Capana E. Lazzaro Spallanzani: At the Roots of Modern Biology. *Mol Dev Evol.* 1999, 285: 178-196.
61. Chang MC. Transport of eggs from the fallopian tube to the uterus as a function of oestrogen. *Nature.* 1966, 212: 1048-1049.
62. Chatdarong K, Lohachit C, Linde-Forsberg C. Distribution of spermatozoa in the female reproductive tract of domestic cat in relation to ovulation induced by natural mating. *Theriogenol.* 2004, 62: 1027-1041.
63. Chen S, Einspanier R, Schoen J. *In vitro* mimicking of estrous cycle stages in porcine oviduct epithelium cells: estradiol and progesterone regulate differentiation, gene expression, and cellular function. *Biol Reprod.* 2013, 89(3): 54, 1-12.
64. Chernaeva L, Milenov K. Studies of the adrenergic reactivity in different regions of rabbit and rat oviduct. *Acta Physiol Pharmacol Bulg.* 1978, 4: 19-25.
65. Chian RC, Sirard MA. Fertilizing ability of bovine spermatozoa co-cultured with oviduct epithelial cells. *Biol Reprod.* 1995, 52: 156-162.
66. Coy P, Canovas S, Mondejar I, Saavedra MD, Romar R, Grullon L, Matas C, Aviles M. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *PNAS.* 2008, 105: 809-814.
67. Coy P, Avilés M. What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biol Rev Cambr Phil Soc.* 2010, 85: 593-605.
68. Coy P, García-Vázquez FA, Visconti PE, Avilés N. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reprod.* 2012, 144: 649-660.
69. Cramo MT, Losinno L, Aguilar J, Araujo GH, Alvarenga M. Oocyte transport to the oviduct of superovulated mares. *Animal Reprod Sci.* 2006, 94: 337-339.

70. Croxatto HB. Physiology of gamete and embryo transport through the fallopian tube. *Reprod Biomed Online*. 2002, 4: 160–169.
71. Czaja K, Majewski M, Klinkosz B, Kaleczyc J. Adrenergic and acetylcholinesterase-positive innervation of the bovine oviduct. *Folia Morphol*. 1993, (Warsz.), 52: 151–159.
72. Czaja K, Kaleczyc J, Sienkiewicz W, Majewski M, Lakomy M. Peptidergic innervation of the porcine oviduct studied by double labelling immunohistochemistry. *Folia Histochem. Cytobiol*. 1996, 34:141–150.
73. Czaja K. Distribution of Primary Afferent Neurons Innervating the Porcine Oviduct and Their Immunohistochemical Characterization. *Cells Tissues Organs*. 2000, 166: 275–282.
74. Czaja K, Kaleczyc J, Pidsudko Z, Franke-Radowiecka A, Lakomy M. Distribution of efferent neurons innervating the oviduct in the pig. *Folia Morphol*. 2001a, (Warsz.), 60: 243–248.
75. Czaja K, Wasowicz K, Klimczuk M, Podlasz P, Lakomy M. Distribution and immunohistochemical characterization of paracervical neurons innervating the oviduct in the pig. *Folia Morphol*. 2001b, (Warsz.), 60: 205–211.
76. Day FT. Survival of spermatozoa in the genital tract of the mare. *J Agric Sci*. 1942, 32: 108–111.
77. Day BN, Polge C. Effects of progesterone on fertilization and egg transport in the pig. *J Reprod Fertil*. 1968, 17: 227-230.
78. Dellmann HD. Sistema reproductor femenino. En “*Histología Veterinaria*”. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España, 1994, 278.
79. DeMott RP, Lefebvre R, Suarez SS. Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. *Biol Reprod*. 1995, 52: 1395–1403.
80. Denissenko P, Kantsler V, Smith DJ, Kirkman-Brown J. Human spermatozoa migration in microchannels reveals boundary-following navigation. *PNAS*. 2012, 109(21): 8007–8010.
81. Desantis S, Ventriglia G, Zizza S, Guaricci AC, Losurdo M, Zarrilli A, Albrizio M. Changes in the expression of the mu-opioid receptor in the mare oviduct during oestrus and anoestrus. *Anim Reprod Sci*. 2010, 119: 40-49.
82. Desantis S, Zizza G, Accogli F, Acone R, Rossi R, Resta L. Morphometric and ultrastructural features of the mare oviduct epithelium during oestrus. *Theriogenol*. 2011, 75: 671-678.
83. Desantis S, Accogli G, Silvestre F, Binetti F, Caira M, Lacalandra GM. Modifications of carbohydrate residues in the sheep oviductal ampulla after superovulation. *Theriogenol*. 2015, 83: 943–952.



84. Desjardins C, Hafs HD. Maturation of the female bovine genitalia from birth through puberty. *J Anim Sci.* 1969, 28:502-507.
85. Dixon RE, Hwang SJ, Henning GW, Ramsey KH, Schripsema JH, Sanders KM and Ward SM. Chlamydia infection causes loss of pacemaker cells and inhibits oocyte transport in the mouse oviduct. *Biol Reprod.* 2009, 80: 665-673.
86. Dobrinski I, Ignatz GG, Thomas PG, Ball BA. Role of carbohydrates in the attachment of equine spermatozoa to uterine tubal (oviductal) epithelial cells in vitro. *Am J Vet Res.* 1996a, 57: 1635–1639.
87. Dobrinski I, Suárez SS, Ball BA. Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro. *Biol. Reprod.* 1996, 54: 783–788.
88. Dobrinski I, Thomas PGA, Ball BA. The oviductal sperm reservoir in the horse: functional aspects. *Proc Ann Meet Soc Theriogenol.* 1996, 265–270.
89. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. In “Textbook of Veterinary Anatomy”, Part III, Chapter 22: The Pelvis and Reproductive Organs of the Horse. Saunders-Elsevier, Fourth Ed., 2010.
90. Einer-Jensen N. Countercurrent transfer in the ovarian pedicle and its physiological implications. *Oxf Rev Reprod Biol.* 1988, 10: 348–381.
91. Einer-Jensen N, Hunter RHF. Physiological and pharmacological aspects of local transfer of substances in the ovarian adnexa in women. *Hum. Reprod. Update.* 2000. 6, 132–138.
92. Einer-Jensen N, Hunter RHF. Counter-current transfer in reproductive biology. *Reproduction.* 2005, 129:9-18.
93. Ekhlesi-Hundrieser M, Gohr K, Wagner A, Tsoлова M, Petrunkina A, Töpfer-Petersen E. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biol Reprod.* 2005, 73: 536–545.
94. El-Banna AA, Hafez ESE. Profile analysis of the oviductal wall in rabbits and cattle. *Anat Rec.* 1969, 166:469-476.
95. England GCW, Burgess CM, Freeman SL, Smith SC, Pacey AA. Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch. *Theriogenol.* 2006, 66: 1410–1418.
96. England GCW, Burgess CM, Clutterbuck AL, Freeman SL. Epithelial surface changes and spermatozoa storage in the reproductive tract of the bitch. *Vet J.* 2013, 195: 185-191.

97. Eriksen T, Terkelsen O, Hyttel P, Greve T. Ultrastructural features of secretory cells in the bovine oviduct epithelium. *Anat Embryol (Berl)*. 1994, 190: 583–90.
98. Farley J. *Gametes and Spores: Ideas about Sexual Reproduction*. The John Hopkins University Press, Baltimore, MD. 1982, 1750–1914.
99. Fiala SM, Pimentel CA, Gelpi Mattos AL, Macedo Gregory R, Costa Mattos R. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenol*. 2007b, 67: 556–562.
100. Fiala SM, Jobim MI, Katila T, Gregory RM, Mattos RC. Sperm distribution in the oviduct and uterus of mares within two hours after artificial insemination. *Pferdeheilkunde*, 2008, 24: 96-98.
101. Fiala SM, Cruz LA, Rodrigues RF, Jobim MI, Gregory RM, Mattos RC. Sperm cells in the reproductive tract of the mare: Where can we find them? *Pferdeheilkunde*, 2010, 26: 19-21.
102. Fléchon JE, Hunter RHF. Distribution of spermatozoa in the utero-tubal junction and isthmus of pigs, and their relationship with the luminal epithelium after mating: a scanning electron microscope study. *Tissue & Cells*. 1981, 13 (1):127-139.
103. Flieger S. Neural vegetative centers of the reproductive organs of sheep. *Med Weter*. 1978, 34: 221-227.
104. Flieger S, Boratynski Z, Welento J, Eustachiewicz R, Szalak M, Krzyzanowski J, Sławomirski J. Experimental studies on localization of the nervous centers of ovary and oviduct in the cow. *Pol Arch Weter*. 1984, 24:261-273.
105. Flieger S, Boratynski Z, Welento J, Krzyzanowski J, Sławomirski J. Sources of the autonomic and afferent fibers to the horns and body of the uterus in pig. *Folia Morphol (Warsz)*. 1988a, 47:77-82.
106. Flieger S, Welento J, Boratynski Z, Krzyzanowski J, Sławomirski J. Sources of the autonomic and afferent fibers to the clitoris in pig. *Folia Morphol (Warsz)*. 1988b, 47: 83-88.
107. Freeman SL, England GCW. Storage and release of spermatozoa from the pre-uterine tube reservoir. *PLoS ONE*. 2013, 8(2): 1-10.
108. Gabler C, Odau S, Muller K, Schon J, Bondzio A, Einspanier R. Exploring cumulus-oocyte-complex-oviductal cell interactions: Gene profiling in the bovine oviduct. *J Physiol Pharmacol*. 2008, 59(9): 29-42.
109. Garfield RE, Kannan MS, Daniel EE. Gap junction formation in myometrium: control by estrogens, progesterone, and prostaglandins. *Am J Physiol*. 1980, 238(3): 81-89.
110. Geng JG, Raub TJ, Baker CA, Sawada GA, Ma L, Elhammer AP. Expression of a P-selectin ligand in zona pellucida of porcine oocytes and P-selectin on acrosomal

- membrane of porcine sperm cells. Potential implications for their involvement in sperm-egg interactions. *J Cell Biol.* 1997, 137: 743–754.
111. Germaná A, Cassata R, Cristarella S, Scirpo A, Muglia U. Three-dimensional architecture of the myosalpinx in the mare as revealed by scanning electron microscopy. *Anat Rec.* 2002, 267:235–241.
  112. Gilbert CL, Cripps PJ, Wathes DC. Effect of oxytocin on the pattern of electromyographic activity in the oviduct and uterus of the ewe around oestrus. *Reprod Fertil Dev.* 1992, 4(2): 193-203.
  113. Ginther OJ. *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects*, 2nd ed. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1992.
  114. Ginther OJ. *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color - Doppler Ultrasonography - Book 4*, Equiservices Publishing, Cross plains 2007.
  115. Guidobaldi HA, Teves ME, Unates DR, Giojalas LC. Sperm transport and retention at the fertilization site is orchestrated by a chemical guidance and oviduct movement. *Reprod.* 2012, 143: 587–596.
  116. Gwathmey TM, Ignatz GG, Suarez SS. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod.* 2003, 69: 809–815.
  117. Hackett AJ, Hafs HD. Biochemical and Morphological Changes in Bovine Tubular Genitalia during the Estrous Cycle. In *J Anim. Sci.* 1969, 29(1): 35–38.
  118. Hafez ESE, Thibault C. *Sperm Transport, Survival and Fertilizing Ability.* INSERM Colloquium Publication. 1973. Paris.
  119. Hafez ESE, Blandau RJ. *The mammalian oviduct.* Chicago and London: University of Chicago Press. 1969.
  120. Hafez ESE, Black DL. The mammalian uterotubal junction. In Hafez ESE and Blandau RJ (eds), *The Mammalian Oviduct: Comparative Biology and Methodology.* The University of Chicago Press, Chicago, IL. 1969, pp. 85–128.
  121. Hafez B, Hafez ESE. Chapter 2, “Anatomy of Female Reproduction”. In: *Reproduction in Farm Animals*, 7<sup>th</sup> Ed. Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2000.
  122. Hafez ESE, Kanakawa H. Scanning microscopy study of the bovine reproductive in the female. *Cornell Vet.* 1973, 63: 469-482.
  123. Heape W. On the artificial insemination of mares, *Veterinarian.* 1989, 71: 202-212.
  124. Hermoso M, Barrera N, Morales B, Pérez S, Villalón M. Platelet activating factor increases ciliary activity in the hamster oviduct through epithelial production of prostaglandin E2. *Pflügers Arch Eur J Physiol.* 2001, 442: 336–345.

125. Herrlinger R, Feiner E. Why did Vesalius not discover the Fallopian Tubes? *Medical History*. 1964, 8: 335-341.
126. Hollis DE, Frith PA, Vaughan JD, Chapman RE, Nancarrow CD. Ultrastructural changes in the oviductal epithelium of Merino ewes during the estrous cycle. *Am J Anat*. 1984, 171: 441-456.
127. Holt WV, Fazeli A. Do sperm possess a molecular passport? Mechanistic insights into sperm selection in the female reproductive tract. *Mol Hum Reprod*. 2015, 21(6): 491-501.
128. Hook SJ, Hafez ESE. A comparative anatomical study of the mammalian uterotubal junctions. *J Morph*. 1968, 125: 159-184.
129. Hunter RHF, Leglise PC. Polyspermic fertilization following tubal surgery in pigs, with particular reference to the role of the isthmus. *J Reprod Fertil*. 1971, 24: 233-246.
130. Hunter RHF. Local action of progesterone leading to polyspermic fertilization in pigs. *J. Reprod. Fertil*. 1972, 31: 433-444.
131. Hunter RHF. Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition of excessive numbers of spermatozoa. *J Exp Zool*. 1973, 183: 57-63.
132. Hunter RHF. Function and malfunction of the fallopian tubes in relation to gametes, embryos and hormones. *Europ J Obstet Gynec Reprod Biol*. 1977, 7(4): 267-283.
133. Hunter RHF. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *J Reprod Fertil*. 1981, 63: 109-117.
134. Hunter RHF. Anatomy and physiology of the Fallopian tube. In *Tubal Infertility: Diagnosis and Treatment* (eds G. Chamberlain and R. Winston). 1982a, pp. 1-29. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
135. Hunter RHF. Interrelationships between spermatozoa, the female reproductive tract, and the egg investments. In *Proceedings of 34th Easter School in Agricultural Science*. University of Nottingham, Chapter 3, 1982b pp. 49-63. Butterworths, London.
136. Hunter RHF, Nichol R. Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *J Exp Zool*. 1983. 228: 121-128.
137. Hunter RHF, Cook B and Poyser NL. Regulation of oviduct function in pigs by local transfer of ovarian-steroids and prostaglandins – a mechanism to influence sperm transport. *Eur J Obstet Gynecol*. 1983, 14: 225-232.
138. Hunter RHF. Preovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J Reprod Fertil*. 1984, 72: 203-211.

139. Hunter RHF, Wilmut I. Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod Nutr Develop.* 1984, 24: 597–608.
140. Hunter RHF, Nichol R. A pre-ovulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. *J Reprod Fert.* 1986, 77, 599–606.
141. Hunter RHF. The fallopian tubes. “Their role in fertility and infertility”. (Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag) 1988.
142. Hunter RHF. Ovarian programming of gamete progression and maturation in the female genital tract. *Zool J Linn Soc.* 1989, 95: 117–124.
143. Hunter RHF, Fléchon B, Fléchon JE. Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: a scanning electron microscopy study. *Tissue Cell.* 1991, 23: 641– 656.
144. Hunter RHF. Modulation of gamete and embryonic microenvironments by oviduct glycoproteins. *Mol Reprod Dev.* 1994, 39: 176–181.
145. Hunter RHF. Ovarian endocrine control of sperm progression in the fallopian tubes. *Oxf Rev Reprod Biol.* 1995, 17: 85–124.
146. Hunter RHF. Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilization to avoid polyspermy. *Mol Reprod Dev.* 1996, 44(3): 417–422.
147. Hunter RHF. *Physiology of the Graafian Follicle and Ovulation.* Cambridge University Press, Cambridge. 2003.
148. Hunter RHF. The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? *Reprod Nutr Dev.* 2005, 45: 281-90.
149. Hunter RHF. Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2012, 87: 244–255.
150. Ignatz G, Lo M, Perez C, Gwathmey T, Suarez SS. Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod.* 2001, 64: 1806–1811.
151. Ismail PM, Li J, DeMayo FJ, O’Malley BW, Lydon JP. A novel LacZ reporter mouse reveals complex regulation of the progesterone receptor promoter during mammary gland development. *Mol Endocrinol.* 2002, 16: 2475–2489.
152. Jansen RP, Bajpai VK. Oviduct acid mucus glycoproteins in the estrous rabbit: ultrastructure and histochemistry. *Biol Reprod.* 1982, 26: 155– 68.
153. Jansen, RP. Endocrine response in the fallopian tube. *Endocr Rev.* 1984, 5: 525-551.

154. Jay V. A portrait in history. The legacy of Reinier De Graff. Arch Pathol Lab Med. 2000, 124: 1115-1116.
155. Jasko DJ, Martin JM, Squires EL. Effect of insemination volume and concentration of spermatozoa on embryo recovery in mares. Theriogenol, 1992, 37, 1233-1239.
156. Jiwakanon J, Persson E, Kaocket K, Dalin AM. The Sow Endosalpinx at Different Stages of the Oestrous Cycle and at Anoestrus: Studies on Morphological Changes and Infiltration by Cells of the Immune System. Reprod Domest Anim. 2005, 40: 28-39.
157. Johnson AD, Foley CW. In "The oviduct and its function", Ed. Academic Press Inc. London, 1974.
158. Kainer RA. Chapter 165, vol. 2, part III. Internal reproductive anatomy, In "Equine Reproduction". McKinnon AO, Squire EL, Vaala WE and Varner DD. 2<sup>nd</sup> Ed. Wiley-Blackwell. 2011, 1582-1597.
159. Kannisto P, Ekblad E, Helm G, Owman C, Sjöberg N.O, Stjernquist M, Sundler F, Walles B. Existence and coexistence of peptides in nerves of the mammalian ovary and oviduct demonstrated by immunocytochemistry. Histochemistry. 1986, 86: 25-34.
160. Kapur RP, Johnson LV. Ultrastructural evidence that specialized regions of the murine oviduct contribute a glycoprotein to the extracellular matrix of mouse oocytes. Anat Rec 1988, 221: 720-729.
161. Katila T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. Equine Reproduction VI. 1995, 515-517.
162. Katila T. Interactions of the uterus and semen. Pferdeheilkunde. 1995, 13: 508-511.
163. Katila T, Sankari S, Mäkelä O. Transport of spermatozoa in the reproductive tracts of mares. J Reprod Fertil Suppl. 2000, 56: 571-578.
164. Kaupp UB, Kashikar ND, Weyand I. Mechanisms of sperm chemotaxis. Annu Rev Physiol. 2008, 70: 93-117.
165. Kawakami E, Kashiwagi C, Hori T, Tsutsui T. Effects of canine oviduct epithelial cells on movement and capacitation of homologous spermatozoa *in vitro*. Anim Reprod Sci, 2001, 68: 121-131.
166. Kennedy JP, Worthington C, Cole ER. The postnatal development of the ovary and uterus of the merino lamb. J Reprod Fertil. 1974, 36: 275-284.
167. Kenngott RA, Vermehren M, Sauer U, Ebach K, Sinowatz F. Cellular expression and localization of estrogen receptor alpha and progesterone receptor mRNA in the bovine oviduct combining laser-assisted microdissection, quantitative PCR, and in situ hybridization. J Histochem Cytochem. 2011, 59: 312-327.

168. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972, 26: 239–257.
169. Killian GJ. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci*. 2004, 82(3): 141-153.
170. Killian GJ. Evidence that oviduct secretions influence sperm function: A retrospective view for livestock, *J Anim Sci*. 2011. 89: 1315–1322.
171. König HE and Liebich HG. Chapter 11, Female genital organs (*Organa genitalia feminine*), In “Veterinary Anatomy of the Domestic Animals” Textbook and Colour Atlas. Ed. Schattauer GmbH, Hölderbinstraße. Germany. 2004, 397-415.
172. Kölle S, Dubielzig S, Reese S, Wehrend A, König P, Kummer W. Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: *ex vivo* analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow. *Biol Reprod*. 2009, 81: 267–274.
173. Kotilainen T, Huhtinen M, Katila T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenol*. 1994, 41: 629-636.
174. Kress A, Morson G. Changes in the oviductal epithelium during the estrous cycle in the marsupial *Monodelphis domestica*. *J Anat*. 2007, 211: 503–517.
175. Latshaw WK. *Veterinary Developmental Anatomy. A Clinically Oriented Approach*. Hamilton, Ontario: BC Decker Inc. 1987.
176. Leemans B, Gadella BM, Sostaric E, Nelis H, Stout TA, Hoogewijs M, Van Soom A. Oviduct binding and elevated environmental pH induce protein tyrosine phosphorylation in stallion spermatozoa. *Biol Reprod*. 2014, 91(1): 13, 1-12.
177. Leemans B, Gadella BM, Stout TA, Sostaric E, Schauwer CD, Nelis H, Hoogewijs M, Van Soom A. Combined albumin and bicarbonate induces head-to-head sperm agglutination which physically prevents equine sperm-oviduct binding. *Reprod*. 2016, 151: 313–330.
178. Leese HJ, Tay JI, Reischl J, Downing SJ. Formation of Fallopian tubal fluid role of a neglected epithelium. *Reprod*. 2001, 121: 339-346.
179. Leese HJ. Studies on the movement of glucose, pyruvate and lactate into the ampulla and isthmus of the rabbit oviduct. *Quart J Exp Physiol*. 1983, 68: 89-96.
180. Lefebvre R, Chenoweth PJ, Drost M, LeClear CT, MacCubbin M, Dutton JT, Suárez SS. Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle. *Biol Reprod*. 1995b, 53: 1066–1074.
181. Lefebvre R, Suárez SS. Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biol Reprod* 1996; 54: 575–582.

182. Lewis AW, Berardinelli JG. Gross anatomical and histomorphometric characteristics of the oviduct and uterus during the pubertal transition in sheep. *J Anim Sci.* 2001, 79: 167–175
183. Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y. Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nature.* 2011, 471: 387–391.
184. Liu IKM, Scott M. Sperm in the mare oviduct. *J Equine Vet Sci.* 1995, 20(12): 836.
185. Lombard L, Banner BM, McNutt SH. The morphology of the oviduct of virgin heifers in relation to the oestrus cycle. *J Morphol.* 1950, 86:1-15.
186. Lyons RA, Saridogan E, Djahanbakhch O. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum Reprod Update.* 2006, 12: 363-372.
187. Madill S, Troedsson MHT, Alexander SL, Shand N, Santschi EM, Irvine CHG. Simultaneous recording of pituitary oxytocin secretion and myometrial activity in oestrous mares exposed to various breeding stimuli. *J Reprod Fertil.* 2000, Suppl. 56: 351-361.
188. Mahmood T, Saridogan E, Smutna S, Habib AM, Djahanbakhch O. The effect of ovarian steroids on epithelial ciliary beat frequency in the human Fallopian tube. *Hum Reprod.* 1998, 13: 2991–2994.
189. Majewski M, Sienkiewicz W, Kaleczyc J, Mayer B, Czaja K, Lakomy M. The distribution and co-localization of immunoreactivity to nitric oxide synthase, vasoactive intestinal polypeptide and substance P within nerve fibres supplying bovine and porcine female genital organs. *Cell Tissue Res.* 1995, 281: 445–464.
190. Mburu JN, Einarsson S, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H. Distribution, number and membrane integrity of spermatozoa in the pig oviduct in relation to spontaneous ovulation. *Anim Reprod Sci.* 1996, 45: 109–21.
191. Medvei VC. (1982). *A History of Endocrinology.* MTP Press Ltd, Lancaster, UK.
192. Mejia CM, Paramo RR, Tolosa J, Saltiel AC. Histological and histochemical characteristics of the oviduct of the mare under the influence of different ovarian structures. *Vet Mex.* 1984, 15: 171.
193. Michailova KN, Usonoff KG. Serosal membranes (pleura, pericardium, peritoneum). Normal structure, development and experimental pathology. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2006, 183: 1–144.
194. Miki K, Clapham DE. Rheotaxis Guides Mammalian Sperm. *Curr Biol.* 2013, 23: 443–452.
195. Miller MR, Mannowetz N, Iavarone AT, Safavi R, Gracheva EO, Smith JF, Hill RZ, Bautista DM, Kirichok Y, Lishko PV. Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via sex hormone progesterone. *Science,* 2016, 10.1126/science.aad6887.



196. Morita M, Miyamoto H, Ishii T, Sugimoto M. The secretory cells of the goat oviductal epithelium: an ultrastructural study. *J Reprod Dev.* 1995, 41: 123-128.
197. Mouguelar H, Díaz T, Borghi D, Quinteros R, Bonino F, Apichela SA, Aguilar JJ. Morphometric Study of the Mare Oviductal Mucosa at Different Reproductive Stages. *Anat Rec*, 2015, 298: 1950–1959.
198. Muglia U, Vizza E, Correr S, Germaná G, Motta PM. Architecture of the myosalpinx of the isthmus in the guinea pig by means of scanning electron microscopy. *Acta Anat.* 1991a, 142: 171–173.
199. Muglia U, Vizza E, Correr S, Germaná G, Motta PM. The three-dimensional architecture of the myosalpinx in the rabbit as revealed by scanning electron microscopy. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1991b, 23: 525–532.
200. Muglia U, Vizza E, Macchiarelli G, Germaná G, Motta PM. The three-dimensional architecture of the myosalpinx in mammals: an anatomical model for a functional hypothesis. *Arch Histol Cytol.* 1992, 55: 171–181.
201. Muglia U, Vizza E, Correr S, Germaná G, Motta PM. The three-dimensional architecture of the myosalpinx in the rat (*Rattus norvegicus*) as revealed by scanning electron microscopy. *Histol Histopathol.* 1996a, 11: 873–880.
202. Muglia U, Germaná A, Laurá R, Germaná G, Motta PM. The three-dimensional architecture of the myosalpinx in the sheep as revealed by scanning electron microscopy. *Arch Histol Cytol.* 1996b, 59: 331–338.
203. Muglia U, Germaná A, Abbate F, Germaná G, Motta PM. The three-dimensional architecture of the myosalpinx in the cow as revealed by scanning electron microscopy. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1997a, 29: 201–207.
204. Muglia U, Abbate F, Correr S, Germaná G, Motta PM. The architecture of the myosalpinx in the sow as revealed by scanning electron microscopy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1997b, 74: 93–98.
205. Muglia U, Motta PM. A new morpho-functional classification of the Fallopian tube based on its three-dimensional myoarchitecture. *Histol Histopathol.* 2001, 16: 227–237.
206. Murray MK, DeSouza MM, Messinger SM. Oviduct during early pregnancy: hormonal regulation and interactions with the fertilized ovum. *Microsc Res Tech.* 1995, 31: 497–506.
207. Mwanza AM, Englund P, Pettersson A, Einarsson S. Oviductal isthmic motility patterns as monitored by Polyview™ in unrestrained sows around ovulation. *Anim Reprod Sci.* 2000, 62: 309-320.

208. Nabil TM. Histological Changes of the Ampullary Epithelium of Cyclic Albino Rat Oviduct: Light and Ultrastructure Examination. *Global Veterinaria*. 2015, 14(6): 903-912.
209. Nakahari T, Nishimura A, Shimamoto C, Sakai A, Kuwabara H, Nakano T, Tanaka S, Kohda Y, Matsumura H, Mori H. The regulation of ciliary beat frequency by ovarian steroids in the guinea pig Fallopian tube: interactions between oestradiol and progesterone. *Biomed Res (Tokyo, Japan)*. 2011, 32: 321–328.
210. Nayak RK, Albert EN, Kassira WN. Cyclic ultrastructural changes in ewe uterine tube (oviduct) infundibular epithelium. *Am J Vet Res*. 1976, 37: 923-933.
211. Nayak RK, Ellington EF. Ultrastructural and ultracytochemical cyclic changes in bovine uterine tube (oviduct) epithelium. *Am J Vet Res*. 1997, 38: 157–168.
212. Nelis H. Deciphering the Embryo-Maternal Dialogue in the Horse Using an Oviduct Explant Model. Dissertation submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium. 2015.
213. Nilsson O, Reinius S. Light and electron microscopic structure of the oviduct. In: Hafez ESE, Blandau RJ, editors. *The mammalian oviduct*. The University of Chicago Press, Chicago, London; 1969. pp. 57–84.
214. Noden DM, DeLahunta A. *The Embryology of Domestic Animals*. Philadelphia: Williams & Wilkins. 1985. Samper JC: *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, 1st ed. Philadelphia: WB Saunders, 2000, 306.
215. Odor DL, Blandau RJ. Egg transports over the fimbrial surface of the rabbit oviduct under experimental conditions. *Fertil Steril*. 1973, 24: 292-300.
216. Odor DL, Gaddumrosse P, Rumery RE, Blandau RJ. Cyclic variations in the oviductal ciliated cells during the menstrual-cycle and after estrogen-treatment in the pig-tailed monkey, *Macaca nemestrina*. *Anat Rec*. 1980, 198: 35–57.
217. Odor DL, Gaddum-Rosse P, Rumery RE. Secretory cells of the oviduct of the pig-tailed monkey, *Macaca nemestrina*, during the menstrual cycle and after estrogen treatment. *Am J Anat*. 1983, 166: 149-172.
218. Odor DL, Augustine JR. Morphological study of changes in the baboon oviductal epithelium during the menstrual cycle. *Microsc Res Tech*. 1995, 32: 13–28.
219. Ohkawa H. Electrical activity of the smooth muscle of guinea-pig oviduct and effects of catecholamines. *Int J Fertil*. 1982, 27: 189–197.
220. Oliphant G. Biochemistry and immunology of oviductal fluid. In *The Fallopian Tubes: Studies and Clinical Contribution* (ed. Seigler AM), Mount Kisco NY. Futura Publishing Co. 1986, 129-145.

221. Oren-Benaroya R, Orvieto R, Gakamsky A, Pinchasov M, Eisenbach M. The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Hum Reprod.* 2008, 23: 2339–2345.
222. Orihuela PA, Ortiz ME, Croxatto HB. Sperm migration into and through the oviduct following artificial insemination at different stages of the estrous cycle in the rat. *Biol Reprod.* 1999, 60: 908–913.
223. Orihuela PA, Croxatto HB. Acceleration of oviductal transport of oocytes induced by estradiol in cycling rats is mediated by nongenomic stimulation of protein phosphorylation in the oviduct. *Biol Reprod.* 2001, 65: 1238–1245.
224. Orihuela PA, Parada-Bustamante A, Cortes PP, Gatica C, Croxatto HB. Estrogen receptor, cyclic adenosine monophosphate, and protein kinase are involved in the nongenomic pathway by which estradiol accelerates oviductal oocyte transport in cyclic rats. *Biol Reprod.* 2003, 68: 1225–1231.
225. Overstreet JW, Cooper GW. Reduced sperm motility in the isthmus of the rabbit oviduct. *Nature.* 1975, 258: 718–719.
226. Overstreet JW, Katz DF, Johnson LL. Motility of rabbit spermatozoa in the secretions of the oviduct. *Biol Reprod.* 1980, 22: 1083–1088.
227. Owman C, Sjöberg NO. Adrenergic innervation of the female genital tract of the dog. *J. Reprod. Med.* 1972, 8: 63–66.
228. Özen A, Ergün E, Kürüm A. Histomorphology of the oviduct epithelium in the Angora rabbit. *Turk J Vet Anim Sci.* 2010, 34(3): 219-226.
229. Pacey AA, Freeman SL, England GCW. Contact of dog spermatozoa with homologous uterine tube epithelium prolongs flagellar activity in relation to the stage of the estrus cycle. *Theriogenol.* 2000, 54: 109–118.
230. Palma G, Miceli D. Interacción funcional de los espermatozoides y el tracto genital femenino. En: *Biotechnología de la Reproducción.* 2º ed., 2008.
231. Parker WG, Sullivan JJ, First NL. Sperm transport and distribution in the mare. *J Reprod Fertil Suppl.* 1975, 23: 63–66.
232. Pedrero-Badillo F, Anaya-Hernández A, Corona-Quintanilla DL, Castellán F, Pacheco P, Martínez-Gómez M, Cuevas E. Morphohistological characteristics of rabbit oviduct: A proposal for a single regionalization. *Anim Reprod Sci.* 2013, 143: 102-111.
233. Pettersson A. Cyclic variations in intraluminal pressure in the isthmus of the oviduct in unrestrained gilts. *J Vet Med.* 1991, Ser. A 38: 337–343.
234. Pickett BW, Amann RP, Mckinnon AO, Squires EL, Voss JL. Management of the stallion for maximum reproductive efficiency, II. Fort Collins: Colorado State University, 1989.

235. Pollard JW, Plante C, King WA, Hansen PJ, Betteridge KJ, Suárez SS. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells. *Biol Reprod.* 1991, 44: 102-107.
236. Polge C, Salamon S, Wilmut I. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet Rec.* 1970, 87: 424-429.
237. Polge C. Fertilization in pig and horse. *J Reprod Fertil.* 1978. 54: 461-471.
238. Pratt HLJ. The storage of spermatozoa in the oviductal glands of western north Atlantic sharks. *Environ Biol Fish.* 1993, 38: 139-49.
239. Priyadarsana M, Wijayagunawardane B, Miyamoto A. Endothelin-1 system in the bovine oviduct: a regulator of local contraction and gamete transport. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004, 44 Suppl 1: 51.
240. Pursel VG, Schulman LL, Johnson LA. Distribution and morphology of fresh and frozen-thawed sperm in the reproductive tract of gilts. *Biol Reprod.* 1978, 19: 69-76.
241. Raychoudhury SS, Millette CF. Multiple fucosyl transferases and their carbohydrate ligands are involved in spermatogenic cell-Sertoli cell adhesion *in vitro* in rats. *Biol Reprod.* 1997, 56: 1268-1273.
242. Rigby, JP. The length of the uterine horn and fallopian tube. *Res Vet Sci.* 1968, 9: 551-556.
243. Rigby S, Derczo S, Brinsko SP, Blanchard TL, Taylor T, Forrest DW, Varner DD. Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination. In: *Proceedings of the 46<sup>th</sup> Annual Convention of the AAEP, 2000*, pp. 332-334.
244. Rijsselaere T, Van Soom A, Van Cruchten S, Coryn M, Görtz K, Maes D, de Kruif A. Sperm distribution in the genital tract of the bitch following artificial insemination in relation to the time of ovulation. *Reprod.* 2004, 128: 801-811.
245. Rodriguez-Martinez H, Einarson S, Larsson B, Akusu M and Setergren L. Spontaneous Motility of the Pig Oviduct *in vitro*. *Biol Reprod.* 1982a, 26: 98-104.
246. Rodriguez-Martinez H, Einarsson S, Larsson B. Spontaneous motility of the oviduct in the anaesthetized pig. *J Reprod Fertil.* 1982b, 66: 615-624.
247. Rodriguez-Martinez H, Stanchev Ph, Edqvist LE, Einarsson S. Estrogen and progesterone nuclear receptor levels in the pig oviduct in relation to its spontaneous motility. 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, University of Illinois at Urbana-Champaign, USA. Vol. III. Brief communications. 1984.

248. Rodriguez-Martinez H, Nicander L, Viring S, Einarsson S, Larsson K. Ultrastructure of the Uterotubal Junction in Preovulatory Pigs. *Anat Histol Embryol.* 1990, 19: 16-36.
249. Rodriguez-Martinez H, Larsson B, Pertoft H and Kjellén L. GAGs and spermatozoon competence *in vivo* and *in vitro*. In *Gametes: Development and Function Serono Symposia.* 1998, 239–272.
250. Rodriguez-Martinez H, Tienthai P, Suzuki K, Funahashi H, Ekwall H, Johannisson A. Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reprod.* 2001, 58: 129–145.
251. Rodriguez-Martinez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, Johannisson A, Vazquez JM. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenol.* 2005, 63: 514–35.
252. Rodriguez-Martinez H. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenol.* 2007, 68: 138–146.
253. Rowley HS, Squires EL, Pickett BW. Effect of insemination volume on embryo recovery in mares. *J Equine Vet Sci.* 1990, 10: 298–300.
254. Sack WO. Rooney's Guide to the Dissection of the Horse, 6th ed. Ithaca, N.Y: Veterinary Textbooks, 1991.
255. Saint-Dizier M, Sandra O, Ployart S, Chebrout M, Constant F. 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.* 2012, 10: 76.
256. Samper JC. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, 1st ed. Philadelphia WB Saunders. 2010, pp. 336.
257. Sánchez E. En: *Aristóteles, Reproducción de los Animales*, Ed. Gredos, Madrid, España, 1994.
258. Saruhan BG, Sagsoz H, Akbalik ME, Ketani MA. Distribution of estrogen receptor alpha and progesterone receptor  $\beta$  in the bovine oviduct during the follicular and luteal phases of the sexual cycle: an immunohistochemical and semi-quantitative study. *Biotech Histochem.* 2011, 86: 315–325.
259. Satir P and Christensen ST. Structure and function of mammalian cilia, *Histochem Cell Biol.* 2008, 129(6): 687–693.
260. Sawyer HR, Olson PN, Gorell TA. Effects of progesterone on the oviductal epithelium in estrogen-primed prepubertal Beagles: Light and electron microscopic observations. *Am J Anat.* 1984, 169: 75–87.
261. Schatten H and Constantinescu GM. Chapter 2, *Anatomy of Reproductive Organs*, In "Comparative Reproductive Biology". Blackwell Publishing, 2007.

262. Schilling E. Untersuchungen u"ber den Bau und die Arbeitsweise des Eileiters vom Schaf und Rind. Z Vet Med. 1962, 9: 805–816.
263. Scott MA, Liu IKM, Robertson KR, Hanrath M, Overstreet JW, Drobnis EZ. Acrosomal status and movement characteristics of sperm in the oviducts of normal mares. Proc 6th Int Symp Eq Reprod, Caxambu, Brazil, 1994, 173-174.
264. Scott MA, Liu IKM, Overstreet JW, Enders AC. The structural morphology and epithelial association of spermatozoa at the utero-tubal junction: a descriptive study of equine spermatozoa in situ using scanning electron microscopy. J Reprod Fertil Suppl 2000, 56: 415–421.
265. Seckinger DL. Spontaneous contraction of the Fallopian tube of the domestic pig with reference to the oestrous cycle. 1923, Bull John Hopkins Hosp, 34: 236-239.
266. Senger PL. Pathways to Pregnancy and Parturition. 2<sup>nd</sup> Revised Ed, Current Conception Inc, USA, 2005.
267. Sever DM, Rania LC, Krenz JD. Annual cycle of sperm storage in spermathecae of the red-spotted newt, *Notophthalmus viridescens* (amphibia: Salamandridae). J Morphol. 1996, 227: 155–170.
268. Sever DM, Halliday T, Waights V, Brown J, Davies HA, Moriarty EC. Sperm storage in females of the smooth newt (*Triturus vulgaris* L): Ultrastructure of the spermathecae during the breeding season. J Exp Zool. 1999, 283: 51–70.
269. Sever DM. Female sperm storage in amphibians. J Exp Zool. 2002, 92: 165–179.
270. Sharma RK, Singh R, Bhardwaj JK, Saini S. Topographic and ultrastructural variations in isthmus segment of oviduct during oestrous cycle in caprines. Scanning. 2013, 35: 344–348.
271. Sharma RK, Singh R, Bhardwaj JK. Scanning and transmission electron microscopic analysis of ampullary segment of oviduct during estrous cycle in caprines. Scanning. 2015, 37: 36–41.
272. Shirley B, Reeder RL. Cyclic changes in the ampulla of the rat oviduct. Int J Exp Zool. 1996, 276(2): 164–173.
273. Sinowatz F. Development of the urogenital system. In: Essential of Domestic Animal Embryology. Hyttel P, Sinowatz F, Vejlsted M. Chapter 15, Saunders-Elsevier. 2010, 270-277.
274. Sisson S. Female genital organs. In: Getty R, Saunders WB, Sisson S, Grossman JD, editors. The anatomy of the domestic animals. Vol. I, 5th ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1973, p 524–549.
275. Skidmore JA. Reproductive physiology in female Old World Camelids. Anim Reprod Sci. 2011, 124: 148–154.

276. Smith TT, Yanagimachi R. Capacitation status of hamster spermatozoa in the oviduct at various times after mating. *J Reprod Fertil.* 1989, 86: 255–261.
277. Smith TT, Yanagimachi R. Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J Reprod Fertil* 1991, 91: 567–573.
278. Sorger T, Pittman R, Soderwall AL. Principal features of the nerve supply to the ovary, oviduct and tubal third of the uterus in the golden hamster. *Biol Reprod.* 1983, 28: 461–482.
279. Sostaric E, Dieleman SJ, van de Lest CH, Colenbrander B, Vos PL, Garcia-Gil N, Gadella BM. Sperm binding properties and secretory activity of the bovine oviduct immediately before and after ovulation. *Mol Reprod Dev.* 2008, 75: 60–74.
280. Squires EL, McCue PM. Superovulation in mares. *Anim Reprod Sci.* 2007, 99: 1–8.
281. Stanchev PH, Rodriguez-Martinez H, Edqvist LE, Eriksson H. Oestradiol and progesterone receptors in the pig oviduct during the oestrous cycle. *J. Steroid Biochem.* 1985, 22: 115–120.
282. Staples LD, Fleet IR, Heap RB. Anatomy of the utero-ovarian lymphatic network and the composition of afferent lymph in relation to the establishment of pregnancy in the sheep and goat. *J Reprod Fertil.* 1982, 64: 409–420.
283. Štastná D, Štastný P, Rolinec M, Šimko M, Gálik B, Juráček M. Morphological changes of oviduct in postnatal development and in oestrous cycle of heifers. *Acta fytotechn zootechn.* 2013, 16 (4): 90–98.
284. Steffl M, Schweiger M, Sugiyama T, and Amselgruber WM. Review of apoptotic and non-apoptotic events in non-ciliated cells of the mammalian oviduct. *Ann Anat.* 2008, 190: 46–52.
285. Steinhauer N, Boos A, Günzel-Apel AR. Morphological changes and proliferative activity in the oviductal epithelium during hormonally defined stages of the oestrous cycle in the bitch. *Reprod Dom Anim.* 2004, 39: 110–119.
286. Strunker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca influx in human sperm. *Nature*, 2011, 471: 382–386.
287. Suárez SS. Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations *in situ*. *Biol Reprod.* 1987, 36: 203–210.
288. Suárez SS, Refern K, Raynor P, Martin F, Phillips DM. Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct *in vitro*: possible role in formation of a sperm reservoir. *Biol Reprod.* 1991, 44: 998–1004.
289. Suárez SS. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. *Biol Reprod.* 1998, 58: 1105–1107.

290. Suárez SS. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Dom Anim.* 2002, 37: 140–143.
291. Suárez SS. Sperm interactions with the female tract: inspiration for assisted reproduction. *Reprod Fertil Dev.* 2007, 19: 104–10.
292. Suárez SS. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol.* 2008, 52: 455–462.
293. Suzuki H, Tsutsumi Y. Morphological studies on the oviductal mucosa of the mare. *J Fac Agric Hokkaido Univ.* 1979, 59(3): 267–277.
294. Talevi R, Gualtieri R. Molecules involved in sperm–oviduct adhesion and release. *Theriogenol.* 2010, 73: 796–801.
295. Taylor U, Rath D, Zerbe H, Schuberth HJ. Interaction of intact porcine spermatozoa with epithelial cells and neutrophilic granulocytes during uterine passage. *Reprod Domest Anim.* 2008, 43: 166–175.
296. Teilmann SC, Clement CA, Thorup J, Byskov AG, Christensen ST. Expression and localization of the progesterone receptor in mouse and human reproductive organs. *J Endocrinol.* 2006, 191: 525–535.
297. Teves ME, Guidobaldi HA, Unates DR, Sanchez R, Miska W, Publicover SJ, Morales Garcia AA, Giojalas LC. Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PLoS One.* 2009; 4: e8211.
298. Tienthai P, Sajjarengpong K, Techakumphu M. Light and Scanning Electron Microscopic Studies of Oviductal Epithelium in Thai Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) at the Follicular and Luteal Phases. *Reprod Dom Anim.* 2009, 44: 450–455.
299. Thomas, PGA, Ball BA, Brinsko SP. Interaction of equine spermatozoa with oviduct epithelial cell explants is affected by estrous cycle and anatomic origin of explant. *Biol. Reprod.* 1994a, 51(2): 222–228.
300. Thomas PGA, Ball BA, Miller PG, Brinsko SP, Southwood L. A subpopulation of morphologically normal, motile spermatozoa attach to equine oviductal epithelial cell monolayers. *Biol Reprod.* 1994b, 51: 303–309.
301. Todd RB. In. *The cyclopædia of anatomy and physiology, Volume 1.* London, 1836.
302. Tokuhiko K, Ikawa M, Benham AM, Okabe M. Protein disulfide isomerase homolog PDILT is required for quality control of sperm membrane protein ADAM3 and male fertility [corrected]. *PNAS.* 2012, 109: 3850–3855.
303. Trautman A, Fiebiger J. *Fundamentals of the histology of domestic animals.* Comstock Publ Assoc. Ithaca, NY, USA, 1952.



304. Troedsson MHT, Crabo BG, Ibrahim NM, Scott M. Ing M. Mating-induced endometritis: mechanisms, clinical importance and consequences. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP. 1995a, 11-12.
305. Troedsson MHT, Steiger BN, Ibrahim NM, Foster DN. Crabo BG. Mechanisms of sperm induced endometritis in the mare. Biol Reprod. 1995b, 52: 307 (abstract).
306. Troedsson MHT, Liu IK. Crabo BG. Sperm transport and survival in the mare: a review. Theriogenol. 1998, 50: 807-818.
307. Troedsson MHT. Therapeutic considerations for mating induced endometritis. Pferdeheilkunde. 1997, 13: 516-520.
308. Troedsson MHT, Alghamdi AS. Mattisen J. Equine seminal plasma protects fertility of spermatozoa in an inflamed uterine environment. Theriogenol. 2002, 58: 453-456.
309. Tulsiani DR, Yoshida-Komiya H, Araki Y. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. Biol Reprod. 1997, 57: 487-494.
310. Tummaruk P, Tienthai P. 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. 2010, 45: 208-213.
311. Tung CK, Hu L, Fiore AG, Ardon F, Hickman DG, Suárez SS, Wu M. Microgrooves and fluid flows provide preferential passageways for sperm over pathogen *Tritrichomonas foetus*. PNAS. 2015, 112 (17): 5431-5436.
312. Ulbrich, SE. *In vitro* systems for intercepting early embryo-maternal cross-talk in the bovine oviduct. Theriogenol, 2010, 73(6): 802-816.
313. Ulbrich SE, Kettler A, Einspanier R. Expression and localization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and progesterone receptor in the bovine oviduct *in vivo* and *in vitro*. J Steroid Biochem Mol Biol. 2003, 84: 279-289.
314. Urhausen C, Beineke A, Piechotta M, Karre I, Beyerbach M, Günzel-Apel AR. Apoptosis in the uterotubal junction and oviductal isthmus during the estrous cycle of the bitch. Anat Rec. 2011, 294: 342-348.
315. Valle GR, Cassali GD, Nogueira JC, Castro AC, Reis AM, Cardoso FM, Figueiredo CB, Nascimento EF. Nuclear estrogen and progesterone receptors in the oviduct of heifers under natural and superovulated estrous cycles. Anim Reprod Sci. 2007, 101: 28-37.
316. Varner DD, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, Kenney RM. Effects of semen fractionation and dilution ratio on spermatozoa motility parameters. Theriogenol. 1987, 28: 709-723.

317. Velázquez-Cornejo G, Zamora-Ramírez ML. La trompa de Falopio. ¿Qué pensaría hoy Gabriele Fallopio del órgano que describió en 1561? *Rev Mex Reprod.* 2012, 5(2): 55-67.
318. Verdugo P, Rumery RE, Tam PY. Hormonal control of oviductal ciliary activity: Effect of prostaglandins. *Fert Steril.* 1980, 33(2): 193-196.
319. Verhage HG, Bareither ML, Jaffe RC and Akbar M. Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in women. *Am J Anat.* 1979, 156: 505-521.
320. Vizza E, Muglia U, Macchiarelli G, Baschieri L, Pasetto N, Motta PM. Three-dimensional architecture of the human myosalpinx isthmus. Scanning electron microscopy after NaOH digestion and ultrasonic microdissection. *Cell Tiss Res.* 1991, 226: 219-221.
321. Vizza E, Correr S, Muglia U, Marchioli F, Motta PM. The three-dimensional organization of the smooth musculature in the ampulla of the human Fallopian tube: a new morpho-functional model. *Hum Reprod.* 1995, 10(9): 2400-2405.
322. Wallgren M, Saravia F, Rodriguez-Martinez H. The vanguard sperm cohort of the board ejaculated is over represented in the tubal sperm reservoir *in vivo*. *J Reprod Dev.* 2010, 56: 68-72.
323. Walter I, Bavdek S. Lectin binding patterns of porcine oviduct mucosa and endometrium during the oestrous cycle. *J Anat.* 1997, 190: 299-307.
324. Wanggren K, Lalitkumar PG, StavreusEvers A, Stabi B, Gemzell-Danielsson K. Prostaglandin E2 and F2alpha receptors in the human Fallopian tube before and after mifepristone treatment. *Mol Hum Reprod.* 2006, 12: 577-585.
325. Wanggren K, Stavreus-Evers A, Olsson C, Andersson E, Gemzell-Danielsson K. Regulation of muscular contractions in the human Fallopian tube through prostaglandins and progestagens. *Hum Reprod.* 2008, 23: 2359-2368.
326. Watson ED, Nikolakopoulos E. Sperm longevity in the mare's uterus. *J Equine Vet. Sci.* 1996, 16: 390-392.
327. Weber JA, Freeman DA, Vanderwall DK, and Woods GL. Prostaglandin E2 hasten oviductal transport of equine embryos. *Biol Reprod.* 1991a, 45: 544-546.
328. Weber JA, Freeman DA, Vanderwall DK, Woods GL. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. *Biol Reprod.* 1991b, 45: 540-543.
329. Weber J, Woods G, Lichtenwalner A. Relaxatory effect of prostaglandin E2 on circular smooth muscle isolated from the equine oviductal isthmus. *Biol Reprod Mono Ser.* 1995, 1: 125-30.
330. Welento J, Flieger S, Boratynski Z, Krzyzanowski J, Strzaoka B, Sławomirski J, Szalak M, Eustachiewicz R. Experimental investigations on localization of the nerve

- centers concerned in the innervation of the ovary and the uterine tube in pig. *Folia Morphol (Warsz)*. 1984, 43: 85-90.
331. Welento J, Szalak M, Flieger S, Eustachiewicz R, Boratynski Z, Krzyzanowski J, Sławomirski J. Experimental studies of the location of neural centers in the bovine uterus. *Pol Arch Weter*. 1987, 25: 297-305
332. West NB, Verhage HG, Brenner RM. Suppression of the estradiol receptor system by progesterone in the oviduct and uterus of the cat. *Endocrinol*. 1976, 99: 1010-1016.
333. Willis P, Sekhar KN, Brooks P, Fayer-Hosken RA. Electrophoretic characterization of equine oviductal fluid. *J Exp Zool*. 1994, 268(6): 477-485.
334. Wislocki GB, Guttmacher AF. Spontaneous of the excised whole uterus and Fallopian tubes of the sows with reference of the ovulation cycle. *Bull John Hopkins Hosp*. 1924, 35: 246-252.
335. Wrobel KH, Kujat R, Fehle G. The bovine tubouterine junction: general organization and surface morphology. *Cell Tissue Res*. 1993, 271: 227-239.
336. Wrobel KH, Kujat R. The bovine tubouterine junction: general innervation pattern and distribution of adrenergic, cholinergic, and peptidergic nerve fibers. *Cell Tissue Res*. 1993, 274: 493-501.
337. Wu ASH, Carlson SD, First N L. Scanning Electron Microscopic Study of the Porcine Oviduct and Uterus. *J Anim Sci*. 1976, 42: 804-809.
338. Yaniz JL. Estudio sobre la estructura y función de la mucosa oviductal y el mesotelio peritoneal de la vaca. Memoria de Tesis presentada para la obtención del título de Doctor. Departament de Producció Animal, Universitat de Lleida. España. 1999.
339. Yaniz JL, Santolaria P, Lopez-Bejar M, Rutllant P, Lopez-Gatius F. A scanning electron microscopy study of the peritoneal mesothelium covering the genital area in the cow. *Anat Histol Embryol*. 2000, 29: 149-155.
340. Yaniz JL, López-Gatius F, Hunter RHF. Scanning Electron Microscopic Study of the Functional Anatomy of the Porcine Oviductal Mucosa. *Anat Histol Embryol*. 2006, 35: 28-34.
341. Yaniz JL, Recreo P, Carretero T, Arceiz E, Hunter RHF, López-Gatius F. The Peritoneal Mesothelium Covering the Genital Tract and Its Ligaments in the Female Pig Shows Signs of Active Function. *Anat Rec*. 2007, 290: 831-837.
342. Yaniz JL, Carretero T, Recreo P, Arceiz E, Santolaria P. Three-dimensional architecture of the ovine oviductal mucosa. *Anat Histol Embryol*. 2013, 38(2): 1-10.

343. Zochodne DW, Low PA. Adrenergic control of nerve blood flow. *Exp Neurol.* 1990, 109: 300–307.

---

**CAPÍTULO IX**  
**PRODUCCIÓN CIENTÍFICA**

---

# Reproduction, Fertility and Development

## GLANDS IN THE OVIDUCTAL MUCOSA OF THE MARE

J. J. Aguilar<sup>A</sup>, J. Cuervo-Arango<sup>A</sup>, C. Mas<sup>B</sup>, M. Reyley<sup>A</sup>, M. B. Rodriguez<sup>A</sup>, H. Mouguelar<sup>A</sup>

<sup>A</sup> Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto 5800, Córdoba, Argentina;

<sup>B</sup> Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

*Reproduction, Fertility and Development* 22(1) 226–226

Published online: 8 December 2009

### Abstract

The oviduct plays a key role in the reproductive process in mammals allowing transport, reservoir, and capacitation of sperm (Hunter RHF, 2008 *Mol. Reprod. Dev.* 75, 167-174), fertilization, and early embryo development among other events. The oviductal mucosa is organized in a vast net of folds that projects towards the lumen (Trautman A and Fiebiger J, 1952 *Comstock. Publ. Assoc.*, Ithaca, NY, USA). In a preliminary study, the presence of some glandular structures in the oviductal mucosa was noticed. Detailed histological studies have incredibly not been described in the mare. The objective of this work was to study the presence of glands in the mare's oviduct. Mares, in good body condition, 3 to 14 years old, were selected at a local slaughterhouse. Reproductive status was determined by transrectal palpation and ultrasonography. Mares were selected in anovulatory phase ( $n = 8$ ), in estrus ( $n = 7$ ), at Day 1 to 2 post-ovulation ( $n = 6$ ) and in diestrus at Day 7 to 8 post-ovulation ( $n = 7$ ). Reproductive tracts were harvested immediately following slaughter and were placed on ice. Oviductal samples of 1.5 cm were taken from the ampulla, the ampullary-isthmic junction (AIJ), and the isthmus and placed in formalin for fixation and subsequent process for hematoxylin-eosin stain. The number of glands was counted at  $\times 400$  in 5 optical fields and was compared by non-parametric Kruskal-Wallis test. Glandular structures were observed in 100% of the oviducts. These glands were alveolar type and resembled those in the endometrium. The glands showed 2 locations: in the periphery of the mucosa (peripheral glands) and within the thickness of the mucosa folds. The peripheral glands were more abundant than those within the mucosa folds ( $P < 0.001$ ). The amount of glands decreased progressively from the ampulla (5.7/5 fields) to the AIJ (4.5) to reach a minimum number in the isthmus (0.2;  $P < 0.05$ ). For each oviductal region, the amount of glands did not change through the different reproductive stages ( $P > 0.05$ ). The epithelium of these glands was formed by ciliated and non-ciliated epithelial cells arranged in a similar way of the epithelial surface. However, the peripheral glands were stained with lighter intensity than the epithelial cells in the mucosal surface. In all literature searched, which included several textbooks of veterinary histology, no reference to glands in the oviducts of several domestic species including the mare was found. In contrast, glands in the oviduct have been described in birds (Richardson KC 1935 *Biol. Sci.* 225, 149-195) where they produce albumen and the eggshell membranes, and interestingly, one article about the oviduct of the bitch (Steinhauer N *et al.*, 2004 *Reprod. Domest. Anim.* 39, 110-119) showed evidence of glands in this organ. In the mare, these oviductal glands probably add a distinct secretion of the oviductal surface to the tubal fluid since they show different chromatic affinity. Further investigation is needed to understand the function of these glands in the mare oviductal physiology.



## Original Research

## Histological Characteristics of the Equine Oviductal Mucosa at Different Reproductive Stages

Javier J. Aguilar DVM, MSc, PhD<sup>a</sup>, Juan Cuervo-Arango DVM, MSc, PhD, Dipl. ECAR<sup>b</sup>, Horacio Mouguelar DVM<sup>c</sup>, Luis Losinno DVM, PhD<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Producción Equina, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina

<sup>b</sup> Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Universidad CEU Cardenal Herrera, Moncada, Valencia, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Anatomía Animal, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina

## a r t i c l e i n f o

## Article history:

Received 19 May 2011

Received in revised form

2 July 2011

Accepted 1 August 2011

Available online xxx

## Keywords:

Mare

Oviduct

Uterine tube

Histology

Gland-like structures

## a b s t r a c t

The objective of this work was to study cellular changes in the epithelium of the mare's oviduct. Oviductal samples were taken from mares at different reproductive stages for optical microscopy and Hoechst 33258 staining. Glandular-like structures were observed in 100% of the oviducts. These structures were of the tubular type and were formed by ciliated and nonciliated epithelial cells arranged in a way similar to the epithelial surface. The amount of structures decreased progressively from the ampulla to the isthmus, but did not change through the different reproductive stages. Histological changes in the epithelium of the oviduct were observed associated with the reproductive stages. In the ampulla, the amount of ciliated cells decreased in the anovulatory phase compared with other reproductive stages. Cords of connective tissue lined by epithelium (trabeculae) and dividing completely the lumen of the oviduct were found in 50% of the oviducts. Epithelial cells projected toward the lumen as large vesicles of cytoplasm, sometimes containing a nucleus. The amount of cells presenting nuclear protrusion varied throughout the oviduct, with highest incidence in the ampulla, decreasing progressively toward the isthmus ( $P < .05$ ). In addition, nuclear protrusions were higher in number during the anovulatory and luteal phases than in the other reproductive stages ( $P < .05$ ). These nuclear protruding cells appeared to be extruding from the epithelium and showed no signs of apoptosis based on the histological and fluorescent stains used. The existence of these gland-like structures in the oviductal mucosa should be considered when studying the oviductal physiology in mares.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

The uterine tube is a key organ in the reproductive tract, where major events occur. Sperm transport, reservoir establishment, capacitation, fertilization, and early embryo development, all take place within the oviductal environment. The oviduct creates the environment for these events

and therefore plays a key role in the initial stages of the reproductive process in mammals.

The oviduct is a tubular duct that connects the ovary with the uterus. It is divided into four segments that can be distinguished anatomically: infundibulum, ampulla, ampullary-isthmic junction (AIJ), and isthmus. The oviduct consists of four layers of tissues: an external wall covered by a peritoneal coating or serosa; a fibrous supportive tissue or adventitia beneath the serosa that continues with the fibrous layers of the broad ligament; the muscular layer (tunica muscularis); and, internally, the mucosa [1]. The oviductal mucosa is organized in a vast net of folds that project toward the lumen into primary and secondary

Corresponding author at: Javier J. Aguilar, DVM, MSc, PhD, Producción Equina, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 Km 601, 5800 Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

E-mail address: jaguilar@ayv.unrc.edu.ar (J.J. Aguilar).

folds [2]. These folds are most pronounced in the infundibulum and the ampulla, where they show extremely complex branching, but progressively decrease in complexity toward the isthmus [3-6]. The luminal surface of the oviduct consists of a simple columnar or pseudostratified epithelium formed by two types of cells, ciliated cells and non-ciliated or secretory cells. There is evidence of secretory activity and microvilli only in the nonciliated cells.

Regional variations in the morphological, histochemical, and biochemical characteristics of the oviduct have been demonstrated in many species [7]. In addition to the morphological differences among the oviductal regions, changes across the reproductive phases were also detected in the cow [8], ewe [9,10], Macaca [11], sow [12], bitch [13], and several laboratory species [14]. However, many basic aspects of the oviductal physiology and the biological significance of these changes are still not fully understood.

Some of the main changes that occur during the estrous cycle in the tubal epithelium include histological changes, such as changes in height of cells, proportion of ciliated and nonciliated cells, and presence of secretory granules in the vascular net. Most of these changes are thought to occur in response to variations in the concentration of ovarian steroids, which lead to variations in the composition of oviductal secretions [14].

In the mare, the oviductal physiology presents some special characteristics that seem to be unique for this species. Extensive work has been reported about embryonic oviductal transport in the mare [15,16] and the role of prostaglandin E2 [17,18]. It has been known for a long time that the unfertilized ova are retained in the oviduct of the mare, whereas only the developing embryos are transported to the uterus [16,19-21]. Another interesting feature of the mare oviduct is the presence of collagenous masses in its lumen [22-24]. In the mare oviduct, many more studies related to oviductal fluid composition [25-27], growth factors [28], lymphocyte subset characterization [29], epithelial sperm interaction [30-32], isolation of m-opioid receptors [33], and localization of glycoconjugates in the epithelium by lectin-binding histochemistry [34,35] have been performed. Recently, some morphometric and ultrastructural features of the mare oviduct epithelium were reported in a study involving four mares in estrus [36]. Despite these investigations, among many others, it is difficult to believe that basic histological characteristics of the mare oviduct have yet not been described. Detailed descriptions of the morphological changes associated to the different reproductive stages are still missing for the equine oviduct.

Therefore, the objective of this study was to determine the existence of gland-like structures in the oviductal mucosa of the mare, and to study the histological changes in the epithelium of the oviductal mucosa in mares at different reproductive stages.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals and Experimental Design

Twenty-eight nonpregnant mares aged 3-14 years were selected at a slaughterhouse plant located 5 km from our laboratory (Argentina, southern hemisphere). Mares with

a body condition score of 4 or more (on a scale ranging from 1 to 9) and no obvious signs of disease were selected. Reproductive status was determined by rectal palpation and ultrasonography of the genital tract. Mares were selected in each of the following reproductive stages: (a) anestrus mares (n = 8) with small ovaries, follicles measuring <15 mm, and no ultrasonographically visible corpus luteum (selected only during August-September); (b) estrous mares (n = 7) with at least one follicle measuring >35 mm, some degree of uterine edema, and low uterine tone; (c) postovulatory mares (n = 6), which were selected in estrus (as described previously) and monitored daily by ultrasonography until ovulation; and (d) diestrus mares (n = 7) with an ultrasonographically visible corpus luteum, increased uterine tone, and no uterine edema. Anestrus and estrous mares were assigned to be slaughtered on the day after selection, whereas postovulatory and diestrus mares were monitored until ovulation and then assigned to be slaughtered on days 1 or 2 and 7 or 8 after ovulation, respectively. Mares were kept in a paddock with water and alfalfa hay ad libitum until they were slaughtered.

### 2.2. Sampling

Reproductive tracts were collected immediately after slaughter and placed on ice in a cooler to be transported to the laboratory within 1 hour. Ovarian structures were confirmed to match the reproductive phase determined by ultrasonography, and dissection was carried out to isolate the oviduct from the rest of the reproductive tract.

After dissection, the oviduct was stretched and portions measuring 1.5 cm were taken from the ampulla at a distance of 1 cm distal from the fimbria; the AII at about the middle third of the oviduct, where the width of the ampulla is substantially reduced; and the isthmus 2 cm proximal from the uterine-tubal junction. These portions were then placed in fresh buffered formalin for fixation, washed and dehydrated in an ethanol series (70%, 80%, 96%, and 100%), cleared in xylene, and embedded in paraffin wax. Sections 5 mm thick were cut and, after dewaxing with xylene and hydration in an ethanol series of descending concentrations, were then stained with hematoxylin and eosin and Hoechst 33258 stains for detection of nuclei.

### 2.3. Evaluation

Both oviducts, from the right and left sides, were studied for each mare. Histological slides were revised under a light microscope by two operators (double-blind) and the following features were registered and counted: (a) gland-like structures observed as hollowed rounded structures lined by epithelial cells located either in the periphery of the mucosa or within the thickness of the folds at 400 (Fig. 1F); (b) number of ciliated and nonciliated cells in the lining of the oviductal lumen at 1000 ; (c) number of cytoplasmic and nuclear protrusions at 1000 (Fig. 1); and (d) trabeculae, cords of connective tissue lined by epithelium that divided completely the lumen of the oviduct. This evaluation was performed methodically in five microscopic fields for each oviductal section (ampulla, AII, and isthmus) using a digital camera (Powershot G6, 7.1 megapixels, Canon INC, Tokyo, Japan)



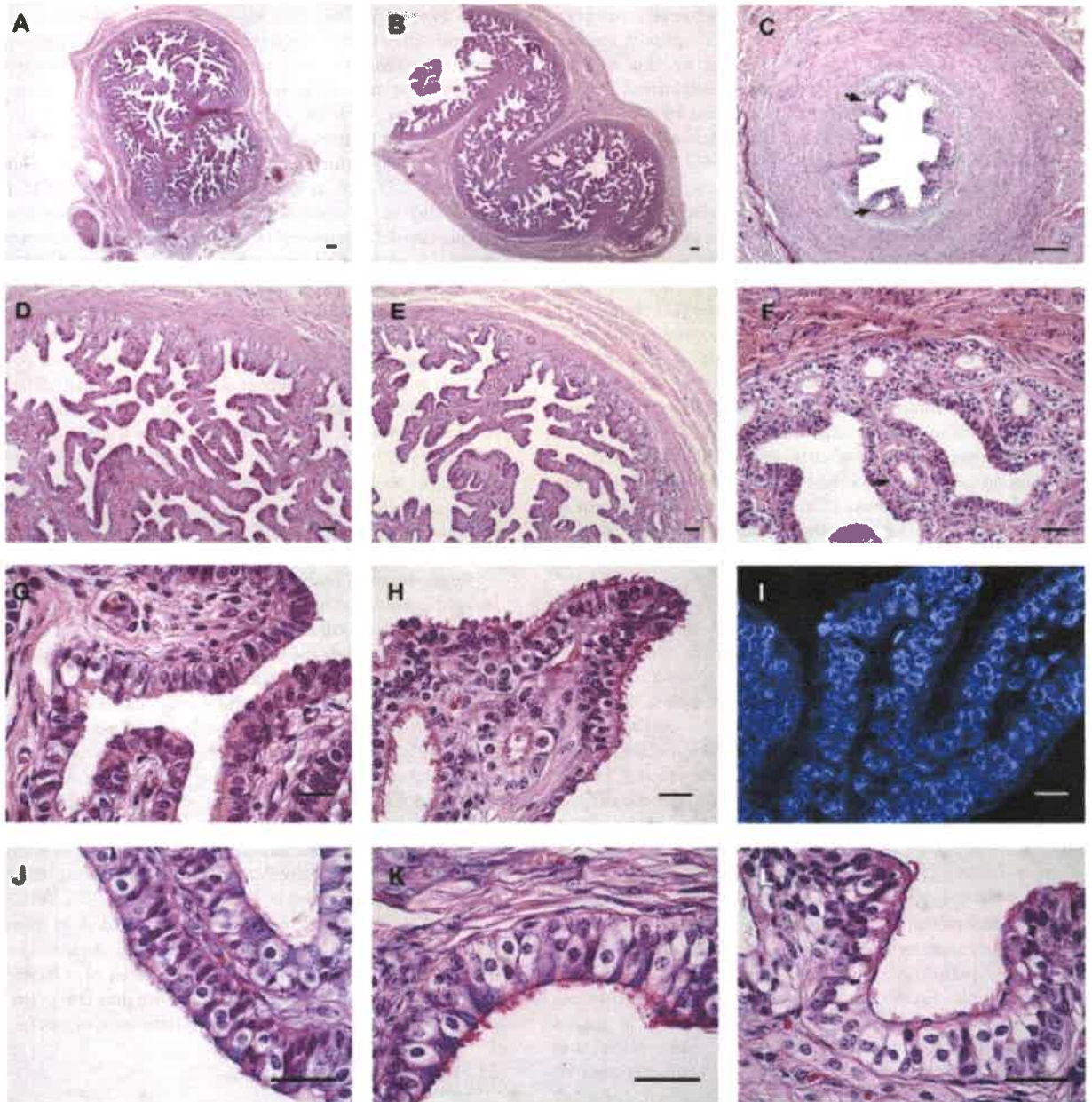


Fig. 1. (A) Ampulla at anovulatory stage showing two dividing trabeculae. (B) Ampullary-isthmic junction showing the main folds alternating from opposite sides, creating a sinusoidal pathway in the lumen. (C) Isthmus at anovulatory stage, black arrows indicate gland-like structures (scale bar in A, B, C indicates 150  $\mu$ m). (D, E) Ampulla at anovulatory stage showing abundant peripheral gland-like structures with a lighter chromatic affinity than the oviductal surface (scale bar in D, E indicates 60  $\mu$ m). (F) Ampulla showing gland-like structures in the periphery and a gland-like structure (black arrow) within a fold (scale bar in F indicates 30  $\mu$ m). (G, H) Ampulla at estrus and anovulatory stage, respectively, showing cytoplasmic and nuclear protrusions. (I) Hoechst staining of ampulla at estrus confirming nuclear protrusion. (J, K) Isthmus at estrus and postovulatory stage, respectively, showing secretory cells with granular basophilic content. (L) Isthmus at anovulatory stage (scale bar in G, H, I, J, K, L indicates 15  $\mu$ m).

and software AxioVisionRelease 4.6.3 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) for image analysis.

#### 2.4. Statistical Analysis

All data were tested for normality of distribution. Numerical data were analyzed by the nonparametric Kruskal-Wallis test (one-way) to evaluate statistically the difference among reproductive stages and oviductal

sections for the following parameters: (a) gland-like structures in the mucosal periphery and within mucosal folds and (b) nuclear and cytoplasmic protrusions. Each parameter was counted visually in five microscopic fields for each oviductal section. Median counts for each parameter were compared among different oviductal sections and reproductive stages. Frequency data (the proportion of ciliated vs. nonciliated cells for different oviductal sections and at different reproductive stages) were tested by  $\chi^2$

analysis (Table 1). A probability of  $P < .05$  indicated that a difference was significant, whereas probabilities ranging between  $P > .05$  and  $P < .1$  indicated that a difference approached significance. Data are given as median (numerical data) and percentage (frequency data), unless stated otherwise.

### 3. Results

#### 3.1. Trabeculae

Cords of connective tissue lined by epithelium and dividing completely the lumen of the oviduct were found in 50% of the oviducts (14/28). Among these, eight were observed in the ampulla (57%), six in the AIJ (43%), and none in the isthmus. On some occasions, these trabeculae ran diametrically from opposite sides of the oviducts (Fig. 1A), dividing the lumen into two similar compartments, whereas on few occasions, the trabeculae were observed dividing the oviductal lumen like a geometrical cord. Trabeculae showed the same structure as the folds, but divided the oviductal lumen into two or three compartments (Fig. 1A).

#### 3.2. Epithelial Folds

All the oviducts showed primary, secondary, tertiary, and, sometimes, quaternary folds. The ampulla showed by far the most highly branched mucosa, which occupied a great part of the lumen (Fig. 1A, D, E). In the AIJ, one main tertiary fold appeared to be penetrating from the lamina propria, alternating from opposite sides, thus producing a sinusoidal pathway in the oviductal lumen (Fig. 1B). In the isthmus, all the mucosa folds were of the primary type (Fig. 1C).

#### 3.3. Gland-like Structures

Gland-like structures were observed in 100% of the oviducts, and according to Banks [37] and Bacha and Bacha [38], these could be classified as glands of the tubular type. These structures were formed by ciliated and nonciliated epithelial cells in apparently the same cell arrangement as the epithelial surface. However, the epithelium of the peripheral gland-like structures stained with a lighter intensity than the epithelial cells within the folds (Fig. 1D, E). Gland-like structures were shown at the following two locations: in the periphery of the mucosa (peripheral

glands) and within the thickness of the folds (Fig. 1F). The gland-like structures were more abundant in the periphery than within the mucosal folds (Fig. 2). The number of peripheral gland-like structures decreased progressively and distally from the ampulla to the isthmus ( $P < .05$ ; Fig. 2). The number of gland-like structures within the folds was low and no statistical analysis was attempted. Reproductive stage did not affect the number of either type of these gland-like structures ( $P > .05$ ).

#### 3.4. Ciliated and Nonciliated Epithelial Cells

Some histological changes in the epithelium of the oviduct were observed associated with the reproductive stages. Ciliated and nonciliated cells were present in the three regions at all reproductive stages examined, with some variations in the proportions of these cells within oviductal region and reproductive stage. In the ampulla and the AIJ, the amount of ciliated cells decreased in the anovulatory phase compared with the other reproductive stages ( $P = .027$  and  $.03$ , respectively; Table 1).

#### 3.5. Nuclear and Cytoplasmic Epithelial Protrusions

Protrusions consisted of projections of the epithelial cells toward the oviductal lumen. These protrusions contained sometimes cytoplasm only and appeared as large vesicles; alternatively, some protrusions contained the nucleus of the cell halfway through over the epithelial surface, this fact was confirmed by using the Hoechst stain (Fig. 1J). Most of these nuclear protrusions showed condensed, but not fragmented, nuclei. Sometimes, whole cells were found as being "pushed or eliminated" toward the lumen, this was mostly observed in the ampulla and to a less extent in the AIJ (Fig. 1G, H). Distribution of cells presenting nuclear protrusion varied throughout the oviduct, with highest incidence in the ampulla, decreasing progressively toward the isthmus ( $P < .05$ ; Table 2). In addition, nuclear protrusions were higher in number during the anovulatory and luteal periods than in the other reproductive stages ( $P < .05$ ; Table 2). A similar pattern was observed in relation to cytoplasmic protrusions (Table 3).

Table 1  
Proportion of ciliated cells in the three oviductal regions of mares at different reproductive stages

Oviductal Regions	Anestrus (n= 8)	Estrus (n= 7)	Postovulation (n= 6)	Diestrus (n= 7)	P Value
Ampulla	30.0	47.7	47.7	47.9	.027
AIJ	36.6	51.8	51.9	52.6	.03
Isthmus	46.7	54.4	50.2	56.1	>.1
P value	.043	>.1	>.1	>.1	

AIJ, ampullary-isthmic junction.

For each column,  $P < .05$  indicates statistical difference in the percentage of ciliated cells among oviductal sections.

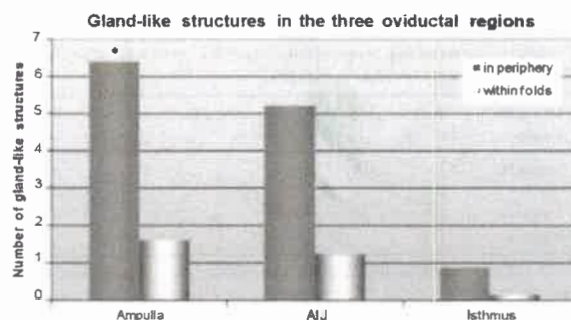


Fig. 2. Gland-like structures were counted at 400 $\times$  in five optical fields in the ampulla, the ampullary-isthmic junction, and the isthmus. \*Significant difference ( $P < .05$ ) compared with the isthmus.

Table 2  
Nuclear protrusions in epithelial cells of the three oviductal regions in mares at different reproductive stages

Oviductal Regions	Anestrus (n= 8)	Estrus (n= 7)	Postovulation (n= 6)	Diestrus (n= 7)	P Value
Ampulla	7	4	2	5	.01
AIJ	3	2	2	3	.07
Isthmus	0	1	0	0	NA
P value	.01	.01	.04	.01	

NA, not attempted.

Each value represents the median count from five microscope fields in two specimens (right and left oviducts) for three sections of the oviduct (ampulla, AIJ, and isthmus) in mares at different reproductive stages. Within each column,  $P < .05$  indicates statistical difference in nuclear protrusion count among oviductal sections. Within each row,  $P < .05$  indicates statistical difference in nuclear protrusion count among reproductive stages.

### 3.6. Other Features

Especially in diestrus, the epithelial cells showed a very consistent location of the nuclei at the base or the center of the cells, the apical surface was very even throughout the epithelium, showing a great consistency in the size and shape of the epithelial cells. In contrast, in estrus and much more evident in the anovulatory period, the nuclei were found at different locations within cells, many toward the apical surface or even protruding into the lumen (Fig. 1G, H).

Swollen "empty-looking" cells were frequently observed in the whole oviduct, but mostly in the isthmus (Fig. 1J-L). A very fine granular basophilic content was observed in the secretory and nonciliated cells of the isthmus during estrus (Fig. 1J) and the postovulatory (Fig. 1K) period; this pattern tended to disappear in diestrus and in the anovulatory phase (Fig. 1L).

## 4. Discussion

The main finding of this study was the existence of some particular histological characteristics in the oviduct of the mare. Gland-like structures are perhaps crypts or invaginations of the epithelium toward the subepithelial region, as their epithelial cells are quite similar to those observed in the surface of the oviductal mucosa. In contrast, the morphology of these structures, their location, their lighter chromatic appearance, their organization, and even the

similarities with the endometrial glands suggest that these structures could be actual glands indeed. Further research should be carried out to better characterize these structures by studying the type of secretion, if any, and its function. Also, ultrastructural studies involving scanning and transmission electron microscopy should be performed. In all the literature that was searched and reviewed, we could not find any description of glands in the oviducts of several domestic species, including the mare. In addition, some textbooks of veterinary histology [38,39] clearly state the absence of glands in the oviduct of domestic species. Conversely, some reports have showed, in marsupials, the existence of oviductal glands that produce a mucoid substance and shell membrane precursors [40]. Moreover, glands in the oviduct have been described in birds [41], where they play important functions, such as producing albumen and the eggshell membranes; interestingly, we found only one article that mentioned a gland in a microphotograph of the oviduct of a bitch [13]. In the mare, these gland-like structures probably add a different kind of secretion to the oviductal fluid, as they show distinct chromatic affinity for the epithelial surface. A better understanding of the oviductal physiology in the mare will perhaps allow for some improvement in the efficiency of some "in vitro" reproductive technologies in horses, which, so far, have shown limited results compared with other species.

Trautman and Fiebiger [2] already described the ampulla of the mare with a more complex folding structure than those of other species. In this study, we found that this folding complexity reaches a third and even a fourth level of branching. In addition, trabeculae were observed in 50% of the oviducts. The presence of these trabeculae implies that the oviductal lumen is divided into more than one compartment, at least in some sections. Because the oviductal sections observed in this study represent only a minimal part of the whole length of the oviduct, it is reasonable to think that more trabeculae are present in the oviduct of a mare. Therefore, we could state that trabeculae are present in the mare oviduct as a morphological feature. The existence of these trabeculae reinforces the idea of microenvironments, particularly in the oviduct of the mare. Studies about the three-dimensional architecture of the oviduct are needed in the mare to understand its spatial organization. In a study involving scanning electron microscopy, subcompartments and pockets in the oviductal lumen have been described in the cow oviduct [42]. Moreover, there is a general agreement about the existence of oviductal microenvironments in the mammalian oviduct [42].

The cell changes of the oviductal epithelium observed in this study reveal the need to understand the meaning of these processes. Cytoplasmic and nuclear protrusions were observed frequently in the oviduct of the mare, but more intensively in the ampulla than in the isthmus. Although these protrusions were present at all reproductive stages studied, they were particularly frequent during the anovulatory phase. Similarly, in the cow, marked cyclic changes on the surface of the epithelium in the fimbriae and ampulla were observed, but few changes were found in the isthmus and uterotubal junction [43]. Epithelial extrusion of large cell fragments, including nuclei and whole cells, is the characteristic feature of nonapoptotic cell loss of

Table 3  
Cytoplasmic protrusions in epithelial cells of the three oviductal regions in mares at different reproductive stages

Oviductal Regions	Anestrus (n= 8)	Estrus (n= 7)	Postovulation (n= 6)	Diestrus (n= 7)	P Value
Ampulla	13	5	4	10	.01
AIJ	6	3	4	6	.07
Isthmus	0	0	0	0	NA
P value	.01	.03	.01	.01	

Each value represents the median count from five microscope fields in two specimens (right and left oviducts) for three sections of the oviduct (ampulla, AIJ, and isthmus) in mares at different reproductive stages. Within each column,  $P < .05$  indicates statistical difference in nuclear protrusion count among oviductal sections. Within each row,  $P < .05$  indicates statistical difference in nuclear protrusion count among reproductive stages.

nonciliated cells in the oviduct of the pig [44], sheep [45,46], goat [47,48], cow [8,49], and bitch [50]. In the ewe, this mechanism of epithelial cell loss was most frequently observed in the luteal phase of the estrous cycle [51,52] and after progesterone treatment or during pregnancy [45,53].

These protrusions represent an interesting phenomenon that seems to be related to complete cells being "eliminated" from the tubal epithelium to the oviductal lumen. It is not clear whether this event is part of a physiological renewal process or whether it involves apoptotic death. It has even been proposed that whole epithelial cells are extruded to the oviductal lumen as apocrine secretion [54], but no role was explained for these extruded cells in the oviductal lumen. In a recent study on the oviduct of a mare, Desatins et al. [36] also described that some nonciliated cells presented large cytoplasmic protrusions containing three different types of secretory granules, as determined by transmission electron microscopy.

In this study, the morphological appearance of these extruding cells was not apoptotic, but, in our opinion, it would indicate some kind of renewal process of the epithelium. Although the appearance of the whole cells and nuclei does not match that of apoptotic cells, it would be interesting to perform terminal deoxynucleotidyl transferase 2'-deoxyuridine 5'-triphosphatase (dUTP) nick end labeling (TUNEL) and other techniques to detect apoptosis.

## 5. Conclusions

This study demonstrates the existence of abundant gland-like structures in the oviductal mucosa of the mare. This is a major histological finding, and it very likely has implications on the oviductal physiology affecting the functions of the oocyte, the sperm, and/or the early embryos. In addition, other important histological features were also observed, such as dividing trabeculae that create subcompartments in the oviductal lumen and cellular changes in the oviductal epithelium associated with some reproductive stages. Clearly, more investigations are needed in this area to reveal the physiological meaning of these findings and their potential applications in several reproductive biotechnologies.

## Acknowledgments

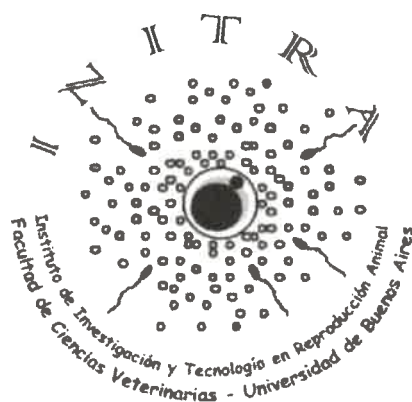
The authors thank AIMAR SA for providing the mares, and Nelcy Schleeff, Alejandro Pelassa, Marcelo Orlando, and Miguel Mancini for technical support. This work was supported by a grant from the Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

## References

- [1] Mejía CM, Paramo RR, Tolosa J, Saltiel AC. Histological and histochemical characteristics of the oviduct of the mare under the influence of different ovarian structures. *Vet Mex* 1984;15:171.
- [2] Trautman A, Fiebiger J. *Fundamentals of the histology of domestic animals*. Ithaca, NY: Comstock Pub Associates; 1952.
- [3] Lombard L, Banner BM, McNutt SH. The morphology of the oviduct of virgin heifers in relation to the oestrus cycle. *J Morphol* 1950;86:1-15.
- [4] Hafez ES, Blandau RJ. *The mammalian oviduct*. Chicago, IL, London: University of Chicago Press; 1969.
- [5] Johnson AD, Foley CW. *The oviduct and its functions*. New York, NY, London: Academic Press, Inc.; 1974.
- [6] Hunter RH. *The fallopian tubes. Their role in fertility and infertility*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1988.
- [7] Abe H. The mammalian oviductal epithelium: regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. *Histol Histopathol* 1996;11:743-68.
- [8] Nayak RK, Ellington EF. Ultrastructural and ultracytochemical cyclic changes in the bovine uterine tube (oviduct) epithelium. *Am J Vet Res* 1977;38:157-68.
- [9] Nayak RK, Albert EN, Kassira WN. Cyclic ultrastructural changes in ewe uterine tube (oviduct) infundibular epithelium. *Am J Vet Res* 1976;37:923-33.
- [10] Murray MK. Changes in secretory status, cell height and percentage ciliation of epithelial lining of sheep fimbria oviduct during early pregnancy. *J Reprod Fertil* 1996;106:173-83.
- [11] Odor DL, Gaddum-Rosse P, Rumery RE, Blandau RJ. Cyclic variations in the oviductal ciliated cells during the menstrual cycle and after estrogen treatment in the pig-tailed monkey, *Macaca nemestrina*. *Anat Rec* 1980;198:35-7.
- [12] Abe H, Hoshi H. Morphometric and ultrastructural changes in ciliated cells of the oviductal epithelium in prolific Chinese Meishan and Large White pigs during the oestrous cycle. *Reprod Domest Anim* 2008;43:66-73.
- [13] Steinhauer N, Boos A, Günzel-Apel AR. Morphological changes and proliferative activity in the oviductal epithelium during hormonally defined stages of the oestrous cycle in the bitch. *Reprod Domest Anim* 2004;39:110-9.
- [14] Aguilar JJ, Reyley M. The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects. *Anim Reprod* 2005;2:91-105.
- [15] Betteridge KJ, Eaglesome MD, Flood PF. Embryo transport through the mare's oviduct depends upon cleavage and is independent of the ipsilateral corpus luteum. *J Reprod Fertil* 1979;27(Suppl):387-94.
- [16] Freeman DA, Weber JA, Geary RT, Woods GL. Time of embryo transport through the mare oviduct. *Theriogenology* 1991;36:823-30.
- [17] Weber JA, Freeman DA, Vanderwall DK, Woods GL. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. *Biol Reprod* 1991;45:540-3.
- [18] Weber JA, Freeman DA, Vanderwall DK, Woods GL. Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. *Biol Reprod* 1991;45:544-6.
- [19] Betteridge KJ, Mitchell D. Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare. *J Reprod Fertil* 1974;39:145-8.
- [20] Betteridge KJ, Mitchell D. A surgical technique applied to the study of tubal eggs in the mare. *J Reprod Fertil* 1975;23(Suppl):519-24.
- [21] Onuma H, Ohnami Y. Retention of tubal eggs in mares. *J Reprod Fertil* 1975;23(Suppl):507-11.
- [22] Tsutsumi Y, Suzuki H, Takeda T. Evidence of the origin of the gelatinous masses in the oviducts of mares. *J Reprod Fertil* 1979;45:287-90.
- [23] Aguilar JJ, Woods GL, Miragaya MH, Olsen LM. Living fibroblast cells in the oviductal masses of mares. *Equine Vet J* 1997;25(Suppl):103-8.
- [24] Lantz KC, Enders AC, Liu JK. Possible significance of cells within intraluminal collagen masses in equine oviducts. *Anat Rec* 1998;252:568-79.
- [25] Engle CC, Foley CW. Certain physiochemical properties of uterine tubal fluid, follicular fluid, and blood plasma in the mare. *Am J Vet Res* 1975;36:149-54.
- [26] Willis P, Sekhar KN, Brooks P, Fayer-Hosken RA. Electrophoretic characterization of equine oviductal fluid. *J Exp Zool* 1994;268:477-85.
- [27] Campbell DL, Douglas LW, Rame JC. Cannulation of the equine oviduct and chemical analysis of oviduct fluid. *Theriogenology* 1979;12:47-59.
- [28] Eriksen T, Terkelsen O, Grondal C, Bruck I. The equine oviduct: histology and PDGF localization. *Theriogenology* 1994;41:191.
- [29] Brinsko SP, Ball BA. Characterization of lymphocyte subsets in the equine oviduct. *Equine Vet J* 2006;38:214-8.
- [30] Ellington JE, Ball BA, Yang X. Binding of stallion spermatozoa to the equine zona pellucida after coculture with oviductal epithelial cells. *J Reprod Fertil* 1993;98:203-8.
- [31] Thomas PG, Ball BA, Brinsko SP. Interaction of equine spermatozoa with oviduct epithelial cell explants is affected by estrous cycle and anatomic origin of explant. *Biol Reprod* 1994;51:222-8.
- [32] Thomas PG, Ball BA, Miller PG, Brinsko SP, Southwood L. A subpopulation of morphologically normal, motile spermatozoa attached to equine oviductal epithelial cell monolayers. *Biol Reprod* 1994;51:303-9.
- [33] Desantis S, Albrizio M, Ventriglia G, Deflorio M, Guaricci AC, Minoia R, et al. The presence of the mu-opioid receptor in the isthmus of mare oviduct. *Histol Histopathol* 2008;23:555-64.

- [34] Desantis S, Acone F, Corriero A, Defflorio M, Suban D, Ventriglia G, et al. Distribution of sialoglycoconjugates in the oviductal isthmus of the horse during anoestrus, oestrus and pregnancy: a lectin histochemistry study. *Eur J Histochem* 2004;48:403-12.
- [35] Desantis S, Ventriglia G, Suban D, Corriero A, Defflorio M, Acone F, et al. Differential lectin binding patterns in the oviductal ampulla of the horse during Oestrus. *Eur J Histochem* 2005;49:33-44.
- [36] Desantis S, Zizza S, Accogli G, Acone F, Rossi R, Resta L. Morphometric and ultrastructural features of the mare oviduct epithelium during oestrus. *Theriogenology* 2011;75:671-8.
- [37] Banks WJ. Epitelios. In: Ed. MVZ Antonio Lemus Gamboa, *Histología Veterinaria Aplicada 2da edición. El Manual Moderno*, S. A. de C. V. México-Santa Fé de Bogotá; 1996, pp. 79.
- [38] Bacha WJ, Bacha LM. *Color atlas of veterinary histology*, 2nd ed. Philadelphia, PA: Lea and Febiger; 1990.
- [39] Dellmann HD. Sistema reproductor femenino. In: Ed. Acirbia S.A. *Histología Veterinaria*. Zaragoza, España; 1994, pp. 278.
- [40] Roberts CT, Breed WG. The marsupial cell membrane: an ultrastructural and immunogold localization study. *Cell Tissue Res* 1996;284:99-110.
- [41] Richardson KC. The secretory phenomena in the oviduct of the fowl, including the process of shell formation examined by microincineration technique. *Phil Trans R Soc B* 1935;225:149-95.
- [42] Yaniz JL, Lopez-Gatius F, Santolaria P, June Mullins K. Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *Anat Rec* 2000;260:268-78.
- [43] Abe H, Oikawa T. Observations by scanning electron microscopy of oviductal epithelial cells from cows at follicular and luteal phases. *Anat Rec* 1993;235:399-410.
- [44] Walter I, Bavdek S. Lectin binding patterns of porcine oviduct mucosa and endometrium during the oestrous cycle. *J Anat* 1997;190:299-307.
- [45] Abdalla O. Observations on the morphology and histochemistry of the oviducts of the sheep. *J Anat* 1968;102:333-44.
- [46] Murray MK. Epithelial lining of the sheep ampulla oviduct undergoes pregnancy-associated morphological changes in secretory status and cell height. *Biol Reprod* 1995;53:653-63.
- [47] Morita M, Miyamoto H, Ishii T, Sugimoto M. The secretory cells of the goat oviductal epithelium: an ultrastructural study. *J Reprod Dev* 1995;41:123-8.
- [48] Abe H, Onodera M, Sugawara S, Satoh T, Hoshi H. Ultrastructural features of goat oviductal secretory cells at follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *J Anat* 1999;195:515-21.
- [49] Wrobel KH, Kujat R, Fehle G. The bovine tubouterine junction: general organization and surface morphology. *Cell Tissue Res* 1993;271:227-39.
- [50] Steffl M, Schweiger M, Sugiyama T, Amselgruber WM. Review of apoptotic and non-apoptotic events in non-ciliated cells of the mammalian oviduct. *Ann Anat* 2008;190:46-52.
- [51] McKenzie FF, Terrill CC. Estrus, ovulation, and related phenomena in the ewe. *Mo Agric Exp Sta Res Bull* 1937;264:4.
- [52] Casida LE, McKenzie FF. The estrous cycle in the ewe: histology of the genital tract. *Mo Agric Exp Sta Res Bull* 1932;170:4.
- [53] Hadek R. Mucin secretion in the ewe's oviduct. *Nature* 1953;171:750.
- [54] Hollis DE, Frith PA, Vaughan JD, Chapman RE, Nancarrow CD. Ultrastructural changes in the oviductal epithelium of Merino ewes during the estrous cycle. *Am J Anat* 1984;171:441-56.

**Terceras Jornadas Internacionales del  
Instituto de Investigación y Tecnología en  
Reproducción Animal  
INITRA**



**Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA  
15 y 16 de noviembre de 2012  
Buenos Aires, Argentina**

<i>Utilización de la gonadotropina coriónica humana (hCG) para el tratamiento de la infertilidad en el macho canino. Estudio retrospectivo.</i>	
Loza, ME; Monachesi, NE; Comercio, EA; Kaliman, FR; Wanke, MM. ....	287
<i>Expresión de isoformas de foliculostatina en folículos quísticos de bovinos con enfermedad quística ovárica (EQO).</i>	
Matiller, V; Stangaferro, ML; Rodriguez, FM; Rey, F; Ortega, HH; Salvetti, NR. ....	288
<i>Reactive oxygen species and redox state participation in bovine oocyte activation in vitro</i>	
Morado, S; Cetica, PD; Beconi, MT; Thompson, JG; Dalvit, G. ....	289
<i>Evaluación de infusiones de antibióticos, mediante citología endometrial, en vacas de cría con endometritis subclínica</i>	
Moscuzza, C; Ambros, L; Alvarez, G; Gutiérrez, B; Zurita, M; Tropeano, M; Perna, R. ....	290
<i>Aspectos morfológicos de la mucosa del ampulla y la unión ampulla-istmo del oviducto de la yegua durante la estación anovulatoria</i>	
Mouguelar, H; Apichela, SA; Aguilar, JJ; Losinno, L. ....	291
<i>Folliculogenesis in columba livia (birds: columbiformes)</i>	
Olea, GB; Sandoval, MT; Carou, MC; Hernando, AB & Lombardo, DM. ....	292
<i>Expresión de componentes de la cascada de señalización de la insulina en folículos ováricos de bovinos con enfermedad quística.</i>	
Panzani, CG; Rodriguez, FM; Benitez, G; Salvetti, NR; Ortega, HH; Rey, F. ....	293
<i>Daño ultraestructural en la membrana de espermatozoides porcinos durante el proceso de congelación-descongelación</i>	
Prenna, G; Miglio, A; Peralta, R; Jurado, S; Williams, S. ....	294
<i>Seguimiento del comportamiento del celo mediante observación visual y pintura en base de la cola asociado a estructura folicular y/o ovulación en bovinos lecheros sincronizados con protocolos de IA</i>	
Regalado, E; Sarramone, C; Scilipoti, G; Santa María, M; Dick, A. ....	295
<i>Anatomía e histología del tracto reproductor masculino del oso melero (Myrmecophagidae, Xenarthra).</i>	
Rossi, LF; Meyer, C; Baldoma, V; Merani, MS. ....	296
<i>Use of 2 and 4% dimethylformamide as the cryoprotectant for freezing llama semen</i>	
Santa Cruz, R; Arraztoa, C; Carretero, MI; Ferrante, A; Caldevilla, M; Moncalvo, E; Giuliano, S. ....	297
<i>Sperm selection in llama cooled semen using different Percoll® gradients</i>	
Santa Cruz, R; Arraztoa, C; Carretero, MI; Ferrante, A; Caldevilla, M; Moncalvo, E; Giuliano, S. ....	298
<i>IATF en vaquillonas comparando dos protocolos de sincronización</i>	
Schinoni, J; Confalonieri, AJ; Carretero, MI; Péndola, CH. ....	299

# Aspectos morfológicos de la mucosa del ámpula y la unión ámpula-istmo del oviducto de la yegua durante la estación anovulatoria

MOUGUELAR, H<sup>1</sup>; APICHELA, SA<sup>2</sup>; AGUILAR, JJ<sup>3</sup>; LOSINNO, L<sup>3</sup>.

**Introducción:** en la región del ámpula y unión ámpula-istmo (UAI) se establece el microambiente necesario para llevar a cabo la fertilización; el desarrollo y mantenimiento del embrión en sus primeros estadios. **Objetivos:** describir las características de la mucosa de la región ampular y UAI durante el período anovulatorio de la yegua. **Materiales y Métodos:** para evaluar la arquitectura de la mucosa oviductal de yeguas anovulatorias (n=7, con folículos  $\leq 15$  mm, sin cuerpo lúteo), se realizó el estudio mesoscópico de moldes tridimensionales del lumen; histología y microscopía electrónica de barrido [MEB]. **Resultados:** pliegues primarios ( $648,2 \pm 239,5 \mu\text{m}$  de longitud), secundarios ( $341,9 \pm 138,7 \mu\text{m}$ ), terciarios ( $187,6 \pm 63,3 \mu\text{m}$ ) y en algunos casos cuaternarios ( $128,5 \pm 30,7 \mu\text{m}$ ), fueron identificados en el ámpula y UAI de todas las secciones histológicas evaluadas. En la UAI los pliegues primarios protruían hacia el lumen creando un trayecto sinuoso. En correspondencia con este hallazgo histológico, dichos pliegues marcaron surcos transversales, profundos y alternados cada  $1482 \pm 254 \mu\text{m}$  en

los moldes tridimensionales. Fueron observadas células ciliadas ( $9,62 \pm 1,56 \mu\text{m}$  de altura) y secretorias ( $7,12 \pm 0,74 \mu\text{m}$ ) en ambas regiones, con predominio de las no ciliadas. Sobre la superficie apical de estas últimas, se proyectaron microvellosidades de baja altura, sin alcanzar en ningún caso la longitud de las cilias ( $3,07 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ). Mediante MEB, fueron visualizados surcos intercelulares delimitando células secretorias vecinas, hecho poco evidente entre las células ciliadas. Secreción mucofilamentosa fue hallada en la profundidad de algunos surcos y sobre la superficie epitelial de ambos segmentos. Protrusiones celulares, con predominio en las células secretorias, fueron observadas en los cortes histológicos y bajo MEB, conteniendo en ciertas ocasiones al núcleo celular. Estructuras vesiculares y globosas contenidas entre las cilias y sobre las células secretorias fue otro hallazgo observado en ambas regiones. **Conclusiones:** la presencia de secreciones y de estructuras vesiculares dispersas implicaría cierta actividad durante este período. Para poder comprender estos hallazgos y otros de los mencionados será necesario continuar con los estudios.

<sup>1</sup>Anatomía Veterinaria, <sup>3</sup> Producción Equina, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto; <sup>2</sup>Instituto Superior de Investigaciones Biológicas, CONICET-Universidad Nacional de Tucumán.



# Morphometric Study of the Mare Oviductal Mucosa at Different Reproductive Stages

HORACIO MOUGUELAR,<sup>1\*</sup> TOMAS DIAZ,<sup>1</sup> DAMIANA BORGHI,<sup>1</sup>  
ROLANDO QUINTEROS,<sup>2</sup> FACUNDO BONINO,<sup>2</sup> SILVANA ANDREA APICHELA,<sup>3</sup>  
AND JOSE JAVIER AGUILAR<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Anatomía Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, 5804 Río Cuarto, Córdoba, Argentina

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, 5804 Río Cuarto, Córdoba, Argentina

<sup>3</sup>Instituto Superior de Investigaciones Biológicas, (CONICET), Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, 4000, Argentina

<sup>4</sup>Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, 5804 Río Cuarto, Córdoba, Argentina

---

---

## ABSTRACT

The objectives of this work were to describe some morphometric characteristics and to establish quantitative parameters of different regions of the equine oviductal mucosa from the isthmus, ampullary-isthmus junction (AIJ), and ampulla. Twenty-one mixed-bred mares were used for this study. Mares were selected in the following reproductive phases: anestrus, estrus, and diestrus. The left oviducts were examined with light microscopy, and right ones were studied through the intraoviductal molds. The isthmus showed the smallest luminal area, mucosal area, epithelial perimeter, and luminal diameter. On the molds surfaces, some grooves extended as longitudinal canals, reducing their depth as they approached to the AIJ. Several small height projections, some obliquely positioned towards utero-tubal junction, were observed in all reproductive phases. These formations may represent pockets or cul-de-sacs in the basal areas of the epithelial folds. The AIJ mucosa gradually changed from the smooth isthmus region toward highly folded ampulla. The number and complexity of epithelial folds showed moderate increase in the same way that many of the morphometric parameters. Multiple curves were observed on the molds of the AIJ, creating a zigzag path in the oviductal lumen. In the ampulla, the high branched epithelial folds occupied most of the lumen, leaving a small luminal area free. A linear relationship between epithelial perimeter and mucosal area was found. The presence of glandular-like structures was observed in all the reproductive stages studied. The

---

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: SeCyT- Universidad Nacional de Río Cuarto; Grant number: 18/A290.

\*Correspondence to: MV. H. Mouguelar, Departamento de Anatomía Animal, Ruta 36, Km. 601, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Fax: 1 54 (0358) 4680280. E-mail: hmouguelar@ayv.unrc.edu.ar

Received 2 March 2015; Accepted 20 May 2015.

DOI 10.1002/ar.23193

Published online 00 Month 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

equine endosalpinx reveals a highly complex tridimensional arrangement where each region shows very particular and specific designs. *Anat Rec*, 00:000–000, 2015. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** mare; oviduct; mucosa arrangement; morphometric characteristics; reproductive stages

## INTRODUCTION

The mammalian Fallopian tube plays a crucial role in many reproductive events. Gamete and embryo transport, sperm storage and final capacitation, fertilization, and early cleavage-stage embryonic development occurs in the oviductal environment (Suarez, 2008). Its specialized architecture enables this organ to coordinate these biological processes. Therefore, the reproductive success of the mammalian female depends initially on the oviduct (Hunter, 1998). In mammals, the oviduct is traditionally divided into several regions; infundibulum, ampulla, ampullary-isthmus junction (AIJ), isthmus, and uterotubal junction (UTJ) based on histological and anatomical characteristics. The gross anatomy and histology of the uterine tube has been studied in many domestic species (Barone, 1978; Banks, 1996; Bacha and Bacha, 2012). It consists of three concentric layers; the serosa (mesosalpinx) composed of mesothelial and nonstriated muscular cells derived from the uterine broad ligament; the middle muscular layer (myosalpinx) organized in a particular arrangement in different species (Muglia and Motta, 2001); and internally the mucosa (endosalpinx), with dense lymphatic and blood vascular network; adrenergic, cholinergic and peptidergic nerve fibers (Wrobel et al., 1993). The complete endosalpinx have folds that project centrally into the lumen. The height, width, and branching of the mucosa folds are more pronounced in the ampulla and the infundibular region. This inner layer is lined by a simple columnar or pseudostratified epithelium, containing ciliated and secretory cells. Ciliated cells play a role in the gamete and embryo transport (Teilmann et al., 2006; Kollé et al., 2009), in collaboration with interstitial Cajal cells present in the myosalpinx (Dixon et al., 2009). Secretory cells are mainly involved in the synthesis and release of different kinds of molecules that dissolve in the oviductal fluid, together with a selective transudate of serum (Oliphant, 1986; Willis et al., 1994; Leese et al., 2001; Hugentobler et al., 2010; Killian, 2011). Qualitative and quantitative analysis of secretory activity has been demonstrated at different oviductal regions in many mammals, eg. in the mouse (Nieder and Macon, 1987), rat (Abe and Abe, 1993), pig (Buhi et al., 1992), sheep (Buhi et al., 1991), baboon (Verhage and Fazleabas, 1988), human (Hyde and Black, 1986), goat (Gandolfi et al., 1993), and cow (Gerena and Killian, 1990). Cyclic morphometrical, ultrastructural, and histochemical changes in the oviductal epithelium have been studied in several mammalian species (Abe, 1996; Nayak and Ellington, 1997; Steinhauer et al., 2004; Abe and Hoshi, 2008; Desantis et al., 2011). These changes appear to respond to gonadal steroids concentrations across reproductive stages. Some particularities have been described about

the equine oviduct, such as selective developing embryo transport (Betteridge et al., 1979; Weber et al., 1991), luminal collagen-cellular masses (Aguilar et al., 1997; Lantz et al., 1998), trabeculae of connective tissue dividing the lumen (Aguilar et al., 2012), and crypts or glandular-like structures in the mucosa (Aguilar et al., 2010). Other reports have been published in relation to lymphocyte subset characterization (Brinsko and Ball, 2006), in vitro sperm–epithelium interaction (Ellington et al., 1993; Thomas et al., 1994), isolation of m-opioid receptors (Desantis et al., 2008), and localization of glycoconjugates in the epithelium (Desantis et al., 2004, 2005). Recently, prostaglandin E2 receptors have been characterized (Ball et al., 2013) and steroids regulation of gene expression (Nelis et al., 2012). Aguilar et al. (2012) described some histological characteristic in the mare oviductal epithelium at different reproductive stages. However, many morphometric features of the luminal surface and tridimensional conformation of the mucosa in the mare oviduct have not been described yet. Therefore, the primary aim of this study was to describe some morphometrical characteristics of the endosalpinx in transverse histologic oviductal sections. In addition, other quantitative parameters from isthmus, AIJ, and ampullary region at different reproductive phases were studied through intraoviductal corrosion casts.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Twenty-one nonpregnant mixed-bred mares, 3–14 years old, were selected at a slaughterhouse located 5 km from our laboratory. Reproductive stages were determined by rectal palpation and ultrasonography of the genital tract. Animals were selected in each of the following phases: anestrous mares (N 56) with small ovaries, follicles <15 mm, and without corpus luteum; estrous mares (N 59) with at least one follicle >35 mm, uterine edema, and low uterine tone; and diestrous mares (N 56) with an ultrasonographically visible corpus luteum, increased uterine tone, and no uterine edema. Anestrous and estrous mares were assigned to be slaughtered on the day of selection, whereas diestrous mares were monitored until ovulation and then assigned to be slaughtered on days 7 or 8 after ovulation.

### Sampling

Genital tracts were collected immediately after slaughter and transported to the laboratory within 1 hr in 37°C tempered saline solution. Reproductive phases were confirmed through ovarian structures examination. Dissection was carried out to isolate the oviduct from the rest of the reproductive tract. After dissection, the

left oviduct was reserved for light microscopy (anestrus N 5 6, estrus N 5 9, diestrus N 5 6) and the right one for intraluminal corrosion casts (anestrus N 5 5, estrus N 5 5, and diestrus N 5 4). Seven oviducts were damaged during the dissection procedure and therefore discarded.

### Light Microscopy Examination

For histology, portions measuring 1 cm were taken from the isthmus 2 cm proximal to the uterine-tubal junction, the AIJ at about the middle third of the oviduct and the ampulla at a distance of 2 cm distal from the fimbria. Oviductal segments were fixed overnight in BFS solution (pH 7.4), washed and dehydrated in ethanol series, cleared in xylene, and embedded in paraffin wax. Transverse tissue sections 7 mm thick were cut, and after dewaxing with xylene and hydration in an ethanol series of descending concentrations they were stained with hematoxylin and eosin. Morphological characteristics from oviductal sections were examined using digital stereomicroscopy<sup>1</sup>. Photomicrographs were taken at 403 magnification and, morphometric quantifications were registered using the software tools<sup>2</sup>. To measure all variables, tissue sections obtained were analyzed only transversely. The following parameters were measured: luminal area (LA), epithelial perimeter (EP), and mucosal area (MA). Mucosal area was calculated from the difference between cross sectional area (CSA) and luminal area. CSA was obtained measuring major and minor diameter to transverse sections (including epithelium and muscular layer but not serosa) and using the formula ( $A = \frac{1}{2} \pi (D^2 - d^2)$ ). Approximate volume (mL) was calculated from the multiplication of the LA and length of each tubular oviductal region.

### Intraoviductal Corrosion Cast and Morphometric Evaluation

Fourteen oviducts at different reproductive stages were used to create intraluminal casts using a low viscosity polyurethane resin<sup>3</sup>. This resin was originally created for building casts accurately from cadaveric small blood vessels (capillaries) and quantitative analysis by scanning electron microscopy. For intraoviductal injection, the resin was stained with pigment powder (at 1–2%, v/v)<sup>4</sup>, previously dissolved in methyl-ethyl-ketona (at 30%, v/v)<sup>5</sup>. Shortly before the injection, the hardener<sup>6</sup> (ratio 100:16 v/v) was added. The utero-tubal junction (UTJ) was dissected and the oviductal papilla channeled with a 25G needle. To create resin molds from the UTJ, retrograde injection was performed (from isthmic region to uterine horn, cranial tip). The oviduct was kept 24 for hours in saline tempered solution, until complete resin polymerization. The samples with surrounding and support tissues were immersed overnight in corrosion solution (KOH 7.5% at 50°C). After the

corrosion process, the intraluminal casts were washed in distilled water and air-dried (Fig. 1, Supporting Information). Molds obtained were observed and photomicrographed using Motic Images Plus 2.0<sup>ML</sup> digital stereomicroscopy to obtain morphometrical parameters. According to the macroscopic characteristics, each region (isthmus, AIJ, and ampulla) was sequentially photographed along its length. Of each mold, 15 images of the isthmus were taken, 5 of the AIJ, and 10 of the ampulla. Each image included a segment of 6.4 mm length to the segment evaluated, and five equidistant transverse measures were made to determined segment luminal diameter (LD, mm). Values obtained from central segment were taken as representative of each region. One additional measure along median axis to determine segment length (mm) was taken (Fig. 2, Supporting Information).

In addition, some molds were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). They were mounted on aluminium stubs, coated with gold, and examined in a Carl Zeiss<sup>V</sup> Supra 55VP scanning electron microscope (USA).

### Statistical Analysis

Data were analyzed to assess the effect of the reproductive stages of the estrous cycle (anestrus, estrus, and diestrus) on the fallopian tube region (isthmus, AIJ, and ampulla) on LA, EP, MA, LD, and SL. Variables were assessed for normality using the Shapiro-Wilks modified test and analyzed using ANOVA and Tukey's post hoc test.

## RESULTS

Intraluminal molds from all processed oviducts revealed an internal tortuous pathway in the different regions of the duct, being very pronounced in the AIJ. On the molds surface, the oviductal mucosa left many grooves with different directions and depths marked, according to the number and branching to the epithelial folds, whose height, category, and branches increased from the isthmus to ampulla.

### Isthmus

In all histological sections, a narrow luminal area not exceeding 0.5 mm<sup>2</sup> was found (Table 1), with no significant differences between reproductive stages ( $P > 0.05$ ). In photomicrographs, eight to ten broad-based and rounded primary folds, separated by shallow grooves radially organized were observed (Fig. 3A). These few primary folds and their low height determined an epithelial perimeter of few millimeters.

Histological sections with large mucosal area, showed a linear increase in the epithelial perimeter ( $r^2 \leq 0.78$ ). However, in this segment, the lowest perimeter compared to the other tubular regions was found, without significant differences between reproductive stages (Table 1).

As in the histological sections, three-dimensional resin molds showed that caudal isthmus and UTJ (papilla, not shown) had the lowest luminal diameter, with no significant differences among reproductive stages evaluated ( $P > 0.05$ , Table 1). On the molds surfaces, three or four grooves (corresponding to primary folds) extended as a continuous longitudinal canal, reducing their depth as they approached the AIJ (Fig. 3B–D). Several low height projections, arranged in rows and

<sup>1</sup>Motic DM 39C-N9GO.

<sup>2</sup>Motic Images Plus 2.0<sup>ML</sup>, China Group Co., Ltd.

<sup>3</sup>PU4ii<sup>V</sup> polyurethane for improved imaging; vasQtec; Zurich-Switzerland.

<sup>4</sup>Farbpaste DW- 0113-5<sup>V</sup>

<sup>5</sup>MEK, Taurus<sup>V</sup>, Argentina.

<sup>6</sup>PU4ii Hardener<sup>V</sup>; vasQtec; Zurich, Switzerland.

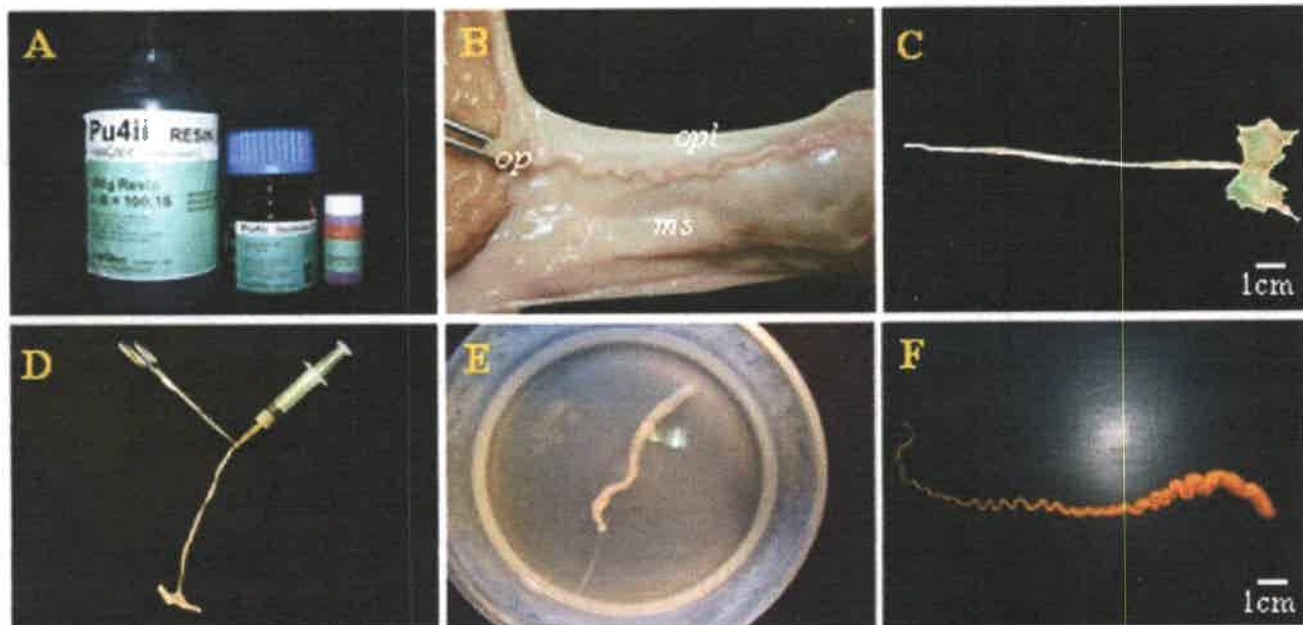


Fig. 1. Technique for intraoviductal repletion cast. A: PU4ii<sup>®</sup>, hardener and pigment; B: papilla (op) and the isthmus of the oviduct with the mesosalpinx (ms) and ovarian proper ligament (opl); C: dissected and displayed oviduct; D: channeled papilla and fixation of the needle by Halsted forceps; E: immersed in corrosive solution; F: mold of oviductal lumen (without infundibulum) after complete corrosion of tissue.

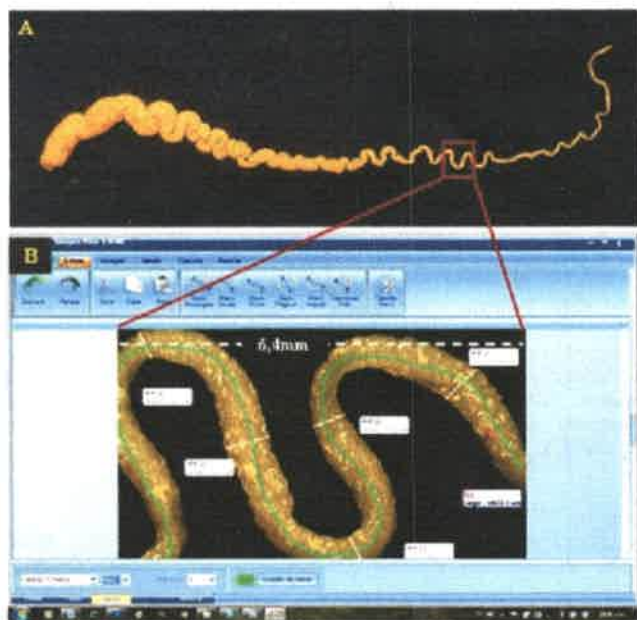


Fig. 2. A: Resin mold of the oviduct (without infundibulum) where a segment is highlighted in the cranial isthmus; B: segment (6.4 mm long) of the cranial isthmus, registered with Motic DM 39C-N9GO digital stereomicroscope at 40 $\times$ . Image analysis with the Motic Images Plus 2.0ML software: white lines in five measurements are to determine the width; and the green line marked on the median axis to measure the length.

separated by small-interconnected secondary grooves, some obliquely positioned toward utero-tubal junction, were observed in all phases of the estrous cycle

(Fig. 3D). These formations may represent crypts, pockets, or cul-de-sacs in the isthmic mucosa.

The caudal isthmus lumen, near the UTJ, was arranged more rectilinearly and in the remaining segment, sigmoid shaped curves were observed, becoming more U or V-shaped toward the AIJ (Fig. 2A, Supporting Information and Fig. 3C). Isthmic region was the longest segment of the oviduct, and with no significant differences between reproductive stages ( $P > 0.05$ , Table 2).

#### Ampullary-Isthmic Junction

The luminal area and epithelial perimeter determined from histological sections increased substantially in the AIJ compared with the isthmic region, showing significant differences between reproductive stages ( $P < 0.05$ , Table 1). The number and branching of epithelial folds showed also considerably increase in the AIJ versus the isthmus. Tertiary and sometimes quaternary folds were observed in the junction and in the caudal ampulla. In basal areas of the primary folds, epithelial crypts were observed (Fig. 4A). In the AIJ as well as in the isthmus, a linear relationship between epithelial perimeter and mucosal area was found ( $r^2 \leq 0.80$ ).

The morphology of the AIJ endosalpinx gradually changed from the isthmus toward the ampullary region. This finding was also observed on the surface of the resin molds. The three-dimensional luminal casts showed a moderate complexity in their folds and grooves compared with the smooth isthmus and high-folded ampulla. Most primary folds branched and divided longitudinally with a perpendicular or oblique position, creating a pattern of folds and grooves without a clear and definite order on molds surfaces (Fig. 4C,D). This region showed a slight increase in the luminal diameter, from

TABLE 1. Oviduct Morphometric Parameters at Different Reproductive Stages

Stage	Isthmus				Ampullary-isthmus junction				Ampulla			
	LA (mm <sup>2</sup> )	EP (mm)	MA (mm <sup>2</sup> )	LD (mm)	LA (mm <sup>2</sup> )	EP (mm)	MA (mm <sup>2</sup> )	LD (mm)	LA (mm <sup>2</sup> )	EP (mm)	MA (mm <sup>2</sup> )	LD (mm)
Anestrus	0.21 (0.11)	4.15 (1.64)	0.42 (0.24)	499.64 (4.87)	2.19 (0.92) <sup>ab</sup>	48.79 (15.52) <sup>a</sup>	3.47 (1.28) <sup>ab</sup>	1850.09 (55.09) <sup>a</sup>	2.10 (0.35)	80.58 (29.87)	6.46 (1.93)	3902.52 (916.20) <sup>a</sup>
Estrus	0.25 (0.09)	3.61 (1.82)	0.36 (0.15)	491.87 (7.97)	1.07 (0.69) <sup>a</sup>	17.80 (14.92) <sup>b</sup>	1.52 (1.19) <sup>a</sup>	1716.07 (63.79) <sup>a</sup>	2.43 (1.51)	51.83 (26.49)	5.71 (2.85)	3737.93 (984.44) <sup>a</sup>
Diestrus	0.24 (0.19)	3.75 (1.47)	0.41 (0.30)	500.83 (7.04)	2.51 (1.35) <sup>b</sup>	45.50 (5.43) <sup>a</sup>	4.80 (1.41) <sup>b</sup>	2549.34 (78.99) <sup>b</sup>	2.72 (0.73)	89.48 (25.49)	6.81 (1.63)	4903.94 (933.95) <sup>b</sup>
P value					<0.01	<0.001	<0.002	<0.001				<0.001

Abbreviations: LA, luminal area; EP, epithelial perimeter; MA, mucosal area; LD, luminal diameter; AL, ampullary-isthmus junction. Different superscripts indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ). Results are mean (S. E).

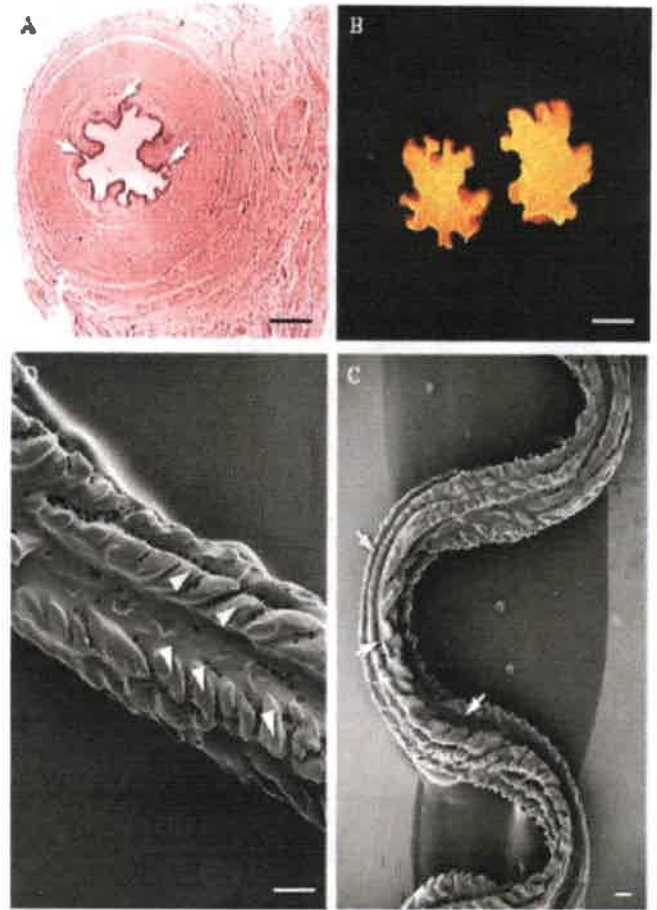


Fig. 3. A: Histological section of the central portion of the isthmus region (H & E stained), showing broaden-base primary folds and radially arrangement grooves, and some lateral cul-de-sacs in basal areas (arrows); B: cross-sectional of luminal cast of the isthmus, where eight to ten grooves and folds were observed with digital stereomicroscope at 403; C: Scanning electron microscopy (SEM, 453) of the resin mold of the isthmus, showing grooves like longitudinal channels along it (arrows); D: low height projections (molds of the cul-de-sacs), arranged in rows (arrowheads) and separated by small-interconnected secondary grooves, some obliquely positioned toward utero-tubal junction, SEM, 1253. Some small air bubbles were located in depth of primary and secondary grooves. Scale bar in A and B indicates 250  $\mu$ m and in C and D, 200  $\mu$ m.

its junction with the isthmus, toward the ampulla, with some differences among the reproductive stages studied (Table 1).

Multiple continuous W-shaped curves were observed on the molds of this region (Fig. 4B). They were produced by transverse folds of subserous connective tissue that penetrated from opposite sides (mesosalpinx and antimesosalpinx), creating a sinuous and zigzag path in the oviductal lumen.

### Ampulla

In histological sections and in all reproductive stages, multiple epithelial folds of different complexity were found; frequently short quaternary folds were also

TABLE 2. Length (mm) of the Different Regions of the Oviduct at Different Reproductive Stages, Calculated from Resin Molds

Region	Anestrus (N 5 6)	Estrus (N 5 9)	Diestrus (N 5 6)	P value	Length in all stages
Isthmus	96.36 (4.31)	108.02 (7.14)	88.71 (6.39)	>.05	96.78 (3.32) <sup>a</sup>
AIJ	48.03 (3.63)	45.89 (6.02)	58.57 (5.38)	>.05	50.24 (3.62) <sup>b</sup>
Ampulla	89.44 (4.86)	89.71 (8.06)	74.12 (7.21)	>.05	85.66 (4.34) <sup>a</sup>
TLO	205.53 (9.99)	236.32 (16.57)	194.21 (14.82)	>.05	
P value					<0.001

Different superscripts indicate statistical differences among regions of oviduct ( $P < 0.05$ ). Abbreviations: AIJ, ampullary-isthmic junction; TLO, total length of the oviducts. Results are mean ( $\pm$  S. E.).

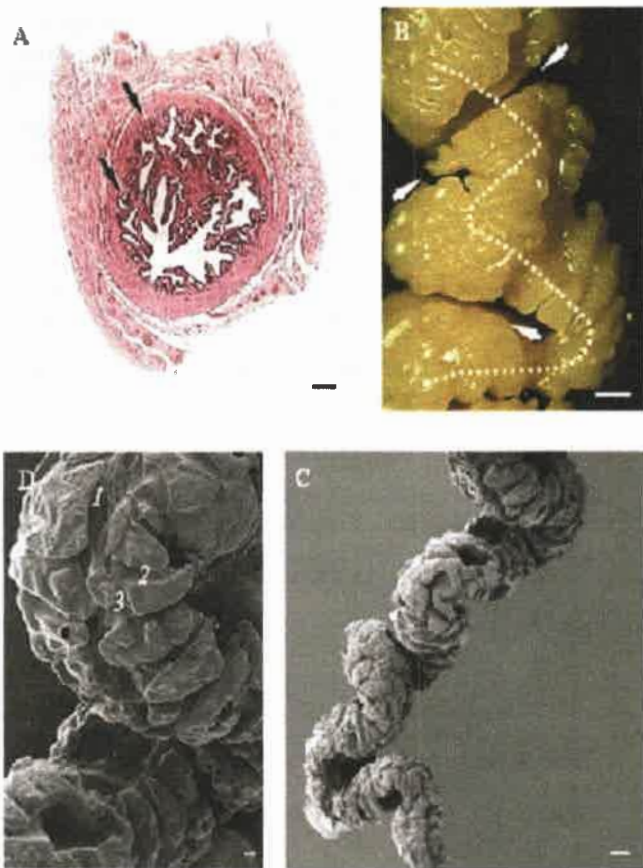


Fig. 4. A: Histological cross-section of the central portion of the ampullary-isthmic junction (AIJ), with hematoxylin and eosin stain, showing different categories of epithelial folds and some crypts (glandular-like structures) in basal areas (arrows); B: stereomicroscopy of resin mold of the AIJ, where deep and opposite grooves (arrows) produce W-shape curves (dotted line) and sinuous path in the lumen (40x); C: Scanning electron microscopy (SEM, 21x) of the resin mold of the AIJ showing a tortuous path and complex system of folds and grooves without specific organization; D: primary (1), secondary (2) and tertiary (3) shallow grooves, produced by epithelial folds, SEM, 703. Scale bar in A and D, indicates 100  $\mu$ m, in B 500  $\mu$ m, and in C 1 mm.

observed (Fig. 5A). Primary, secondary, tertiary, and quaternary folds occupied most of the lumen, leaving a small luminal area free. No significant differences among the reproductive stages were detected ( $P > 0.05$ ,

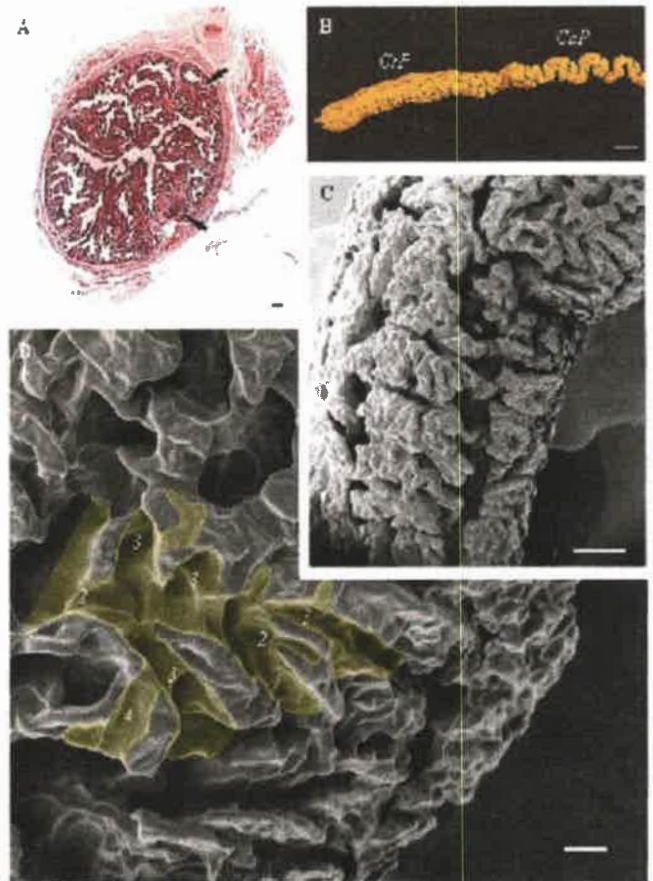


Fig. 5. A: Photomicrograph of the central portion of the ampulla, (H & E), where primary, secondary, tertiary, and quaternary folds occupied most of its lumen. Numerous epithelial crypts (glandular-like structures) in folds are shown (arrows); B: low magnification stereomicroscopy (7.53) of the mold of the ampulla, showing some curves in the caudal portion (CaP), that gradually disappear toward its cranial portion (CrP), where the lumen of ampulla becomes a rectilinear path; C: Scanning electron microscopy (SEM, 333) of the resin mold of the ampulla showing the intricate arrangement of the ampullary endosalpinx; D: branching of the primary, secondary (2), tertiary (3), and quaternary (4) grooves (highlighted), corresponding to different categories of epithelial folds, SEM, 653. Scale bar in A indicates 100  $\mu$ m, in B 5 mm, in C 1 mm, and in D 200  $\mu$ m.

Table 1). Such as in AIJ, numerous epithelial crypts (glandular-like structures) in basal areas of primary folds were found (Fig. 5A).

TABLE 3. Approximate Volume (uL) of the Different Regions of the Oviduct Among Reproductive Stages, Calculated from Histological Section

Stage	Isthmus	AIJ	Ampulla
Anestrus	21.54 (9.09)	125.05 (36.93) <sup>a</sup>	504.46 (38.73) <sup>a</sup>
Estrus	37.16 (5.03)	46.08 (18.03) <sup>b</sup>	283.63 (53.63) <sup>ab</sup>
<sup>b</sup> Diestrus	21.84 (7.04)	108.02 (7.14) <sup>a</sup>	203.92 (51.90)
P value	>.05	<0.005	<0.01

Different superscripts indicate statistical differences among regions of oviduct ( $P < 0.05$ ).

AIJ, ampullary-isthmus junction.

Results are mean (6S. E).

In resin molds, irregular grooves of different depth, width, and orientations were observed, showing the intricate arrangement of the ampullary endosalpinx. Some longitudinal, deep and asymmetrical grooves (corresponding to the primary folds) were oriented toward infundibular region, separating or joining with other multiple small and shallow lateral grooves (Fig. 5C,D).

The numerous and branched epithelial folds induced a substantial increase in epithelial perimeter, compared with isthmus and ampullary-isthmus region. This finding was observed in all reproductive stages of the estrous cycle (Table 1). Similarly to the AIJ and isthmus, in this ampullary region, a linear relationship between epithelial perimeter and mucosal area was found ( $r^2 \leq 0.79$ ).

In the molds, the caudal portion of the ampulla (near to AIJ) showed several curves in the lumen, gradually disappearing into the cranial portion and toward the infundibulum, where the lumen of ampulla adopted a rectilinear path (Fig. 5B).

In this tubular segment of the oviduct, a larger intraluminal diameter was found, and some significant differences between the reproductive stages evaluated were observed (Table 1).

The difference in the total length of the oviducts at different reproductive stages was not statistically significant (Table 2). The approximate volume in microliters (uL) showed differences for each tubular region and some phases of the estrous cycle (Table 3).

## DISCUSSION

The gross anatomy of the oviduct of numerous species of domestic mammals has been extensively documented (Barone, 1978). Such as in the pig, cow, sheep, goat and other mammals, the mare oviduct presents different curves or convolutions, whose shape varies at different morphological regions of the fallopian tube. Duct tortuosity is closely related to the oviduct length (Hunter, 1988), such as in the female rabbit, which has short and practically straight oviducts (Pedrero-Badillo et al., 2013). In sows, the length (and degree of sinuosity) increases after first estrus post-weaning (Rigby, 1968), and in cows the fallopian tubes growth is completed after puberty (Hunter, 1988). In the mare, this information has not been documented yet.

Several anatomical descriptions determined that the oviduct of the mare is the longest of all species of domestic mammals, reaching an average of 20 cm (Getty, 1982; Dyce et al., 2010), and often 30 cm in length (Barone, 1978). One report describes some morphometric details through direct observation of dissected mare's oviducts

(Suzuki and Tsutsumi, 1979). They found a length of 20.9  $\pm$  1.2 cm from the oviducts evaluated. In the present study, from the intraluminal molds, and in agreement with the previous literature, similar lengths were found. However, in this work the infundibular region was not included, which would add a few centimeters more to the whole length of the fallopian tubes in the mare.

Of the different tubular regions of the duct, the isthmus had numerous curves along its path in all reproductive stages evaluated. This finding probably made the isthmus region the longest of all the regions of the tube evaluated. In agreement with Suzuki and Tsutsumi (1979) and Dyce et al. (2010), the length of the isthmus showed no statistical differences with the ampullary region. Despite the large number of curves found, the length of AIJ was approximately 2.5 times shorter than the isthmus and ampullary region of the oviduct.

The curves on the AIJ (produced by transverse folds of subserous connective tissue) and the sinuous path observed in the oviductal molds are consistent with previous histological findings (Aguilar et al., 2012).

The lengths at the different regions of the oviduct, in relation to hormonal milieu or at different reproductive stages, have received little attention. Lewis and Berardinelli (2001) described some gross morphometric and histomorphometric changes in oviducts of post-pubertal transition and mature ewes. The length of the isthmus and ampulla from mature ewes was longer than those for postpubertal transition sheep. In the present study, no significant differences for this morphometric measure between reproductive stages were observed.

The internal morphometry of the different tubular regions of the oviduct have been studied in rabbit (Leese, 1983; Pedrero-Badillo et al., 2013), bovine (Yaniz et al., 2000), swine (Sua rez, 2008), ovine (Yaniz et al., 2013), and canine (England et al., 2013) oviducts. These previous studies described the internal diameter, the luminal area, luminal perimeter, and area of folds protruding into the oviduct lumen. In agreement with these studies, we found that the isthmus of the mare oviduct had the most constricted lumen of all portions of the duct. The present study shows that the isthmus presented a luminal diameter around to 300 microns near to the utero-tubal junction (oviductal papilla, data not shown), around 500 microns in its middle part, and approximately one millimeter (1 mm) at the join with the AIJ.

Although in our study no differences were found in the luminal diameter of the isthmus among reproductive stages, the mucosal edema, muscle contraction, and vascular congestion have been observed in the isthmus region in the sow (Hunter, 1973, 1975a, 1975b, 2012) and cow (Sua rez, 2002) oviduct, during estrus and periovulatory stage. This could explain the decrease in luminal diameter at this reproductive stage in their studies.

According to Suzuki and Tsutsumi (1979), the external and internal diameter (lumen) of the oviduct gradually increased from isthmus toward the ampulla. Similarly, in our study the middle part of the ampulla had the largest diameter (4–5 millimeters approximately) among reproductive stages.

The equine endosalpinx presents epithelial folds with different degree of branching and morphology, showing the ampullary region a higher degree of complexity

(Trautman and Fiebiger, 1952; Barone, 1978; Bacha and Bacha, 2012). Our results showed that the number and branching of epithelial folds increased significantly from the isthmus to the ampulla, where tertiary and quaternary folds were found frequently in all histological sections and reproductive stages. This finding was not observed in the same way in the three-dimensional molds because the epithelial folds were partially flattened during filling of the lumen with the resin. The luminal perimeter showed significant changes between regions of the equine fallopian tube. The low-folded isthmic mucosa produced the lowest luminal perimeter compared to the AIJ and highly folded ampullary region. The larger luminal perimeter of the ampullary region provides a large contact surface to support biological events such as embryo development. Possibly this is related to the fact that the ampulla appears to be the most active secretory region, where more fluid is produced by epithelial cells, supplying the necessary nutrients for gamete meeting, fertilization, and early cleavage of embryos. Leese (1983) found similar results in rabbit oviduct, where more fluid was produced in the ampulla than in the isthmic region, reflecting the greater surface area of the first one.

Ampullary-isthmic junction during estrus had the smallest luminal perimeter and diameter compared with the samples obtained in anestrus and diestrus. This finding may be because of edema, thickening of the folds and hypertrophy or hyperplasia of epithelial cells in response to circulating estrogens. England et al., (2013) found similar results along the length of the bitch uterine tube at different stages of the estrous cycle. Although the isthmus has a smaller epithelial surface outline (perimeter) for sperm binding, studies on pig (Sua rez et al., 1991), equine (Thomas et al., 1994), human (Baillie et al., 1997), rat (Orihuela et al., 1999), and cow (Sua rez et al., 1997; Sostaric et al., 2008) have shown that spermatozoa preferentially bind to the isthmic mucosa (in vitro and in vivo) compared with the ampulla. In the same study, England et al., (2013) observed some differences in epithelial surface outline (perimeter) among reproductive stages. In the metoestrus and diestrus they found the smallest perimeter compared with proestrus and estrus in all regions of the bitch oviduct.

It could be suggested that some folds and grooves may be continuous along the isthmus, AIJ, and ampulla. Through the molds, it was possible to replicate with enough detail the complex tridimensional architecture of the endosalpinx of the ampulla, with folds of different height, category and tridimensional arrangement.

There is consensus in relation to the absence of glands in the oviduct of most domestic mammals (Banks, 1996; Bacha and Bacha, 2012). However, in all histological sections and at different reproductive stages, epithelial crypts, whose organization resembles glandular structures were found, reinforcing previous histological descriptions (Aguilar et al., 2010). In agreement with reports for other species, such as rabbits (Jansen and Bajpai, 1982), cows (Yaniz et al., 2000), cats (Chatdarong et al., 2004), bitches (Steinhauer et al., 2004), sows (Ekhlasi-Hundrieser et al., 2005; Tummaruk and Tienthai, 2010), and sheep (Yaniz et al., 2013) these crypts were observed in the equine oviductal mucosa in histological sections and some molds like small projections.

There are few morphological studies of the mare oviductal mucosa by scanning electron microscopy. The

existence of different subcompartments, cul-de-sacs and crypts in the mucosa is widely described in the oviduct of the sow (Wu et al., 1976; Yaniz et al., 2006), cow (Yaniz et al., 2000), and recently in the sheep (Yaniz et al., 2013). Our findings from histology and tridimensional molds suggests that the equine endosalpinx is arranged in a very complex way and has all these different subcompartments, sacculations, or cul-de-sacs at different regions, suggesting that each segment has particular functions.

Since the 1990s oocyte transfer has been used to obtain pregnancies from mares considered infertile using standard breeding methods or embryo transfer (Carnevale et al., 2005). In these technologies, empirical volumes of 0.1 to 0.3 milliliters of transfer medium deposited into the cranial ampulla were used during oocyte transfer (OT) (Hinrichs et al., 1998; Carnevale et al., 2001). In this study, we found an approximate volume of 215–345  $\mu$ L for the ampulla that can house the volumes used in OT during estrus stage. The values found in the present study partially agree with those reported for the oocyte transfer technic.

## CONCLUSIONS

The combination of histology and intraluminal molds allowed us to characterize some morphometric parameters of oviductal lumen of the mare at different reproductive stages. The findings presented provide useful information to build a more complete model on the three-dimensional organization of the oviductal mucosa of the mare. Knowing the anatomic, histologic, and physiologic complexity of this organ may be relevant for improving the application of assisted reproductive technologies in horses.

## ACKNOWLEDGEMENT

All authors have made substantial contributions to the research design and to the collection, analysis, and interpretation of data. Dr. Javier Aguilar acts as head of the research group.

## LITERATURE CITED

- Abe H. 1996. The mammalian oviductal epithelium: regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. *Histol Histopathol* 11:743–768.
- Abe H, Abe M. 1993. Immunological detection of an oviductal glycoprotein in the rat. *J Exp Zool* 266:328–335.
- Abe H, Hoshi H. 2008. Morphometric and ultrastructural changes in ciliated cells of the oviductal epithelium in prolific Chinese Meishan and large white pigs during the oestrous cycle. *Reprod Dom Anim* 43:66–73.
- Aguilar JJ, Woods GL, Miragaya MH, Olsen LM. 1997. Living fibroblast cells in the oviductal masses of mares. *Equine Vet J* 25(Suppl): 103–108.
- Aguilar JJ, Cuervo-Arango J, Mas C, Reyley M, Rodriguez MB, Mouguelar H. 2010. Glands in the oviductal mucosa of the mare. *Reprod Fert Dev* 22:226.
- Aguilar JJ, Cuervo-Arango J, Mouguelar H, Losinno L. 2012. Histological characteristics of the equine oviductal mucosa at different reproductive stages. *J Equine Vet Sci* 32:99–105.
- Bacha WJ and Bacha LM. 2012. Female reproductive system. In: *Color atlas of veterinary histology*, 3rd ed. Wiley-Blackwell, Iowa. p 243–265.
- Baillie HS, Pacey AA, Warren MA, Scudamore IW, Barratt CLR. 1997. Greater numbers of human spermatozoa associate with



- endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampulla. *Hum Reprod* 12:1985-1992.
- Ball BA, Scoggin KE, Troedsson MHT, Squires EL. 2013. Characterization of prostaglandin E receptors (EP2, EP4) in the horse oviduct. *Anim Reprod Sci* 142:35-41.
- Banks WJ. 1996. Epitelios. En: *Histologia Veterinaria Aplicada*. Ed. El Manual Moderno, S. A. de C. V. Mexico-Santa Fe de Bogota. p 79-92.
- Barone R. 1978. Appareil Uro-genital. En: *Anatomie comparee des Mammifères Domestiques*. Imprimeri Des Meaux-Arts, J.Tixier & Fils. S.A, Lyon, France. p 311-321.
- Betteridge KL, Eaglesome MD, Flood PF. 1979. Embryo transport through the mare's oviduct depends on cleavage and is independent of the ipsilateral corpus luteum. *J Reprod Fertl Suppl* 27: 387-394.
- Brinsko SP, Ball BA. 2006. Characterization of lymphocyte subsets in the equine oviduct. *Equine Vet J* 38:214-218.
- Buhi WC, Ashworth CJ, Bazer FW, Alvarez IM. 1992. In vitro synthesis of oviductal secretory proteins by estrogen-treated ovariectomized gilts. *J Exp Zool* 262:426-435.
- Buhi WC, Bazer FW, Alvarez IM, Miranda MA. 1991. In vitro synthesis of oviductal proteins associated with estrus and 17 $\beta$ -estradiol treatment of ovariectomized ewes. *Endocrinology* 128: 3086-3095.
- Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Panzani D, Stokes JE, Squires EL. 2005. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology* 64:519-527.
- Carnevale EM, Squires EL, Maclellan LJ, Alvarenga MA, Scott TJ. 2001. Use of oocyte transfer in a commercial breeding program for mares with reproductive abnormalities. *J Am Vet Med Assoc* 218:87-91.
- Chatdarong K, Lohachit C, Linde-Forsberg C. 2004. Distribution of spermatozoa in the female reproductive tract of domestic cat in relation to ovulation induced by natural mating. *Theriogenology* 62:1027-1041.
- Desantis S, Acone F, Corriero A, Deflorio M, Suban D, Ventriglia G, Palmieri G, De Metrio G. 2004. Distribution of sialoglycoconjugates in the oviductal isthmus of the horse during anoestrus, oestrus and pregnancy: a lectin histochemistry study. *Eur J Histochem* 48:403-412.
- Desantis S, Albrizio M, Ventriglia G, Deflorio M, Guaricci AC, Minoia R, De Metrio G. 2008. The presence of the mu-opioid receptor in the isthmus of mare oviduct. *Histol Histopathol* 23: 555-564.
- Desantis S, Ventriglia G, Suban D, Corriero A, Deflorio M, Acone F, Palmieri G, Metrio DG. 2005. Differential lectin binding patterns in the oviductal ampulla of the horse during oestrus. *Eur J Histochem* 49:33-44.
- Desantis S, Zizza G, Accogli F, Acone R, Rossi R, Resta L. 2011. Morphometric and ultrastructural features of the mare oviduct epithelium during oestrus. *Theriogenol* 75:671-678.
- Dixon RE, Hwang SJ, Henning 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* 80:665-673.
- Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. 2010. The pelvis and reproductive organs of the horse. In: *Textbook of veterinary anatomy*. 4th ed. Saunders-Elsevier, Atlanta. p 568-578.
- Ekhlesi-Hundrieser M, Gohr K, Wagner A, Tsolova M, Petrunkina A, Topfer-Petersen E. 2005. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biol Reprod* 73:536-545.
- Ellington JE, Ball BA, Yang X. 1993. Binding of stallion spermatozoa to the equine zona pellucida after coculture with oviductal epithelial cells. *J Reprod Fertl* 98:203-208.
- England GCW, Burgess CM, Clutterbuck AL, Freeman SL. 2013. Epithelial surface changes and spermatozoa storage in the reproductive tract of the bitch. *Vet J* 195:185-191.
- Gandolfi F, Passoni L, Modena S, Brevini TAL, Varga Z, Lauria A. 1993. Similarity of an oviduct-specific glycoprotein between different species. *Reprod Fertl Dev* 5:433-443.
- Gerena RL, Killian GJ. 1990. Electrophoretic characterization of proteins in oviduct fluid of cows during the estrous cycle. *J Exp Zool* 256:113-120.
- Getty R. Sistema Urogenital de los equinos. En: Sisson S y Grossman JD, *Anatomia de los animales domesticos*, Elsevier-Masson, 5ta. Ed. 1982, p 605-614.
- Hinrichs K, Matthews GL, Freeman DA, Torello EM. 1998. Oocyte transfer in mares. *J Am Vet Med Assoc* 212:982-986.
- Hugentobler SA, Sreenan J, Humpherson P, Leese H, Diskin M, Morris D. 2010. Effects of changes in the concentration of systemic progesterone on ions, amino acids and energy substrates in cattle oviduct and uterine fluid and blood. *Reprod Fertl Dev* 22: 684-694.
- Hunter RHF. 1973. Transport, migration, and survival of spermatozoa in the female genital tract: species with intrauterine deposition of semen. In: ESE Hafez & C Thibault, editors. *Sperm Transport, Survival and Fertilizing Ability*. INSERM, Paris. pp. 309-342.
- Hunter RHF. 1975a. Physiological aspects of sperm transport in the domestic pig, *Sus scrofa*. I. Semen deposition and cell transport. *Br Vet J* 131:565-573.
- Hunter RHF. 1975b. Physiological aspects of sperm transport in the domestic pig, *Sus scrofa*. II. Regulation, survival and fate of cells. *Br Vet J* 131:681-690.
- Hunter RHF. 1988. The fallopian tubes. "Their role in fertility and infertility". Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg.
- Hunter RHF. 1998. Have the fallopian tubes a vital role in promoting fertility? *Acta Obstet Gynecol Scand* 77:475-486.
- Hunter RHF. 2012. Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biol Rev* 87:244-255.
- Hyde BA, Black DL. 1986. Synthesis and secretion of sulphated glycoproteins by rabbit oviduct explants in vitro. *J Reprod Fertl* 78: 83-91.
- Jansen RP, Bajpai VK. 1982. Oviduct acid mucus glycoproteins in the estrous rabbit: ultrastructure and histochemistry. *Biol Reprod* 26:155-168.
- Killian G. 2011. Evidence that oviduct secretions influence sperm function: a retrospective view for livestock. *J Anim Sci* 89:1315-1322.
- Kolle S, Dubielzig S, Reese S, Wehrend A, König P, Kummer W. 2009. Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: ex vivo analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow. *Biol Reprod* 81:267-274.
- Lantz KC, Enders AC, Liu IK. 1998. Possible significance of cells within intraluminal collagen masses in equine oviducts. *Anat Rec* 252:568-579.
- Leese HJ. 1983. Studies on the movement of glucose, pyruvate and lactate into the ampulla and isthmus of the rabbit oviduct. *Quart J Exp Physiol* 68:89-96.
- Leese HJ, Tay JR, Sandra J. 2001. Formation of fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Downing Reproduction* 121: 339-346.
- Lewis AW, Berardinelli JG. 2001. Gross anatomical and histomorphometric characteristics of the oviduct and uterus during the pubertal transition in sheep. *J Anim Sci* 79:167-175.
- Muglia U, Motta PM. 2001. A new morpho-functional classification of the Fallopian tube based on its three-dimensional myoarchitecture. *Histol Histopathol* 16:227-237.
- Nayak RK, Ellington EF. 1997. Ultrastructural and ultracytochemical cyclic changes in the bovine uterine tube (oviduct) epithelium. *Am J Vet Res* 38:157-168.
- Nelis HM, Goossens K, Leemans B, Peelman L, and Van Soom A. 2012. Steroid-regulated mRNA expression in oviduct epithelial cells in the mare. *Reprod Fertl Dev* 25(1), Abstract 220.
- Nieder GL, Macon GR. 1987. Uterine and oviductal protein secretion during early pregnancy in the mouse. *J Reprod Fertl* 81:287-294.
- Oliphant G. 1986. Biochemistry and immunology of oviductal fluid. In: Siegler AM, editor. *The fallopian tube: basic studies and clinical contributions*. Mount Kisco, New York: Futura. p 129-145.
- Orihuela PA, Ortiz ME, Croxatto HB. 1999. Sperm migration into and through the oviduct following artificial insemination at different stages of the estrous cycle in the rat. *Biol Reprod* 60:908-913.
- Pedrero-Badillo F, Anaya-Hernandez A, Corona-Quintanilla DL, Castelan F, Pacheco P, Martinez-Gomez M, Cuevas E. 2013.

- Morphohistological characteristics of rabbit oviduct: a proposal for a single regionalization. *Anim Reprod Sci* 143:102-111.
- Rigby JP. 1968. The length of the uterine horn and fallopian tube. *Res Vet Sci* 9:551-556.
- Sostarić E, Dieleman SJ, van de Lest CH, Colenbrander B, Vos PL, Garcia-Gil N, Gadella BM. 2008. Sperm binding properties and secretory activity of the bovine oviduct immediately before and after ovulation. *Mol Reprod Dev* 75:60-74.
- Steinhauer N, Boos A, Günzel-Apel AR. 2004. Morphological changes and proliferative activity in the oviductal epithelium during hormonally defined stages of the oestrous cycle in the bitch. *Reprod Dom Anim* 39:110-119.
- Sua rez SS. 2002. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Dom Anim* 37:140-143.
- Sua rez SS. 2008. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* 52:455-462.
- Sua rez SS, Brockman K, Lefebvre R. 1997. Distribution of mucus and sperm in bovine oviduct after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod* 56:447-453.
- Sua rez SS, Refern K, Raynor P, Martin F, Phillips DM. 1991. Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct in vitro: possible role in formation of a sperm reservoir. *Biol Reprod* 44:998-1004.
- Suzuki H and Tsutsumi Y. 1979. Morphological studies on the oviductal mucosa of the mare. *J Fac Agr Hokkaido Univ* 59(3):267-277.
- Teilmann SC, Clement CA, Thorup J, Byskov AG, Christensen ST. 2006. Expression and localization of the progesterone receptor in mouse and human reproductive organs. *J Endocrinol* 191:525-535.
- Thomas PGA, Ball BA, Brinsko SP. 1994. Interaction of equine spermatozoa with oviduct epithelial cell explants is affected by estrous cycle and anatomic origin of explant. *Biol Reprod* 51:222-228.
- Trautman A and Fiebiger J. 1952. *Fundamentals of the Histology of Domestic Animals*. Ithaca, New York: Comstock Pub Assoc.
- Tummaruk P, Tienthai P. 2010. Number of spermatozoa in the crypts of the sperm reservoir at about 24h after a low-dose intra-uterine and deep intrauterine insemination in sows. *Reprod Dom Anim* 45:208-213.
- Verhage HG, Fazleabas AT. 1988. The in vitro synthesis of estrogen-dependent proteins by the baboon (*Papio anibis*) oviduct. *Endocrinology* 123:522-558.
- Weber JA, Freeman DA, Vanderwall DK, Woods GL. 1991. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. *Biol Reprod* 45:540-543.
- Willis P, Sekhar KNC, Brooks P, Fayrer-Hosken RA. 1994. Electrophoretic characterization of equine oviductal fluid. *J Exp Zool* 268:477-485.
- Wrobel KH, Kujat R, Fehle G. 1993. The bovine tubouterine junction: general organization and surface morphology. *Cell Tissue Res* 271:227-239.
- Wu ASH, Carlson SD, First NL. 1976. Scanning electron microscopic study of the porcine oviduct and uterus. *J Anim Sci* 42:804-809.
- Yaniz JL, Carretero T, Recreo P, Arceiz E, Santolaria P. 2013. Three-dimensional architecture of the ovine oviductal mucosa. *Anat Histol Embryol* 38:1-10.
- Yaniz JL, Lopez-Gatius F, Hunter RH. 2006. Scanning electron microscopic study of the functional anatomy of the porcine oviductal mucosa. *Anat Histol Embryol* 35:28-34.
- Yaniz JL, Lopez-Gatius F, Santolaria P, Mullins JK. 2000. Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *Anat Rec* 260:268-278.

76151

217