



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL FLUIDO DE LA TUBA UTERINA DE LA CERDA SINCRONIZADA, SOBRE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA DE LOS ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS.

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA:**

CIPATLI GARCÍA DALMÁN

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA

COMITÉ TUTORAL:

**DRA. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA
DR. DANIEL MOTA ROJAS**

México, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A mi papá, mamá y hermana,
por que siempre apoyan todas las
empresas que comienzo y me impulsan
a crecer.*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me fue otorgada durante mis estudios de maestría, al proyecto DGAP-UNAM (PAPIIT IN206506) y a los laboratorios Intervet por el apoyo proporcionado para la realización de este trabajo.

A los miembros de mi jurado Dr. Luis A. Zarco y Dra. Ana Ma. Rosales, por sus valiosos comentarios para mejorar esta tesis.

A Ma. Elena, por aceptarme desde el primer día que llegué con ella. A Lourdes, por compartir conmigo sus conocimientos, experiencia y amor por la biología celular. A Daniel, por las palabras de aliento y por los acertados comentarios a mi trabajo. A los tres, gracias por su apoyo, confianza y amistad.

A Oscar y Yazmin, por compartir sus experiencias y estar a mi lado incondicionalmente.

A Oscar, Chava, Dania, Juan Carlos y mas tarde Yazmin, por compartir los ratos buenos y malos durante nuestros estudios y por enseñarme a trabajar en equipo, experiencia muy difícil pero muy enriquecedora para mi.

A Luci y Ana, por su amistad, sus palabras de aliento y porque siempre me apoyaron diciendo si a la lista interminable de peticiones que les hice.

A Arantza y Carlos, por estar al pendiente de mi e impulsarme a ser mejor.

A las personas de los Deptos. de Morfología y Reproducción que siempre me apoyaron, especialmente Jorge, Sr. Francisco, Susi y Memo.

A mi abuelo Lupe, por dedicarle su vida al campo y los animales, especialmente los cerdos; y a mi abuelo Goyo, por querer una familia de profesionistas.

A todas aquellas personas que siempre creyeron en mi.

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	
1 La tuba uterina	4
2 El transporte espermático en la tuba uterina	5
3 Establecimiento del reservorio espermático	6
3.1 Acción mecánica	6
3.2 Formación del fluido	6
3.3 Interacción epitelio espermatozoide	10
3.4 Liberación del espermatozoide	11
4 Capacitación espermática	11
5 Tratamientos hormonales para controlar el estro	12
6 Criopreservación	14
III. JUSTIFICACIÓN	16
IV. OBJETIVOS	17
V. HIPÓTESIS	17
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	
Diseños experimentales	18
Metodologías	19
VII. RESULTADOS	25
VIII. DISCUSIÓN	28
Conclusiones	33
IX. REFERENCIAS	34
ANEXO1. Cuadros y Figuras	40

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1.	Proteínas presentes en la tuba uterina de la cerda	8
Cuadro 2.	Funciones del espermatozoide, huevo y embrión afectadas al ser tratadas con glicoproteínas específicas de la tuba uterina	9
Cuadro 3.	Volúmen promedio de fluido de la tuba uterina obtenido de la región del istmo y ámpula de las cerdas pertenecientes a los grupos testigo, progestágeno y eCG-hCG.	41
Cuadro 4.	Promedio de la concentración de proteína del fluido de la tuba uterina obtenido de la región del istmo y ámpula de las cerdas pertenecientes a los grupos testigo, progestágeno y eCG-hCG	42
Cuadro 5.	Comparación del efecto del fluido de la tuba uterina proveniente del istmo y ámpula, según el tratamiento de sincronización, en el número de células que presentaron el patrón F (células no capacitadas), a las 4 h y 8 h 30 min de incubación, de células espermáticas provenientes de semen fresco y semen congelado descongelado	46
Cuadro 6.	Comparación del efecto del tratamiento de sincronización y del efecto del fluido de la tuba uterina proveniente del istmo y ámpula, en el número de células que presentaron el patrón B (células capacitadas), a las 4 h y 8 h 30 min de incubación, de células espermáticas provenientes de semen fresco y semen congelado descongelado	47
Cuadro 7.	Comparación del efecto del fluido de la tuba uterina proveniente del istmo y ámpula, según el tratamiento de sincronización, en el número de células que presentaron el patrón RA (células con reacción acrosomal), a las 4 h y 8 h 30 min de incubación, de células espermáticas provenientes de semen fresco y semen congelado descongelado	48

Cuadro 8. Comparación entre el número de células espermáticas provenientes de semen fresco y semen congelado descongelado, que presentaron el patrón F (células no capacitadas), con 4 h y 8 h 30 min de incubación, en presencia de fluido de la tuba uterina de la región del istmo y ámpula, con los diferentes tratamientos de sincronización	49
Cuadro 9. Comparación entre el número de células espermáticas provenientes de semen fresco y semen congelado descongelado, en el número de células que presentaron el patrón B (células capacitadas), con 4 h y 8 h 30 min de incubación, en presencia de fluido de la tuba uterina de la región del istmo y ámpula, con los diferentes tratamientos de sincronización	50
Cuadro 10. Comparación entre el número de células espermáticas provenientes de semen fresco y semen congelado descongelado, en el número de células que presentaron el patrón RA (Células con reacción acrosomal), con 4 h y 8 h 30 min de incubación, en presencia de fluido de la tuba uterina de la región del istmo y ámpula, con los diferentes tratamientos de sincronización	51
Figura 1. Patrón proteínico obtenido del fluido de la tuba uterina de la región del istmo, de las cerdas pertenecientes a los grupos testigo, progestágeno y eCG-hCG	43
Figura 2. Patrón proteínico obtenido del fluido de la tuba uterina de la región del ámpula, de las cerdas pertenecientes a los grupos testigo, progestágeno y eCG-hCG	44
Figura 3. Patrones de fluorescencia observados con la clortetraciclina para evaluar el estado fisiológico en los espermatozoides de cerdo. F (No capacitados): fluorescencia uniforme en el espermatozoide, ligeramente mayor en la zona apical de la cabeza; B (Capcitados): banda fluorescente en la región ecuatorial y; RA (con Reacción Acrosomal): sin fluorescencia en la zona apical de la cabeza, fluorescencia en la región postacrosomal	45
Esquema 1. Dibujo que representa la preparación de la columna de sephadex G 10 para el filtrado de la muestra espermática	24

RESUMEN

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL FLUIDO DE LA TUBA UTERINA DE LA CERDA SINCRONIZADA, SOBRE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA DE LOS ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS.

García DC, Juárez MML, Mota RD, Trujillo OME. El propósito del presente trabajo, fue investigar si el proceso de capacitación de los espermatozoides criopreservados se afecta, de acuerdo a la composición del fluido de la tuba uterina secretado en la región del istmo y ampulla, en cerdas sincronizadas con el progestágeno sintético oral altrenogest, y la combinación de gonadotropina coriónica equina (eCG) con gonadotropina coriónica humana (hCG). Se utilizaron 9 cerdas, a las que posterior al primer estro se les aplicó el tratamiento. Grupo 1: testigo; grupo 2: 20 mg/día durante 18 días de altrenogest y; grupo 3: 400 UI de eCG y 200 UI de hCG. Al estro post-tratamiento, se extrajeron las tubas uterinas mediante cirugía, se dividieron en istmo y ampulla y cada región se lavó con 500 μ l de solución salina fisiológica; se midió el volumen de las muestras colectadas y se almacenaron a -196 °C. La concentración proteínica del fluido se determinó por el método de Lowry y la separación proteínica se realizó mediante electroforesis (SDS-PAGE 10%). Para la evaluación del efecto del fluido sobre la capacitación espermática, se incubaron 5 000 células espermáticas, provenientes de semen fresco y semen congelado-descongelado, con 50 μ l de cada muestra de fluido; se valoró el estado de capacitación mediante el ensayo de clortetraciclina a las 4 y 8.3 horas de incubación, contando 50 células de cada muestra. Los tratamietos aplicados para sincronizar el estro provocaron un aumento en el volumen de fluido producido y en la concentración proteínica. En cuanto al estado de capacitación, se encontró un menor número de espermatozoides capacitados, en las células incubadas con fluido del grupo testigo que en las del grupo del progestágeno y eCG-hCG, con diferencias estadísticas por efecto del tratamiento ($P < 0.05$); al mismo tiempo, se encontraron diferencias estadísticas significativa ($P < 0.05$) de acuerdo a la región de origen (istmo o ampulla), en los dos diferentes tiempos de incubación y en el estado de capacitación de los espermatozoides provenientes de semen fresco y congelado. Se pudo demostrar que el uso del progestágeno sintético oral y la combinación eCG-hCG afecta el volumen del fluido producido en la tuba uterina y la concentración proteínica del fluido en la región del istmo y ampulla, estos cambios modifican el momento de la capacitación de los espermatozoides criopreservados, al acelerar este proceso.

Palabras Clave: Sincronización, tuba uterina, capacitación.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE EFFECT OF THE UTERINE TUBE FLUID OF THE SINCRONIZED SOW ON THE SPERM CAPACITATION OF CRIOPRESERVED SPERM. García DC, Juárez MML, Mota RD, Trujillo OME.

The aim of the present study was to investigate if the capacitation process of criopreserved sperm gets affected, according to the composition of the uterine tube fluid, secreted in the isthmus and ampullar regions in sows sincronized with the synthetic progestagen altrenogest, and with a commercial gonadotropin mixture (400 UI eCG, 200 UI hCG). The treatment was applied in 9 sows after the first estrous cycle divide in group 1 or control, group 2 or altrenogest and group 3 or eCG-hCG. At post treatment oestrus, uterine tubes were surgically removed, each region was dissected (isthmus and ampulla) and washed with 500 μ l of physiologic saline solution; the volumen of the collected samples was measured and kept at -196°C. The fluid proteinic concentration was determined by the Lowry method, while the proteinic separation was done by electrophoresis (10% SDS PAGE). To evaluate the uterine fluid effect on sperm capacitation, 5000 sperm cells were incubated with 50 μ l from each sample, on fresh and frozen-thawed semen. The capacitation state was evaluated by the chlortetracycline assay after 4 h and 8 h 30 min incubation. counting 50 cells from each sample. Treatments applied for estrous sincronization increased the fluid volumen and the proteinic concentration; while the number of capacitated sperm decreased in the cells incubated in the control fluid group compared to the progestagen and the eCG-hCG groups, statistical differences were observed in each treatment ($P < 0.05$); at the same time, statistical differences were observed on each region ($P < 0.05$) at both incubation periods used and in the sperm capacitation of fresh and frozen-thawed semen. It was demonstrated that the use of the synthetic progestagen and the combination of eCG-hCG affects the fluid volumen produced in the uterine tube and the fluid proteinic concentration on the isthmus and ampulla regions, this changes modify the sperm capacitation moment of criopreserved sperm.

Key words: sincronization, uterine tube, sperm capacitation

I. INTRODUCCIÓN

Los elementos esenciales de la fertilización en los mamíferos placentados consisten en una cascada de complejas interacciones entre el espermatozoide y el óvulo, que inician con el contacto del espermatozoide capacitado y las células del cumulus del huevo y culmina con la fusión huevo-espermatozoide y la combinación de sus genomas (Aitken RJ *et al.*, 1997).

Después de abandonar el testículo, el espermatozoide es incapaz de fertilizar el óvulo, ya que antes debe experimentar una fase de maduración en el epidídimo y un periodo de incubación que se lleva a cabo conforme el espermatozoide es transportado a través del tracto femenino, dotando al espermatozoide con la habilidad para penetrar y fertilizar al huevo. Este último periodo, durante el cual el espermatozoide adquiere la habilidad de responder a las señales del óvulo para sufrir la reacción acrosomal, es conocido como capacitación (Aitken RJ *et al.*, 1997).

La capacitación modifica la arquitectura intrínseca de la membrana plasmática del espermatozoide por la remoción o adsorción de las proteínas plasmáticas o epididimales, lo que promueve un desorden lipídico con una consecuente relocalización de las proteínas. Con base a estudios *in vivo* e *in vitro* se ha observado que la capacitación espermática ocurre cuando el espermatozoide se encuentra dentro de la tuba uterina, aunque aún no es claro como se modula este evento (Tienthai P *et al.*, 2004; Smith TT *et al.*, 1989).

Los espermatozoides depositados en el tracto reproductor de la hembra son transportados a través del útero hasta la tuba uterina, dentro de la cual son retenidos en la unión útero tubárica, en donde se establece un reservorio espermático funcional (Johansson M *et al.*, 2000). El reservorio espermático tiene tres funciones principales: prevenir la fertilización poliespérmica, mantener la fertilidad del espermatozoide hasta que el ovocito sea liberado y regular el proceso de capacitación y de hiperactivación del espermatozoide (Suarez SS, 2002). Tanto la interacción de la porción apical de la membrana plasmática del espermatozoide con la superficie de las células epiteliales del istmo, así como el fluido intraluminal han sido mencionados como los principales componentes que regulan la formación de este reservorio espermático (Johansson M *et al.*, 2000; Tienthai P *et al.*, 2004).

La unión y la interacción de las células epiteliales participa en la formación del reservorio espermático por medio de una adhesión específica con la región apical de la cabeza espermática. La habilidad de unirse o desprenderse del epitelio parece estar relacionado con el estado de capacitación ya que coincide con la habilidad del espermatozoide para ser

liberado del reservorio espermático (Fazeli A *et al.*, 1999; Smith TT *et al.*, 1998). La unión y liberación del espermatozoide al reservorio espermático juega un papel no solo en la coordinación temporal de la fertilización sino también para controlar el número apropiado de espermatozoides que llegan al sitio de fertilización (Fazeli A *et al.*, 1999).

Antes de la ovulación la tuba uterina secreta grandes cantidades de una secreción viscosa, rica en glicoproteínas, implicada en el arresto y maduración del espermatozoide (DeMooitt *et al.*, 1992). Esta secreción o fluido de la tuba uterina es bioquímicamente muy compleja y son las proteínas su mayor componente, muchas de las cuales son similares a las presentes en el suero, sin embargo existe un grupo de glicoproteínas específicas sintetizadas por las células epiteliales secretoras. La producción de estas proteínas se ve afectada cuantitativamente y cualitativamente por la concentración de las hormonas esteroides gonadales circulantes, las cuales actúan ya sea de forma directa sobre las células epiteliales o indirectamente por medio de una acción vascular (Killian GJ, 2004; Gandolfi F, 1995; Jansen RPS, 1984).

Existen diversos factores que pueden modificar las concentraciones séricas de las diferentes hormonas reproductivas, como el uso de hormonas para el manejo reproductivo; sin embargo, el efecto de estas hormonas no es solo a nivel local sino también tienen efectos secundarios en otras partes del organismo, de manera que desencadenan o inhiben diferentes procesos fisiológicos.

En la actualidad con el objetivo de aumentar la productividad de las explotaciones porcinas se han implementado como técnicas comunes en el manejo reproductivo de la piara, el uso de hormonas exógenas para inducir o sincronizar el estro en las hembras con el objeto de facilitar la inseminación artificial. Los programas de sincronización e inducción del estro en las cerdas representan muchas ventajas para el porcicultor, como lo son una mejor organización y distribución del trabajo y la optimización del uso de instalaciones, entre otras (Foxcroft G, 1999).

Con este fin, se han utilizado productos estereoidales y no esterooidales, así como diferentes combinaciones; la mejor forma de inducir el estro en cerdas prepúberes es mediante el uso de la combinación de la gonadotropina coriónica equina (eCG)-gonadotropina coriónica humana (hCG) y para la sincronización de los estros se utiliza el altrenogest el cual es un progestágeno sintético, presentando con este método el estro el 95 % de las cerdas tratadas a las 53 horas (Hühr U *et al.*, 1996). Con la combinación de eCG-hCG y con el progestágeno sintético el 100 % de las hembras entra en estro aproximadamente a los 7 días después de retirar el tratamiento con una tasa de concepción del 88 % (Foxcroft G *et al.*, 1999).

Una de las principales razones para el uso de los métodos de sincronización es facilitar la inseminación artificial, sea con semen fresco, semen refrigerado o criopreservado. Es importante resaltar que la criopreservación del semen ha contribuido a conservar los recursos genéticos de diferentes especies animales, permitiendo su aplicación en diferentes áreas como en la producción animal.

El semen congelado del cerdo ha estado disponible comercialmente desde 1975, sin embargo solo un bajo porcentaje de las inseminaciones se realizan con semen congelado, debido a las bajas tasas de parición y de camadas obtenidas después de inseminar con semen criopreservado en comparación con el uso del semen fresco (Johnson LA *et al.*, 2000).

Existen diversos factores que afectan la funcionalidad de los espermatozoides cuando son almacenados, entre ellos la temperatura a la cual es colectado y almacenado, así como las condiciones del medio de suspensión y muchos otros factores. Con la disminución de la temperatura, durante el proceso de congelación es inevitable que los espermatozoides pierdan la integridad de su ultraestructura y componentes bioquímicos de la membrana plasmática, por lo que los espermatozoides sufren ciertos cambios en la composición lipídica y la fluidez de la membrana (Johnson LA *et al.*, 2000). Es importante mencionar que antes de que el espermatozoide llegue a fertilizar al huevo, es necesario que se lleve a cabo la capacitación espermática, proceso continuo de desestabilización de las membranas espermáticas; razón por la cual la criopreservación ha tomado importancia, debido a que se ha visto que induce un cambio parecido a la capacitación en el espermatozoide (Johnson LA *et al.*, 2000).

Es conocido que los espermatozoides criopreservados tienen una vida media más corta dentro del tracto reproductor de la hembra comparado con el semen fresco. Entonces, si los espermatozoides congelados-descongelados presentan una tasa acelerada de capacitación, las células tendrán una vida media más corta, lo que contribuye a reducir la fertilidad con el uso del semen congelado-descongelado. Aunado a esto si se utilizan productos hormonales exógenos para la sincronización o inducción del estro en la cerda, los cuales pueden influir en la producción y composición del fluido de la tuba uterina ya que son dependientes de las condiciones hormonales, la capacitación espermática se podría ver afectada y por tanto la tasa de fertilización también, por ello el propósito de este trabajo es el evaluar el efecto de dos diferentes programas de sincronización en la producción y composición proteínica del fluido de la tuba uterina al momento de la ovulación y su efecto en la capacitación espermática de los espermatozoides criopreservados.

II. ANTECEDENTES

1 La tuba uterina

La tuba uterina es un órgano tubular que usualmente se divide en tres regiones. El istmo, región que se conecta a los cuernos uterinos; ampulla, sitio donde se da la fertilización; e infundíbulo, bordeado por la fimbria y la abertura tubal u ostium. La unión útero tubal o tubárica es el sitio de formación del reservorio espermático, la unión istmo-ampular es el sitio de fertilización y la fimbria es el sitio que recoge los ovocitos (Rodríguez-Martínez H *et al.*, 2001).

Histológicamente la mucosa de la tuba uterina está formada por un epitelio columnar de células ciliadas y células secretoras no ciliadas. Las células ciliadas están intercaladas entre las células secretoras, estas últimas pueden estar aisladas o en grupos de 2-3 células formando un mosaico junto con las células ciliadas; las primeras también presentan microvellocidades entre los cilios. Las células secretoras presentan una alta actividad de secreción principalmente en la unión útero tubal (Rodríguez-Martínez H *et al.*, 1990).

El aporte sanguíneo de la tuba uterina se deriva de la arteria ovárica y uterina; una rama de la arteria ovárica nutre al infundíbulo, el ampulla y el istmo distal, mientras que el istmo proximal y la unión útero tubal se nutre de una rama de la arteria uterina. El drenaje venoso es paralelo a la arteria, ello posibilita que las moléculas puedan ser transferidas del ovario vía vena ovárica, a la arteria ovárica y arteria uterina llegando a la tuba uterina en un sistema de contracorriente (Leese HJ, 1988). De la misma forma, la nutrición linfática es rica y está involucrada en la transferencia de hormonas esteroideas de origen ovárico (Leese HJ, 1988).

Se ha observado que existe una actividad diferencial en la tuba uterina en función a su estado fisiológico, ya que la actividad gonadal regula y coordina la maduración y presentación de los gametos. Cerca de la ovulación bajo la influencia de hormonas de origen folicular, mediante la transferencia contracorriente, tanto la tuba uterina como los espermatozoides son reprogramados justo antes de la liberación del huevo de forma que los espermatozoides se hiperactivan para llegar al sitio de fertilización (Hunter RHF, 1995).

En el cerdo, se ha visto que existe un incremento en la síntesis de progesterona (P₄) más que de estradiol (E₂) como consecuencia de la pérdida de la actividad de la enzima aromatasa, por lo que el suministro sanguíneo de la tuba uterina es rico en P₄ alrededor de la ovulación con niveles de 20-200 veces más altos que en la circulación sistémica (Barboni B, 1995). Un papel particular de la P₄ es interaccionar con la pared de la tuba uterina

y facilitar el transporte espermático, las prostaglandinas ováricas y hormonas peptídicas como la relaxina y la oxitocina también parecen estar implicadas ya que se han encontrado receptores para estas hormonas en el istmo (Hunter RHF, 1995).

Por otro lado las células de la granulosa son capaces de secretar esteroides, debido a la presencia de células del cumulus que se desprenden junto con el ovocito y permanecen durante 46-48 h a través de su tránsito en la tuba uterina, por lo que estas pueden influir en el proceso de fertilización. Por este motivo las células foliculares extraováricas pueden ser vistas con un importante y potente tejido parácrino en la tuba uterina (Hunter RHF, 2002).

2 El transporte espermático en la tuba uterina

Durante la monta natural o en la inseminación artificial la mayoría de los espermatozoides son eliminados en el útero, a excepción de una pequeña población de espermatozoides que son transportados rápidamente por medio de contracciones miométricas hasta la unión útero tubal. Algunos espermatozoides de esta población llegan al sitio de fertilización, sin embargo al final de su viaje terminan muy dañados por lo que no les es posible participar en la fertilización, liberando así productos de degradación dentro del lumen de la tuba uterina que interactúan con el epitelio, y quizá participen en la maduración de los gametos y la sensibilización del sistema de fagocitosis en preparación para la llegada de un gran número de espermatozoides. Esta es la primera etapa del transporte espermático conocida como fase rápida (Hunter RHF, 1995; Birkhead TR *et al.*, 1998; Rodríguez-Martínez H *et al.*, 2005).

Los espermatozoides que son retenidos a nivel de la unión útero tubal forman el reservorio espermático, donde permanecen almacenados en contacto con el epitelio e inmersos en el fluido de la tuba uterina. El establecimiento del reservorio espermático constituye la segunda fase del transporte espermático en el aparato reproductor de la hembra (Rodríguez-Martínez H *et al.*, 2005).

Cuando los espermatozoides del reservorio espermático son liberados continuamente hacia el sitio de fertilización, por acción de las hormonas esteroides de origen ovárico sobre las células epiteliales de la tuba uterina, se establece la tercera fase del transporte espermático (Rodríguez-Martínez H *et al.*, 2005).

3 Establecimiento del reservorio espermático

Solo los espermatozoides que son móviles y morfológicamente normales llegan a colonizar la tuba uterina y forman el reservorio espermático, en el cual la mayoría de ellos mantienen su estructura y viabilidad (Rodríguez-Martínez H *et al.*, 2001; Birkhead TR *et al.*, 1998). Las funciones principales del reservorio espermático es el asegurar la presencia del número adecuado de espermatozoides fértiles en la tuba uterina en el momento adecuado para la fertilización; mantener la viabilidad espermática y su capacidad fertilizante, escapando del sistema inmune de la hembra; modular la capacitación e hiperactivación espermática y; prevenir la poliespermia al retener los espermatozoides y liberarlos secuencialmente hacia el sitio de fertilización (Suaréz SS, 1998).

Es importante remarcar que el reservorio espermático no es equivalente a los órganos de almacén espermático descrito en aves e insectos, los cuales son altamente especializados en almacenar los espermatozoides durante semanas, meses o años (Birkhead *et al.*, 1998).

El reservorio espermático preovulatorio es construido por diversos factores, entre ellos la acción mecánica dada por la barrera física de menor diámetro y los múltiples pliegues del epitelio en la unión útero tubal, el fluido luminal viscoso y también por las interacciones con su microambiente.

3.1 Acción mecánica

Durante el arresto espermático, el músculo del istmo es tónico y contráctil, y la mucosa es edematosa, condiciones que prolongan bajo la influencia de la secreción de E₂ y la presencia de receptores adrenérgicos que están densamente distribuidos en la capa muscular. Estos aspectos imponen una forma de restricción fisiológica y actúan significativamente reduciendo el lumen del istmo, obstruyendo el paso de los espermatozoides y reduciendo su movimiento flagelar. De la misma forma la actividad contráctil del miosalpinx puede ser acentuada por la influencia de los espasmógenos del plasma seminal que bañan la unión útero tubal y que quizás entran al istmo en cantidades estrictamente limitadas (Hunter RHF, 1995).

3.2 Formación del fluido

El fluido intraluminal de la tuba uterina es en su mayoría producto de la trasudación y coincide considerablemente con la composición del plasma, sin embargo difiere en composición iónica, pH, osmolaridad y contenido de macromoléculas, los cuales varían de acuerdo al ambiente hormonal (Hunter RHF, 2002).

El moco presente en la unión útero tubal es de color blanquecino y extremadamente viscoso de forma que ocluye completamente el istmo antes de la ovulación. Tiene propiedades viscoelásticas, lo que ayuda a que los espermatozoides sean arrestados físicamente y a que la actividad flagelar sea suprimida por la naturaleza física de las secreciones pre-ovulatorias, contribuyendo así junto con las interacciones celulares a la fase de almacenamiento.

Bajo condiciones *in vivo*, los glucosaminoglicanos y glicoproteínas tienen la función de formar y dar viscosidad al fluido luminal, estabilizando así el entorno alrededor de los gametos. Además, esta secreción viscosa ayuda a despojar al espermatozoide de los componentes del plasma seminal; evita que el fluido uterino pase a regiones más distantes del reservorio; impide que el fluido luminal del ampulla llegue al reservorio espermático, ya que puede estimular el metabolismo espermático y su motilidad; dirige al espermatozoide hacia los pliegues de la superficie epitelial y reduce el movimiento flagelar; y finalmente puede atrapar a los leucocitos polimorfonucleares y bacterias que pueden entrar inadvertidamente al reservorio espermático (Hunter RHF, 2002; Rodríguez-Martínez H *et al.*, 2001).

Posterior a la ovulación, la viscosidad disminuye debido a un aumento de la trasudación dentro del lumen y por tanto del volumen, lo que facilita el movimiento flagelar para el avance de los espermatozoides (Hunter RHF, 1995).

Glucosaminoglicanos

Para que los espermatozoides puedan residir temporalmente en la tuba uterina, se secretan glucosaminoglicanos a la luz del istmo para que participen en la obliteración del lumen. Los más comunes en el epitelio del reservorio espermático son el ácido hialurónico y el heparansulfato (Rodríguez-Martínez H *et al.*, 2001).

La viscosidad de las soluciones de ácido hialurónico varía con su peso molecular y concentración teniendo diferentes efectos sobre el comportamiento celular. Las cadenas cortas de ácido hialurónico estimulan la proliferación celular mientras que cadenas pesadas tienen efectos contrarios, por lo que el tamaño del ácido hialurónico puede estar afectando la función espermática (Rodríguez-Martínez H *et al.*, 2001; Tienthai P *et al.*, 2003).

La membrana plasmática de las células epiteliales de la tuba uterina de la cerda contiene enzimas transmembranales capaces de sintetizar ácido hialurónico, sin embargo se desconocen los mecanismos que regulan su producción y aunque el ácido hialurónico se ha encontrado en abundancia en el reservorio espermático, existe un alto grado de degradación en comparación con otros polisacáridos (Tienthai P *et al.*, 2003). Por otro lado, el principal receptor para ácido hialurónico, CD44, se encuentra presente en las células epiteliales

NÚMERO	PROTEINA	Mr, kD	Sitio de síntesis
1-3	Proteína secretora del oviducto porcino (POSP-E1-3)	75-85 100 100	A>Inf>Ist
4	-	335	-
5	-	100	-
6	Inhibidor de plaminógeno activador (PAI-1)	45	Ist>Inf/A
7	Complemento C3b	65	Inf/A
8	Metaloproteinasa (TIMP)	29	Ist>INF/A
9	Procológeno	Complejo 30-40	Inf/A/Ist
10	-	Complejo 28-30	A>Inf>Ist
11	-	20	Inf/A
12	Clusterina	Complejo 45-50	Inf/A/Ist
13	-	90	Inf
14	Cadena pesada IgA	60	Inf/A

A= Ámpula Ist= Istmo Inf=Infundíbulo Adaptado de Buhi WC *et al.*, 2000.

Cuadro 1: Proteínas presentes en la tuba uterina de la cerda.

de la tuba uterina de la cerda, lo que sugiere su participación en la adhesión espermática mediante la coordinación de un mecanismo específico de señalización, que va a conducir a la inhibición del metabolismo espermático sin afectar su viabilidad (Tienthai P *et al.*, 2003; Bains R *et al.*, 2002).

PROTEÍNAS

El contenido proteínico encontrado dentro del lumen del fluido de la tuba uterina está constituido por proteínas séricas que pasan a través del transporte pasivo y proteínas

Espermatozoide	Huevo	Embrión
Mantienen motilidad y viabilidad	Reduce tasas de la unión de espermatozoides	Facilita el desarrollo y supervivencia del embrión
Estimulan la capacitación	Aumenta tasas de fertilización	
Aumentan las tasas de fertilización	Estimula el encuentro de gametos	

Adaptado de Killian GJ, 2004.

Cuadro 2: Funciones del espermatozoide, huevo y embrión afectadas al ser tratadas con glicoproteínas específicas de la tuba uterina.

sintetizadas en el epitelio de la tuba uterina (Hunter RHF, 1988; Leese HJ, 1998); el mayor componente del trasudado son proteínas séricas (albúmina, transferrina e inmunoglobulinas), pero también contiene enzimas y otra gran cantidad de moléculas proteínicas, incluyendo citocinas, factores de crecimiento y proteínas de transporte. Las células epiteliales de la tuba uterina sintetizan y secretan moléculas al lumen. La síntesis y secreción de proteínas es regulada por las hormonas esteroides; también se encuentra un gradiente de actividad biosintética de acuerdo a los segmentos funcionales de la tuba uterina: istmo, ampolla e infundíbulo (Rodríguez-Martínez H *et al.*, 2001; Hunter RHF, 2002; Buhi WC *et al.*, 2000) (Cuadro 1).

Dentro de las proteínas reportadas en la tuba uterina se encuentran la oviductina, proteínas de secreción del oviducto (OSP), glicoproteínas específicas del oviducto asociadas a estrógenos (OSGP) o glicoproteínas estrógeno dependientes específicas del oviducto (OGP). En cultivos celulares porcinos se han encontrado 14 proteínas principales, 5 de las cuales ya han sido identificadas, caracterizadas y definida su localización y al parecer también son expresadas por otras especies (Buhi WC *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que las proteínas encontradas en la tuba uterina son exclusivas de este órgano y además están altamente conservadas entre las diferentes especies de mamíferos; las cuales tienen funciones que afectan al espermatozoide, al huevo y al embrión, participando así principalmente en la fertilización (Buhi WC *et al.*, 2003; Hunter RHF, 2002; Leese HL *et al.*, 2001; Rodríguez-Martínez H *et al.*, 2001; Buhi WC *et al.*, 1990; Buhi WC *et al.*, 2000) (Cuadro 2).

3.3 Interacción epitelio-espermatozoide

Aunque al momento de establecerse el reservorio espermático existe un mecanismo local de regulación por parte de los ovarios sobre el epitelio de la tuba uterina y una barrera física de moco dentro de la tuba uterina, existen evidencias de una interacción epitelio-espermatozoide. Sin embargo, el estado de maduración o la integridad morfológica del espermatozoide son necesarios para completar esta unión ya que existe una selección de los mismos durante el paso de los espermatozoides a través de la unión útero tubal. En estudios *in vitro*, los espermatozoides que se unen al epitelio tienen intacto el acrosoma, sin embargo la naturaleza del mecanismo de selección todavía no está claro (Petrunkina AM *et al.*, 2001).

La habilidad del espermatozoide para unirse y separarse del epitelio tubal está relacionada con su estado de capacitación, esto puede estar dado por los cambios en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide (Smith TT *et al.*, 1990; Lefebvre R *et al.*, 1996; Smith TT, 1998).

En la unión del espermatozoide al epitelio de la tuba uterina está involucrado el reconocimiento de carbohidratos, en apoyo a lo anterior se ha visto que la fetuina y el ácido siálico inhiben la unión del espermatozoide del hamster al epitelio, además esto indica la existencia de una lectina en la cabeza del espermatozoide no capacitado responsable de la unión del espermatozoide al epitelio (DeMott RP *et al.*, 1995). La lactosa, maltosa y manosa son carbohidratos que inhiben la unión del espermatozoide del cerdo a las células epiteliales de la tuba uterina (Green CE *et al.*, 2001). El reconocimiento de diferentes carbohidratos según la especie nos indica que las lectinas presentes en los espermatozoides tienen especificidad hacia un carbohidrato y que por lo tanto el reconocimiento de carbohidratos en la interacción espermatozoide-tuba uterina es especie específico (Suarez SS, 1998).

En cultivos de tejido de la tuba uterina, los espermatozoides adheridos al epitelio permanecen con movimiento durante dos o mas días comparados con los espermatozoides no unidos, indicativo de que el tejido de la tuba uterina afecta la viabilidad espermática. También se ha observado una mayor cantidad de espermatozoides unidos a la región del istmo que a la del ámpula, ello a pesar de la presencia o ausencia de esteroides lo que indica la existencia de un mayor número de sitios de unión en el istmo que en el ámpula que permite la formación del reservorio espermático. Sin embargo, los niveles altos de E2 aumentan la unión de los espermatozoides al epitelio en ambas regiones (Raychoudhury SS *et al.*, 1991).

3.4 Liberación del espermatozoide

La presentación de los gametos masculinos y femeninos se lleva a cabo de manera coordinada y principalmente dirigida por el folículo maduro; para esto se da la liberación de un número limitado de espermatozoides, los cuales sufren una serie de cambios en la membrana plasmática que culmina con la reacción acrosomal (Hunter RHF, 1995).

La activación y liberación de los espermatozoides del reservorio espermático se da poco antes de la ovulación, en parte controlado por el miosalpinx que es estimulado por la llegada de las catecolaminas a su capa muscular y mucosa; así mismo, los espermatozoides también poseen receptores para las catecolaminas por lo que podrían estar respondiendo a esta molécula de señalización (Hunter RHF, 2002). Poco después de la ovulación, con el incremento en la síntesis y secreción de P4 en el ovario, la pared del istmo se edematiza y disminuye la tensión del miosalpinx; como consecuencia se abre el lumen gradualmente, lo que aumenta la liberación de espermatozoides progresivamente, en su mayoría con hipermotilidad pero pocos con reacción acrosomal (Hunter RHF, 1995; Hunter RHF, 2002).

4 Capacitación espermática

La capacitación espermática se ha definido como un proceso gradual que modifica la arquitectura de la membrana plasmática del espermatozoide, incluye el retiro de colesterol y la sensibilización de este a señales específicas mediadas por glucosaminoglicanos, glicoproteínas, pH y Ca^{2+} . Este proceso se lleva a cabo durante el paso secuencial del espermatozoide en el tracto genital de la hembra. Las modificaciones en la membrana preceden a cambios específicos en el transporte de Ca^{2+} , en los patrones de motilidad como la hiperactivación, y la realización de la reacción acrosomal (Tienthai P *et al.*, 2004; Breitbart H, 2002).

La capacitación espermática en la tuba uterina de la cerda, requiere 5-6 h después de la cópula, pero esta puede durar menos de 2 horas si el depósito del semen es cercana al tiempo de la ovulación (Hunter RHF *et al.*, 1998; Hunter RHF, 1990).

La tasa de capacitación en el reservorio espermático puede asegurar que un número apropiado de espermatozoides fértiles estén presentes cuando se da la ovulación, maximizando así la probabilidad de fertilización cuando el depósito de espermatozoides es efectuado antes de la ovulación. Considerando que el tiempo que dura la ovulación (alrededor de 3 h) y que el transporte del óvulo es rápido (menos de 1 h) en la cerda,

entonces en esta especie se requiere de la presencia de espermatozoides en diferentes estadios de capacitación, para tratar de cubrir así el área en el cual los ovocitos pueden aparecer y por lo tanto proveer la mejor oportunidad de éxito a la hora de la fertilización (Rodríguez-Martínez RHF *et al.*, 2001).

El modulador de la capacitación espermática es el reservorio espermático, ya que la capacitación puede ser modulada por el fluido intraluminal o por el contacto entre la membrana apical del espermatozoide y las células epiteliales del istmo (Suarez SS, 1991; Smith T, 1998). La capacitación en la tuba uterina es más lenta antes de la ovulación que después de la misma. La unión del espermatozoide al epitelio también demora la tasa de capacitación en el reservorio espermático dado que previene la entrada pasiva de Ca^{2+} al espermatozoide, manteniendo de esta manera, bajas concentraciones intracelulares de este ión (Dobrinski *et al.*, 1997). Es importante mencionar que solo los espermatozoides no capacitados se unen al epitelio de la tuba uterina, ya que los espermatozoides capacitados presentan una reducción en su capacidad de unión (Rodríguez-Martínez RHF *et al.*, 2001).

Aunque la capacitación puede realizarse *in vitro*, empleando medios de cultivo químicamente definidos, existe evidencia de que *in vivo*, por lo menos los estados finales, son programados por factores ováricos que afectan directamente la función espermática, o por la transferencia de las señales correspondientes por parte del endosalpinx. En la especie porcina la región caudal del istmo es particularmente eficiente para neutralizar los componentes seminales y ejercer una serie de efectos sobre la célula espermática para modular e iniciar la capacitación espermática (Petrunkina AM *et al.*, 2001; Hunter RHF *et al.*, 1998).

5 Tratamientos hormonales para controlar el estro

Existen diferentes productos hormonales en el mercado que son empleados en el manejo de la actividad reproductiva de la hembra y que ayudan a inducir la pubertad, a sincronizar o controlar el ciclo estral después del parto o lactación (Hühr U *et al.*, 1996). Se ha visto que el uso de éstos productos hormonales, esteroidales o no esteroidales, o la combinación de estos, es un manejo rutinario que afecta la fertilidad y el tamaño de la camada (Trujillo OM, 1994).

La hCG, eCG, E2, P4, hormona folículo estimulantes, hormona liberadora de gonadotropinas entre otras, son hormonas que han sido utilizados para realizar la sincronización del estro en las cerdas, cada una de ellas tienen diferentes efectos dependiendo de la dosis, así como la presentación de algunos efectos secundarios (Trujillo OM, 1994); sin embargo, históricamente las gonadotropinas y los progestágenos han sido usados para mejorar los programas reproductivos

de la pira porcina (Rozeboom *et al.*, 2000).

La pubertad puede ser inducida en cerdas de 145 a 160 días de edad, con la inyección intramuscular de 5 ml de P.G.600® (Intervet Inc.). Este producto es una combinación de 400 UI de eCG y 200 UI de hCG. La eCG tiene cualidades biológicas que mimetizan la acción de la FSH produciendo un crecimiento folicular, con el consecuente aumento de los niveles de estradiol y la presentación del estro; mientras que la hCG mimetiza la acción de la LH que induce la ovulación (Coffey DR *et al.*, 1997; Rozeboom *et al.*, 2000). Debido a que típicamente los productores no reproducen a las hembras al inicio de la pubertad y a que las hembras generalmente no entran en estro al mismo tiempo aunque hayan sido inducidas, es benéfico y efectivo sincronizar el segundo estro; sin embargo, las hembras que ya están ciclando no responderán al tratamiento del P.G.600 durante la fase lutea por la retroalimentación negativa establecida con la progesterona, por esta razón se aplicará la inyección de P.G.600 después del día 17-18 del ciclo (Coffey DR *et al.*, 1997). Otro uso del P.G.600 es su aplicación al momento del destete, para estimular el crecimiento folicular y acelerar y sincronizar el estro, de esta forma se reduce el periodo entre partos y la incidencia del anestro. La mayor limitante del P.G.600 es su alto costo, por lo que se le da un mejor aprovechamiento en grupos de cerdas con más de 10 días de no retorno al estro posteriores al destete o en casos de altas frecuencias de anestros (Coffey DR *et al.*, 1997). Estienne MJ *et al.*, (2001) aplicó la inyección de la combinación eCG-hCG en hembras prepúberes induciendo el estro en el 90% de las hembras tratadas, presentándose el estro a los 4 días después del tratamiento; resultados similares obtuvo Britt *et al.* (1989) al inducir estros fértiles en cerdas prepúberes tratadas con P.G.600. Duanyai S y Srikandakimar A (1998) obtuvieron mejores resultados, ya que la ovulación se presentó a las 40 h después de la aplicación de hCG.

El éxito del uso de los progestágenos sintéticos aplicados vía oral, se debe a que inhibe la liberación de las gonadotropinas durante 14-18 días, que resulta en el crecimiento folicular y la subsecuente ovulación. Mientras la hipófisis es inhibida, el cuerpo luteo en los ovarios experimenta una regresión natural; en las hembras que están ciclando, la suplementación del progestágeno en el alimento durante 14 o más días, simula la actividad biológica de la P4 y al finalizar el tratamiento, ocurre un aumento en la secreción de gonadotropinas con el consecuente desarrollo y crecimiento folicular así como la ovulación (Kirkwood A, 1999; Coffey DR *et al.*, 1997). Estienne MJ *et al.*, (2001) logró la sincronización del estro en un 90% de los casos, presentándose éste a los 5 días después del retiro del tratamiento con la administración del altrenogest a una dosis de 20 mg/d durante 18 días continuos; sin embargo,

también se ha observado que la administración diaria del progestágeno sintético tiene el efecto de inhibir el estro, presentar bajos índices de fertilidad y favorecer la presencia de quistes ováricos, en el caso de dosis bajas o durante un corto periodo de tiempo (Weel A, 1978).

6 Criopreservación

El semen congelado muy raramente es usado en la inseminación artificial en la producción comercial del cerdo; sin embargo el aumento en las exportaciones del semen ha implicado el crear técnicas de criopreservación (Watson PF, 1995). A pesar de ello, cuando el semen congelado descongelado del cerdo es usado en la inseminación artificial la tasa de gestación se reduce aproximadamente de 10-25% y las camadas son pequeñas, 1-3 lechones menos comparado con la inseminación con semen fresco (Johnson LA *et al.*, 1981). Se ha sugerido que estos eventos pueden ser debido a la incapacidad de los espermatozoides congelados-descongelados a sobrevivir en el tracto reproductor de la hembra causándose una reducción en el transporte de los espermatozoides al sitio de fertilización (Kemp B *et al.*, 1997). Mas aún, los espermatozoides que sobreviven la congelación-descongelación tienen alterada la membrana plasmática que les proporciona propiedades que funcionalmente son similares a los espermatozoides capacitados (Watson PF, 1995).

La criopreservación expone al espermatozoide a un estrés físico-químico, y menos del 50% de los espermatozoides sobrevive manteniendo su habilidad para fertilizar al ovocito. Se ha postulado que, los efectos negativos del enfriamiento, congelación y descongelación son principalmente causados por la formación de hielo y los cambios osmóticos inducidos por el flujo de agua, los que conllevan a la subsecuente reorganización de la membrana, influyendo así en su integridad, estructura y función (Hammerstedt RH *et al.*, 1990).

La desestabilización de la membrana plasmática durante el ciclo de congelación-descongelación es la mayor causa de muerte celular durante la criopreservación. Esta desestabilización y/o ruptura de la membrana ocurre cuando disminuye la temperatura, lo que ocasiona que la membrana lleve a cabo la transición de fases, pasa de una fase fluida a una fase de gel (Graham JK *et al.*, 2005). Las células al congelarse están expuestas a la cristalización del hielo extracelular que se produce como resultado en una alta concentración de solutos (Holt WV *et al.*, 1994; Watson PF, 1995); respondiendo a este efecto con la pérdida de agua, reduciendo su volumen hasta que la concentración de solutos entre los espacios intra y extracelulares puedan equilibrarse. Inversamente, cuando las células son expuestas a un ambiente extracelular hipotónico, como es en el caso de

la descongelación, el volumen celular aumenta por una difusión pasiva del agua. De tal forma que la capacidad del espermatozoide para responder a los ajustes del volumen celular, está determinado por diferentes factores, incluyendo la composición fosfolipídica de la membrana, la permeabilidad al agua, la temperatura a la que se da la transición de fases lipídica, la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ , los canales de agua y la concentración de iones (Meyers SA, 2005).

Además como resultado de la criopreservación se da la pérdida de lípidos de la membrana plasmática y por tanto el rearrreglo de lípidos y proteínas dentro de la misma lo que da un espermatozoide "precapacitado", lo que se refleja en la reducida vida media del espermatozoide (Bailey JL *et al.*, 2000).

Para una concepción exitosa el espermatozoide tiene que mantener sus membranas, organelos y genoma funcionalmente competentes. La membrana plasmática rodea completamente al espermatozoide guardando dentro a los organelos y componentes intracelulares y por su característica semipermeable mantiene el gradiente químico de iones y otros solutos, por lo tanto, si la membrana plasmática del espermatozoides no está funcionalmente intacta el espermatozoide es considerado deteriorado y por tanto sin la capacidad de fertilizar al ovocito (Silva PEN *et al.*, 2006).

Además, cuando los espermatozoides son expuestos a cambios en las condiciones osmóticas, se producen una serie de eventos que influyen en la habilidad de las células para mantener los procesos de señalización, por lo que esto puede ser una importante consecuencia de los daños por criopreservación. Por ejemplo, un incremento de calcio intracelular y la salida del colesterol de la membrana plasmática son eventos observados en los espermatozoides criopreservados. Por ello, la inducción de la criocapacitación es atribuida a un incremento del calcio intracelular asociado al daño de membrana con este tipo de células (Bailey JL, 1994; Holt WV, 2000; Meyers SA, 2005).

III. JUSTIFICACIÓN

El establecimiento del reservorio espermático en la cerda depende de numerosos factores, como las concentraciones de calcio y bicarbonato, cambios en la concentración de progesterona y estrógenos, entre otros. Por ello, cualquier cambio que se llegase a presentar pueden alterar el funcionamiento normal de la tuba uterina, alterando no solo el establecimiento del reservorio espermático y la liberación de los espermatozoides, sino también el microambiente en el cual se va a llevar a cabo la capacitación. Como respuesta a los tratamientos de sincronización se inducen cambios a nivel sistémico y folicular, en los niveles de estrógenos y progesterona que da como resultado la alteración del microambiente de la tuba uterina y cambios en los procesos fisiológicos que se llevan a cabo en el interior de este órgano, como es el caso de la capacitación espermática. Aunado a ello, si se utiliza la inseminación artificial con semen congelado descongelado en el cual los espermatozoides presentan una falsa capacitación por efecto del proceso, se interfiere con el establecimiento del reservorio espermático, ello debido a que las células epiteliales tienen mayor afinidad por los espermatozoides no capacitados. Por lo tanto, un mal establecimiento de las interacciones normales del epitelio con los espermatozoides puede conducir a reducir la fertilidad y la vida media de los espermatozoides descongelados, ya que la capacidad fertilizante de los espermatozoides esta asociada a su habilidad de sobrevivir en el tracto reproductor de la hembra y con el establecimiento del reservorio espermático (Curry MR, 2000; Greve T, 2001).

IV. OBJETIVOS

Evaluar el efecto de dos diferentes programas de sincronización en la producción del fluido de la tuba uterina y en la composición proteínica al momento de la ovulación.

Evaluar el efecto del fluido de la tuba uterina de la región del istmo y del ámpula proveniente de cerdas sincronizadas con dos diferentes programas, sobre la capacitación de los espermatozoides criopreservados.

V. HIPÓTESIS

El proceso de capacitación de los espermatozoides criopreservados se afecta de acuerdo a la composición proteínica del fluido luminal secretado en cada una de las regiones de la tuba uterina de la cerda sincronizada con dos diferentes tratamientos.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el Departamento de Producción Animal: Cerdos y en el Departamento de Morfología. Se utilizaron 9 cerdas prepúberes provenientes de una granja comercial localizada en Atlixco, Puebla. Se obtuvo el semen de dos sementales, un híbrido Yorkshire-Landrace perteneciente al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en producción porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ubicado en Jilotepec, Estado de México; y de un semental raza Yorkshire perteneciente a una granja comercial ubicada en Milpa Alta, D.F.

Diseños Experimentales

Efecto del tratamiento de sincronización en la composición del fluido de la tuba uterina

Para evaluar el efecto de dos diferentes programas de sincronización (eCG-hCG y altrenogest) en la producción y composición del fluido de la tuba uterina al momento de la ovulación, se utilizaron 9 hembras prepúberes divididas en 3 grupos que se llamarán testigo, progestágeno y eCG-hCG. Se dividió la tuba uterina en dos regiones, istmo y ámpula y se obtuvo el fluido de cada una de ellas. Se determinó el volumen de fluido de la tuba uterina recuperado, la concentración proteínica y se realizó la separación de proteínas de cada muestra obtenida. Las variables a medir fueron el volumen de fluido de la tuba uterina, la concentración proteínica y las proteínas presentes en el fluido.

Efecto del fluido de la tuba uterina en la capacitación de los espermatozoides criopreservados

Para evaluar el efecto del fluido de la tuba uterina de la región del istmo y ámpula, proveniente de cerdas sincronizadas con dos diferentes programas sobre la capacitación de los espermatozoides criopreservados, se realizaron dos ensayos de capacitación con espermatozoides provenientes de semen fresco y semen congelado descongelado en presencia de cada muestra de fluido. Se contaron 50 células espermáticas a las 4 h y 8 h 30 min de incubación. La variable medida fue el número de células no capacitadas, capacitadas y con reacción acrosomal.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de las variables del volumen de fluido, concentración proteínica y los de la evaluación microscópica tanto del semen fresco como del semen congelado descongelado se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney en el programa estadístico MINITAB versión 13.1.

Metodologías

Manejo de las hembras

Se trabajaron un total de 9 cerdas prepúberes divididas en tres grupos llamados testigo, progestágeno y eCG-hCG. Diariamente se realizó la observación de la presentación del comportamiento estral, de la vulva y la prueba de cabalgue para detectar la pubertad; una vez detectado el primer estro se esperó a que las hembras presentaran un segundo estro y entonces se les dió el tratamiento hormonal.

Para el grupo testigo se esperó que de forma natural presentara el estro, es decir se esperó la presentación del tercer estro. El grupo progestágeno, a partir del día 1 del ciclo estral recibió un tratamiento que consistió en la administración del progestágeno a una dosis de 20 mg/día durante 18 días consecutivos (Regumate, Intervet). El tercer grupo se trató con la combinación de eCG/hCG a una dosis de 400 UI de eCG y 200 UI de hCG (P.G.600, Intervet) vía intramuscular, entre el día 16 y 17 del ciclo estral.

Colección de las tubas uterinas

La colección de las tubas uterinas de las hembras del grupo testigo se realizó al momento en que entraron en estro; a los 4 días después de la suspensión del tratamiento en el grupo que recibió el progestágeno y; a las 36 horas posteriores a la aplicación del tratamiento eCG/hCG. Los tiempos de colección fueron determinados de acuerdo a las observaciones realizadas por Trujillo OM, 1994.; momento en el que se estima se da la ovulación con los dos diferentes tratamientos hormonales.

Las cerdas fueron privadas de alimento 24 h antes de la cirugía, teniendo libre acceso al agua; se tranquilizaron con 20 mg/kg de peso de asaperona (Sural, Intervet) vía intramuscular y con 10 mg/kg de peso de metomidato (Hypnodil) vía intravenosa como anestésico. Una vez anestesiadas las cerdas, se realizó la laparotomía de acuerdo a la técnica descrita por Dougherty RW (1981); una vez en cavidad abdominal, con una mínima manipulación se localizaron, ligaron y cortaron las tubas uterinas, para ser transportadas al laboratorio en solución salina fisiológica al 0.9% a 37 °C. Una vez extraídas las muestras las cerdas fueron sacrificadas mediante una sobredosis de anestésico.

Para corroborar que las hembras estuvieran cercanas al momento de la ovulación, se realizó la colección de los ovarios, se contaron y midieron las estructuras ováricas presentes al momento de la colección de las tubas uterinas; al mismo tiempo se realizaron biopsias vaginales de cada uno de los animales.

Colección del fluido de la tuba uterina

Las tubas uterinas se disecaron y mediante la observación morfológica se dividieron en dos regiones, istmo y ampulla, mediante una ligadura y un corte; posteriormente para corroborar la correcta división de la tuba uterina se realizaron cortes histológicos (datos no mostrados). Cada segmento de tuba uterina obtenido se lavó suavemente con 0.5 ml de solución salina fisiológica empleando una jeringa de 1 ml con un cateter 20 G x 1 1/4". Las muestras obtenidas se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min y al sobrenadante se le adicionaron 40 μ l de inhibidores de proteasas (Coctel completo de inhibidores de proteasas, Roche). Antes de agregar los inhibidores de proteasas se midió el volumen de fluido recuperado con una micropipeta. Las muestras se congelaron a -196 °C en nitrógeno líquido hasta su uso.

Análisis del fluido de la tuba uterina

Una vez colectado el fluido se realizó la cuantificación proteínica de la muestra por el método de Lowry (Lowry OH *et al.*, 1951). Las soluciones utilizadas fueron: solución A, 5 g de Na₂CO₃, 0.5 g de NaOH, 0.0335 g Tartrato de Na, en 250 ml de agua bidestilada; solución B, 0.125 g de CuSO₄ en 12.5 ml de agua destilada; solución C, 50 partes de la solución A mas 1 parte de la solución B y; solución Folin, dilución 1:1 del reactivo Folin-Cicalteau en agua destilada. Junto con las muestras se elaboró una curva de calibración con 0, 5, 10, 20 30, 40 y 50 μ g de albúmina. El ensayo se realizó de la siguiente manera: en un tubo se adicionaron 10 μ l de la muestra a medir completando a un volumen total de 0.2 ml con agua destilada, se agregó 1 ml de la solución C y se agitó, se dejó incubar durante 10 min, se agregó 0.1ml de la solución Folin y se incubó a temperatura ambiente durante 45 min, finalmente se leyó a 660 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro SmartSpec 3000.

Para separar las distintas proteínas presentes en cada región de la tuba uterina se empleó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% SDS-PAGE de los laboratorios BIO-RAD basada en lo descrito por Laemmli UK, 1970. Se utilizaron como referencia los marcadores de peso molecular bajo correspondientes a: fosforilasa B de 97.4 kDa, albúmina sérica bovina de 66.2 kDa, ovoalbúmina de 45.0 kDa, Anhidrasa C de 31.0 kDa, Inhibidor de tripsina de 21.5 kDa y lisozima de 14.4 kDa.

De acuerdo a la concentración del fluido de la tuba uterina se decidió agregar 1 μg de proteína por cada carril, obteniendo una adecuada separación de las proteínas para el fluido proveniente de las cerdas tratadas con eCG-hCG, sin embargo para el fluido proveniente de las cerdas de los grupos testigo y progestágeno, fué necesario triplicar el volumen adicionado en cada carril de la electroforesis, para evidenciar de una forma más clara las proteínas presentes en cada muestra.

Los geles fueron teñidos mediante la tinción de plata realizada como a continuación se describe: se fijó el gel en una solución 3:1:6 de etanol, ácido acético y agua durante 30 min; se fijó el gel con una solución de glutaraldehído al 0.5% y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 0.1%, en una solución de etanol al 30%, en $\text{Na}_3\text{CH}_3\text{CO}$ al 0.4 M, pH 6 durante 30 min; se lavó el gel con agua desionizada durante 2 h con recambio del agua cada 15 min; se tiñó el gel durante 30 min con una solución de AgNO_3 al 0.1% en metanol al 3%, con 25 μl de formaldehído por cada 100 ml de solución; se enjuagó el gel con agua desionizada durante 10-15 seg; se reveló durante 30 seg con una solución de Na_2CO_3 al 2.5% con 40 μl de formaldehído por cada 100 ml de solución, se hicieron recambios con la solución fresca durante 6 a 10 min; la reacción se detuvo con una solución de CH_3COOH al 5% durante 10 min (Oakley, 1980).

Manejo del Semen

Colección del semen

La colección del semen se realizó mediante la técnica de la mano enguantada, obteniendo la fracción rica en espermatozoides que se diluyó a una proporción 1:1 con el diluyente comercial de larga duración IMV USA870 XT-R y fueron transportados al laboratorio de Morfología de la FMVZ, UNAM. La transportación se realizó dentro de una caja de unicel controlando el descenso de la temperatura de colección 35-36 °C a la temperatura de transporte 20-23 °C o temperatura ambiente, en no menos de 1 hora.

Evaluación del semen

La evaluación de la motilidad espermática se realizó al observar una gota de semen al microscopio óptico marca Carl Zeiss, sobre un portaobjetos a 37 °C.

Se realizó el cálculo de la concentración espermática, para ello se diluyeron 50 μl de semen en 1 ml de Triton-X-100 al 0.1% en PBS y se colocó la muestra en una cámara de Neubauer para proceder al conteo espermático. Se realizó el conteo de las células presentes en cinco cuadrantes en el microscopio óptico. Se aplicó la siguiente fórmula: $\text{FD} \times \text{No. de células contadas} \times 10,000 \times 5$. Donde, FD o factor de dilución es igual a 21; número de

células contadas en los 5 cuadrantes; 10,000 dado por las dimensiones de la cámara y 5 representa el número de cuadrantes contados. Junto con el conteo celular se obtuvo el porcentaje de anomalías presentes en el eyaculado.

Fueron descartados los eyaculados que presentaron una motilidad menor al 85% y con más del 10% de anomalías.

Congelación

El protocolo de congelación que se utilizó fue el propuesto por Thilmant modificado por Martín Rillo (Thilmant P, 1997; Cordova IA *et al.*, 2001).

El semen se recibió en el laboratorio a una temperatura entre 20-23 °C o temperatura ambiente. Se preparó el diluyente A o de refrigeración (11% lactosa, 20% yema de huevo en agua destilada) y se llevó a la temperatura en que se recibió el semen. Se realizó el cálculo de la cantidad necesaria de semen diluido para obtener la concentración de 1200×10^6 espermatozoides/ml para la congelación. El volumen de semen calculado se centrifugó a $800 \times g$ durante 10 min para retirar el diluyente de transporte, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en el diluyente A en una relación 1:1, el equilibrio de la muestra se realizó bajando gradualmente la temperatura hasta 15 °C en un lapso de 3 h; la temperatura se controló dentro de una caja de unicel agregando hielos y/o refrigerantes. Una vez alcanzado el equilibrio a los 15°C el semen se llevó a la temperatura de 4°C en 1 h 30 min. Se preparó el diluyente B o de congelación (11 % lactosa, 20 % yema de huevo, 8 % glicerol en agua destilada) y se atemperó a 4 °C. Cuando el semen alcanzó los 4 °C se adicionó el diluyente B también a una relación 1:1 de manera creciente (5, 10, 15 y 20 % del volumen total final), a intervalos de 10 min entre cada adición y manteniendo la temperatura a 4 °C, dentro de una cámara fría.

La muestra se envasó cuidando la temperatura, en pajillas de 0.5 ml a una concentración final de 600×10^6 espermatozoides/ml. Las pajillas se expusieron a vapores de nitrógeno líquido durante 20 min, aproximadamente a 5 cm de distancia, para alcanzar la temperatura entre -130 a -150 °C. Por último, las pajillas se sumergieron en el nitrógeno líquido (-196 °C) para su almacenamiento. Las pajillas utilizadas estuvieron congeladas en un promedio de 2 a 3 meses.

Descongelación

Las pajillas fueron descongeladas en baño maría a 38 °C durante 30 seg y se mantuvieron a esta temperatura durante 20 min para estabilizarse. Se realizó la evaluación de la motilidad, sobre un portaobjetos a 37°C al microscopio óptico. Se descartaron aquellas muestras con menos del 80 % de motilidad.

Selección de las células espermáticas para la capacitación

Con la finalidad de obtener espermatozoides motiles después de la descongelación, las muestras tanto de semen fresco como el semen congelado descongelado, fueron filtradas para así eliminar a las células no viables. Para ello las muestras se pasaron por una columna de 1 cm³ de Sephadex G 10 (6.25 % p/v de sephadex en citrato de sodio al 2.9%) (Esquema 1).

Capacitación espermática

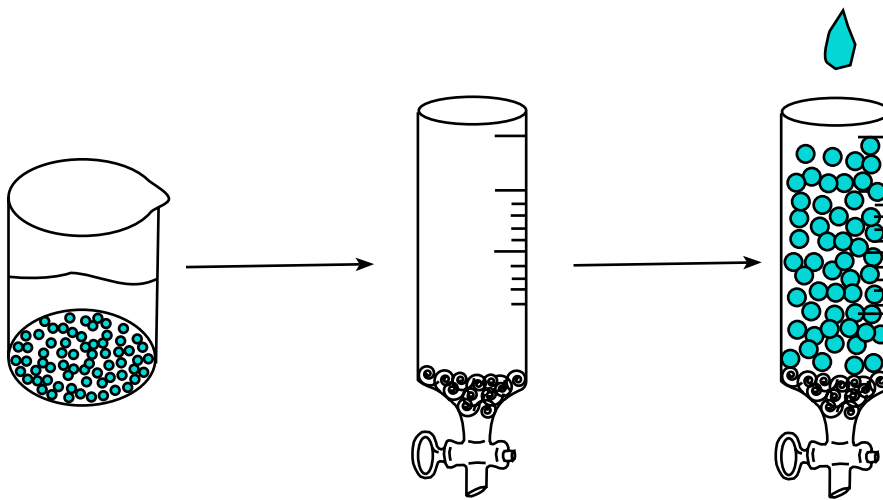
Para evaluar el efecto del fluido de la tuba uterina sobre la capacitación espermática se utilizaron muestras de semen fresco y semen congelado descongelado. Se capacitaron 5000 células espermáticas, previamente filtradas, en presencia de 50 μ l de cada muestra de fluido de la tuba uterina en un volumen total de 157.5 μ l con el diluyente comercial de larga duración IMV. Los espermatozoides fueron incubados durante 8 h 30 min a 39 °C y 5% de CO₂ (Fazeli A et al., 1999).

Como grupo testigo, ambos tipos de muestras (espermatozoides de semen fresco y semen congelado y descongelado) se colocaron en la misma concentración, 5000 células en 157.5 μ l, en el medio de capacitación TALP (NaCl 116 mM, kCl 3.1 mM, MgSO₄ 0.4 mM, NaH₂PO₄ 0.3 mM, glucosa 5 mM, Lactato de Na 21.7 mM, Piruvato de Na 1 mM, HEPES 20 mM, 3mg/ml BSA, 100 mg/ml Gentamicina, 20 μ g/ml rojo fenol, CaCl₂ 4.5 mM, Na HCO₃ 15 mM), bajo las mismas condiciones.

Evaluación del estado de capacitación.

Para valorar el estado de la capacitación espermática se realizó el ensayo de clortetraciclina (CTC) con el cual, los espermatozoides se clasificaron como no capacitados (F), capacitados (B) o con reacción acrosomal (RA) (Mattioli M et al., 1996). El ensayo de CTC se realizó a las 0 h, 4 h y 8 h 30 min de incubación, contando 50 células de cada muestra.

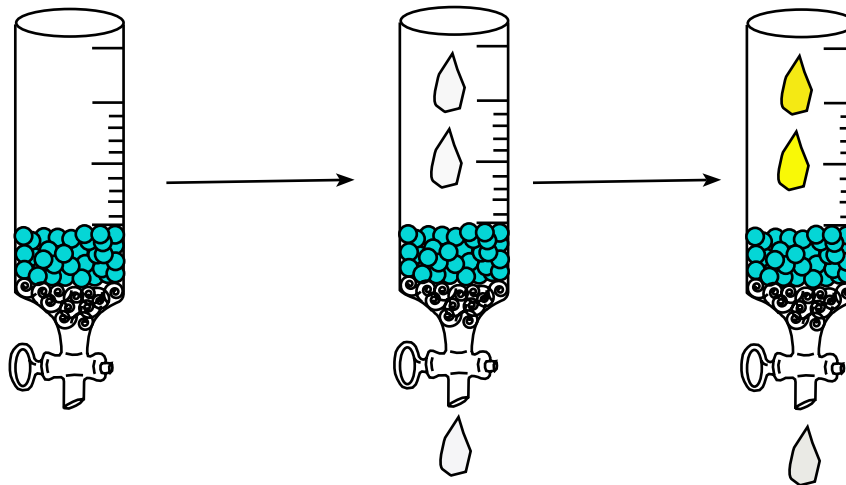
La solución de CTC (130mM NaCl, 20 mM Tris Base, 5 mM L-Cisteína, 1mM CTC, pH 7.8) fué preparada el día del ensayo realizándose de la siguiente forma: se mezclaron 22.5 μ l de muestra mas 22.5 μ l de solución CTC dejando reaccionar durante 15 seg, las células fueron fijadas con 4 μ l de glutaraldehído al 12.5% en Tris-HCl. Una gota de 4 μ l de muestra fue colocada en un portaobjetos debidamente lavado y desengrasado y se adicionó una gota de medio de montaje para fluorescencia (Glicerol-PBS 9:1), enseguida se cubrió con un cubreobjetos y se selló con esmalte comercial para uñas. La observación se realizó en el microscopio de fluorescencia Leica con el filtro de 470 nm.



Activar el Shepadex G 10 en Citrato de sodio al 2.9 %. 4°C. 12 h.

Colocar una cama de fibra de vidrio dentro de una columna de 5 ml.

Adicionar dentro de la columna el sephadex G 10 activado.



Dejar sedimentar durante 5 min.

Lavar con 5 ml del diluyente comercial IMV a 37 °C, 2 veces.

Adicionar el semen, desechar las 3 primeras gotas y recuperar las 5 gotas siguientes.

Esquema 1. Dibujo que representa la preparación de la columna de sephadex G 10 para el filtrado de la muestra espermática.

VII. RESULTADOS

Efecto del tratamiento de sincronización en la composición proteínica del fluido de la tuba uterina.

Los tratamientos aplicados para sincronizar el estro provocaron un aumento tanto en volumen del fluido de la tuba uterina como en la concentración de las proteínas. Como se puede observar en el cuadro 3 el volumen del fluido de la tuba uterina obtenido de las hembras del grupo testigo fue menor que el obtenido en las hembras tratadas, observándose un mayor volumen en el grupo eCG-hCG (81 μ l istmo, 50 μ l ámpula). En cuanto a la concentración proteínica, esta fue mayor para el tratamiento de eCG-hCG tanto en la región del ámpula como en el istmo respectivamente (Cuadro 4) en comparación con los grupos progestágeno y testigo, siendo este último grupo el que presentó una menor concentración proteínica.

El patrón electroforético del fluido de la tuba uterina obtenido de la región del istmo (Figura 1), reveló un promedio de 13 bandas proteínicas en el grupo testigo y 22 en los grupos progestágeno y eCG-hCG. Las bandas proteínicas reveladas fueron divididas en 4 grupos, el primero en el rango de 97-46 kDa, el segundo de 74-37 kDa, el tercero de 34-26 kDa y el cuarto de 21-14.4 kDa. La mayor cantidad de bandas proteínicas se encontraron localizadas en el segundo y tercer grupo; en el segundo grupo se localizaron 7 bandas para el grupo testigo y 10 en los grupos progestágeno y eCG-hCG; en el tercer grupo también se encontró un mayor número de bandas (6 bandas proteínicas) en el fluido de las cerdas tratadas que en las testigo. En general, las 13 bandas proteínicas reveladas en el grupo testigo presentaron mayor intensidad en los grupos progestágeno y eCG-hCG, manifestándose en estos dos tratamientos como proteínas mayoritarias. En el caso de los grupos tratados, progestágeno y eCG-hCG, se presentaron 8 bandas no evidentes en el grupo testigo, con pesos moleculares de 55, 52, 50, 34, 33, 29, 19 y 18 kDa.

Para la región del ámpula (Figura 2), en el grupo testigo se encontraron en promedio 21 bandas proteínicas, en el grupo progestágeno 25 y en el grupo eCG-hCG 29 bandas. Las bandas proteínicas se agruparon de igual forma que para la región del istmo, en 4 grupos, mostrándose con una mayor intensidad las bandas tenues presentes en la región del istmo; las bandas proteínicas se concentraron en el grupo 2 y 3, donde se revelaron 10, 11 y 12 bandas en los grupos testigo, progestágeno y eCG-hCG respectivamente en el grupo 2 y en el grupo 3 se pueden apreciar 6, 6 y 8 bandas respectivamente en cada uno de los tratamientos. En el caso del ámpula, solo se encontraron 3 bandas diferentes en los grupos progestágeno y eCG-hCG no presentes en el grupo testigo.

Cabe señalar que para poder identificar el patrón proteínico en los grupos testigo y progesterona, fué necesario triplicar el volumen de fluido de la tuba uterina empleado del utilizado en el grupo eCG-hCG; lo que nos indica que aunque los grupo progesterona y eCG-hCG revelaron de manera similar las bandas priteínicas, éstas se encontraban en diferente cantidad. Al mismo tiempo, para evidenciar las bandas proteínicas del grupo testigo se necesitó de una mayor cantidad de muestra.

Efecto del fluido de la tuba uterina en el estado de capacitación de los espermatozoides criopreservados.

Los patrones observados con la prueba fluorescente de CTC se muestran en la Figura 3.

Efecto del tratamiento de sincronización

La cuantificación de los patrones de CTC, a los dos tiempos de capacitación (4 h y 8h 30 min), en los espermatozoides provenientes de semen fresco mostró un mayor número de células no capacitadas en el fluido del grupo testigo que en el fluido del grupo tratado con progestágeno o eCG-hCG, demostrando un efecto por tratamiento de sincronización ($P < 0.05$) (Cuadro 5). En los espermatozoides de semen congelado descongelado, se observó efecto similar, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticas entre los espermatozoides incubados en el fluido del grupo testigo y progestágeno, tanto en la región del istmo como del ámpula (Cuadro 5).

En cuanto al número de espermatozoides capacitados de semen fresco, se encontró un número menor de espermatozoides en el grupo testigo que en los grupos progestágeno y eCG-hCG, mostrándose diferencias estadísticas por tratamiento ($P < 0.05$), con excepción del grupo progestágeno y eCG-hCG en la región del ámpula a las 4 horas (Cuadro 6). En el caso del semen congelado, se observa el grupo mas homogéneo en el porcentaje de células capacitadas y se presentaron menos diferencias estadísticas por efecto del tratamiento ($P < 0.05$) (Cuadro 6).

El número de espermatozoides de semen fresco con reacción acrosomal fué en términos generales bajo, presentándose el mayor número de células de este tipo en el grupo eCG-hCG, y una diferencia estadísticamente significativa por efecto del tratamiento ($P < 0.05$) excepto para el grupo testigo y progestágeno en la región del istmo y ámpula a los dos tiempos de incubación (Cuadro 7). En las células de semen congelado, el número de células aumentó, presentándose también un mayor número de espermatozoides con reacción acrosomal en el grupo eCG-hCG que en

el progestágeno y testigo, sin embargo entre el grupo testigo y progestágeno no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) (Cuadro 7).

Efecto de la región del istmo o ámpula

Se observó un mayor número de células sin capacitar en la región del ámpula en comparación con el istmo, encontrándose diferencias estadísticamente significativas por regiones ($P < 0.05$) (Cuadro 5) en los espermatozoides de semen fresco; un comportamiento similar se presentó en los espermatozoides de semen congelado, encontrándose diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$), con excepción del istmo y ámpula del grupo progestágeno (Cuadro 5).

El número de células clasificadas como capacitadas en el semen fresco, fué mayor en el istmo que en el ámpula, encontrándose diferencias estadísticas por efecto de la región ($P < 0.05$), excepto entre el istmo y ámpula en el fluido de las cerdas tratadas con el progestágeno a las 4 horas (Cuadro 6). En el caso del semen congelado, se presentaron menos diferencias entre regiones, sin embargo aunque bajas si hubo diferencias estadísticas significativas por efecto de la región ($P < 0.05$) (Cuadro 6).

El número de células de semen fresco clasificadas con reacción acrosomal fué menor en comparación con las otras clasificaciones (capacitadas y no capacitadas), observándose mayor número de células con reacción acrosomal en la región del istmo que del ámpula y en la mayor parte de los casos se encontraron diferencias estadísticamente significativas por efecto de la región ($P < 0.05$), a excepción del istmo y ámpula del grupo testigo y progestágeno (Cuadro 7). En los espermatozoides del semen congelado, el número de células con reacción acrosomal aumentó en todos los grupos, siendo mayor en la región del istmo que del ámpula, existiendo diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) por efecto de la región (Cuadro 7).

Efecto entre las 4 h y 8 h 30 min de incubación

Se encontró una diferencia estadísticas significativa ($P < 0.05$) en los diferentes grupos a los dos tiempos de incubación de las células, 4 h y 8 h 30 min (Cuadros 5-7).

Efecto de semen fresco y congelado

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el estado de capacitación de los espermatozoides provenientes de semen fresco y semen congelado descongelado, es decir en el número de células no capacitadas, capacitadas y con reacción acrosomal tanto a las 4 h como a las 8 h 30 min de incubación en los diferentes fluidos (Cuadro 8-10).

VIII. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio en el que se analiza el fluido de la tuba uterina, de cerdas tratadas con hormonas exógenas para su sincronización y su efecto en la capacitación espermática de células criopreservadas.

Efecto del tratamiento de sincronización en la composición proteínica del fluido de la tuba uterina.

La importancia del estudio de la composición proteínica del fluido de la tuba uterina radica en que estas proteínas han sido asociadas con procesos como el transporte de gametos, la capacitación espermática y la fertilización. En este estudio se encontró que los tratamientos con altrenogest y con eCG-hCG para la sincronización de cerdas, afectan tanto el volúmen como la concentración de proteínas del fluido de la tuba uterina. Stevenson *et al.* (1982) realizaron un estudio donde evaluaron la sincronización del estro con alternogest, encontrando concentraciones altas de P₄ en las cerdas tratadas en el día 14 a 17 en comparación con el grupo testigo; estas diferencias en los niveles de P₄ indican que la administración oral del progestágeno altera o retrasa la luteólisis o que la hormona aplicada exógenamente compite con la P₄ endógena. Utilizando el mismo compuesto Redner *et al.* (1981), encontraron que los niveles de P₄ y LH permanecieron bajos a lo largo del tratamiento, al igual que los niveles de E₂. Sin embargo, Guthrie HD *et al.* (1997), encontraron un aumento en la concentración de E₂ entre el día 1 y 4 con una disminución entre el día 4 y 7 después de la última administración del altrenogest. En el caso del uso de gonadotropinas, Guo J *et al.* (1998), encontraron que los niveles de estrógenos se mantienen bajos antes del tratamiento pero aumentan en las días subsecuentes, la P₄ aumenta en los días 8 al 16 posteriores a la aplicación del tratamiento, correlacionándose positivamente con el número de cuerpos luteos presentes; también aumentaron las concentraciones de estrógenos de las hembras tratadas en comparación con los controles en los días 2 y 4. Como se sabe, las secreciones de la tuba uterina están bajo el control endócrino del ovario, teniendo una mayor influencia los E₂ y P₄ (Hunter RHF, 2002). En este estudio se encontró que el volumen del fluido de la tuba terina producido, aumentó con los tratamientos de sincronización, lo que posiblemente se deba al aumento en el nivel de estrógenos post-tratamiento descritos por Guthrie HD *et al.* (1997) y Guo J *et al.* (1998) con el uso de altrenogest y gonadotropinas para la sincronización de las cerdas. Se ha establecido que los estrógenos en la tuba uterina, van a actuar principalmente sobre las células secretoras para aumentar su actividad biosintética y secretora formando así como un mayor volumen del fluido de la tuba uterina (Hunter RHF, 1995).

La mayor concentración de proteínas encontradas en la region del ámpula en comparación con las del istmo, se podría explicar por el estado hormonal del ámpula, ya que tiene una mayor capacidad biosintética (2-3 veces), mostrandose así una respuesta diferencial de acuerdo a los diferentes segmentos (Buhi WC 1997, Rodríguez.Martínez H 2001).

Consistentemente el número de proteínas identificadas en la región del ámpula (Figura 4) fue mayor que en la región del istmo (Figura 3), aunque la mayoría de ellas fueron compartidas. Diversos estudios del fluido recuperado de la tuba uterina han revelado que las proteínas, presentes en el fluido de la tuba uterina del porcino en su mayoría provienen del suero (Buhi WC, 2000). Buhi *et al.*, (1989) al analizar en la tuba uterina la distribución y síntesis de proteínas en el istmo y ámpula de la cerda, encontraron que en el istmo se sintetizan y secretan tres proteínas de 335, 115 y 85 kDa, diferentes de las sintetizadas por el ámpula, asociadas estas con los niveles elevados de estrógenos; la proteína de 335 kDa aunque fué dominante en la región del istmo, también estuvo presente en la región del ámpula (Buhi *et al.*, 1990). Además los mismos investigadores encontraron que muchas proteínas permanecieron en el gel concentrador después de la electroforesis, indicativo de la presencia de proteínas con un peso molecular mucho mas alto, complejos de proteínas no disociados, o proteínas con grandes cantidades de carbohidratos. Al mismo tiempo, en este trabajo se revelaron 8 bandas proteínicas con pesos moleculares entre 30 y 55 kDa en los grupos tratados las cuales no estuvieron presentes en el grupo testigo, esto indica que los tratamientos de sincronización de la cerda tienen un efecto sobre la síntesis de proteínas en el epitelio de la tuba uterina; si se toma en cuenta que las proteínas sintetizadas en la tuba uterina son proteínas altamente conservadas entre las especies, las nuevas bandas proteínicas encontradas en este trabajo podrían ser las descritas en el conejo, por Oliphant A (1982) , quien encontró tres glicoproteínas sulfatadas de mas de 200 kDa, compuestas por subunidades de 32 a 71 kDa. En este estudio los resultados presentados indicaron que el fluido de la tuba uterina del la región del istmo y del ámpula de la cerda esta formado por una gran cantidad de proteínas, sin embargo la presencia y distribución de las proteínas en ambas regiones requiere de estudios mas específicos, es también importante ampliar el estudio del efecto de los diferentes tratamientos hormonales usados en el manejo rutinario en las granjas porcinas, sobre la tuba uterina ya que este es un sitio importante en los eventos que rodean a la fertilización.

Efecto del fluido de la tuba uterina en el estado de capacitación de los espermatozoides criopreservados.

Efecto del tratamiento de sincronización

La diferencia en las concentraciones de proteínas en el fluido de la tuba uterina, de acuerdo a los tratamientos de sincronización, podría estar influyendo en el estado de capacitación de las células espermáticas, ello debido a que se encontró un mayor número de células capacitadas y con reacción acrosomal con el tratamiento del grupo eCG-hCG que en el grupo progestágeno y testigo (Cuadro 6 y 7). En estudios *in vitro*, se ha visto que el fluido periovulatorio colectado de la unión istmo ampular de la cerda aumenta el número de espermatozoides con cambios en la motilidad (Nichol R *et al.*, 1997). Por otra parte, se ha observado que la adición de fluido de la región del istmo al medio de capacitación en los espermatozoides de cerdo mantiene la viabilidad espermática (en términos de prevenir la capacitación)(Tientahai P, 2004). Se conoce que el fluido intraluminal de la tuba uterina participa en el control de la capacitación espermática durante el periodo preovulatorio y periovulatorio del cerdo, así como también en estimular el proceso durante el periodo postovulatorio (Tienthai P, 2004). De hecho, el contenido del fluido de la tuba uterina puede ser manipulado en términos de volumen y concentración proteínica al alterar el balance de las hormonas esteroides, ejemplo de ello es la influencia del tratamiento local del istmo con altas concentraciones de P₄, y que conduce a una alta incidencia de fertilización poliespérmica en cerdas (Hunter RHF, 1972), dada posiblemente por la reducción significativa de glicoproteínas (Hunter RHF, 2002). Por ello, al utilizar en la cerda hormonas exógenas con fines productivos (sincronizar estros) se altera el contenido proteínico del fluido de la tuba uterina como se refirió anteriormente, por ello al capacitar espermatozoides en presencia de este fluido el estado de capacitación estará en relación a la concentración de proteínas del fluido y por ende al tratamiento de sincronización. En este estudio la concentración proteínica del fluido de la tuba uterina entre los grupos testigo y progestágeno tuvo una diferencia menor que entre los grupos testigo y eCG-hCG (Cuadro 2), lo que podría explicar el no haber encontrado diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre el estado de capacitación de los espermatozoides incubados con el fluido de la tuba uterina del grupo testigo y progestágeno (Cuadro 4) o entre las regiones del istmo y ámpula.

El efecto del fluido de la tuba uterina en la capacitación de los espermatozoides criopreservados fue diferente a la presentada por los espermatozoides provenientes de semen fresco, lo que posiblemente se deba al proceso de congelación descongelación que sufrió la célula (Se explicará mas adelante).

Efecto de la región del istmo o ámpula

Al realizar este estudio, en las células de semen fresco se observó un efecto del fluido de la tuba uterina en el estado de capacitación presentado por las células, de acuerdo a la región de origen, istmo o ámpula ($P < 0.05$) (Cuadro 6). A este respecto, con la finalidad de estudiar las diferencias atribuidas a las regiones de la tuba uterina Grippo AA *et al.*, 1995 realizaron un estudio en el que colectaron el fluido de la tuba uterina de la región del istmo y del ámpula durante el ciclo estral e incubaron a los espermatozoides de toro en presencia del fluido del istmo y ámpula en la fase no lutea y lutea del ciclo y encontraron que el fluido del istmo en fase no lutea disminuyó la motilidad espermática mientras que la tasa de reacción acrosomal inducida y por ende de capacitación fue más alta que en los espermatozoides incubados con fluido ampular no luteo. Resultados similares fueron obtenidos por Hunter RHF *et al.*, 1998, al observar que el fluido de la tuba uterina es capaz de regular la velocidad de la capacitación espermática *in vivo*, y que la capacitación espermática de los espermatozoides porcinos es más rápida cuando son depositados en la región del istmo que en la región del ámpula. Por lo tanto, el microambiente al cual el espermatozoide es expuesto en el lumen del istmo es funcionalmente diferente al del ámpula, por lo que la región de la tuba uterina y el momento del ciclo estral afectan el fluido de la tuba uterina modificando la viabilidad espermática, motilidad, capacitación, reacción acrosomal y habilidad de fertilización (Grippo *et al.*, 1995).

Efecto entre las 4 h y 8 h 30 min de incubación

En este estudio, se encontró que una parte de la población espermática se capacitó a las 4 h y aumentó significativamente a las 8 h 30 min sin llegar a capacitarse la totalidad de la población en ninguno de los casos expuestos en el experimento. Es difícil, determinar la duración del proceso de capacitación; en estudios *in vitro*, se ha visto que puede iniciarse en minutos (Harrison RAP, 1996; 1997); pero se requiere de 1-2 horas o más *in vivo*, dependiendo del estado espermático o el sitio y momento de depósito del semen en la hembra (Rodríguez-Martínez H *et al.*, 2005).

Efecto de semen fresco y congelado

En los diferentes experimentos de este trabajo se encontraron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre el estado de capacitación de las células de semen fresco y el semen congelado y descongelado (Cuadro 9-14). Se ha sugerido que la criopreservación aumenta la proporción de espermatozoides capacitados (Watson, 1995; Gillan, 1999; Maxwell, 1999), resultados similares fueron obtenidos por Cerolini S *et al.*, 2001 quienes observaron

la pérdida de colesterol (característica en el evento de capacitación) en espermatozoides criopreservados. Por otro lado, Gadela *et al.*, 1995 encontraron que existe pérdida de la simetría de la membrana plasmática por el proceso de criopreservación, con el consecuente aumento de la fluidez y pérdida de la sensibilidad a Ca^{2+} , ión fundamental en el proceso de capacitación (Buhr MM, 1991). Wang WH *et al.*, 1995 en el estudio que realizaron con espermatozoides congelados descongelados encontraron que la capacitación y la reacción acrosomal ocurría espontáneamente en muchas de las células, las cuales al parecer eran no fertilizantes ya que fueron dañadas por la congelación descongelación; así mismo encontraron que los espermatozoides que permanecieron fertilizantes parecían capacitarse mas despacio. Estos eventos coinciden con el estado de capacitación espermática, por lo que este fenómeno producido por el proceso de criopreservación es conocido como "capacitación prematura". Aunque en este estudio las células espermáticas a las que se les indujo la capacitación fueron seleccionadas al pasarlas por una columna de sephadex, se observó que los espermatozoides criopreservados se capacitaron de una manera más rápida que los no criopreservados, mostrando que la criopreservación si altera el estado fisiológico de la célula espermática.

Es necesario tomar en cuenta que al realizar la inseminación artificial con espermatozoides congelados la sobrevivencia celular se reduce a mas de la mitad; por lo que esta técnica se vuelve altamente dependiente de buenas técnicas para predecir, controlar y detectar la ovulación (Holt WV, 2000). Con los resultados obtenidos en este estudio se puede decir que los métodos de sincronización pueden favorecer el uso del semen criopreservado ya que las condiciones creadas en la tuba uterina van a favorecer la vida del espermatozoide en el tracto reproductor de la hembra. Sin embargo, es necesario realizar mas estudios tanto para conocer mejor el efecto que los métodos de sincronización tienen sobre el fluido de la tuba uterina, y la capacitación espermática; así como para conocer el proceso de criopreservación, que en el caso del porcino todavía no está bien establecido y; también conocer sobre el momento óptimo para realizar la inseminación. El desarrollar conocimientos en esta área favorecería el uso de los espermatozoides criopreservados en la inseminación artificial junto con la sincronización de las hembras en los porcinos.

CONCLUSIONES

El uso del progestágeno oral y eCG-hCG como tratamientos de sincronización cambian la actividad biosintética de las células secretoras de la tuba uterina, de esta forma el volúmen y contenido proteínico del fluido de la tuba uterina aumenta de acuerdo al tratamiento aplicado.

El porcentaje de células espermáticas capacitadas en presencia de fluido de la tuba uterina obtenido de cerdas sincronizadas con eCG-hCG es mayor que en presencia del fluido de la tuba uterina de cerdas sincronizadas con progestágeno o de cerdas sin tratamiento.

El número de células espermáticas capacitadas en presencia del fluido de la tuba uterina, aumenta con el uso del semen criopreservado.

VIII. REFERENCIAS

- Aitken RJ. The cell biology of fertilization. In. The fate of the male germ cell. NY. 1997. Ivell and Holstein.
- Tienthai P, Johannisson A, Rodríguez-Martínez H. Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Anim Reprod Sci.* 2004;80:131-146.
- Smith TT, Yanagimachi R. Capacitation status of hamster spermatozoa in the oviduct at various times after mating. *J Reprod Fert.* 1989;86:255-261.
- Johansson M, Tienthai P and Rodriguez-Martínez H. Histochemical and ultrastructure of the intraluminal mucus in the sperm reservoir of the pig oviduct. *J Reprod Dev.* 2000;46:183-192.
- Suarez SS. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Dom Anim.* 2002;37:140-143.
- Fazeli A, Duncan AE, Watson PF and Holt W. Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol Reprod.* 1999;60:879-886.
- Smith TT. The modulation of sperm function by the oviductal epithelium. *Biol Reprod.* 1998;58:1102-1104.
- DeMott RP and Suarez SS. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol Reprod.* 1992;46:779-785.
- Killian GJ. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-82:141-153.
- Gandolfi F. Functions of proteins secreted by oviduct epithelial cells. *Mic Res Tech.* 1995;32:1-12.
- Jansen RPS. Endocrine response in the fallopian tube. *Endocrine Rev.* 1984;5:525-551.
- Foxcroft G, Goller J, Willis J and Engen van M. Use of regumate in gilt breeding programs. *Advances in pork production.* 1999;10: Abstract 4.
- Hühr U, Jöchle W and Brüssow KP. Techniques developed for the control of estrus, ovulation and parturition in the east german pig industry: a review. *Theriogenology.* 1996;46:911-924.

- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P and Maxwell WMC. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci.* 2000;62:143-172.
- Rodríguez-Martínez H, Tienthai P, Suzuki K, Funahashi H, Ekwall H and Johannisson A. Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reprod Suppl.* 2001;58:129-145.
- Rodríguez-Martínez H, Nicander L, Viring S, Einarsson S and Larsson K. Ultrastructure of the uterotubal junction in preovulatory pigs. *Anat Histol Embryol.* 1990; 19:16-36.
- Leese HJ. The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fert.* 1988; 82:843-856.
- Hunter RHF. Ovarian endocrine control of sperm progression in the fallopian tubes. *Ox Rev Reprod Biol.* 1995; 17:85-125.
- Barboni B, Mattioli M and Seren E. Influence of progesterone on boar sperm capacitation. *J Endoc.* 1995;144:13-18.
- Hunter RHF. Vital aspects of fallopian tube physiology in pigs. *Reprod Dom Anim.* 2002;37:186-190.
- Birkhead TR and Moller AP. Sperm competition and sexual selection. Academic Press.1998
- Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, Johannisson a, Vázquez JM, Martínez E, Roca J, Sanz L, Calvete JJ. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology.* 2005;63:514-535.
- Suarez SS. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. *Biol Reprod.*1998;58:1105-1107.
- Tienthai P, Kimura N, Heldin P, Sato E and Rodríguez-Martínez H. Expression of hyaluronan synthase-3 in porcine oviducal epithelium during oestrus. *Reprod fertil Dev.* 2003; 15:99-105.
- Bains R, Adeghe J and Carson RJ. Human sperm cells express CD44. *Fertil Steril.* 2002;78,307-312.
- Buhi WC, Alvarez IM. Identification, characterization and localization of three proteins expressed by the porcine oviduct. *Theriogenology* 2003; 60:225-238.
- Buhi WC. Secreted proteins of the oviduct. *Cells Tissues Organs.* 2000;166:165-179.
- Leese HL, Tay JL, Reischl J and Dowing SJ. Formation of fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction.* 2001;121:339-550.

- Hunter RHF. 1988. In: The Fallopian Tubes: Their role in fertility and infertility. Springer-Verlag. New York. pp 53-80.
- Buhi WC, Alvarez IM, Sudhipong V and Dones-Smith MM. Identification and characterization of De Novo-Synthesised porcine oviductal secretory proteins. Biol Reprod. 1990;43: 929-938.
- Petrunkina AM, Gehkhaar R, Drommer W, Waberski and töpfer-Petersen E. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. Reproduction. 2001;122:469-480.
- Smith TT and Yanagimachi R. Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. J Reprod Fertil. 1990;42:450-457.
- Lefebvre R and Suarez SS. Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. Biol Reprod. 1996;54:575-582.
- Smith TT. The modulation of sperm function by the oviductal epithelium. Biol Reprod 1998; 58:1102-1104.
- DeMott RP, Lefebvre R and Suarez SS. Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. Biol Reprod. 1995;52:1395-1403.
- Green CE, Bredl J, Holt WV, Watson PF and Fazeli A. Carbohydrate mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cell in vitro. Reproduction 2001; 122:305-315.
- Raychoudhury SS and Suarez SS. Porcine sperm binding to oviductal explants in culture. Theriogenology. 1991;36:1059-1070.
- Hunter RHF, Huang WT and Holtz W. Regional influences of the fallopian tubes on the rate of boar sperm capacitation in surgically inseminated gilts. J Reprod Fert. 1998;114: 17-23.
- Breitbart H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. Mol Cell Endoc. 2002;187:139-144.
- Trujillo Ortega ME. Sincronización del estro en cerdas nulíparas y primíparas. Tesis para obtener el grado de maestría en producción animal:cerdos. Universidad Nacional Autónoma de México. Diciembre de 1994.
- Rozeboom K, See T and Flower B. Swine news.NC State University. College of Agriculture and life sciences. 2000;23:4.
- Coffey RD, Parker GR and Laurent KM. Manipulation of the estrous cycle in swine. University of Kentucky. College of Agriculture. 1997:1-6.

- Estienne MJ, Harper AF, Horsley BR, Estienne CE and Knight JW. Effects of P.G.600 on the onset of estrus and ovulation rate in gilts treated with regu-mate. *J Anim Sci.* 2001;79:2757-2761.
- Britt JH, Day BN, Webel SK and Brader MA. Induction of fertile estrus in prepubertal gilts by treatment with a combination of pregnant mare's serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin. *J Anim Sci.* 1989;67:1148-1153.
- Duanyai S and Srikandakumar A. Premature elevation of progesterone shortens duration of ovulation in PMSG/hCG-treated prepubertal gilts. *Theriogenology.* 1998;50:433-443.
- Kirkwood RN. Pharmacological intervention in swine reproduction. *Swine Health and Production.* 1999;7:29-35.
- Watson PF. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev.* 1995;7:871-891.
- Kemp B and Soede NM. Consequences of variation in interval from insemination to ovulation on fertilization in pigs. *J Reprod Fertil Suppl.* 1997;52: 79-89.
- Hammerstedt RH, Graham JK and Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl.* 1990;11:73-88.
- Graham JK and Mocé E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology.* 2005;64:492-504.
- Bailey JL, Bilodeau JF and Cornier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging capacitating phenomenon. *J Androl.* 2000;21:1-7.
- Silva PEN, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology.* 2006;65:958-978.
- Holt WV, North RD. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol Reprod.* 1994;51:414-424.
- Meyers SA. Spermatozoal response to osmotic stress. *Anim Reprod Sci.* 2005;89:57-64.
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 2000;60-61:481-492.
- Dougherty RW y Uson JG. Cirugía experimental de los animales de granja. Ed. Acribia. España, 1989.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:256-275.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.

Oakley BR, Kirsch DR and Morris NR. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Annal Biochem.* 1980;105:361-363.

Thilmant P. Congélation du sperme de verrat en paillette de 0.5 ml resultants sur le terrain. *Ann Med Vet.* 1997;142:457-462.

Córdova IA, Pérez JF, Lleo B, García A y Martin Rillo S. In vitro fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Reprod Dom Anim.* 2001;36:199-202.

Mattioli M, Barboni B, Lucidi P and Seren E. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology.* 1996;45:373-381.

Stevenson JS and Davis DL. Estrous synchronization and fertility in gilts after 14 or 18 day feeding of altrenogest beginning at estrus or diestrus. *J Anim Sci.* 1982;55:119-123.

Readner DA and Day BN. Ovarian activity and hormonal patterns in gilts fed allyl trembolone. *J Anim Sci.* 1981;53:1088-1094.

Guthrie HD, Pursel VG and Wall RJ. Porcine follicle-stimulating hormone treatment of gilts during an altrenogest-synchronized follicular phase: effects on follicle growth, hormone secretion, ovulation, and fertilization.

Guo J, Grieger DM and Davis DL. Uterine and ovarian responses to puberty induction and pregnancy in prepubertal gilts. *J Anim Sci.* 1998;76:1463-1468.

Buhi WC, Alvarez IM and Kouba AJ. Oviductal regulation of fertilization and early embryonic development. *J Reprod Fert.* 1997;52:285-300.

Nichol R, Hunter RHF, De Lamirande E, Gagnon C and Cooke GM. Motility of spermatozoa in hydrosalpingeal and follicular fluid of pigs. *J Reprod Fert.* 1997;110:79-86.

Tienthai P, Johannisson A, Rodríguez-Martínez H. Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Anim Reprod Sci.* 2004;80:131-146.

Hunter RHF. Local action of progesterone leading to polyespermic fertilization in pigs. *J Reprod Fert.* 1972;31:433-444.

Grippo AA, Way AL, Killian GJ. Effect of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on motility, acrosome reaction and fertility of bull spermatozoa. *J Reprod Fert.* 1995;105:57-64.

Harrison RAP. Capacitation mechanism, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev.* 1996;8:581-594.

Harrison RAP. Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. *J Reprod Fertil Suppl.* 1997;52:195-211.

Gadella BM, Lopes-Cardozo M, van Golde LMG, Coembrandt B and Gadella TWJ. Glycolipid migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membrane precedes the acrosome reaction. Evidence for a primary capacitation event in boar spermatozoa. *J Cell Sci.* 1995;108:935-945.

Buhr MM, Bailey JL and Cavin AT. Effects of semen preservation on boar spermatozoa plasma membranes. *Gamete Res.* 1989;23:441-449.

Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci.* 2000;62:3-22.

ANEXO 1

FIGURAS

Y

CUADROS

Tratamiento	n	Istmo μl	Ámpula μl
Testigo	6	62	24
Progestágeno	6	79	45
eCG-hCG	6	81	50

Cuadro 3. Volúmen promedio de fluido de la tuba uterina obtenido de la región del istmo y ámpula de las cerdas pertenecientes a los grupos testigo, progestágeno y eCG-hCG.

Tratamiento	n	Istmo μg/10 μl de fluido de la tuba uterina	Ámpula μg/10 μl de fluido de la tuba uterina
Testigo	6	2.29	5.8
Progestágeno	6	2.42	6.43
eCG-hCG	6	3.01	7.84

Cuadro 4. Promedio de la concentración de proteína del fluido de la tuba uterina obtenido de la región del istmo y ámpula de las cerdas pertenecientes a los grupos testigo, progestágeno y eCG-hCG.

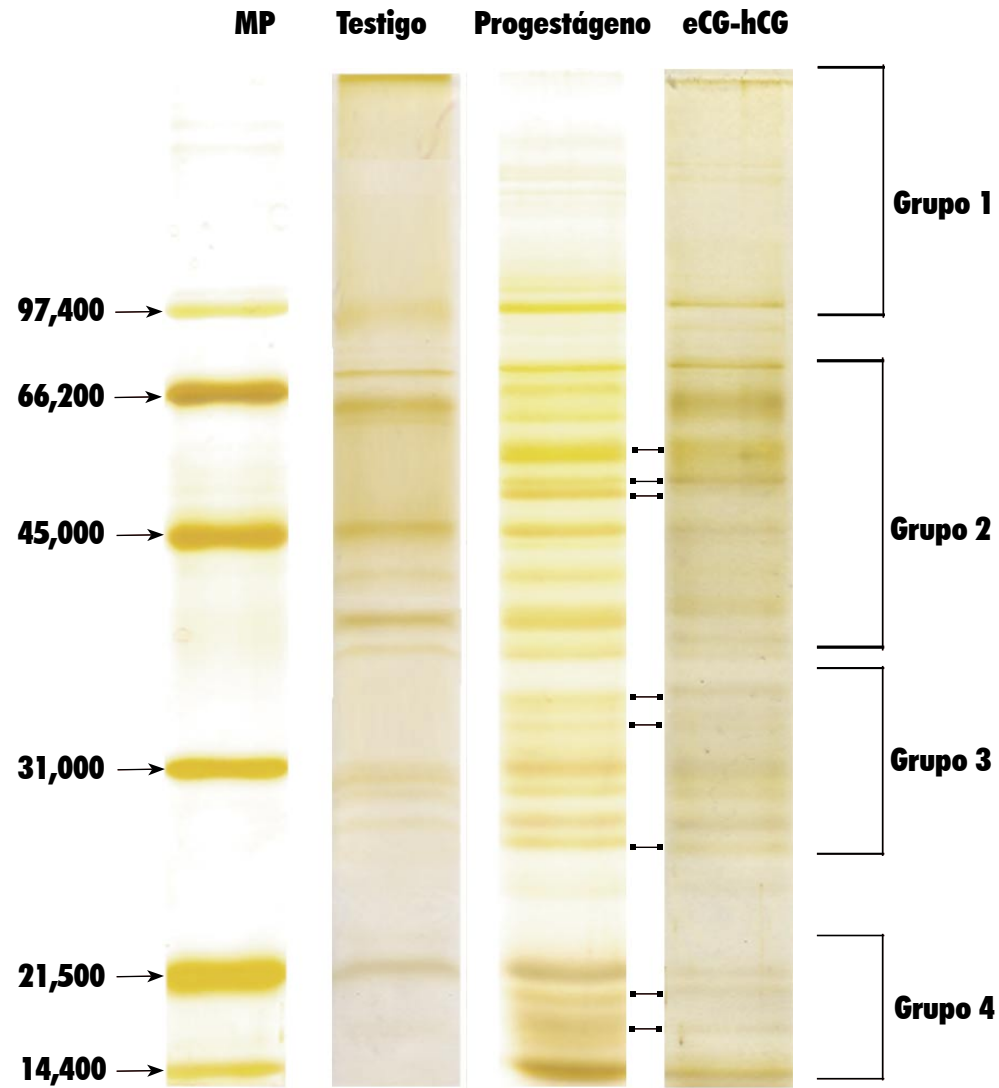


Figura 1. Patrón proteínico obtenido del fluido de la tuba uterina de la región del ISTMO, de las cerdas pertenecientes a los grupos testigo, progestágeno y eCG-hCG. Los corchetes indican el agrupamiento de las bandas proteínicas (Ver resultados). ┌─┐ Indica nuevas bandas proteínicas.

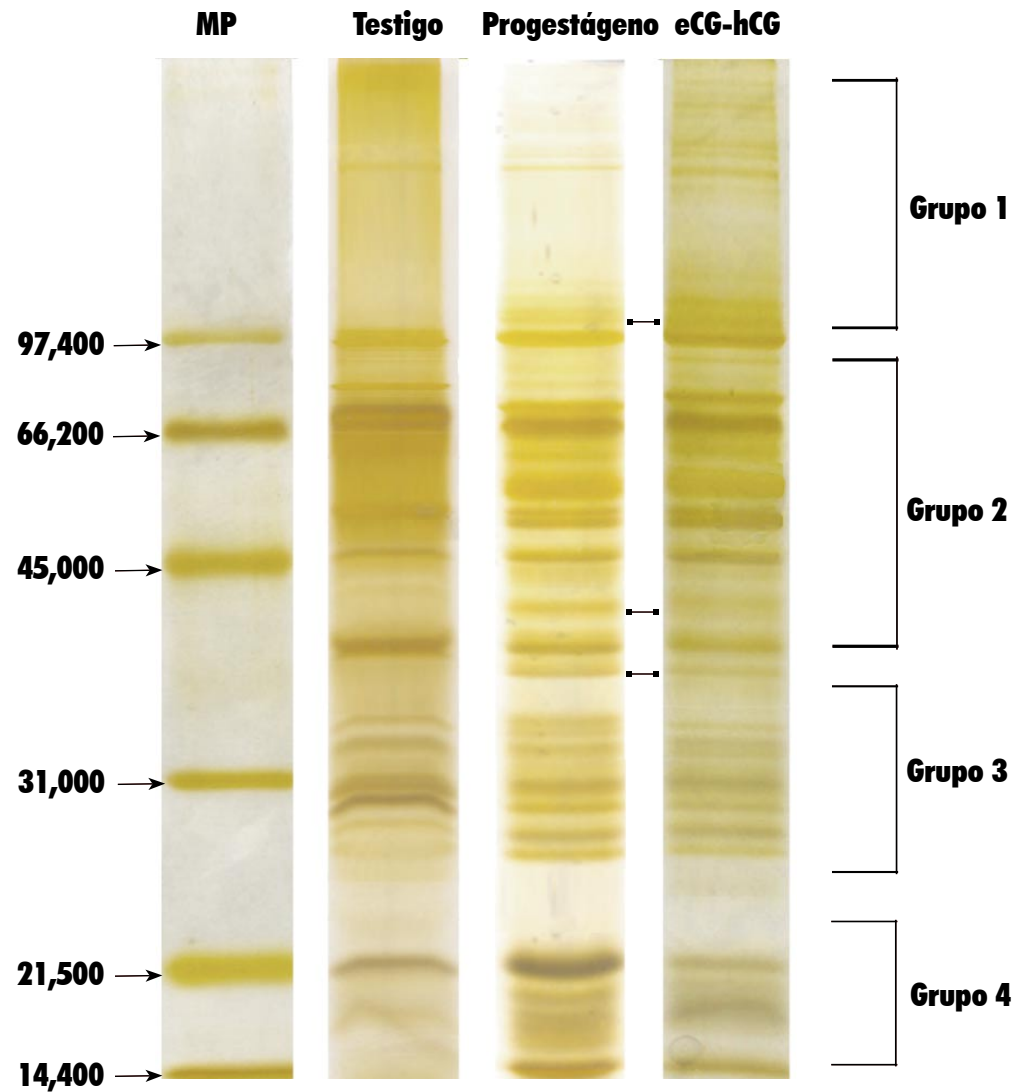
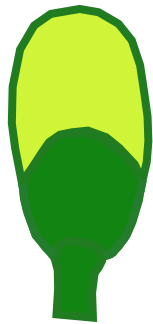


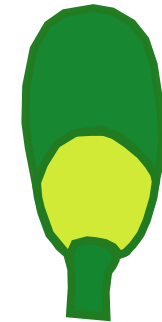
Figura 2. Patrón proteínico obtenido del fluido de la tuba uterina de la región del ÁMPULA, de las cerdas pertenecientes a los grupos testigo, progestágeno y eCG-hCG. Los corchetes indican el agrupamiento de las bandas proteínicas (Ver resultados) ← Indica nuevas bandas proteínicas.



F
NO CAPACITADOS



B
CAPACITADOS



RA
CON REACCIÓN ACROSOMAL

Figura 3. Patrones de fluorescencia observados con la clortetraciclina para evaluar el estado fisiológico en los espermatozoides de cerdo. F (No capacitados): fluorescencia uniforme en el espermatozoide, ligeramente mayor en la zona apical de la cabeza; B (Capacitados): banda fluorescente en la región ecuatorial y; RA (con Reacción Acrosomal): sin fluorescencia en la zona apical de la cabeza, fluorescencia en la región postacrosomal.

Tratamiento	n	Semen Fresco				Semen Congelado			
		Istmo 4 h	Ámpula 4 h	Istmo 8 h 30 min	Ámpula 8 h 30 min	Istmo 4 h	Ámpula 4 h	Istmo 8 h 30 min	Ámpula 8 h 30 min
Testigo	6	40.833 ± 2.787 a	43.833 ± 2.041 a	35.333 ± 1.033 b	41.333 ± 1.033 c	20.500 ± 1.643 k	23.500 ± 0.837 l	9.333 ± 0.816 m	17.167 ± 1.169 n
Progestágeno	6	31.167 ± 3.125 d	39.667 ± 3.445 e	23.667 ± 3.830 f	37.333 ± 3.38 e	16.667 ± 8.477 kñ	21.500 ± 8.191 lñ	11.333 ± 9.852 mo	17.000 ± 8.173 no
eCG-hCG	6	21.667 ± 1.033 g	32.667 ± 0.816 h	14.000 ± 0.894 i	29.500 ± 1.225 j	4.833 ± 0.753 p	12.333 ± 1.033 q	2.333 ± 0.816 r	9.167 ± 0.983 s

Valores con literales distintas entre columnas muestran significancia estadística (P<0.05)

Valores expresados en medias ± error estándar

Cuadro 5. Comparación del efecto del fluido proveniente del istmo y ámpula, según el tratamiento de sincronización, en el número de espermatozoides provenientes de semen fresco y semen congelado descongelado, que presentaron el patrón F (Células NO CAPACITADAS), a las 4 h y 8 h 30 min de incubación.

Tratamiento	n	Semen Fresco				Semen Congelado			
		Istmo 4 h	Ámpula 4 h	Istmo 8 h 30 min	Ámpula 8 h 30 min	Istmo 4 h	Ámpula 4 h	Istmo 8 h 30 min	Ámpula 8 h 30 min
Testigo	6	8.667 ± 2.805 a	5.167 ± 0.753 b	13.667 ± 1.366 c	8.500 ± 1.049 d	15.833 ± 2.994 l	16.333 ± 1.211 lt	24.167 ± 1.722 m	20.667 ± 1.033 n
Progestágeno	6	17.333 ± 22.167 e	13.333 ± 7.967 eig	21.000 ± 1.549 f	12.167 ± 3.061 g	15.167 ± 4.119 ñs	16.667 ± 3.141 ñqt	17.167 ± 2.563 ou	16.167 ± 1.169 ov
eCG-hCG	6	22.167 ± 0.753 h	16.000 ± 0.632 i	24.833 ± 1.472 j	19.333 ± 1.211 k	23.167 ± 1.329 pq	19.333 ± 1.506 g	14.667 ± 1.366 ru	15.333 ± 1.366 rv

Valores con literales distintas entre columnas muestran significancia estadística (P<0.05)

Valores expresados en medias ± error estándar

Cuadro 6. Comparación del efecto del fluido proveniente del istmo y ámpula, según el tratamiento de sincronización, en el número de espermatozoides provenientes de semen fresco y semen congelado descongelado, que presentaron el patrón B (Células CAPACITADAS), a las 4 h y 8 h 30 min de incubación.

Tratamiento	n	Semen Fresco				Semen Congelado			
		Istmo 4 h	Ámpula 4 h	Istmo 8 h 30 min	Ámpula 8 h 30 min	Istmo 4 h	Ámpula 4 h	Istmo 8 h 30 min	Ámpula 8 h 30 min
Testigo	6	0.5000 ± 0.8367 abj	0.1667 ± 0.4082 ak	1.000 ± 0.632 b	0.1667 ± 0.4082 c	13.667 ± 2.066 j	10.167 ± 1.169 k	16.500 ± 1.643 l	12.167 ± 1.941 m
Progestágeno	6	1.500 ± 1.2247 dj	0.333 ± 0.5164 dk	5.833 ± 4.167 e	0.5000 ± 0.8367 eci	16.333 ± 8.189 jno	11.833 ± 5.345 kn	21.667 ± 10.073 ñl	16.833 ± 8.472 ñm
eCG-hCG	6	6.1667 ± 0.4082 f	1.333 ± 0.5164 g	11.167 ± 0.753 h	1.333 ± 0.5164 i	22.000 ± 1.673 o	18.333 ± 1.211 p	33.000 ± 1.673 q	24.500 ± 1.517 r

Valores con literales distintas entre columnas muestran significancia estadística (P<0.05)

Valores expresados en medias ± error estándar

Cuadro 7. Comparación del efecto del fluido proveniente del istmo y ámpula, según el tratamiento de sincronización, en el número de espermatozoides provenientes de semen fresco y semen congelado descongelado, que presentaron el patrón RA (Células con REACCIÓN ACROSOMAL), a las 4 h y 8 h 30 min de incubación.

		Semen Fresco	Semen Congelado	Semen Fresco	Semen Congelado	Semen Fresco	Semen Congelado	Semen Fresco	Semen Congelado
Tratamiento	n	Istmo 4 h		Istmo 8 h 30 min		Ámpula 4 h		Ámpula 8 h 30 min	
Testigo	6	40.833 ± 2.787 a	20.500 ± 1.643 b	35.333 ± 1.033 g	9.333 ± 0.816 h	43.833 ± 2.041 m	23.500 ± 0.837 n	41.333 ± 1.033 r	17.167 ± 1.169 s
Progestágeno	6	31.167 ± 3.125 c	16.667 ± 8.477 c	23.667 ± 3.830 i	11.333 ± 9.852 j	39.667 ± 3.445 ñ	21.500 ± 8.191 o	37.333 ± 3.38 t	17.000 ± 8.173 u
eCG-hCG	6	21.667 ± 1.033 e	4.833 ± 0.753 f	14.000 ± 0.894 k	2.333 ± 0.816 l	32.667 ± 0.816 p	12.333 ± 1.033 q	29.500 ± 1.225 v	9.167 ± 0.983 w

Valores con literales distintas entre columnas muestran significancia estadística (P<0.05)

Valores expresados en medias ± error estándar

Cuadro 8. Comparación entre el número de células espermáticas provenientes de semen fresco y semen congelado descongelado, que presentaron el patrón F (Células NO CAPACITADAS), con 4 h y 8 h 30 min de incubación, en presencia de fluido de la tuba uterina de la región del istmo y ámpula, con los diferentes tratamientos de sincronización.

		Semen Fresco	Semen Congelado	Semen Fresco	Semen Congelado	Semen Fresco	Semen Congelado	Semen Fresco	Semen Congelado
Tratamiento	n	Istmo 4 h		Istmo 8 h 30 min		Ámpula 4 h		Ámpula 8 h 30 min	
Testigo	6	8.667 ± 2.805 a	15.833 ± 2.994 b	13.667 ± 1.366 g	24.167 ± 1.722 h	5.167 ± 0.753 m	16.333 ± 1.211 n	8.500 ± 1.049 r	20.667 ± 1.033 s
Progestágeno	6	17.333 ± 22.167 c	15.167 ± 4.119 d	21.000 ± 1.549 i	17.167 ± 2.563 j	13.333 ± 7.967 ñ	16.667 ± 3.141 o	12.167 ± 3.061 t	16.167 ± 1.169 u
eCG-hCG	6	22.167 ± 0.753 e	23.167 ± 1.329 f	24.833 ± 1.472 k	14.667 ± 1.366 l	16.000 ± 0.632 p	19.333 ± 1.506 q	19.333 ± 1.211 v	15.333 ± 1.366 w

Valores con literales distintas entre columnas muestran significancia estadística (P<0.05)

Valores expresados en medias ± error estándar

Cuadro 9. Comparación entre el número de células espermáticas provenientes de semen fresco y semen congelado descongelado, en el número de células que presentaron el patrón B (Células CAPACITADAS), con 4 h y 8 h 30 min de incubación, en presencia de fluido de la tuba uterina de la región del istmo y ámpula, con los diferentes tratamientos de sincronización.

		Semen Fresco	Semen Congelado	Semen Fresco	Semen Congelado	Semen Fresco	Semen Congelado	Semen Fresco	Semen Congelado
Tratamiento	n	Istmo 4 h		Istmo 8 h 30 min		Ámpula 4 h		Ámpula 8 h 30 min	
Testigo	6	0.5000 ± 0.8367 a	13.667 ± 2.066 b	1.000 ± 0.632 g	16.500 ± 1.643 h	0.1667 ± 0.4082 m	10.167 ± 1.169 n	0.1667 ± 0.4082 r	12.167 ± 1.941 s
Progestágeno	6	1.500 ± 1.2247 c	16.333 ± 8.189 d	5.833 ± 4.167 i	21.667 ± 10.073 j	0.333 ± 0.5164 ñ	11.833 ± 5.345 o	0.5000 ± 0.8367 t	16.833 ± 8.472 u
eCG-hCG	6	6.1667 ± 0.4082 e	22.000 ± 1.673 f	11.167 ± 0.753 k	33.000 ± 1.673 l	1.333 ± 0.5164 p	18.333 ± 1.211 q	1.333 ± 0.5164 v	24.500 ± 1.517 w

Valores con literales distintas entre columnas muestran significancia estadística (P<0.05)

Valores expresados en medias ± error estándar

Cuadro 10. Comparación entre el número de células espermáticas provenientes de semen fresco y semen congelado descongelado, en el número de células que presentaron el patrón RA (Células con REACCIÓN ACROSOMAL), con 4 h y 8 h 30 min de incubación, en presencia de fluido de la tuba uterina de la región del istmo y ámpula, con los diferentes tratamientos de sincronización.