



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**CONTRACTILIDAD DEL MIOMETRIO DE CONEJAS  
ASOCIADA A LA PRESENCIA DE ESPERMATOZOIDES  
CAPACITADOS**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**JAVIER FROYLÁN LAZCANO REYES**

**TUTOR: DR. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ**  
**COMITÉ TUTORAL: DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR**  
**DR. JAVIER VALENCIA MÉNDEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

*Cultivo una rosa blanca en junio como en enero  
para el amigo sincero que me da su mano franca  
y para aquel que me arranca el corazón con que vivo,  
cardo ni ortiga, cultivo una rosa blanca.*

José Martí

## **Créditos**

**Las siguientes personas e instituciones apoyaron la realización de este trabajo.**

**Dr. José Alfredo Medrano Hernández. Tutor principal, por su apoyo en todo momento**

**La cátedra de reproducción y comportamiento de los animales domésticos (CONS-201)**

**La FES-Cuautitlán . Por la comisión otorgada**

**El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología . Por la beca otorgada**

**MC. Magdalena Zamora Fonseca. Módulo de conejos de la FES Cuautitlán**

**Laboratorios de Reproducción y Fisiología de la FES Cuautitlán**

**Dr. Arturo Trejo González y Dr. Salvador Romo García. Por el equipo facilitado**

<b>Índice general</b>	Página
<b>Créditos</b> .....	3
<b>Resumen</b> .....	8
<b>Abstract</b> .....	9
<b>1. Introducción</b> .....	10
<b>2. Antecedentes</b> .....	13
2.1 Motilidad del músculo liso uterino.....	13
2.2. Transporte espermático.....	16
2.3 Formación del reservorio espermático.....	17
2.4 Capacitación espermática.....	21
<b>3. Hipótesis</b> .....	32
<b>4. Objetivos</b> .....	32
<b>5. Material y Métodos</b> .....	33
5.1 Diseño experimental.....	33
5.2 Sincronización de las conejas.....	34
5.3 Determinación del estado de capacitación espermática.....	34
5.4 Medición de la contractilidad y actividad eléctrica uterina.....	35
5.5 Tratamientos de la fase uno .....	36
5.6 Procedimiento experimental de la fase uno.....	37
5.7 Tratamientos de la fase dos.....	39
5.8 Procedimiento experimental de la fase dos.....	39
5.9 Procedimiento del análisis estadístico.....	42
<b>6. Resultados</b> .....	43
6.1 Fase 1. Evaluación de la fuerza de contracción, actividad eléctrica (frecuencia y voltaje) del músculo liso uterino, sometido a tres diferentes tratamientos: plasma seminal, PBS y monta natural.....	43
6.1.1 Análisis entre segmentos dentro de tratamiento.....	43
6.1.2 Análisis entre tratamientos.....	47
6.1.3 Correlación entre la actividad mecánica y eléctrica.....	49
6.2 Fase 2. Efecto de la presencia de espermatozoides capacitados y sin capacitar sobre la actividad mecánica y eléctrica del tracto reproductivo de la coneja.....	52
6.2.1 Análisis entre segmentos dentro de tratamiento.....	42
6.2.2 Análisis entre tratamientos.....	54
6.2.3 Correlación entre la actividad mecánica y eléctrica.....	54
<b>7. Discusión</b> .....	57
<b>8. Conclusión</b> .....	65
<b>9. Referencias</b> .....	66
<b>10. Anexos</b> .....	70
Anexo 1. Composición del Medio de TALP .....	70

Anexo 2. Preparación de la tinción eosina-nigrosina.....	72
Anexo 3. Cuadros y figuras.....	73

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Diseño experimental de la fase 1.....	30
<b>Cuadro 2.</b> Diseño experimental de la fase 2.....	31
<b>Cuadro 3.</b> Efecto del plasma seminal sobre la contractilidad y actividad eléctrica de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	73
<b>Cuadro 4.</b> Efecto del PBS sobre la contractilidad y actividad eléctrica de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	73
<b>Cuadro 5.</b> Efecto de la monta natural sobre la contractilidad y actividad eléctrica de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	74
<b>Cuadro 6.</b> Comparación de los valores basales entre dos tratamientos, plasma seminal y PBS sobre la contractilidad y actividad eléctrica.....	74
<b>Cuadro 7.</b> Comparación de los valores experimentales entre dos tratamientos, plasma seminal y PBS sobre la contractilidad y actividad eléctrica.....	74
<b>Cuadro 8.</b> Comparación de la diferencia entre valores basales y experimentales de dos tratamientos (plasma seminal y PBS) sobre la contractilidad y actividad eléctrica	75
<b>Cuadro 9.</b> Comparación entre tratamientos (monta natural, plasma seminal, PBS) de los valores experimentales de tres segmentos agrupados.....	76
<b>Cuadro 10.</b> Valores de correlación entre actividad mecánica y eléctrica de valores experimentales en tres tratamientos de la fase uno.....	77
<b>Cuadro 11.</b> Valores de correlación entre actividad mecánica y eléctrica de valores basales en tres tratamientos de la fase uno.....	50
<b>Cuadro 12.</b> Valores de correlación entre la actividad mecánica y eléctrica de tres segmentos agrupados del tracto reproductivo de la coneja.....	51
<b>Cuadro 13.</b> Efecto de la presencia de espermatozoides sin capacitar sobre la contractilidad y actividad eléctrica de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	77
<b>Cuadro 14.</b> Efecto de la presencia de espermatozoides capacitados sobre la contractilidad y actividad eléctrica de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	78
<b>Cuadro 15.</b> Valores basales de 40 unidades experimentales con 3 repeticiones sobre el efecto en la contractilidad y actividad eléctrica (frecuencia y voltaje) en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	79
<b>Cuadro 16.</b> Comparación de los valores experimentales de dos tratamientos y su efecto sobre la contractilidad y actividad eléctrica en tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	80
<b>Cuadro 17.</b> Comparación de los valores DIF de dos tratamientos y su efecto sobre la contractilidad y actividad eléctrica en 3 segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	81
<b>Cuadro 18.</b> Comparación entre tratamientos (espermatozoides capacitados y sin capacitar) de valores experimentales agrupados de los tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	82
<b>Cuadro 19.</b> Valores de correlación entre la contractilidad y la actividad eléctrica de datos basales en espermatozoides capacitados y sin capacitar en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	55

<b>Cuadro 20.</b> Valores de correlación entre la contractilidad y actividad eléctrica de datos experimentales de espermatozoides sin capacitar y capacitados.....	55
<b>Cuadro 21.</b> Valores de correlación entre la contractilidad y actividad eléctrica de los valores DIF de espermatozoides sin capacitar y capacitados.....	56
<b>Cuadro 22.</b> Valores de correlación entre contractilidad y actividad eléctrica de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja agrupados.....	56

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Espermatozoides de conejo teñidos con CTC.....	35
<b>Figura 2.</b> Modelo experimental.....	36
<b>Figura 3.</b> Detalle del modelo experimental.....	38
<b>Figura 4.</b> Efecto del plasma seminal sobre la actividad eléctrica de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	44
<b>Figura 5.</b> Efecto del plasma seminal sobre la contractilidad de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	44
<b>Figura 6.</b> Efecto del PBS sobre la actividad eléctrica en tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	45
<b>Figura 7.</b> Efecto del PBS sobre la contractilidad en tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	45
<b>Figura 8.</b> Efecto de la monta natural sobre la actividad eléctrica en tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	46
<b>Figura 9.</b> Efecto de la monta natural sobre la contractilidad en tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	46
<b>Figura 10.</b> Comparación de los valores basales de dos tratamientos (plasma seminal y PBS) sobre la actividad eléctrica de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	47
<b>Figura 11.</b> Espermatozoides de conejo teñidos con CTC.....	48
<b>Figura 12.</b> Modelo experimental.....	48
<b>Figura 13.</b> Detalle del modelo experimental.....	75
<b>Figura 14.</b> Efecto del plasma seminal sobre la actividad eléctrica de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	75
<b>Figura 15.</b> Comparación de los valores DIF de dos tratamientos (plasma seminal y PBS) sobre la contractilidad en tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	76
<b>Figura 16.</b> Diferencias entre tratamientos de los valores experimentales sobre la actividad eléctrica en segmentos agrupados del tracto reproductivo de la coneja.....	49
<b>Figura 17.</b> Diferencias entre tratamientos de los valores experimentales sobre la contractilidad en segmentos agrupados del tracto reproductivo de la coneja.....	76
<b>Figura 18.</b> Comparación de tres valores de la actividad eléctrica de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja en espermatozoides sin capacitar.....	52
<b>Figura 19.</b> Comparación de tres valores de la contractilidad de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja en espermatozoides sin capacitar.....	53
<b>Figura 20.</b> Comparación de tres valores de la actividad eléctrica de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja en espermatozoides capacitados.....	53
<b>Figura 21.</b> Comparación de tres valores de la contractilidad de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja en espermatozoides capacitados.....	78

<b>Figura 22.</b> Valores básales sobre la actividad eléctrica de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	79
<b>Figura 23.</b> Valores básales sobre la contractilidad de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	79
<b>Figura 24.</b> Comparación de valores experimentales de dos tratamientos (espermatozoides sin capacitar y capacitados) sobre la actividad eléctrica en tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	80
<b>Figura 25.</b> Comparación de valores experimentales de dos tratamientos (espermatozoides sin capacitar y capacitados) sobre la contractilidad en tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	80
<b>Figura 26.</b> Comparación de valores DIF de dos tratamientos (espermatozoides sin capacitar y capacitados) sobre la actividad eléctrica en tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	81
<b>Figura 27.</b> Comparación de valores DIF de dos tratamientos (espermatozoides sin capacitar y capacitados) sobre la contractilidad en tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja.....	81
<b>Figura 28.</b> Diferencias entre tratamientos de valores experimentales sobre la actividad eléctrica en segmentos agrupados del tracto reproductivo de la coneja.....	82
<b>Figura 29.</b> Diferencias entre tratamientos de valores experimentales sobre la contractilidad en segmentos agrupados del tracto reproductivo de la coneja.....	82

#### **Abreviaturas**

AMPc. Del inglés: ciclic Adenosin Mono Phosphate (monofosfato de adenosina cíclico)

ANOVA. Análisis de Varianza

BAS. Datos basales

CTC. Tinción de clortetraciclina

DAG. Diacilglicerol

DIF. Diferencias entre datos experimentales menos datos básales

eCG. Del inglés equine Corionic Gonadotropine (gonadotropina coriónica equina)

EGF. Del inglés: Epidermal Grow Factor (factor de crecimiento epidermal)

EGFR. Receptor de tirosina cinasa

EHG. Electrohistorigrama

EXP. Datos experimentales (con tratamiento)

FSH. Del inglés: Follicular Stimulating Hormone (hormona foliculoestimulante)

GAGs. Glicosaminoglucanos

HCO<sub>3</sub>. Radical bicarbonato

IP<sub>3</sub>. Inositol trifosfato

LH. Del inglés Luteotropic Hormone (hormona luteotrópica)

OAM. Del inglés: Out Acrossomal Membrane (membrana acrosomal externa)

OEC. Del inglés: Oviductal Epitelial Cells

OSP. Del inglés Oviductal Secretion Protein (proteína de secreción oviductal)

PBS. Phosphated Buffer Solution

pH. Potencial de Hidrógeno

PKA. Del inglés: Phosphokinasse A

PKC. Del inglés: Phosphokinasse C (fosfocinasa C)

PLC. Del inglés: Phospholipase C (fosfolipasa C)

PM. Del inglés: Plasmatic Membrane (membrana plasmática)

SFP. Del inglés: Seminal Fluid Protein (Proteína del Fluido Seminal)

TALP. Medio de cultivo para espermatozoides

TU. Tuba Uterina

UTB. Unión Útero Tubal

UTE. Útero

## Resumen

La motilidad del músculo liso uterino es de vital importancia durante la gestación, el parto y el periodo alrededor de la cópula, este movimiento puede desempeñar un papel preponderante en el transporte espermático y durante la capacitación espermática. El contacto físico entre los espermatozoides y las células epiteliales es un factor estimulador de las características del movimiento espermático, esto podría ser un mecanismo muy importante de la capacitación *in vivo*. En consecuencia, un aumento en la motilidad del músculo liso uterino (cuernos y tuba uterina) se espera se presente al momento en que una determinada población de espermatozoides muestre el movimiento de hiperactivación, característico de los espermatozoides capacitados. El aumento en la contractilidad uterina sería ventajoso porque facilitaría la separación de los espermatozoides del epitelio de la tuba uterina. La hipótesis de este trabajo radica en que la contractilidad de ciertos segmentos del útero, posterior a la cópula, varía a medida que ocurre el proceso de capacitación espermática.

Se emplearon 39 conejas de la raza Nueva Zelanda y FESC, en la primera fase se midió la contractilidad del miometrio de diferentes segmentos del tracto reproductivo: Útero (UTE), Unión Útero-Tubal (UTB) y Tuba Uterina (TU) tras la aplicación de 200, 100 y 50  $\mu\text{L}$  respectivamente de cada tratamiento 1) posterior a la cópula natural y fértil (testigo), 2) infusión de plasma seminal, y 3) infusión de PBS (Phosphated Buffer Solution).

En la segunda parte, se depositaron poblaciones de espermatozoides: 1) capacitados y 2) sin capacitar en los diferentes segmentos arriba indicados. Se registró la contractilidad y la actividad eléctrica (voltaje en mV y frecuencia en Hz) de cada segmento. Los datos se analizaron mediante ANOVA para determinar las diferencias entre tratamientos y entre segmentos y una prueba de correlación entre la fuerza de contracción y la actividad eléctrica del músculo uterino. Los resultados de la fase 1, la Monta Natural reportó diferencias significativas en la frecuencia de la corriente que fue casi doble (0.076 Hz) respecto a los otros tratamientos (plasma seminal 0.043 Hz y PBS 0.046 Hz). En plasma seminal las diferencias se dieron en la variable frecuencia. Para PBS los hallazgos son mínimos y aislados por lo tanto no determinantes para la respuesta electromotriz. Las diferencias encontradas entre los tratamientos Monta Natural, Plasma Seminal y PBS, son debidas principalmente a la variable frecuencia, es decir que la frecuencia de la corriente influye sobre la respuesta en algunos de los tres segmentos (UTE y TU) del tracto reproductivo de la coneja. Para la fase 2 en espermatozoides sin capacitar el UTE fue diferente de los otros segmentos en voltaje y contractilidad, para espermatozoides capacitados, la variable frecuencia fue diferente entre segmentos ( $P < 0.05$ ). Entre los dos tratamientos no se observaron diferencias para las variables ni para los segmentos. En cuanto a las correlaciones significativas, se observaron sólo en espermatozoides capacitados entre todas las variables ( $P < 0.05$ ), esto es relevante y probablemente sea debido a algún factor presente en los capacitados y que sería recomendable seguir estudiando. En conclusión este modelo experimental representa una opción para la experimentación *in vivo* de la actividad electromotriz del aparato reproductor de la coneja alrededor de la monta. La Monta Natural, el Plasma seminal y PBS producen una diferencia significativa en la actividad eléctrica (frecuencia). La presencia de espermatozoides capacitados y sin capacitar no producen diferencias en la actividad mecánica y eléctrica. La variable frecuencia de la corriente fue un factor determinante en la correlación entre la actividad mecánica y eléctrica.

## Abstract

Motility of uterine smooth muscle is very important throughout pregnancy, parturition and the period around mating; this activity plays an important role in sperm transport and during the process of capacitation. The interaction sperm-epithelial cell is a stimulating factor for the sperm to display a special sort of movement, hyperactivation, characteristic of *in vivo* capacitated spermatozoa. Thus, an increase in motility of uterine smooth muscle (uterine horns and tube) would be necessary when one sperm subpopulation show signs of capacitation such as hyperactivated motility. That increase in uterine motility would facilitate sperm detachment from oviduct epithelial cells. The purpose of this work was to characterize the mechanic and electric activity of three uterine segments of the rabbit after natural mating and under the presence of capacitated spermatozoa. Thirty nine adult rabbit does (New Zealand and FESC hybrids) 1.5 years old, 2 parturition at least, 3.9 Kg live weight, housed into cages, fed with commercial food, water *ad libitum*, were used for these experiments. Experimental work was carried out in two stages: Stage 1, ovulation was synchronized by eCG 20 UI 72 h before: 1) Natural mating 2) Seminal plasma (intrauterine infusion) and 3) PBS (intrauterine infusion). Stage 2, 1) Capacitated or 2) Non capacitated sperm populations were put into: i) Uterus horns (UTE) ii) Uterus-tubal junction (UTJ) and iii) Uterine tube (UT). Data was analysed by Friedman ANOVA for between uterine segments and one way ANOVA for differences between treatments; for possible correlation between mechanic and electric activity, the Spearman test was carried out. Results indicate that in the Stage 1, a significant difference was detected between treatments within segments regarding Electric Frequency in uterine horns considering experimental values: Seminal Plasma, 0.043; PBS, 0.046; Natural Mating, 0.076 Hz ( $P < 0.008$ ). Differences between treatments were mainly due to the variable Electric Frequency; that is, this variable influences the response of some of the three uterine segments (UTE, UTJ) of the rabbit. Stage 2, there were no differences between segments or when grouping segments between treatments (capacitated vs. non capacitated spermatozoa). A significant correlation was detected between electric and mechanic activity in the presence of capacitated spermatozoa ( $P < 0.05$ ). Regarding non capacitated spermatozoa, UTE was different from the other segments on voltage and contractibility; in contrast, for capacitated spermatozoa Electric Frequency was different between segments ( $P < 0.05$ ). Mechanic activity of the three different uterine segments was not different; in contrast, electric activity (frequency) of uterine horn was different from that of the other two segments when exposed to Seminal Plasma. It could be, seminal plasma compounds affect uterine horn muscle activity, important for early sperm transport. However, natural mating produced no effect in any uterine activity; it may be, the time period from mating to recording of uterine activity was inappropriate. Either capacitated or non capacitated spermatozoa produced no difference in uterus mechanic and electric activity; however, non capacitated spermatozoa produced significant difference in electric activity between segments. In conclusion, this experimental model represents an option for the *in vivo* assessment of electric and mechanic activity of rabbit uterus around mating. Natural Mating, Seminal Plasma and PBS produced a significant difference in electric activity (frequency). The presence of capacitated or non capacitated spermatozoa produced no difference in contractibility of any of the three uterine segments. However, a significant correlation between electric and mechanic activity was revealed when analysing the variable current frequency but not voltage.

## **1. Introducción.**

El proceso de reproducción en cualquier especie siempre ha sido de vital importancia para la producción animal. Así la actividad reproductiva de las hembras en las especies animales cobra tal relevancia que sin un buen manejo reproductivo no sería rentable cualquier explotación. El conocimiento de todo el proceso reproductivo nos conduce a lograr una productividad en el proceso lo cual implica mas gestaciones y nacimientos. El aparato reproductor de las hembras de los animales para producción presenta similitudes pero al mismo tiempo se observan diferencias importantes tanto en la anatomía como en la fisiología. Sin embargo tejidos como el músculo liso, componente primordial del útero, tiene características similares para todas las especies. Por tanto, las funciones que este tejido realiza se verán reflejadas en la función del órgano en su conjunto.

En las conejas, la pubertad se alcanza entre las 11 y 14 semanas de edad, el efecto de la estimulación ovárica al llegar la pubertad, se explica por la influencia a determinadas hormonas, nivel nutricional y el fotoperiodo. Estudios realizados por Gosalvez *et al.* (1994), sobre la pubertad en conejas indican un efecto nutricional sobre la ovulación a las 17 semanas.

La ovulación es un mecanismo fisiológico que funciona por vía aferente desde el aparato genital hasta el hipotálamo. Los estímulos desencadenantes suelen darse en las zonas erógenas, pero también influyen las feromonas olfativas y otros estímulos como los visuales y auditivos. El mensaje hormonal promueve la secreción del factor de liberación GnRh el cual a nivel de la hipófisis induce la secreción de las hormonas adecuadas para la ovulación (Khalifa, 1994).

Las conejas pueden ser inseminadas o montadas 11 días después del parto, aun cuando los gazapos destetados a los 35 días, por lo que al decrecer los intervalos entre partos se incrementa la prolificidad. Sin embargo, las hembras son menos receptivas y ovulan menos que aquellas inseminadas el día 12 o 19. En combinación la separación temporal de la camada y cambios ambientales pueden estimular mecanismos que involucran al SNC y al eje hipotálamo-hipófisis con un efecto positivo sobre los parámetros reproductivos. Por ejemplo la ausencia de amamantamiento antes de la monta en ritmos semintensivos,

decrecen las concentraciones plasmáticas de prolactina las cuales son esenciales para la lactación (Rebollar et al., 2006).

El aparato reproductor de la coneja está compuesto de una vagina muy amplia seguida de dos cervix, cada uno comunicando al cuerno uterino respectivo, y la tuba uterina bastante larga algunas veces más que el útero (Rodríguez, 1999).

La tuba uterina de un mamífero puede ser dividida en tres regiones anatómicas diferentes: infundibulum, ámpula e istmo, cada una asociada a distintas funciones fisiológicas. El infundibulum fimbriado en la porción rostral del oviducto, es responsable del transporte del ovocito dentro del tubo después de la ovulación (Bosch y Wright, 2005).

El ámpula representa una región tubular dilatada en la cual el proceso de fertilización es completado. El istmo está involucrado en el transporte de gametos y embriones y es considerado la base anatómica del reservorio espermático (Bosch y Wright, 2005).

Histológicamente, el istmo se caracteriza por un mayor grosor del órgano, debido particularmente a que la porción muscular (miosalpinx) presenta un mayor número de capas; la mucosa presenta pocos pliegues y el epitelio es predominantemente secretor (Anzaldúa *et al.*, 2003). La pared de la tuba uterina está comprendida por tres capas distintas: una externa serosa llamada mesosalpinx; una intermedia de doble capa llamada miosalpinx; y una interna llamada endosalpinx. Esta última también es llamada mucosa de la tuba uterina, consiste en una capa de células epiteliales columnares ciliadas y no ciliadas. arregladas en pliegues, los cuales incrementan en complejidad la unión útero-tubal al ostium (Bosch y Wright, 2005). Por otra parte la unión istmo-ampular actúa como un esfínter muscular, que controla el transporte del óvulo hacia el útero.

En el caso de la coneja el incremento en el grosor de la pared y la menor distensibilidad del istmo en comparación con el ámpula, explican por sí mismos la retención pasiva del embrión y no sólo de manera específica en la unión istmo-ampular, por lo que aparentemente en esta especie, la acción del esfínter no es un mecanismo activo sino que corresponde a razones anatómicas. La unión útero-tubarica se abre de manera exclusiva los días tres o cuatro de la gestación, que corresponde con el paso del cigoto hacia el útero.

Las secreciones de la mucosa de la tuba uterina juegan un papel trascendente en el desarrollo embrionario; en la coneja se añade al ovocito una cubierta albuminoide externa (Anzaldúa *et al.*, 2003).

Se ha postulado que la región del ámpula tiene un mayor grado de secreción, en relación con el istmo, debido a que presenta mayor número de pliegues y de superficie epitelial que favorecen los procesos de extravasación de sustancias a partir del plasma sanguíneo. Además en las conejas se ha identificado el factor natriurético atrial, el cual probablemente tenga algún efecto sobre el flujo sanguíneo y la extravasación de ciertos iones a la tuba uterina.

La tuba uterina está involucrada de manera importante en la supervivencia de los embriones, participando en funciones específicas del proceso reproductivo como: transporte de gametos, capacitación espermática, reacción acrosomal, fertilización, dirección de las primeras divisiones mitóticas del embrión y transporte del mismo hacia el útero para la implantación. El fluido de la tuba uterina consta de dos componentes: 1) el trasudado selectivo de moléculas y iones procedentes del suero y 2) el producto de la síntesis de moléculas específicas, estas últimas varían de acuerdo a la región, y tienen efecto trófico en el embrión favoreciendo el crecimiento y la multiplicación inicial (Anzaldúa *et al.*, 2003).

En este trabajo se caracterizó la motilidad y la actividad eléctrica (frecuencia en Hertz e intensidad de la respuesta en Volts) del tracto reproductivo de la coneja y la interacción de éste con la capacitación espermática con la finalidad de comprobar que la actividad electromotriz de los segmentos del útero podría estar influyendo de manera secuencial en el proceso de almacenamiento, sobre los cambios bioquímicos de la capacitación y en la hiperactivación de los espermatozoides fecundantes. Los beneficios de este conocimiento reproductivo podrán verse reflejados en el aumento de la producción.

## **2. Antecedentes**

### ***2.1 Contracción del músculo liso uterino***

El músculo liso se encuentra ubicado en distintos lugares formando órganos o parte de ellos. Morfológicamente, se ha dividido en dos: a) Músculo multiunitario, formado por fibras aisladas o pocas fibras unidas entre sí que se comportan como unidades aisladas con funciones específicas, b) Músculo unitario, forma láminas con las fibras lisas que funcionan como una unidad dando la propiedad de plasticidad, capaz de resistir grandes tensiones, este músculo se encuentra en vísceras huecas, como el tracto uterino. La contracción del músculo liso es involuntaria y su actividad está regulada por nervios autónomos y por diversos tipos de señales hormonales (Berne-Levy, 2001).

El músculo liso se puede acortar para vaciar la víscera, esto se denomina contracción fásica. Pero también se puede contraer isométricamente durante largos periodos a fin de mantener las dimensiones del órgano, a esto se le llama contracción tónica. ( Berne-Levy 2001).

Las unidades contráctiles constan de filamentos finos (actina) unidos a un citoesqueleto, que se superponen a un número mucho menor de filamentos gruesos (miosina). Los filamentos están alineados a lo largo del eje mayor de la célula. Además de estas proteínas también interactúan la tropomiosina y la calmodulina, ésta última se une al calcio para iniciar el proceso de contracción ( Berne-Levy 2001). La actividad mecánica del músculo liso está precedida por una actividad eléctrica, la cual puede ser evaluada mediante un electroenterograma (EEnG) o electromiograma (EMG), estas dos actividades pueden ser registradas simultáneamente definiendo en su conjunto la actividad del músculo liso (Martínez de Juan et al., 2000).

La actividad eléctrica del músculo liso es valorada de dos maneras 1) la amplitud de la onda eléctrica que se mide en milivolts presenta dos tipos de ondas: asincrónicas alfa y sincrónicas beta. Las ondas alfa son irregulares y de baja amplitud, mientras que las ondas beta son regulares e incrementan la contracción. 2) La frecuencia del voltaje es el número de ciclos por segundo (Hertz), el espectro de frecuencia de las ondas alfa y beta se encuentra entre 0.03 y 2 Hz. (Shenbaga y Ravindran, 1996). El músculo liso del útero,

intestino y vejiga urinaria poseen una actividad eléctrica en la forma de ondas lentas y picos de rápida actividad o potenciales de acción que inician la actividad de contracción en estos órganos (Shafik et al., 2004).

El control de la motilidad del músculo liso uterino es de vital importancia durante la gestación y el parto. Sin embargo, también lo es durante el periodo alrededor de la cópula, ya que este movimiento puede desempeñar un papel preponderante para el transporte espermático y durante la capacitación espermática. La actividad del músculo liso uterino está regulada principalmente por una serie de hormonas: estrógenos, progesterona, oxitocina y prostaglandinas que suprimen o activan la motilidad (Spilman *et al.*, 1976).

Cuando ocurre la monta o una hembra es inseminada artificialmente (IA), los espermatozoides tienen que viajar desde el sitio donde son depositados hasta encontrar el óvulo. La fase de transporte espermático rápido es un evento pericoital, caracterizado por la presencia de espermatozoides en los oviductos minutos después de la monta o inseminación artificial (Scott, 2000). Esta tasa de transporte es mucho más rápida que la velocidad de los espermatozoides nadando, consecuentemente el transporte se atribuye a la contractibilidad muscular del tracto femenino y a cambios en la presión intraluminal del mismo (Scott, 2000).

Se ha observado que el incremento en la contractibilidad del mesosalpinx en la región ampular, durante el periodo preovulatorio puede ser dado por gradientes de temperatura. En el istmo, la capa de músculo liso localizada entre la mucosa y la serosa, está bien desarrollada y se encuentra profusamente inervada por fibras colinérgicas del sistema nervioso simpático que controla la contracción tónica del músculo. Además, un alto número de receptores adrenérgicos está presente en las células de la capa circular de músculo liso por lo que la estimulación de éstos podría significativamente reducir el lumen de la tuba uterina. Por otra parte los altos niveles de estrógenos durante el celo podrían incrementar la tonicidad de la contracción del músculo liso, efecto probablemente mediado a través de receptores adrenérgicos. Más aun, los estrógenos provocan también la obstrucción de la tuba uterina por incrementar la altura del epitelio mucosal y por provocar edema de la pared

de la tuba uterina. Todos estos factores, aunado a cambios en la dirección o intensidad del movimiento ciliar, parecen estar involucrados en la viabilidad del espermatozoide en el istmo caudal antes de la ovulación (Bosch y Wright, 2005).

Trabajos similares en borregas han mostrado un incremento en la actividad de la motilidad cervical cuando se tratan con progesterona y eCG (Gonadotropina Coriónica equina, por sus siglas en inglés) comparado con las que presentaron celos naturales, esto sugiere que las hormonas exógenas utilizadas en protocolos de sincronización no tienen una acción supresora sobre la motilidad cervical durante el periodo pre-ovulatorio, aunque también se encontró un aumento en la actividad de la capa muscular durante la monta (Cavaco-Gonçalves *et al.* 2006).

La medición de la actividad eléctrica del músculo uterino se realiza por medio del electrohisterograma (EHG). Éste es un registro que se puede realizar sobre la pared abdominal o *in situ* sobre el órgano. Una desventaja de este registro es que puede ser corrompido principalmente por otras señales eléctricas producidas por distintos órganos. En el caso de una hembra gestante, el EHG y el ECG (Electrocardiograma) materno tienen un espectro coincidente. El EHG es una señal externa de muy baja amplitud (debajo de 1 mV) cuyo registro ha sido hecho muy cuidadosamente desde que la magnitud de la señal depende de la impedancia de los electrodos y de las características de la piel. Su principal energía está en el rango de 0.2 a 3 Hz.

La contracción mecánica uterina es una consecuencia de la actividad eléctrica de las células lisas uterinas. Esta actividad eléctrica representa la suma de las actividades eléctricas de las células uterinas bajo los electrodos (Leman y Marque, 2000). Un estudio en yeguas reveló que la contractilidad de la capa de músculo longitudinal fue mayor a la del circular en cuanto al área bajo la curva (amplitud de la respuesta). Con respecto a la frecuencia, los valores registrados durante el estro fueron mayores en el músculo circular (Hirsbrunner *et al.*, 2001).

Se cree que las contracciones uterinas juegan un importante papel en el transporte de las células espermáticas en la tuba uterina después de la inseminación y son absolutamente necesarias para el transporte espermático a través de los cuernos uterinos. Sin embargo, este papel no está claro todavía ya que la estimulación intensiva de las contracciones uterinas,

usando hormonas, también puede reducir la tasa de fertilización probablemente por un incremento en el reflujo de células espermáticas durante la inseminación (Langendijk et al., 2005).

## ***2.2 Transporte espermático***

Una fase rápida de transporte es seguida por una fase prolongada de migración espermática, durante la cual la distribución de espermatozoides en el tracto femenino continúa y se establecen los reservorios. Es durante esta última fase, que los espermatozoides competentes arribarán a la tuba uterina; este evento toma de 1 a 2 horas en la cerda y de 1.5 a 6 horas en la coneja (Scott, 2000).

Por otra parte la motilidad *per se* no asegura el éxito en la migración espermática, por ejemplo puede haber fallas a nivel de la interacción epitelio-espermatozoide. Estudios con ratones transgénicos, han mostrado que alteraciones de las proteínas de la superficie espermática pueden comprometer la migración del espermatozoide, que de otro modo desplegaría una motilidad normal (Scott, 2000). Estas proteínas son la fertilina y la isoenzima testicular de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE), distintivas de la superficie espermática. Scott (2000), sugiere que las proteínas de superficie son elementos funcionales importantes en el proceso de transporte espermático y en el estrés.

Después de la monta, los espermatozoides de mamíferos se transportan hacia la parte baja del istmo de la tuba uterina. Los espermatozoides son secuestrados en el istmo por su unión e interacción con células epiteliales del oviducto, formando un reservorio espermático (Green *et al.*, 2001).

En todas las especies mamíferas estudiadas a la fecha, las células espermáticas permanecen arrestadas en el istmo caudal antes de la ovulación, formando el reservorio oviductal. La manipulación del reservorio espermático representa una herramienta potencial para mejorar la eficiencia reproductiva (Bosch y Wright, 2005).

### **2.3 Formación del reservorio espermático**

Se ha hipotetizado que uno de los factores involucrados en la formación del reservorio espermático, es el contacto directo entre espermatozoides y células epiteliales de la tuba uterina (en inglés, Oviductal Epithelial Cells, OEC) y éste es el principal mecanismo en la formación del reservorio espermático. Otros factores como las secreciones mucosas, las propiedades químicas del fluido oviductal, los gradientes de temperatura, pueden contribuir en diferentes grados al establecimiento de tal reservorio espermático (Suárez et al., 1998). En hamsters, el ácido sialico y la fetuina (una sialo-glicoproteína) reducen el número de espermatozoides adheridos a explantes oviductales sugiriendo que la interacción es mediada al menos en parte por estas moléculas. En cerdos la formación del reservorio espermático parece involucrar la interacción de ligandos del oligosacarido manosil en las células oviductales con la unión de moléculas en la superficie espermática. En bovinos datos experimentales indican que la fucosa es el carbohidrato reconocido de manera particular en el sitio de unión del epitelio de la tuba uterina. Mas allá, la caracterización de esta interacción establece que una molécula de trisacarido está involucrada en la unión de células de la tuba uterina a los espermatozoides. Este oligosacarido el cual tiene una molécula de fucosa en su composición tiene una gran habilidad para inhibir la adherencia de espermatozoides a las OEC (Bosch y Wright, 2005).

Otro de los sitios de reserva de espermatozoides, en el cerdo, la unión útero-tubárica (UTB) y el bajo istmo de la tuba uterina, son considerados como reservorios espermáticos funcionales porque los espermatozoides pueden sobrevivir en estas regiones a lo largo de 24 horas después de la IA (Scott, 2000). El contacto físico entre los espermatozoides y las OEC en sistemas de cultivo, ha demostrado que éste es el principal factor estimulador de las características del movimiento espermático (hiperactivación); esto podría ser un mecanismo muy importante de la capacitación *in vivo* (Kervancioglu *et al.*, 2000).

En la coneja, los reservorios espermáticos como: la vagina, el cervix y el útero mantienen cada uno una población de espermatozoides con motilidad progresiva hasta por 16 horas después de la monta (Scott, 2000). En la coneja, la cual no ovula espontáneamente, el

reservorio del istmo acumula numerosos espermatozoides normales después de la IA, pero éstos no se encuentran en lo alto de la tuba uterina a no ser que la ovulación sea inducida. En el caso de la perra, la motilidad de los espermatozoides puede persistir en el lumen del útero a lo largo de 11 días (Scott, 2000).

Una relación estrecha entre espermatozoides y epitelio luminal en el tracto femenino parece ser importante para la supervivencia de los espermatozoides en los reservorios. Sin considerar especies, lugares o tiempo del almacenaje, durante el periodo de almacenaje los espermatozoides se encuentran desplegados en una línea típica, lado por lado, colocados con sus cabezas asociadas estrechamente con el epitelio luminal. En las especies domésticas, las observaciones de espermatozoides *in situ*, seguida de IA han demostrado interacciones similares espermatozoides-epitelio en las regiones de acumulación espermática (Scott, 2000).

Por otra parte el análisis de las interacciones entre espermatozoides vivos del ratón y el epitelio de la tuba uterina en tubas que fueron retiradas, ha hecho posible proponer dos mecanismos posibles para la retención espermática en el istmo: 1) la adherencia hacia el epitelio o 2) la inmovilización. En la coneja, la motilidad del semen se ve suprimida en fluidos nativos recuperados del bajo istmo por lo que es un mecanismo propuesto de su retención en ese sitio (Overstreet, 1980). Por otro lado los espermatozoides son secuestrados por la adhesión a células epiteliales de la tuba uterina, resultando en la formación de un reservorio espermático localizado primariamente en el bajo istmo de la tuba uterina. El reservorio espermático del istmo no solo sirve como un sitio de almacén para la oportuna coordinación de la fertilización, también mantiene la habilidad del espermatozoide para fertilizar (Green *et al.*, 2001).

Green *et al.* (2001) observan que en la especie porcina, los espermatozoides se encuentran distribuidos de 0 a 44 por célula epitelial, existiendo diferencias entre individuo en el número de espermatozoides ligados a las células epiteliales. Aproximadamente de 2 a 5% de las células epiteliales tienen cilios largos y una figura distorsionada. Micrografías electrónicas revelan que todas las uniones entre los espermatozoides con las células epiteliales son en la porción apical de la cabeza del espermatozoide y que todos ellos

conservan acrosomas intactos. Aunque las microvellocidades de las células epiteliales son de varias longitudes, esto no afecta el número de espermatozoides adheridos y se ha visto que el número de espermatozoides adheridos a las células epiteliales se incrementa con el aumento de la concentración espermática, esto también es similar en espermatozoides bovinos unidos a monocultivos de tuba uterina (Green *et al.*, 2001).

Otros datos adicionales afirman que el contacto físico entre los espermatozoides y las células epiteliales en sistemas de cultivo muestran que éste es el principal factor estimulador en las características del movimiento espermático y que esto puede ser el principal mecanismo de la capacitación *in vivo* de los espermatozoides (Kervancioglu *et al.* 2000).

En otras especies se ha demostrado la inhibición efectiva de la unión espermática-células epiteliales empleando grandes moléculas de carbohidratos. Las glicoproteínas inhiben más efectivamente la unión que aquellas sub-unidades de monosacáridos. Green *et al.* (2001), sugieren que estas diferencias pueden ser debidas al decremento en la afinidad de la unión de monosacáridos en comparación con los oligosacáridos. Ensayos de las interacciones indican que la alta afinidad de la unión de oligosacáridos puede ser debida a un segundo sitio de unión en el dominio de reconocimiento del carbohidrato

La mediación del reconocimiento de carbohidratos durante la unión espermatozoides-células epiteliales parece ser específica de especies. En todas las especies estudiadas a la fecha, diferentes carbohidratos proveen una inhibición efectiva de la unión de espermatozoides y células epiteliales. En ganado, la fucosa y la glucoproteína fucoidina son potentes inhibidores de la unión de espermatozoides. Green *et al.* (2001), mencionan que los disacáridos maltosa y lactosa y el monosacárido manosa inhiben la unión del semen de verraco con las células epiteliales de tuba uterina.

Las selectinas, (lectinas tipo C, moléculas de adhesión) conocidas por tener baja afinidad para monosacáridos y una unión específica con grandes oligosacáridos, han sido caracterizadas por su papel en la mediación de interacciones temporales entre leucocitos y plaquetas durante la inflamación o respuesta infecciosa (Green *et al.*, 2001). Un modelo posible para las interacciones de las células epiteliales de la tuba uterina de mamíferos puede involucrar interacciones con las selectinas y lectinas tipo C.

El transporte y supervivencia de los espermatozoides es de vital importancia para que cumplan su cometido de fertilizar al óvulo, aquí están implicadas la motilidad espermática y la motilidad del músculo uterino. En yeguas, los espermatozoides que han alcanzado la tuba uterina pueden ser almacenados en estado funcional por varios días (Troedsson *et al.*, 1998).

Yao *et al.* (2000) dan una evidencia de que las células de la tuba uterina humanas producen factores que mantienen la motilidad espermática, y que sólo se requiriere de 5 horas para que las células secreten suficiente cantidad de factores para mantener la motilidad. En este estudio, un péptido del fluido folicular humano, termoestable, con peso molecular menor a 1000 Da mantiene la motilidad espermática. Un factor de 1885 Da de ovocitos de erizo de mar, conocido como speract, también estimula la motilidad espermática. Los factores que mantienen la motilidad son resistentes a la proteinasa K, probablemente porque el péptido no contiene aminoácidos alifáticos o aromáticos, esto interesaría para determinar el efecto de otras proteasas en sitios específicos sobre la actividad del péptido. Igualmente, Yao *et al.* (2000) proveen evidencia de que la secreción de las células epiteliales también juega un papel en este proceso. El mecanismo por el cual la presencia del péptido afecta la motilidad espermática es desconocido, pero pudiera actuar a través de la modificación del balance de  $Ca^{2+}$ , del AMPc o del pH, factores conocidos que afectan la motilidad espermática.

Otro estudio muestra que las proteínas de la tuba uterina bovina (>8 kDa) derivadas de fuentes *in vivo* e *in vitro* afectan la viabilidad, el estatus acrosomal y la motilidad de los espermatozoides bovinos (Boquest *et al.*, 1999). Estos resultados apoyan las conclusiones de otras investigaciones, en que se han medido diferentes parámetros, incluyendo la motilidad, viabilidad, estatus acrosomal y habilidad para fertilizar ovocitos de espermatozoides bovinos obtenidos de oviductos. En cultivos de células epiteliales o incubadas en fluido de la tuba uterina ocurren cambios específicos de la función de los espermatozoides (Boquest *et al.*, 1999).

En bovinos, también se encontró una glicoproteína de 95 kDa presente en el fluido de la tuba uterina en concentraciones elevadas alrededor del estro, la cual prolongó la viabilidad de espermatozoides bovinos. Los mecanismos de las proteínas de la tuba uterina están

dirigidos a la protección de las membranas de los espermatozoides del daño oxidativo y proteolítico, mantenimiento la integridad de la membrana por retraso en la capacitación, neutralización tóxica por productos del metabolismo y reducción del metabolismo (Boquest *et al.*, 1999).

La acción protectora de la proteína del fluido seminal (SFP) ha sido atribuida a la supresión del metabolismo espermático y a la reducción de la peroxidación lipídica debida a la función redox de la proteína (Boquest *et al.*, 1999).

#### **2.4 Capacitación espermática**

La capacitación es un fenómeno bioquímico complejo que involucra profundas modificaciones en la organización de la membrana plasmática, aumento en la permeabilidad de la misma, disminución en el contenido de fosfolípidos y cambios en su carga neta (Berne-Levy, 2001). Ocurren muchos cambios intracelulares durante la capacitación como son: el incremento en la fluidez de la membrana, el flujo de colesterol, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la concentración de AMPc, fosforilación de proteínas en tirosina, cambios en los patrones natatorios y motilidad quimiotáctica (Breinbart, 2002; Berne-Levy, 2001). El proceso de capacitación puede involucrar una considerable remodelación de la membrana plasmática del espermatozoide (Harrison y Gadella, 2005)

Los primeros estudios sobre capacitación de espermatozoides llevados a cabo por Austin (1951) y Chang (1951), sobre la necesidad de la permanencia por cierto tiempo de los espermatozoides de conejo en el tracto de la coneja para poder ser fértiles, fueron más tarde retomados por Brackett y Oliphant (1975) quienes capacitaron espermatozoides de conejos en un medio hiperosmótico (altamente iónico) lograron la fertilización de óvulos y el trasplante de embriones. Más tarde, Hosoi *et al.* (1981) retomaron los trabajos de Brackett y Oliphant (1975) y demostraron la capacitación *in vitro* de espermatozoides de conejo, obtenidos del epidídimo en el medio HIS (medio altamente ionico) en un tiempo de 10 a 10.5 horas logrando la fertilización de los óvulos de coneja después de 1 a 1.5 horas de inseminadas. En contraste, Lambert *et al.* (1984) obtuvieron resultados contradictorios, por un lado aumentó la tasa de fertilización de espermatozoides lavados con el medio HIS e

incubados en un medio isotónico, pero por otro lado, encontró mejores resultados cuando esos espermatozoides eran lavados e incubados en un medio isotónico adicionado de fluido folicular al 5%. Estos autores sugieren que la variabilidad entre machos puede ser la fuente de estos resultados contradictorios y que estos factores del macho determinan el éxito de la capacitación.

Estudios *in vitro* han mostrado que la unión de los espermatozoides con las células de la tuba uterina y productos solubles presentes en un medio acondicionado ocasionan que la tuba uterina produzca un potente factor capacitante. La evidencia experimental presentada sugiere que el contacto de espermatozoides con OEC y las secreciones del epitelio de la tuba incrementan la capacitación espermática; la capacitación espermática está asociada a la reducción del lapso de vida de las células espermáticas (Bosch y Wright, 2005).

Muchos autores separan la reacción acrosomal de la capacitación y consideran la capacitación como una preparación para la reacción acrosomal. Durante los últimos 30 años, se han encontrado muchos cambios en la membrana a nivel molecular e inmunológico de espermatozoides que se preparan para cambios fisiológicos como la hiperactivación y cambios morfológicos como la reacción acrosomal. Estos eventos se dirigen hacia una motilidad más vigorosa y a la liberación de varias enzimas para la penetración del óvulo. Existen cambios definidos antes de la hiperactivación y reacción acrosomal pero estos cambios son parte de la capacitación (Chang, 1984).

En rumiantes y primates, el proceso de capacitación espermática se inicia en el cervix con la remoción de las proteínas de la superficie espermática, esto debido a que los espermatozoides nadan a través de la estructura cervical (Scott, 2000).

Estudios de Seitz *et al.* (1970) demostraron que la capacitación de los espermatozoides del conejo se llevaba a cabo en la tuba uterina, aunque ésta también se ve favorecida en el útero y en la unión útero-tubal en un tiempo mínimo de 8 horas, En el trabajo de Seitz *et al.* (1970), los espermatozoides recuperados del útero a las 36 horas post-coito fueron aún capaces de fertilizar óvulos. Akruk *et al.* (1979), lograron la capacitación espermática *in*

*vitro* adicionando 20% de suero de conejo calentado al medio de incubación en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 8% de O<sub>2</sub> y 87% de N<sub>2</sub> en un tiempo de 12 horas.

Es bien conocido que la capacitación de los espermatozoides está asociada con la hiperactivación, la cual es importante en la penetración de la zona pelucida y en el transporte a través del moco oviductal. Un complejo proteínico conteniendo IGF-I (factor de crecimiento semejante a insulina) ha sido aislado del plasma seminal de conejo, los receptores para éste se han identificados en el espermatozoide de conejo. La adición de forma aislada de IGF-I a espermatozoides mostró efectos sustanciales en la motilidad espermática así como la inducción de la reacción acrosomal en los espermatozoides capacitados (Minelli *et al.*, 2001).

El movimiento de hiperactivación y capacitación de los espermatozoides libres en el lumen de la tuba uterina parecen ser inducidos por glicaminoglucanos (GAGs). En muchas especies de mamíferos, la mayoría de los espermatozoides en las tubas uterinas se ha encontrado adheridos a las células epiteliales de la tuba uterina (OEC) hasta la ovulación (Kawakami, 2001). La viabilidad y motilidad de los espermatozoides equinos se prolonga por la adhesión a las OEC y el flujo de Ca<sup>2+</sup> hacia los espermatozoides, el cual se requiere para inducir la capacitación espermática (Kawakami *et al.*, 2001).

Para que los espermatozoides puedan residir temporalmente en la tuba uterina, la secreción de GAGs (ácido hialurónico y heparansulfato) participan en la obliteración del lumen para formar el reservorio espermático, así mismo existe una importante secreción de proteínas, que son proteínas séricas y proteínas sintetizadas en el epitelio de la tuba uterina, esta síntesis es regulada por hormonas esteroideas. Dentro de estas proteínas se encuentran la oviductina, la proteína de secreción del oviducto (OSP), las glicoproteínas específicas del oviducto asociadas a estrógenos (OSGP) y la glicoproteína estrógeno dependiente específica de oviducto (OGP). Estas proteínas son exclusivas de la tuba uterina y están altamente conservadas entre las especies de mamíferos (García, 2006)

El fluido de la tuba uterina es un inductor del transporte espermático, asimismo el fluido de muchas especies (Kawakami *et al.*, 2001) incluyendo el perro, induce la capacitación

espermática; se han encontrado que los (GAGs) del fluido de la tuba están asociados también con la hiperactivación y reacción acrosomal de los espermatozoides. Kawakami (2001), demostró que espermatozoides de perro adheridos a OEC homólogas mantienen la viabilidad y motilidad e inhiben la reacción acrosomal por los efectos de la adhesión de estas células.

En otros estudios en conejos se mostró que espermatozoides incubados con células epiteliales o en un medio de cultivo tienen una habilidad similar de fertilización (Lee *et al.*, 1990).

En la coneja el óvulo puede ser encontrado en la tuba uterina 10 a 18 horas después de la ovulación. Hallazgos *in vivo* en los cuales se recuperaron espermatozoides del útero de coneja 16 horas post-copulación, mostraron que éstos tenían más alto potencial de fertilización que los espermatozoides recuperados después de 12 o 24 horas (Rovasio, 2004).

La comparación entre espermatozoides de humano y de conejo sugiere que el tiempo y duración del estado de capacitación, es programado en mamíferos de acuerdo al tiempo de la disponibilidad del óvulo en la tuba uterina, tiempo extendido en ovuladoras periódicas y corto en ovuladoras por inducción, esta situación aparentemente maximiza la posibilidad de que un óvulo liberado (ovulado) encuentre espermatozoides en mejor estado funcional. (Rovasio, 2004).

En la capacitación de espermatozoides humanos, sólo una pequeña fracción de la población espermática se capacita en un tiempo dado o sea que diferentes sub-poblaciones de espermatozoides obtienen este estado en diferentes espacios de tiempo, resultando un continuo reemplazo de células capacitadas dentro de la población espermática (Rovasio, 2004). Sin embargo, la prolongada disponibilidad de los espermatozoides capacitados no sería ventajosa para los mamíferos que ovulan en respuesta a la monta, como la coneja.

Cuando el espermatozoide se mueve del istmo hacia la ampolla es claro que la motilidad es importante. (Knobil, 1994). Los seminolípidos que se encuentran en la capa externa de la membrana plasmática son desulfurados por la arisulfatasa previo al proceso de

traslocación de fosfolípidos que se da en la capacitación ( Flesch y Gadella , 2000; Soto y Medrano, 2008)

El plasma seminal en el cual están contenidos los espermatozoides es un fluido proveniente de la próstata, vesículas seminales y bulbouretrales y contiene elementos como: fructosa,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , LH, FSH, prolactina, testosterona, estradiol, oxitocina, endorfinas y enzimas, que intervendrán también en el proceso de capacitación espermática (Berne-Levy, 2001; Hafez, 1987, Knobil, 1994). Otra hormona que estimula, la progesterona, el mecanismo de capacitación espermática, parece ser que el receptor para progesterona está regulado por el fluido del plasma ya que lo cubre, por lo que no se une a la progesterona, pero durante la capacitación reaccionarán en respuesta a la exposición a la misma (Soto y Medrano, 2008). Los movimientos semejantes a hiperactivación causados por el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pueden acelerar la liberación de los espermatozoides de las OEC ( Kawakami, 2001).

Parece ser que la progesterona del fluido folicular que fluye en el lumen del oviducto con el óvulo después de la ovulación, promueve los movimientos de hiperactivación de las uniones OEC-espermatozoides para que estos sean liberados y, estén disponibles para la fertilización ( Kawakami, 2001).

Lo anterior ya había sido estudiado por Dhindsa *et al.* (1995) quienes experimentaron capacitando espermatozoides de búfalo en el tracto uterino de hamsters, se observó un efecto significativo en los procesos de capacitación y reacción acrosomal en animales sensibilizados con estrógenos y progesterona.

Los espermatozoides contienen un receptor específico de superficie para progesterona que permite el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  por apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. Este receptor puede pertenecer a una nueva familia de receptores esteroides (Gadella *et al.*, 2001). Es conocido también que la capacitación del espermatozoide humano se logra por el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia la célula ( Kawakami, 2001). Este efecto se ha reproducido *in vitro* usando el ionóforo A23187 para cationes bivalentes, el cual forma un complejo lipolítico con los iones de calcio, para transportarlo a través de la membrana del espermatozoide permitiendo una completa reacción acrosómica (Hewitt, 1998; Rovasio, 2004). El uso del ionóforo A23187 para la inducción de la reacción acrosomal en espermatozoides de

mamíferos se logra en muchas especies incluyendo al humano, conejo y carnero; la incubación por 60 minutos con ionóforo A23187 promueve la capacitación y reacción acrosómica en espermatozoides caninos (Hewitt y England, 1998).

Los movimientos hiperactivos del espermatozoide canino requieren de un incremento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Al mismo tiempo, el movimiento activo de los espermatozoides y el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la célula afectan negativamente el mantenimiento de la viabilidad y vida fértil de espermatozoides en las tubas uterinas (Kawakami *et al.*, 2001). El flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citoplasma ha sido encontrado como inhibidor en la unión OEC-espermatozoides ( Bosch y Wright , 2005).

Existen varias vías que pueden estar participando en el proceso de capacitación. Dentro de éstas están involucrados constituyentes básicos y segundos mensajeros. Los principales constituyentes que inician o regulan la capacitación son: la albúmina sérica, el calcio y el bicarbonato.

Dentro de los efectores y segundos mensajeros se encuentra el AMPc, la fosforilación de proteínas en tirosina, el pH intracelular, el potencial de membrana, los radicales libres, la heparina y la glucosa. El flujo de salida del colesterol de la membrana plasmática mejora la permeabilidad del  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , llevando a cabo la activación de la enzima adenilciclase resultando en la producción de AMPc el cual activa a la protein cinasa (PKA) llevando a cabo la fosforilación de proteínas en tirosina. Esta fosforilación puede también ocurrir vía activación del EGFR (receptor de tirosina cinasa). El alto grado de fosforilación causa la polimerización de la actina F y la traslocación de PLC en la membrana plasmática (Gadella *et al.*, 2001; Hsiao Chang *et al.*, Breinbart, 2002; Harrison *et al.*, 2005) Harrison y Gadella (2005) encontraron que la depleción del colesterol en la membrana mediada por albúmina, sólo ocurre si la mezcla de los lípidos de la membrana ha sido inducida con bicarbonato.

La regulación de la concentración de calcio intracelular es un mecanismo dentro del espermatozoide que involucra a la membrana plasmática a los almacenes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y más concretamente al acrosoma y a la mitocondria (Breinbart, 2002). La membrana plasmática y acrosomal contienen bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ , las células remueven  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol (Breinbart, 2002). Depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  han sido detectados en el acrosoma (Breinbart, 2002).

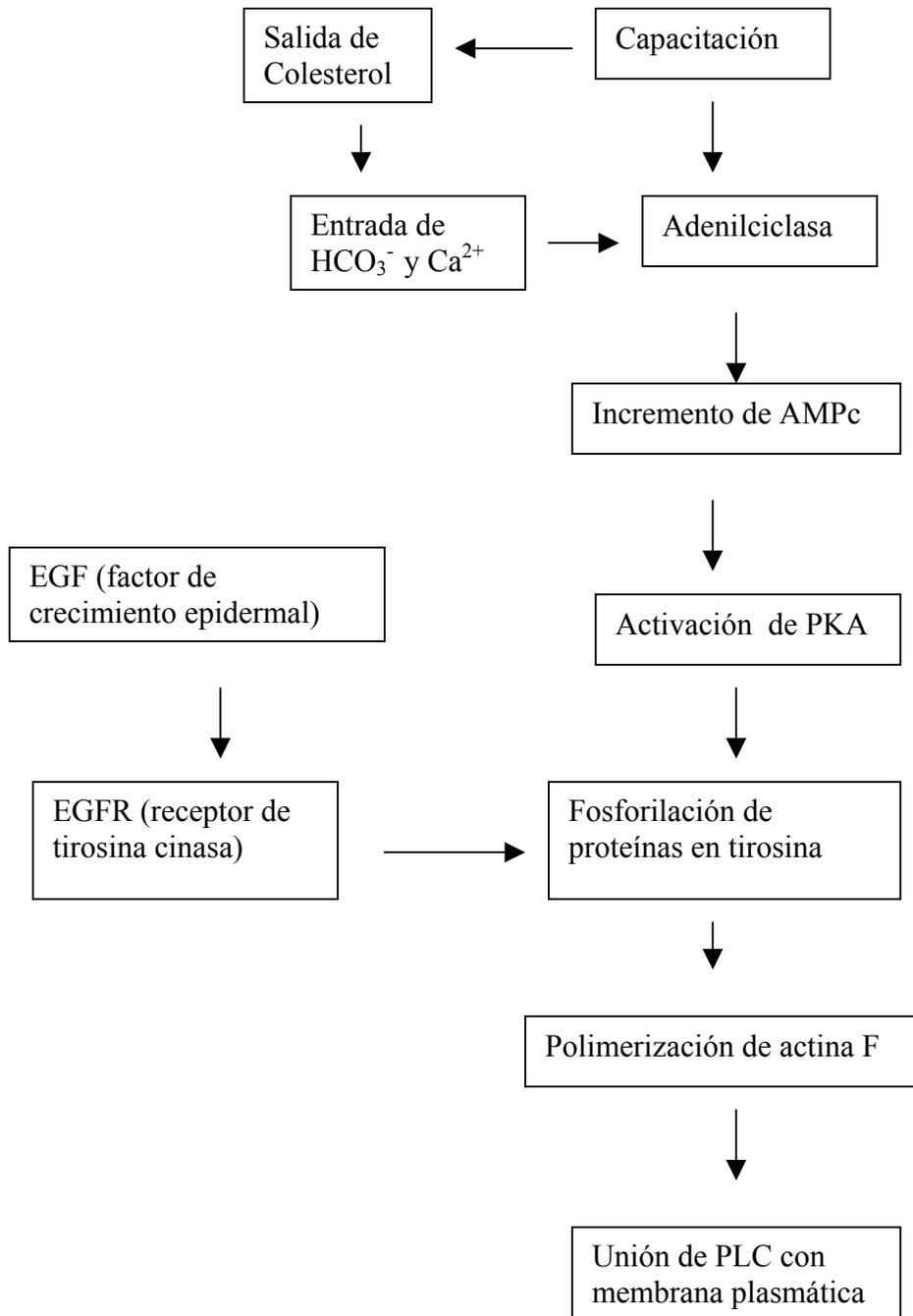
Se ha demostrado la existencia de almacenes de  $\text{Ca}^{2+}$  no mitocondrial que activan la acumulación por una bomba ATP dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$

En el espermatozoide capacitado la unión del receptor espermático a la zona pelúcida activa, probablemente, un canal selectivo para cationes, guiando a la membrana a la despolarización y a un incremento en la activación de las proteínas G, dependiente del pH intracelular, seguida por la apertura del canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , dependiente de voltaje, y al consiguiente incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (Breinbart, 2002). En espermatozoides bovinos, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se incrementa de  $25 \pm 10$  a  $160 \pm 40$  nM, esto durante la incubación bajo condiciones de capacitación. El flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  está involucrado en la reacción acrosomal.

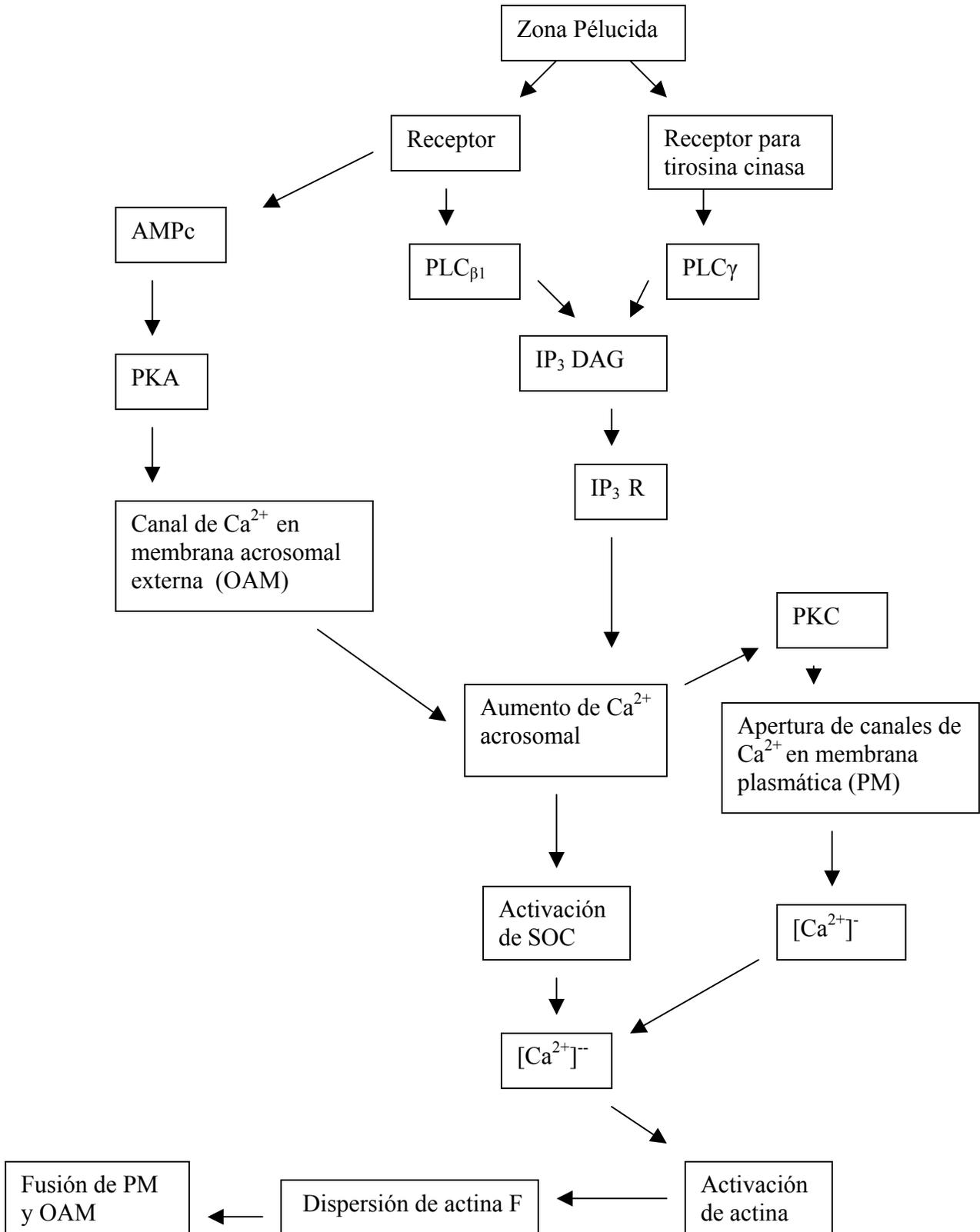
Otra vía sugerida en la reacción acrosomal es la unión del espermatozoide con la zona pelúcida puede activar la adenilciclasa para formar AMPc el cual activa a PKA para abrir los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana acrosomal (Breinbart, 2002; Gadella et al., 2001; Hsiao Chang et al 2006), dando como resultado que el  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el citosol espermático esté incrementado y la PLC sea activada para producir  $\text{IP}_3$  y diacil-glicerol. El diacil-glicerol puede activar la PKC para abrir el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática, el  $\text{IP}_3$  puede causar la liberación acrosomal de  $\text{Ca}^{2+}$  vía la compuerta  $\text{IP}_3$ -canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , resultando en una depleción de  $\text{Ca}^{2+}$  en el acrosoma y activando el mecanismo capacitante de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Breinbart, 2002).

Este paso final causaría una relativa elevación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , de este modo provocando la desestabilización de la proteína actina F, participando en la dispersión de la barrera de esta proteína que se interpone entre la membrana plasmática superpuesta sobre la acrosomal externa. Por lo que las membranas podrían luego ser capaces de entrar en contacto y fusionarse, liberando el contenido acrosomal y completando la reacción acrosomal (Breinbart, 2002)

## Capacitación (Breinbart, 2002)



# Reacción Acrosomal (Breinbart, 2002)



Por otra parte en conejos, algunos reportes indican que el semen de diferentes machos difiere en el tiempo de capacitación, en tuba uterina 10 horas (Abney y Williams, 1970), *in vitro* 12 horas (Akruk et al, 1979), otros reportes sugieren que el congelado de los espermatozoides puede afectar el tiempo de capacitación (Chen et al., 1989) Así mismo el plasma seminal contiene una sustancia capaz de revertir el proceso de capacitación por incubación *in vitro* con espermatozoides que han sido capacitados en útero (Abney y Williams, 1970).

Otro fenómeno que se da casi al mismo tiempo es la hiperactivación de los espermatozoides capacitados. La hiperactivación es un cambio en el movimiento del flagelo, que involucra un incremento en la amplitud de batido del flagelo. Esto puede proveer la fuerza necesaria para superar la atracción entre espermatozoides y epitelio del oviducto (Suárez, 2007), este proceso demanda un tremendo estallido de actividad metabólica y puede tener un efecto dramático en el pH intracelular induciendo una acidificación significativa del citoplasma celular. (García-Macedo et al., 2001). Se ha considerado, que la hiperactivación es parte del proceso de capacitación, sin embargo, hay evidencia de que la hiperactivación es regulada por una vía separada divergente de la que regula la respuesta acrosomal. (Suárez, 2007). La presencia de ATPasas tipo V en la membrana de espermatozoides de mamíferos puede explicar parcialmente los cambios en el pH intracelular que acompañan el control y la adquisición de la motilidad en espermatozoides (García-Macedo et al., 2001). En el conejo y quizás en otros espermatozoides de mamífero, una ATPasa localizada en la membrana plasmática podría ser necesaria para asegurar la alcalinización citoplasmática que acompaña la capacitación., la adición de bafilomicina A<sub>1</sub> a la suspensión de espermatozoides epididimales o eyaculados decrece significativamente el porcentaje de capacitación después de un periodo de 6 horas de incubación; la bafilomicina A<sub>1</sub> es un inhibidor altamente específico de ATPasas H<sup>+</sup> tipo V (García-Macedo et al., 2001).

Se concluye que la capacitación reduce la afinidad a la unión de espermatozoides por el epitelio. Estas observaciones indican que la capacitación induce cambios en la membrana plasmática (cambios en los fosfolípidos) de la cabeza del espermatozoide y son responsables para reducir la afinidad, y como los espermatozoides pierden la afinidad de

unión, la hiperactivación realza su liberación del epitelio. Las señales hormonales que inducen la ovulación o las señales del folículo preovulatorio, pueden estimular el epitelio para secretar factores que disparan la capacitación espermática y la hiperactivación (Suárez, 2007).

En el presente proyecto se utilizó la tinción de clortetraciclina (CTC) para demostrar la capacitación de los espermatozoides de conejo. Otros métodos de coloración usados para la evaluación de la capacitación y de la reacción acrosómica en el espermatozoide del perro son el uso de una técnica de triple tinción con microscopía de luz y el método de coloración con lectina fluorosinada (Hewitt y England, 1998).

Según Hewitt (1998), la tinción de CTC fue pensada para tener ventajas sobre otros métodos incluyendo la triple tinción (Talbot y Chacon, 1981). Los 3 patrones de tinción CTC han sido identificados en humanos y muchas otras especies (Hewitt y England, 1998; Green y Watson, 2001)

La CTC para la valoración del estado de capacitación espermática muestra los siguientes patrones de tinción:

F = No capacitados con acrosoma intacto. Este patrón presenta fluorescencia total

B = Capacitados con acrosoma intacto. Presentan una banda libre de fluorescencia en el dominio posacrosomal.

AR = Capacitados con reacción acrosomal. Se observa una baja fluorescencia en la totalidad de la cabeza con una banda de fluorescencia brillante a lo largo del segmento ecuatorial y con una variación consistente en la emisión de fluorescencia en la región posacrosomal. (Flores, 2005)

El presente trabajo pretendió llevar a cabo una serie de experimentos para demostrar si algunas variables introducidas al aparato reproductivo de la coneja tendrían efecto sobre la motilidad del mismo, esto como a continuación se plantea en la hipótesis, nos podría dar elementos mas precisos del comportamiento del útero de coneja en su proceso reproductivo y con la posibilidad de plantearlo para otras especies en otra serie de estudios.

### **3. Hipótesis**

La contractilidad y la actividad eléctrica de diferentes segmentos del útero, posterior a la cópula, se modifican a medida de que ocurre el proceso de capacitación espermática.

En consecuencia, se esperaría un aumento en la motilidad del músculo liso uterino (cuernos y tuba uterina) al momento en que una determinada población de espermatozoides muestre el movimiento de hiperactivación característico de los espermatozoides capacitados. Dicho aumento en la contractilidad uterina sería ventajoso porque facilitaría la separación de los espermatozoides del epitelio de la tuba uterina.

*Ultima hominis felicitas est in contemplatione veritatis. Sto Tomás de Aquino*

### **4. Objetivos**

#### ***4.1 Objetivo general:***

Establecer un modelo experimental para la valoración de la actividad electromotriz mediante el registro de la actividad del tracto reproductivo de la coneja para conocer el efecto de la presencia de espermatozoides capacitados y sin capacitar.

#### ***4.2 Objetivos particulares:***

1. Valoración de la actividad basal eléctrica y mecánica en el tracto reproductivo de la coneja en tres segmentos: útero, unión útero-tubal y tuba uterina.
2. Valoración de la actividad mecánica y eléctrica de los tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja bajo la exposición a tres tratamientos: monta natural, solución de PBS y plasma seminal.
3. Determinar si la actividad mecánica y eléctrica de los tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja son influidos por la presencia de espermatozoides capacitados y sin capacitar.

## 5. Material y métodos

### 5.1 Diseño experimental

Se emplearon 39 conejas con sus dos cuernos uterinos, cada cuerno se considero una unidad experimental. Se llevaron a cabo 3 repeticiones por tratamiento por unidad experimental que son tres lecturas de cada segmento con duración de 3 minutos cada lectura. Las conejas fueron de la raza Nueva Zelanda blanco y una raza híbrida llamada FESC (Nueva Zelanda, Chinchilla y California) adultas de aproximadamente 1.5 años de edad con fertilidad demostrada por registros con más de 2 partos, con un promedio de 3.9 Kg. de peso vivo alojadas en el módulo de producción de conejos de la FES - Cuautitlán con suministro de agua y alimento balanceado comercial *ad libitum*. El trabajo experimental se llevó a cabo en las instalaciones de la FES - Cuautitlán, en los Laboratorios de Fisiología y de Reproducción Animal; con la siguiente localización geográfica: latitud norte 19° 41' 42", longitud oeste 99° 11' 25" a una altura sobre el nivel del mar de 2268 m.

Este trabajo se realizó en dos fases

Fase 1, el diseño experimental comprendió un modelo de  $3^2$  con 3 repeticiones.

Fase 2, un modelo  $2^1 \times 3^1$  con 3 repeticiones. La matriz experimental fue la siguiente:

Cuadro 1. Diseño experimental de la fase 1 con dos variables independientes (segmento del útero y solución tratamiento) con tres valores útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU) y los tratamientos: monta natural, plasma seminal y PBS respectivamente, con tres repeticiones

Fase 1															
Segmento	Variables Independientes									Respuestas					
	Útero (UTE)			Unión Útero-Tubal (UTB)			Tuba Uterina (TU)			Actividad Mecánica			Actividad Eléctrica (Voltaje y Frecuencia)		
Tratamiento	X1	X2	X3	X1	X2	X3	X1	X2	X3	Y1	Y1	Y1	Y2/Y3	Y2/Y3	Y2/Y3
	Monta	Plasma	PBS	Monta	Plasma	PBS	Monta	Plasma	PBS	UTE	UTB	TU	UTE	UTB	TU
1	1	0	0	1	0	0	1	0	0						
2	0	1	0	0	1	0	0	1	0						
3	0	0	1	0	0	1	0	0	1						

Cuadro 2. Diseño experimental de la fase 2 con una variable independientes (tipo de espermatozoides) con dos valores (capacitados y sin capacitar), otra variable independiente (segmento uterino) con tres valores útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU) y los tratamientos: monta natural, plasma seminal y PBS respectivamente, con tres repeticiones

Fase 2										
	Variables Independientes						Respuestas			
Segmento	Útero (UTE)		Unión Útero-Tubal (UTB)		Tuba Uterina (TU)		Actividad Mecánica		Actividad Eléctrica Voltaje y Frecuencia	
Tratamiento	X1 Cap	X2 Sin cap	X1 Cap	X2 Sin cap	X1 Cap	X2 Sin cap	Y1 Cap	Y1 Sin Cap	Y2/Y3 Cap	Y2/Y3 Sin cap
1	1	0	1	0	1	0				
2	0	1	0	1	0	1				

## 5.2 Sincronización de las conejas

Las conejas fueron sincronizadas para que los tiempos en la medición de las variables fueran los mismos; la sincronización se hizo con Gonadotropina Coriónica equina (eCG) (Folligon, Laboratorios Intervet). La hormona se administró en base a lo reportado por Rebollar (2006) quién encontró que la inyección de 20 UI de eCG 72 horas antes de la IA, produce un efecto significativo sobre la intensidad de la ovulación (más cuerpos lúteos). Se ha encontrado que en conejas sincronizadas, los altos niveles de estradiol en el día 4 post-parto están relacionados con la acción de la FSH, el tratamiento con eCG mejora la receptividad e incrementa el crecimiento folicular (Rebollar, 2006).

Con el propósito de comprobar la efectividad de la hormona eCG sobre la sincronización del estro y la presencia de folículos en el ovario se procedió al conteo de estructuras en los ovarios de conejas tratadas.

## 5.3 Determinación del estado de capacitación espermática

Antes de iniciar la primera fase y considerando un tiempo promedio de capacitación para espermatozoides de conejo de 10 horas en concordancia con el tiempo que tarda la ovulación (Giojalas *et al*, 2004) se procedió a determinar el estado de capacitación de los espermatozoides en los intervalos de tiempo de 3, 6, 8 y 10 o mas horas mediante la técnica siguiente:

Se obtuvo el eyaculado, por la técnica de monta natural y recolección en vagina artificial de 12 machos de fertilidad probada, el plasma seminal se separó de los espermatozoides por doble centrifugación (800g x 10 minutos y 1500g por 15 minutos) y se procedió a la incubación en medio TALP (Anexo 1) en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

Para determinar la viabilidad de los espermatozoides, previamente se sometieron a la tinción de eosina-nigrosina, que determina que espermatozoides están vivos o muertos.

La preparación de la tinción y la técnica para preparar los frotis se presenta en el anexo 2.

Los espermatozoides teñidos con CTC se observaron bajo iluminación de luz UV (excitación de 400-440 nm, emisión a 470 nm), se contaron 100 espermatozoides de acuerdo a los patrones que abajo se indican (Hewitt y England, 1998; Green y Watson, 2001). (Figura 1.)

F = No capacitados con acrosoma intacto

B = Capacitados con acrosoma intacto

AR = Capacitados con reacción acrosomal

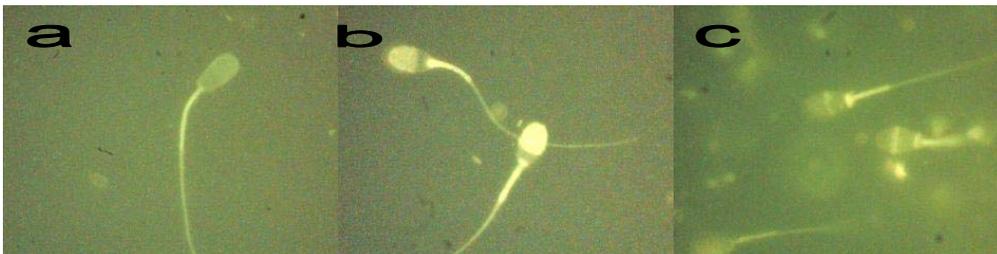


Figura 1. Fotografías de espermatozoides de conejo teñidos con CTC mostrando los patrones de fluorescencia observados: a) patrón F, b) patrón B y c) patrón AR

#### ***5.4 Medición de la contractilidad y actividad eléctrica uterina***

En la primera fase se midió la contractibilidad del músculo liso uterino en diferentes segmentos del tracto reproductor de la hembra:

- 1) Cuerno uterino
- 2) Unión útero-tubárica
- 3) Parte media de la tuba uterina

En esta primera fase el registro de la actividad mecánica y eléctrica se hizo de manera simultánea al colocar los transductores de fuerza y los electrodos en cada segmento del órgano como se muestra en la Figura 2.

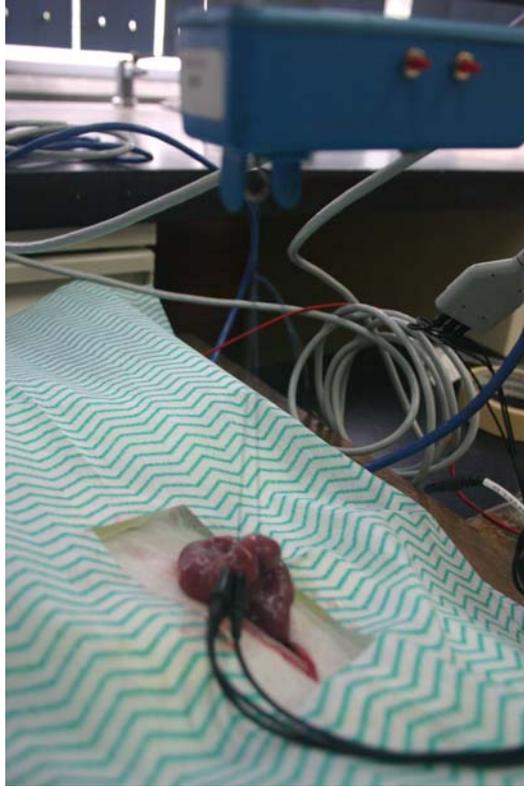


Figura 2. Montaje del modelo experimental: transductor de tensión, electrodos de aguja y parte del útero

### ***5.5 Tratamientos de la Fase I***

En esta primera fase se consideraron los siguientes tratamientos:

- 1) Posterior a la cópula natural y fértil (6 conejas),
- 2) Posterior al depósito de PBS en los tres segmentos (6 conejas),
- 3) Posterior al depósito de plasma seminal en los tres segmentos (7 conejas).

En el grupo que recibió monta natural se obtuvieron los datos de ambos cuernos y a las 2 horas se comprobó la presencia de espermatozoides en la unión útero-tubal (UTB) por

lavado con PBS, en este grupo no se obtuvo un registro basal por obvias razones. Se tienen observaciones basales de otras conejas sin tratamiento.

En el grupo que recibió PBS se realizó un registro basal en ambos cuernos, posteriormente se administró 50, 100 y 200 µl de PBS a 37° C en tuba uterina (TU), UTB y útero (UTE), respectivamente.

En el grupo que recibió plasma seminal se realizó el registro basal de ambos cuernos, posteriormente se administró de 50, 100 y 200 µl de plasma seminal a 37° C en tuba uterina, UTB y útero, respectivamente.

Cada segmento fue aislado colocando dos ligaduras en ambos extremos del segmento seleccionado, con la finalidad de evitar que las soluciones fluyeran por todo el tubo. Cada uno de los tres segmentos evaluados en donde se colocó el tratamiento tuvo una longitud de 2 cm.

### ***5.6 Procedimiento experimental de la Fase 1***

La sucesión de actividades desarrolladas en esta primera fase compendió lo siguiente:

1. Sincronización del estro de la coneja 72 horas antes de la cirugía, con 20 UI de hormona Gonadotropina Coriónica equina (eCG) vía IM. Se determinó la efectividad de la sincronización de la hormona mediante conteo de las estructuras ováricas (folículos, cuerpos hemorrágicos y cuerpos lúteos).
2. El día de la experimentación, la coneja recibió monta natural con un conejo previamente evaluado en laboratorio, la hembra se pesó y se condujo al Laboratorio de Fisiología donde se preparó para la cirugía y la exposición de los órganos en estudio.
3. La coneja fue anestesiada con acepromacina (Calmivet, Vetoquinol, Francia) con una dosis de 0.84 mg/Kg PV vía IM (preanestésico) y posteriormente anestesia con Tiletamina + Zolazepam (Zoletil, Virbac, Francia) con una dosis de 12.5 mg/Kg PV vía IM.
4. El equipo de adquisición de datos fisiológicos, así como los electrodos, soluciones y equipo de cirugía se preparó previamente.
5. Para la exposición de los órganos de estudio se realizó una incisión en línea media y se localizó el aparato reproductor, se procedió a tomar un registro basal de cada segmento: cuerpo del útero, unión utero-tubal y tuba uterina.

6. Cada segmento se suspendió mediante un hilo de algodón al transductor de fuerza a una distancia de 10 cm y con tensión de 10 g para obtener el registro. En seguida, se colocaron tres electrodos de aguja fina en el segmento correspondiente entre puntos distintos y equidistantes formando un triángulo a una distancia no mayor a 5 mm (Figura 3).

7. Los electrodos y el transductor de tensión (F-60 Narco, Bio-Systems) se conectaron a la unidad de adquisición de datos fisiológicos (Biopac MP35) y ésta a una computadora portátil para el registro y lectura de los datos.

En cada segmento se registró la actividad mecánica y eléctrica por espacio de 3 minutos con 3 repeticiones para cada tratamiento: Monta, PBS y Plasma Seminal. Los dos cuernos, izquierdo y derecho, fueron evaluados en la misma cirugía. Los datos se archivaron en la computadora para su análisis posterior.

8. La anestesia fue mantenida por bolos de 0.5 ml vía IV de la combinación de ambos medicamentos.

9. Terminada la cirugía, la coneja aún anestesiada fue sacrificada por desnucamiento.

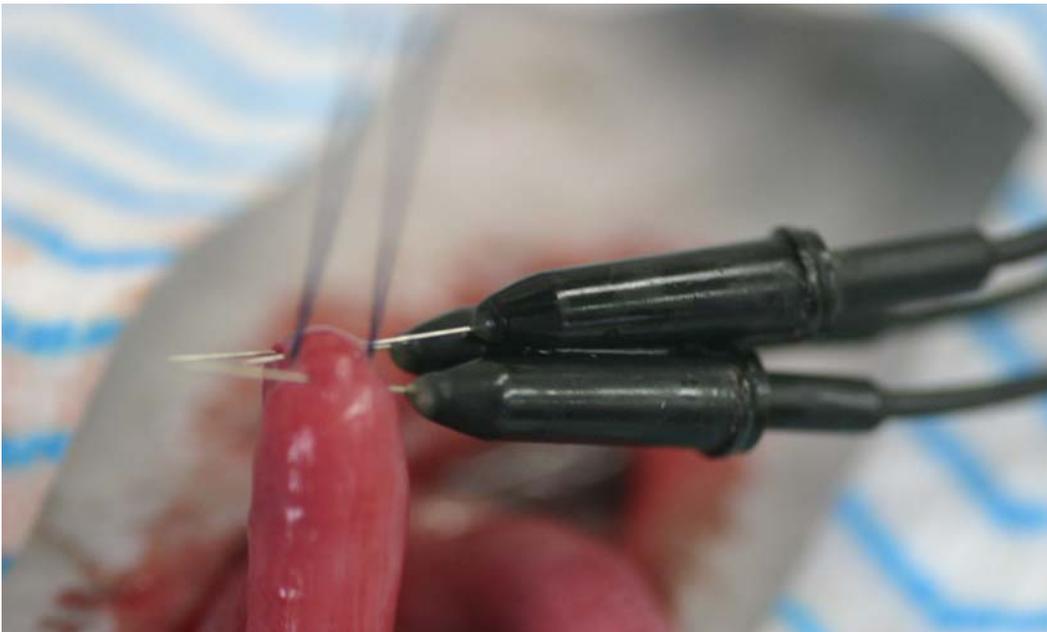


Figura 3. Segmento de la parte media del útero suspendido en el transductor de fuerza con los electrodos de aguja fina para el registro de la actividad eléctrica.

Las variables que se tuvieron en cuenta para controlar en esta primera fase fueron:

- 1) Registros basales previos en los distintos tratamientos
- 2) Volumen administrado de cada tratamiento en cada segmento; se consideró en algunos casos una disminución de 20% debido al tamaño de los segmentos, esto evitó la distensión del órgano y una posible sobre estimulación
- 3) La temperatura del medio (tratamiento) administrado
- 4) La longitud y tensión del amarre de cada segmento en el transductor de fuerza
- 5) Un manejo mínimo de tejidos
- 6) El área de contacto de los electrodos para el electrohisterograma (EHG)
- 7) La evaluación de la administración de eCG para sincronizar.

### ***5.7 Tratamientos de la Fase 2***

En la segunda fase, se depositaron poblaciones de espermatozoides:

- 1) Capacitados
- 2) No capacitados

En diferentes segmentos del útero:

- a) Cuerno uterino, parte media
- b) Unión utero-tubárica
- c) Tuba uterina, parte media.

### ***5.8 Procedimiento experimental de la Fase 2***

La sucesión de actividades desarrolladas en la segunda fase compendió lo siguiente:

1. Sincronización del estro de la coneja 72 horas antes de la cirugía, con 20 UI de hormona Gonadotropina Coriónica equina (eCG) vía IM.
2. El día de la experimentación, la coneja se pesó y se condujo al Laboratorio de Fisiología donde se preparó para la cirugía de abdomen.
3. Se obtuvo el semen de un conejo por medio de vagina artificial, la muestra de semen fue centrifugada (600 g x 10 min.), se retiró el plasma seminal y el botón de espermatozoides se resuspendió en medio TALP. Enseguida, se procedió a su evaluación para determinar la

concentración y viabilidad espermática (número de vivos y muertos); finalmente, se ajustó la concentración a 66 millones por mL.

4. Los espermatozoides en TALP, de acuerdo al tratamiento, se emplearon de la siguiente manera: i) incubación en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% por espacio de 6 horas, pasado este tiempo se procedió a introducirlos a la coneja, ii) los espermatozoides sin incubar, es decir sin capacitar, se introdujeron a los diferentes segmentos del útero.

5. La coneja fue anestesiada con acepromacina (0.84 mg/Kg PV vía IM., preanestésico) y posteriormente anestesia con Tiletamina + Zolazepam (12.5 mg/Kg PV vía IM).

6. El equipo de toma de datos, así como los electrodos, soluciones y equipo de cirugía se preparó previamente.

7. . Para la exposición de los órganos de estudio se realizó una incisión en línea media y se localizó el aparato reproductor, se procedió a tomar un registro basal de cada segmento: cuerpo del útero, unión utero-tubal y tuba uterina.

8. Cada segmento se suspendió mediante un hilo de algodón al transductor de fuerza a una distancia de 10 cm y con tensión de 10 g para obtener el registro. Enseguida, se colocaron tres electrodos de aguja fina en el segmento correspondiente entre puntos distintos y equidistantes formando un triángulo a una distancia no mayor a 5 mm (Figura 3).

9. Los electrodos y el transductor de fuerza se conectaron a la unidad de adquisición de datos fisiológicos y ésta a una computadora para el registro y lectura de los datos.

10. Se aplicaron los tratamientos: i) espermatozoides capacitados, ii) sin capacitar. se administró 50, 100 y 200 µl de espermatozoides capacitados o sin capacitar a 37° C en tuba uterina, unión útero-tubal y útero, respectivamente

11. En cada segmento se registró la actividad mecánica y eléctrica por espacio de 3 minutos con tres repeticiones para cada tratamiento. Los dos cuernos, izquierdo y derecho, fueron evaluados en la misma cirugía. Los datos se archivaron en la computadora para su análisis posterior.

12. La anestesia fue mantenida por bolos de 0.5 mL vía IV de la combinación de ambos medicamentos.

13. Terminada la cirugía, la coneja aún anestesiada fue sacrificada por desnucamiento.

Las variables que se tuvieron en cuenta para controlar en esta segunda fase fueron:

- 1) Registros basales previos en los dos tratamientos.
- 2) Volumen administrado de cada tratamiento en cada segmento. Se consideró en algunos casos una disminución de 20% debido al tamaño de los segmentos, esto evitó la distensión del órgano y una posible estimulación.
- 3) La temperatura del medio (tratamiento) administrado.
- 4) La longitud y tensión del amarre de cada segmento en el transductor de fuerza.
- 5) Un manejo mínimo de tejidos.
- 6) El área de contacto de los electrodos para el electrohisterograma (EHG)
- 7) La evaluación de la administración de eCG para sincronizar.

Los espermatozoides ya capacitados en el laboratorio por un tiempo mínimo de 6 horas (ver la técnica arriba) fueron colocados en cada uno de los segmentos ya descritos por separado, mediante punción con aguja fina para insulina calibre 31, colocando las mismas cantidades que para los tratamientos de la Fase 1. Posteriormente se procedió al registro de la contractibilidad y la actividad eléctrica (EHG) de cada segmento. Cada segmento fue aislado por dos ligaduras colocadas a ambos lados del segmento seleccionado, para evitar que los espermatozoides o la solución control fluyeran por todo el tubo. Cada uno de los tres segmentos evaluados en donde se colocó el tratamiento tuvo una longitud de 2 cm.

Se consideró que la distribución de espermatozoides a lo largo del tracto reproductivo fuera similar a lo observado por Fateh El-Bab *et al.* (1983): 99.4% en cervix, 0.4 % en útero y 0.1 % en oviducto.

La toma de datos de la contracción y actividad eléctrica se realizó mediante el equipo de Adquisición de Datos Fisiológicos Biopac MP35 (USA) con un transductor de fuerza modelo F-60 de Narco-Bio-Systems (USA), electrodos para EMG.

## ***5.9 Procedimiento del análisis estadístico***

Los datos obtenidos se analizaron, en primer lugar, mediante una prueba de normalidad para ubicar los resultados dentro de pruebas paramétricas o no paramétricas.

Mas tarde el análisis siguió el siguiente esquema:

1. Análisis entre cuernos
  1. 1. De los valores básales (BAS)
  1. 2. De los valores experimentales (EXP)
  1. 3. De las diferencias entre los valores basal y experimental (DIF)
2. Análisis entre segmentos:
  2. 1. De los valores básales (BAS)
  2. 2. De los valores experimentales (EXP)
  2. 3. De las diferencias entre los valores basal y experimental (DIF)
3. Análisis entre tratamientos:
  3. 1. De los valores básales (BAS)
  3. 2. De los valores experimentales (EXP)
  3. 3. De las diferencias entre los valores basal y experimental (DIF)

Para lo anterior se llevó una serie de ANOVA de Friedman (Medidas repetidas), para determinar las diferencias entre segmentos y ANOVA de una vía para el análisis entre los tratamientos. Asimismo se agruparon los 3 segmentos (UTE + UTB + TU) para cada registro (basal, experimental y diferencias entre basal y experimental), se llevo a cabo una prueba de correlación Spearman entre la fuerza de contracción y la actividad eléctrica (voltaje y frecuencia). Se empleo el paquete estadístico STATISTICA 5.0 (Stat Soft, Reino Unido) para el análisis de los datos.

## **6. Resultados**

Para el análisis de los datos se realizó primero un análisis entre cuernos izquierdo y derecho de las variables en estudio: fuerza de contracción (gramos), amplitud de la respuesta eléctrica (milivolts) y frecuencia de la corriente eléctrica generada (Hertz), al no encontrarse diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) los datos de ambos cuernos fueron agrupados.

Un segundo análisis fue entre segmentos con los datos obtenidos de: 1) valores basales (BAS), 2) valores experimentales (EXP); 3) diferencias entre experimentales y basales (DIF).

Un tercer análisis fue entre tratamientos con los datos obtenidos de los valores basales (BAS), valores experimentales (EXP), diferencias entre los valores experimentales y basales (DIF).

Por último se realizó un análisis de correlación entre las variables estudiadas: frecuencia de la corriente, voltaje y contractilidad (fuerza de contracción) para cada uno de los 3 distintos grupos de valores (BAS, EXP, DIF) para cada segmento y para segmentos agrupados.

### ***6.1 FASE 1. Evaluación de la fuerza de contracción, actividad eléctrica (frecuencia y voltaje) del músculo liso uterino sometido a tres tratamientos: plasma seminal, PBS, monta natural.***

#### **6.1.1 Análisis entre segmentos dentro de tratamiento.**

En el caso del plasma seminal, se observó que no hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tres diferentes segmentos en cuanto a contractilidad. En cuanto a la actividad eléctrica (voltaje), se encontró diferencia entre UTE y los otros dos segmentos TU y UTB ( $P < 0.04$ ) al comparar los valores DIF (cuadro 3 anexo 3, figuras 4 y 5).

La solución PBS no causó diferencias en la actividad eléctrica y fuerza de contracción entre los tres segmentos ( $P > 0.05$ ), (cuadro 4 anexo 3, figuras 6 y 7).

Al aplicar monta natural a cada una de las conejas de este grupo, se esperaba un aumento en la actividad eléctrica y mecánica de los tres segmentos en estudio a medida que los espermatozoides ascendieron, sin embargo, la presencia de éstos no modificó significativamente la actividad eléctrica y mecánica (cuadro 5 anexo 3, figuras 8 y 9).

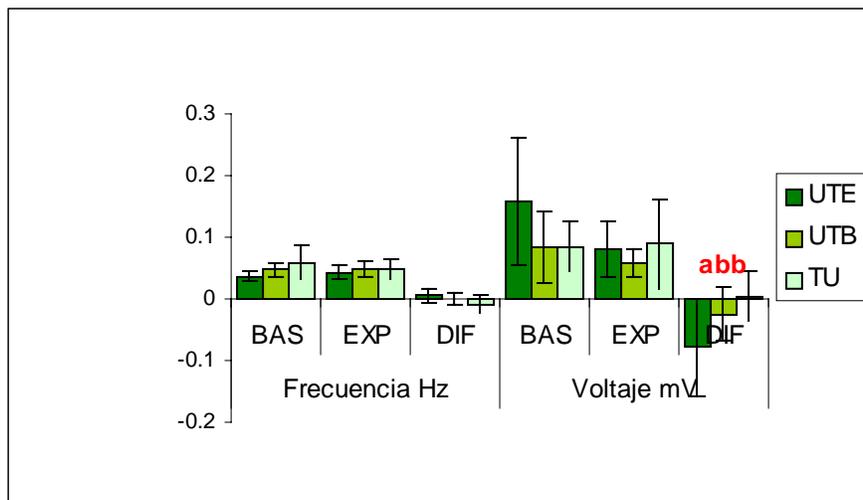


Figura 4. Efecto del plasma seminal sobre la actividad eléctrica de tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja. Se encontró diferencia estadística en la actividad eléctrica (voltaje) entre útero (UTE) (a) y los otros dos segmentos unión útero-tubal (UTB) (b) y tuba uterina (TU) (b) ( $P < 0.04$ ) al comparar los valores DIF. Los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar obtenidos de 14 unidades experimentales con 3 repeticiones.

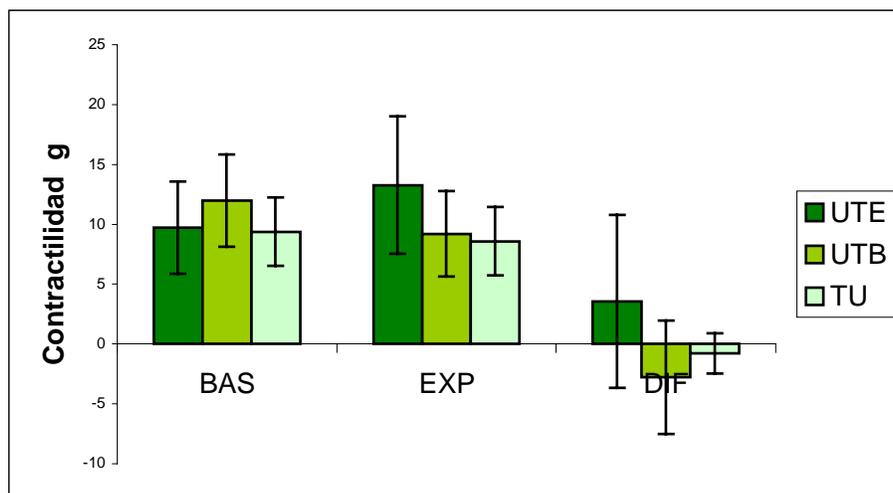


Figura 5. Efecto del plasma seminal sobre la contractilidad en gramos de tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja. No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) entre los segmentos útero (UTE), tuba uterina (TU) y unión útero-tubal (UTB) en los diferentes grupos basal (BAS), experimental (EXP) y diferencias entre estos últimos (DIF). Los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar obtenidos de 14 unidades experimentales con 3 repeticiones.

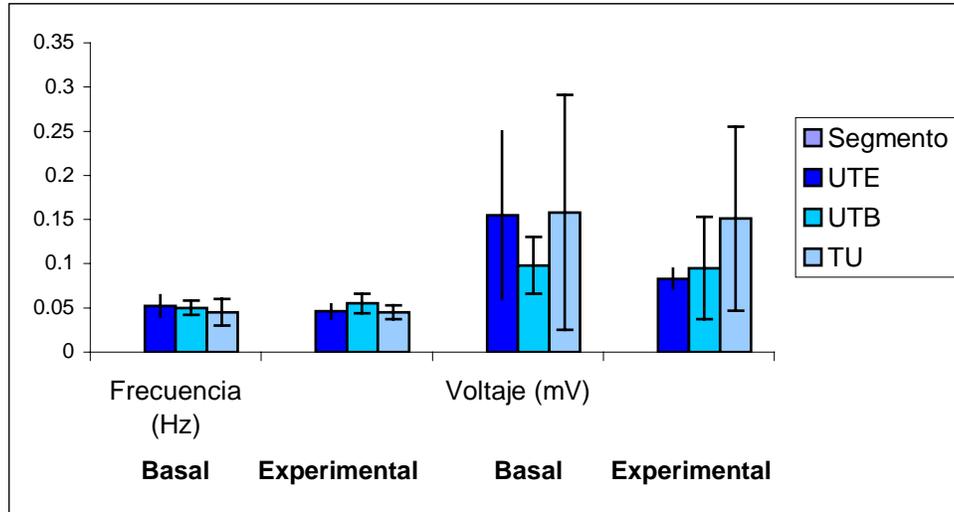


Figura 6. Efecto del PBS sobre la actividad eléctrica en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU) en los diferentes grupos basal (BAS) y experimental (EXP). No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ), los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar obtenidos de 12 unidades experimentales con 3 repeticiones.

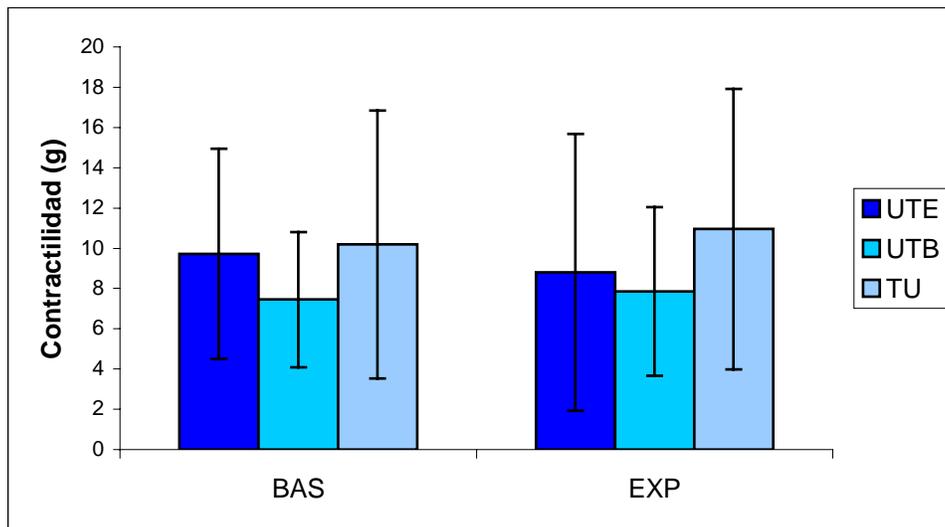


Figura 7. Efecto del PBS sobre la contractilidad de tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU) en los diferentes grupos basal (BAS) y experimental (EXP). No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ), los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar obtenidos de 12 unidades experimentales con 3 repeticiones.

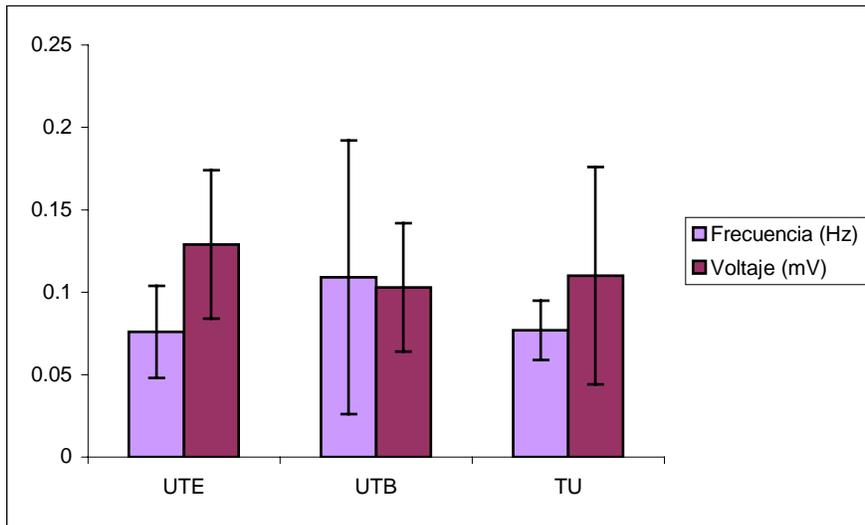


Figura 8. Efecto de la monta natural sobre la actividad eléctrica, frecuencia y voltaje en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ), los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar obtenidos de 11 unidades experimentales con 3 repeticiones.

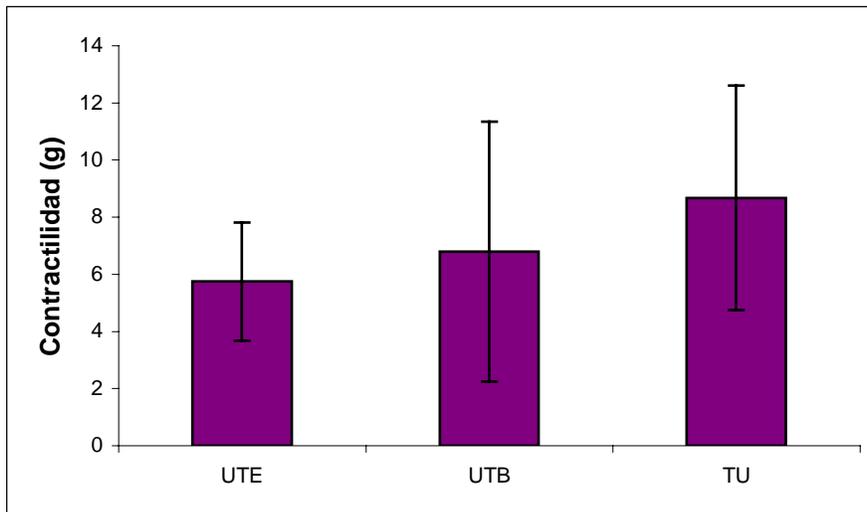


Figura 9. Efecto de la monta natural sobre la contractilidad en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, , útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ), los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar obtenidos de 11 unidades experimentales con 3 repeticiones. Sin embargo se observa una tendencia a incrementarse la fuerza contráctil conforme cambia el segmento

### 6.1.2 Análisis entre tratamientos

El análisis entre los tres diferentes tratamientos, monta natural, PBS y plasma seminal para cada segmento indica que si existe diferencia significativa en cuanto a actividad mecánica y eléctrica en UTE, UTB y TU.

Para la variable frecuencia de la corriente, el análisis entre tratamientos para cada segmento, indicó una diferencia significativa en UTE, para los valores EXP: plasma 0.043 Hz, PBS 0.046 Hz y monta 0.076 Hz ( $P < 0.008$ ); en la TU, para los valores EXP: plasma 0.049 Hz, PBS 0.045 Hz, monta 0.077 Hz ( $P < 0.004$ ). (Cuadro 7 anexo 3, figura 12). También hubo diferencia cuando se analizaron los valores EXP de los segmentos agrupados: 0.046 Hz, 0.049 Hz, 0.087 Hz para plasma seminal, PBS y monta natural respectivamente ( $P < 0.0001$ . Cuadro 9 anexo3, figura 16).

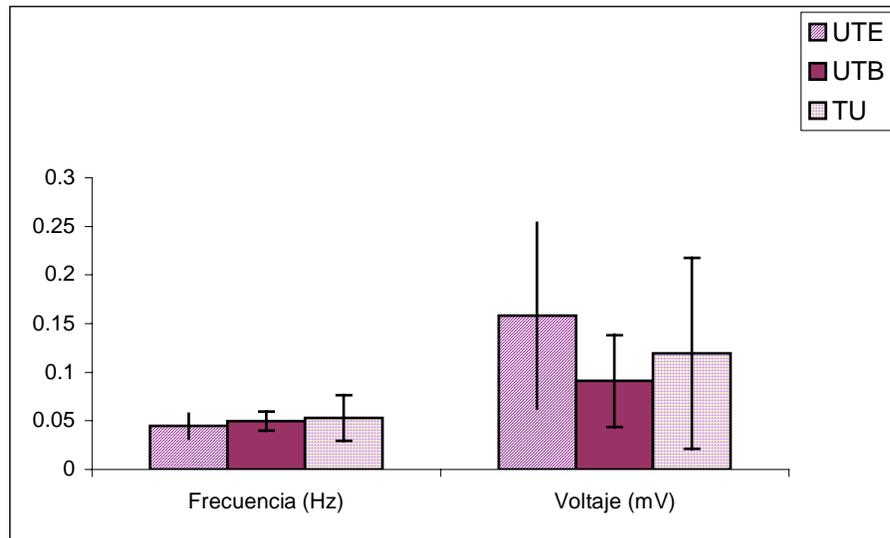


Figura 10. Valores basales (BAS) obtenidos de 26 unidades experimentales con 3 repeticiones, sobre la actividad eléctrica, frecuencia y voltaje en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). Los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar,

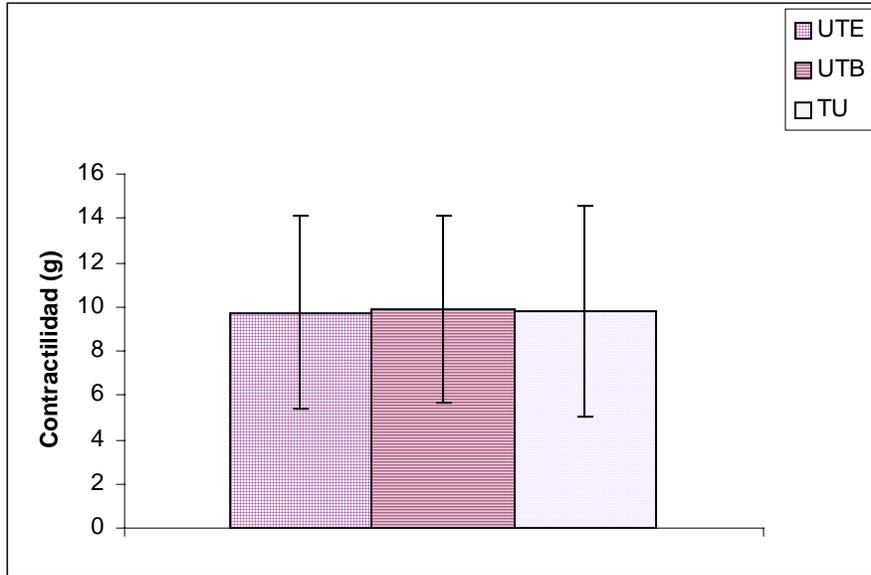


Figura 11. Valores básicos (BAS) obtenidos de 26 unidades experimentales con 3 repeticiones, sobre la contractilidad en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de coneja útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). Los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar

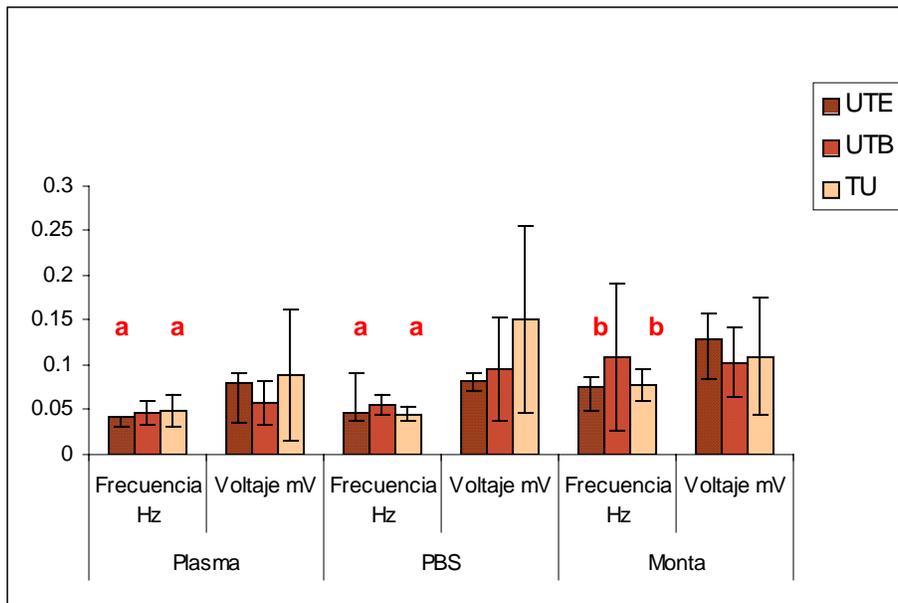


Figura 12. Comparación de los valores experimentales (EXP) de tres tratamientos, plasma seminal, PBS y monta natural obtenidos de 14, 12 y 11 unidades experimentales respectivamente con 3 repeticiones sobre la actividad eléctrica en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). Se observa que la variable frecuencia de la corriente es mayor en el tratamiento monta natural (b) fue significativa ( $P < 0.05$ ) con respecto a los tratamientos plasma seminal y PBS (a). Los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar

Para los valores DIF el análisis mostró que no hubo diferencias entre tratamientos al comparar ambos valores entre cada uno de los segmentos evaluados (Cuadro 8 anexo 3).

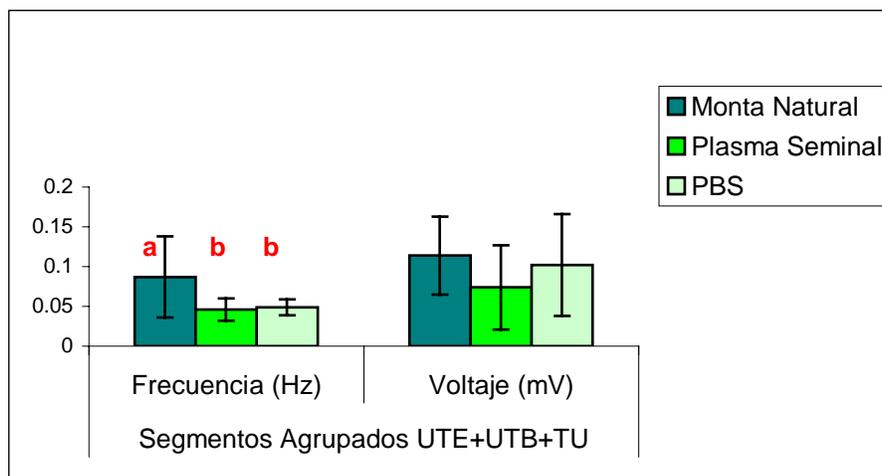


Figura 16. Diferencias entre tratamientos de los valores EXP sobre la actividad eléctrica de segmentos del tracto reproductivo de la coneja agrupados útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). Se observa la diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en la variable frecuencia de la corriente para el tratamiento monta natural (a) con respecto a los tratamientos plasma seminal y PBS. Los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar obtenidos de 11, 14 y 12 unidades experimentales respectivamente con 3 repeticiones

### 6.1.3 Correlación entre actividad mecánica y eléctrica

La correlación entre la actividad eléctrica (voltaje) y la fuerza de contracción para plasma seminal entre segmentos no fue significativa para los valores EXP y los DIF (cuadro 10). En contraste, para el caso de PBS la correlación entre fuerza y frecuencia (BAS) fue significativa para TU ( $P < 0.04$ , Cuadro 11). Para Monta Natural no se encontró una correlación significativa entre las variables, fuerza, voltaje y frecuencia (Cuadro 10, anexo 3).

Al agruparse los valores DIF existe una correlación significativa ( $r = -0.46$ ,  $P < 0.002$ ). Sin embargo para los otros valores BAS y EXP los valores de correlación no fueron significativos para este tratamiento (Cuadro 12).

Para los valores BAS en el tratamiento PBS, se encontró que el valor de correlación de fuerza de contracción con la frecuencia de la corriente eléctrica, fue significativo ( $r = -0.55$ ,  $P < 0.01$ ) (Cuadro 11); para el tratamiento monta natural no se encontraron correlaciones significativas entre las variables de estudio (Cuadro 12).

Cuadro 11. Valores de correlación entre la fuerza de contracción y la actividad eléctrica (frecuencia y voltaje) de valores basales (BAS) con PBS y Plasma Seminal de 12 y 14 unidades experimentales en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU).

	Plasma Seminal		PBS	
	r	P	r	P
UTE				
Fuerza/frecuencia	0.14	0.75	-0.25	0.62
Fuerza/voltaje	-0.32	0.48	0.77	0.07
Frecuencia/voltaje	0.64	0.11	-0.14	0.78
UTB				
Fuerza/frecuencia	-0.28	0.53	-0.65	0.15
Fuerza/voltaje	-0.32	0.48	-0.54	0.26
Frecuencia/voltaje	-0.21	0.64	0.77	0.07
TU				
Fuerza/frecuencia	-0.35	0.43	-0.82	<b>0.04 *</b>
Fuerza/voltaje	-0.14	0.75	0.60	0.20
Frecuencia/voltaje	-0.53	0.21	-0.60	0.20
Segmentos Agrupados				
Fuerza/frecuencia	-0.20	0.37	-0.55	<b>0.01 *</b>
Fuerza/voltaje	-0.19	0.39	0.37	0.13
Frecuencia/voltaje	-0.19	0.40	-0.17	0.49

\* Estos valores ( $P < 0.05$ ) indican que son significativos

Cuadro 12. Valores de correlación entre la actividad mecánica y eléctrica (frecuencia y voltaje) de los tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja agrupados, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU) comparando los tres grupos de valores diferentes, valores básales (BAS), valores experimentales (EXP) y diferencias entre estos dos últimos (DIF). El número de unidades experimentales es 14 para plasma seminal, 12 para PBS y 11 para monta natural con 3 repeticiones.

	Monta Natural						Plasma Seminal						PBS					
	Fza/frec.		Fza/volt.		Frec/volt.		Fza/frec.		Fza/volt.		Frec/volt.		Fza/frec.		Fza/volt.		Frec/volt.	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
BAS							-0.20	0.37	0.25	0.11	-0.19	0.40	<b>-0.55*</b>	<b>0.01*</b>	0.37	0.13	-0.17	0.49
EXP	0.17	0.49	-0.24	0.33	-0.07	0.76	-0.01	0.93	-0.20	0.38	-0.34	0.12	-0.10	0.66	-0.02	0.91	-0.20	0.40
DIF							0.09	0.68	<b>-0.46*</b>	<b>0.002*</b>	-0.01	0.94	0.10	0.68	0.43	0.07	-0.08	0.72

\* Estos valores ( $P < 0.05$ ) indican que son significativos

## 6.2 FASE 2. Efecto de la presencia de espermatozoides capacitados y sin capacitar sobre la actividad mecánica y eléctrica del tracto reproductivo de la coneja

### 6.2.1 Análisis entre segmentos dentro de tratamiento

La presencia de espermatozoides sin capacitar causó diferencia en la contractilidad de los tres diferentes segmentos del tracto reproductivo, cuando se evaluaron los valores para DIF ( $P < 0.03$ ). Para la actividad eléctrica (voltaje) sólo los valores EXP mostraron una diferencia de la UTB con respecto a la TU ( $P < 0.04$ ). (Cuadro 13 anexo 3, figura 18 y 19). En cuanto a la presencia de espermatozoides capacitados y su efecto sobre los 3 segmentos del útero se observaron diferencias significativas al evaluar los valores BAS de la actividad eléctrica (frecuencia), siendo UTE diferente de TU ( $P < 0.05$ ) pero no de UTB (Cuadro 14 anexo 3, figura 20).

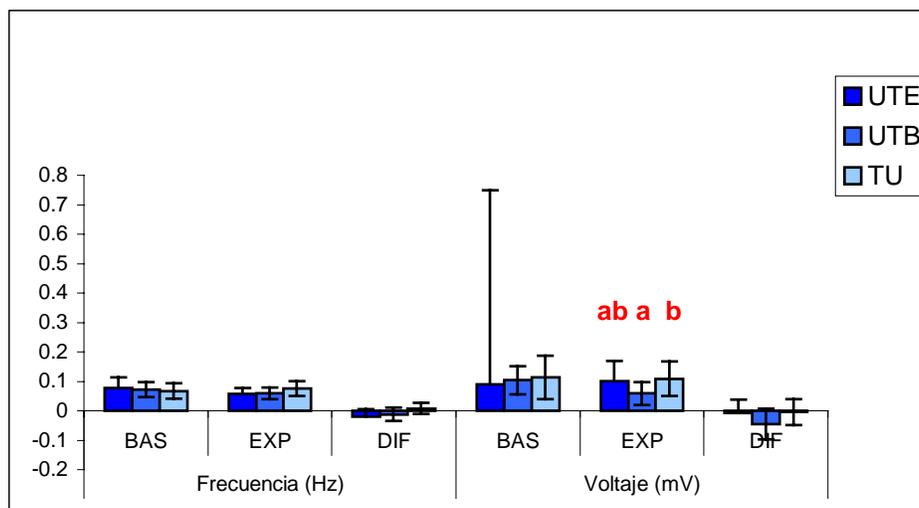


Figura 18. Comparación de 3 valores analizados de la actividad eléctrica de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU) con espermatozoides sin capacitar. En la variable voltaje se observa que el segmento TU (b) es diferente del segmento UTB (a) ( $P < 0.04$ ) pero no del segmento UTE. Los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar

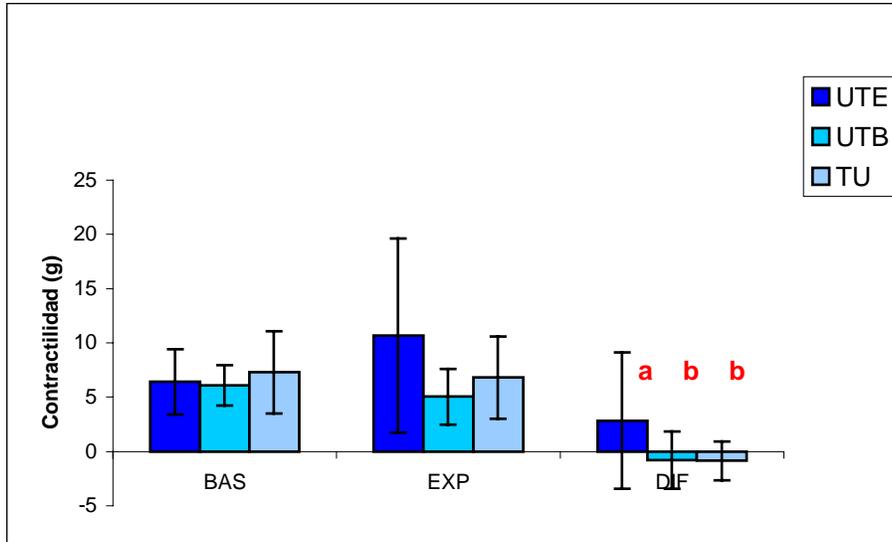


Figura 19. Comparación de tres valores analizados de la contractilidad de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja con espermatozoides sin capacitar. La presencia de espermatozoides sin capacitar causó diferencia ( $P < 0.03$ ) en la contractibilidad de útero (UTE) con respecto a la unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU) con valores DIF. Los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar

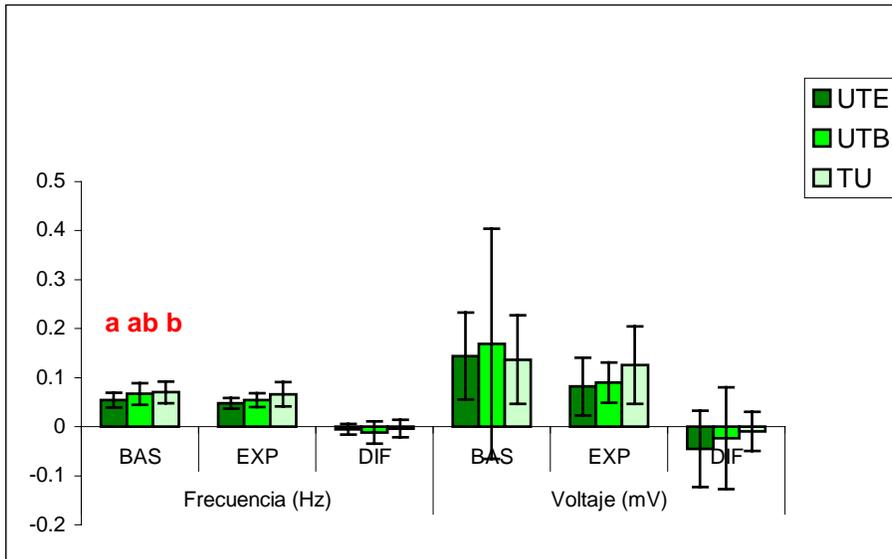


Figura 20. Comparación de tres valores analizados de la actividad eléctrica de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja con espermatozoides capacitados. Se observaron diferencias significativas al evaluar los valores basales (BAS) de la actividad eléctrica (frecuencia), siendo UTE (a) diferente de TU (b) ( $P < 0.05$ ) pero no de UTB. Los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar

### 6.2.2 Análisis entre tratamientos

Al comparar los tratamientos de espermatozoides capacitados contra espermatozoides sin capacitar, las diferencias entre segmentos para ambos tratamientos no fueron significativas, para las dos actividades evaluadas: eléctrica (frecuencia y voltaje) y mecánica en las tres categorías (BAS, EXP y DIF) en que fueron agrupados los valores (Cuadros 15, 16 y 17 anexo 3).

Al agrupar los segmentos UTE, UTB y TU, no hubo diferencias estadísticas entre los dos tratamientos, espermatozoides capacitados y sin capacitar. Cuadro 16 y figuras 24 y 25 en anexo 3.

### 6.2.3 Correlación entre actividad mecánica y eléctrica

El análisis de la correlación entre la actividad eléctrica (voltaje y frecuencia) y la fuerza de contracción cuando fueron administrados espermatozoides capacitados a los tres segmentos del aparato reproductor de la coneja, se encontró una correlación significativa en los valores BAS del segmento TU, fuerza contra frecuencia ( $r = -0.68$ ,  $P < 0.02$ ) y frecuencia contra voltaje ( $r = 0.66$ ,  $P < 0.03$ ) (Cuadro 19).

Para los valores EXP del segmento UTB, fuerza contra frecuencia ( $r = -0.75$ ,  $P < 0.01$ ), el segmento TU frecuencia contra voltaje ( $r = 0.63$ ,  $P < 0.05$ ) (Cuadro 20).

En los valores DIF del segmento TU, fuerza contra frecuencia ( $r = -0.64$ ,  $P < 0.04$ ) (Cuadro 21). En relación a los tratamientos agrupados se observó una correlación significativa en los casos de los valores BAS ( $r = -0.42$ ,  $P < 0.02$ ), DIF ( $r = -0.40$ ,  $P < 0.02$ ) con las variables fuerza contra frecuencia eléctrica (Cuadro 22).

Para espermatozoides sin capacitar no existió correlación entre las tres variables estudiadas.

Cuadro 19. Valores de correlación entre la contractilidad y la actividad eléctrica (frecuencia y voltaje) de los valores básales (BAS) en 20 unidades experimentales con 3 repeticiones para los tratamientos con espermatozoides capacitados y sin capacitar en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU).

	Capacitados		Sin capacitar	
	r	P	r	P
<b>UTE</b>				
Fuerza/frecuencia	-0.21	0.55	-0.44	0.20
Fuerza/voltaje	0.12	0.72	-0.32	0.46
Frecuencia/voltaje	0.16	0.65	0.03	0.93
<b>UTB</b>				
Fuerza/frecuencia	-0.49	0.14	-0.20	0.57
Fuerza/voltaje	0.43	0.21	-0.05	0.88
Frecuencia/voltaje	-0.18	0.60	-0.16	0.65
<b>TU</b>				
Fuerza/frecuencia	-0.68	<b>0.02*</b>	0.16	0.65
Fuerza/voltaje	-0.38	0.27	-0.33	0.34
Frecuencia/voltaje	0.66	<b>0.03*</b>	-0.18	0.60
Segmentos Agrupados				
Fuerza/frecuencia	-0.42	0.017	-0.11	0.53
Fuerza/voltaje	0.13	0.46	-0.29	0.11
Frecuencia/voltaje	0.17	0.36	-0.10	0.57

\* Estos valores (P< 0.05) indican que son significativos

Cuadro 20. Valores de correlación entre la contractilidad y la actividad eléctrica (frecuencia y voltaje) de los valores experimentales (EXP) en 20 unidades experimentales con 3 repeticiones para los tratamientos con espermatozoides capacitados y sin capacitar en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU).

	Capacitados		Sin capacitar	
	r	P	r	P
<b>UTE</b>				
Fuerza/frecuencia	0.28	0.42	0.16	0.65
Fuerza/voltaje	0.24	0.48	-0.26	0.46
Frecuencia/voltaje	-0.32	0.36	-0.11	0.75
<b>UTB</b>				
Fuerza/frecuencia	-0.75	<b>0.01*</b>	0.40	0.24
Fuerza/voltaje	0.03	0.93	-0.44	0.20
Frecuencia/voltaje	-0.15	0.67	0.24	0.48
<b>TU</b>				
Fuerza/frecuencia	-0.27	0.44	-0.06	0.85
Fuerza/voltaje	0.13	0.70	-0.57	0.08
Frecuencia/voltaje	0.63	<b>0.047*</b>	0.13	0.70
Segmentos Agrupados				
Fuerza/frecuencia	-0.32	0.07	-0.12	0.50
Fuerza/voltaje	0.02	0.88	-0.20	0.27
Frecuencia/voltaje	0.17	0.36	0.04	0.80

\* Estos valores (P< 0.05) indican que son significativos

Cuadro 21. Valores de correlación entre contractilidad y actividad eléctrica (frecuencia y voltaje) de las diferencias entre valores básales y experimentales (DIF) en 20 unidades experimentales con 3 repeticiones para los tratamientos con espermatozoides capacitados y sin capacitar en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU).

	Capacitados		Sin capacitar	
	r	P	r	P
<b>UTE</b>				
Fuerza/frecuencia	-0.40	0.24	0.09	0.80
Fuerza/voltaje	-0.21	0.36	-0.20	0.57
Frecuencia/voltaje	-0.36	0.29	0.49	0.14
<b>UTB</b>				
Fuerza/frecuencia	-0.47	0.16	-.12	0.72
Fuerza/voltaje	-0.08	0.72	-0.09	0.80
Frecuencia/voltaje	0.20	0.57	-0.32	0.36
<b>TU</b>				
Fuerza/frecuencia	-0.64	<b>0.04*</b>	-0.10	0.77
Fuerza/voltaje	-0.06	0.85	-0.53	0.10
Frecuencia/voltaje	0.28	0.42	-0.32	0.36
Segmentos Agrupados				
Fuerza/frecuencia	-0.40	<b>0.02*</b>	-0.11	0.53
Fuerza/voltaje	-0.22	0.22	0.19	0.29
Frecuencia/voltaje	0.05	0.78	-0.01	0.93

\* Estos valores (P< 0.05) indican que son significativos

Cuadro 22. Valores de correlación entre la actividad mecánica y eléctrica (frecuencia y voltaje) de los tres segmentos uterinos agrupados útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU), comparando los tres tipos de valores empleados para el análisis, básales (BAS), experimentales (EXP) y diferencias entre estos dos últimos (DIF) en 20 unidades experimentales con 3 repeticiones para los tratamientos con espermatozoides capacitados y sin capacitar

	Capacitados						Sin capacitar					
	Fza/frec		Fza/vol		Frec/vol		Fza/frec		Fza/vol		Frec/vol	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
BAS	<b>-0.42</b>	<b>0.02*</b>	0.13	0.46	0.17	0.36	-0.11	0.53	-0.29	0.11	-0.10	0.57
EXP	-0.32	0.07	0.02	0.88	0.17	0.36	-0.12	0.50	-0.20	0.27	0.04	0.80
DIF	<b>-0.40</b>	<b>0.02*</b>	-0.22	0.22	0.05	0.78	-0.11	0.53	0.19	0.29	-0.01	0.93

\* Estos valores (P< 0.05) indican que son significativos

## **7. Discusión**

El diseño de este trabajo tuvo como finalidad tratar de responder las siguientes preguntas:

- 1) ¿Hay diferencias en la actividad mecánica y eléctrica entre los tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja: tuba uterina, unión útero-tubárica y cuerno uterino?
- 2) ¿La monta natural modifica la actividad mecánica y eléctrica de los tres segmentos del útero?
- 3) ¿El plasma seminal modifica la actividad mecánica y eléctrica de los tres segmentos del útero?
- 4) ¿La presencia de espermatozoides capacitados modifica la actividad mecánica y eléctrica de los tres segmentos del útero?

Para ello, el trabajo experimental se dividió en dos fases: en la primera los tratamientos fueron la monta natural, plasma seminal y PBS, en la segunda los tratamientos fueron espermatozoides capacitados y no capacitados. El efecto de cada uno de estos tratamientos sobre la actividad mecánica y eléctrica fue medido en cada uno de los tres segmentos en que se dividió el tracto reproductivo de la coneja.

Considerando que en otras especies uno de los dos ovarios es más activo y por ende influye en la fisiología de uno de los dos cuernos uterinos, se podría pensar en que existieran diferencias funcionales entre los dos cuernos que conforman el aparato reproductor de la coneja. Al realizarse el análisis entre dichos cuernos en cuanto a actividad mecánica y eléctrica no se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) por lo cual se optó por utilizar los registros obtenidos como un sólo conglomerado de datos para el análisis de los mismos.

En la fase 1, el análisis entre segmentos para el tratamiento monta natural, se podría haber esperado un aumento en la actividad de los tres segmentos arriba señalados a medida que los espermatozoides ascendían, sin embargo la presencia de éstos no modificó estadísticamente la actividad entre los tres segmentos. Se ha señalado que el aumento en la

actividad motriz del tracto reproductivo en el momento de la monta es responsable de llevar a los espermatozoides en pocos minutos a la tuba uterina, y que este aumento de la contractilidad muscular se acompaña por cambios en la presión intraluminal del útero, para que así el transporte rápido de espermatozoides sea seguido por una migración prolongada de espermatozoides para establecer los reservorios (Scott, 2000), fase que en la coneja dura de 1.5 a 6 horas, y que en este estudio fue comprobada al extraer por lavado espermatozoides de la UTB a las 2 horas de la monta (datos no mostrados).

En la monta natural realizada no se obtuvieron los registros basales, ya que inmediatamente después de que se daba la monta natural se preparaba a las conejas para cirugía y se procedía a los registros, sin embargo se obtuvieron los registros basales de otras conejas sin tratamiento, no encontrándose diferencias significativas entre los registros basales y los experimentales. En relación a la actividad eléctrica, diferencia entre UTE y los otros dos segmentos TU y UTB ( $P < 0.04$ ) al analizar los valores DIF (cuadro 3). El plasma seminal, desprovisto de espermatozoides ha señalado que produce un efecto en la contractibilidad y actividad eléctrica del músculo liso uterino. A través de sus componentes como: fructosa, sorbitol, inositol, ácido cítrico, fosforilcolina, ergotioneína y glicerofosforilcolina, LH, FSH, prolactina, testosterona, estradiol, inhibina, oxitocina, endorfinas y enzimas (Austin, 1982; Hafez, 1987; Berne-Levy, 2001).

Tal vez, mas que el plasma, los espermatozoides influyen en la contracción al adherirse a las células epiteliales de la tuba uterina (OEC), situación que no se demostró en este trabajo y hasta el momento no se ha reportado. Kervancioglu (2000), Yao et al. (2000), Troedsson et al. (1998) comentan que la unión con las OEC ayuda a mantener la motilidad espermática pero no hablan a cerca de la motilidad uterina.

Sin embargo el hecho de que la actividad eléctrica (voltaje) del UTE fuera menor que en la UTB y TU, sugiere que ciertos componentes del plasma seminal no están ejerciendo una acción sobre el trabajo del músculo uterino (no manifestado en la fuerza de contracción), necesario para el transporte espermático; como es el efecto de los estrógenos y prostaglandinas (Troedsson, 2005).

La solución de PBS, empleada como grupo testigo, no tuvo efecto sobre la actividad eléctrica (frecuencia y voltaje) y fuerza de contracción en ninguno de los tres segmentos. Esto sugiere que la presencia de la solución PBS no estimuló alguna actividad en ninguno de los tres segmentos del tracto reproductivo de conejas a pesar de la distensión mecánica que ocasionó.

Al encontrarse un efecto mayor de la frecuencia eléctrica en la monta natural que en el plasma seminal y PBS en los distintos segmentos se acepta que las contracciones uterinas son generadas por una actividad eléctrica originada de la despolarización y repolarización de las células miométriales, la ocurrencia de esta actividad sucesiva forma “estallidos” de actividad, estos estallidos están formados por una serie de picos de voltaje menores a 1 mV (Garfield *et al.*, 2005).

Las diferencias encontradas entre los tratamientos monta natural, plasma seminal y PBS de la fase 1, son debidas principalmente a la variable frecuencia, es decir que la frecuencia de la corriente influye sobre la respuesta en algunos de los tres segmentos (UTE y TU) del tracto reproductivo de la coneja. Cabe notar que cuando los tres segmentos fueron agrupados, los valores EXP presentaron una significancia evidente, notándose que el efecto de plasma seminal y PBS fue diferente al de la monta natural. El semen depositado en la monta natural ejerce un mayor estímulo sobre la frecuencia eléctrica del tracto reproductivo de la coneja. Aunque esto no se manifiesta en un incremento en la contractilidad. En este sentido, el efecto del macho al montar a la hembra desencadena la ovulación y consigo la secreción de hormonas (LH, FSH, prostaglandinas) que pudieron influir en el aumento de la frecuencia el eléctrica.

La correlación entre la actividad eléctrica (voltaje) y la fuerza de contracción fue discordante: por un lado, para plasma seminal entre segmentos el valor no fue significativo; para el caso de PBS la correlación entre fuerza y frecuencia fue significativa (TU, valores BAS.  $P < 0.04$ ). Para la monta natural no se encontró una correlación significativa entre las variables frecuencia, voltaje y frecuencia, excepto el dato de la tuba uterina (TU). En el caso de la frecuencia, Martínez de Juan *et al.* (2000) al estudiar la correlación entre actividad eléctrica y contracción en el intestino delgado encontraron una correlación por

arriba de los 2 Hz de la energía de la frecuencia, se menciona que más que el voltaje la frecuencia se correlaciona con la contracción, al agrupar los valores DIF de los tres segmentos del tratamiento de plasma seminal, se encontró una correlación negativa para fuerza y voltaje ( $r = -0.46$ ,  $P < 0.002$ ); esto probablemente se deba al momento en que se tomó el registro que fue una hora posterior a la monta (tiempo en que se preparó a la coneja para la cirugía), hay que recordar también el largo del tracto reproductivo por lo que los estímulos no fueron suficientes para generar una actividad eléctrica y luego mecánica.

Otras causas también pueden ser : los tres electrodos de aguja usados, la colocación de los mismos, la interferencia por ruido y posiblemente el bajo nivel de estimulación de los tratamientos que no propiciaron respuestas significativas. En este estudio los electrodos utilizados son de acero inoxidable y se colocaron a una distancia equidistante no mayor de 5 mm formando un triangulo; Muñoz *et al.* (2002) sugieren una distancia no mayor a 2.5 mm. Sin embargo este tipo de electrodos no evita la interferencia electromagnética ni tampoco los ruidos debido al acoplamiento del electrodo (Martínez y Suaste, 2001).

Otro hecho que puede explicar una correlación inconsistente (sólo en algunos casos) entre actividad mecánica y eléctrica puede ser lo encontrado por Karsdon *et al.* (2005) quién menciona que una corriente eléctrica débil puede inhibir las contracciones uterinas, las cuales pueden ser reversibles en un periodo corto de tiempo. En su estudio *in vivo* en conejos observaron que la inhibición eléctrica se dio solamente en el cuerno deseado y no sistémicamente, es decir no está causado por una hormona o un neurotransmisor sistémico. Estos mismos autores observaron que en ratas la inhibición eléctrica no sólo inhibe la contracción muscular sino que inhibe la actividad electromiografica del útero. Los factores químicos que están asociados a esta inhibición pueden ser: la liberación de neurotransmisores, por ejemplo bajas dosis de noradrenalina, péptido intestinal vasoactivo, o la formación de radicales libres, algún efecto neurogénico de los nervios en el útero, así como la hiperpolarización de la membrana celular o posiblemente afectando canales de calcio. En nuestro trabajo, las conejas fueron anestesiadas con la mezcla de acepromacina más tiletamina-zolacepam de los cuales no se ha reportado tengan efecto sobre útero. Sin embargo está mantenida por mas de 3 horas con bolos de 0.5 ml de la mezcla, este factor y algunos de los arriba mencionados, como la noradrenalina y la hiperpolarización de

membranas pudieron haber determinado una correlación no significativa en la mayoría de los casos cuando ésta fue evaluada en cada segmento.

El modelo experimental para la valoración de la actividad de tracto reproductivo de la coneja bajo diferentes situaciones de estimulación, pretende mostrar una alternativa de experimentación *in vivo*, esto implica afrontar muchas dificultades propias de este tipo de modelos y las variables inherentes de cada sujeto de experimentación. Aunque los resultados de ninguna manera son concluyentes para esta fase, se puede afirmar que el modelo experimental desarrollado es adecuado para el propósito de este trabajo y que algunas inconsistencias encontradas pueden ser explicadas por la dinámica del modelo (vgr. anestesia, colocación de los electrodos, tamaño del útero de la coneja).

En la fase 2, que consistió en comparar el efecto de espermatozoides capacitados contra espermatozoides sin capacitar objetivo central de este estudio se observó en un primer momento que la presencia de espermatozoides sin capacitar causó diferencia en la contractilidad de los tres diferentes segmentos del tracto reproductivo, cuando se analizó mediante los valores DIF ( $P < 0.03$ ): el segmento UTE fue diferente de los segmentos UTB y TU ( $P < 0.005$ ). El aumento de la contractilidad del segmento UTE sobre los otros segmentos podría explicarse por la mayor masa muscular presente en UTE o algún factor presente en espermatozoides sin capacitar que sea capaz de estimular la masa muscular prominente del UTE. Para la actividad eléctrica (voltaje) con los datos EXP se observó una diferencia para UTB con respecto a TU ( $P < 0.04$ ). Sin embargo la variación de voltaje entre los dos segmentos vecinos no parece ser determinante para inducir una real diferencia para la variable voltaje entre UTB y TU.

Por otro lado, se observó que la presencia de espermatozoides capacitados produjo diferencias significativas en la actividad eléctrica (frecuencia) analizando los valores BAS: UTE fue diferente de TU ( $P < 0.05$ ); similar a lo encontrado en espermatozoides sin capacitar el segmento UTE fue diferente, sin embargo la diferencia en una sola variable no parece ser determinante en el conjunto del tratamiento por lo que la presencia de espermatozoides capacitados no afectaría en el conjunto la actividad electromotriz entre los diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja.

La diferencia de UTE con UTB y TU para espermatozoides sin capacitar, no es concluyente ya que como se mostró la mayoría de los segmentos del tratamiento “sin capacitar” no tuvo cambios significativos ni tampoco para espermatozoides capacitados. El plasma seminal compuesto de múltiples elementos, como ya se mencionó, intervienen en el proceso de capacitación espermática (Kawakami, 2001) al ser sustituido éste por el medio de cultivo TALP, esperaríamos la acción directa de espermatozoides sin capacitar y capacitados sobre el endometrio y luego sobre el miometrio causando un estímulo sobre éstos y por consiguiente una respuesta de algún tipo. Esta situación que no se obtuvo con suficiente evidencia conlleva a sugerir algunas hipótesis:

1) Que algunos factores presentes en el plasma seminal o medio de TALP pueden estar afectando la interacción con el endometrio y con las células epiteliales de la tuba uterina. Como por ejemplo, el aumento de  $Ca^{2+}$  intracitoplasmático inhibe la unión de los espermatozoides con las células epiteliales de la tuba uterina (Kawakami, 2001), al no existir una interrelación física entre espermatozoides y células del epitelio de la tuba uterina pudiese haber una disminución de la actividad electromotriz. También, se atribuye una acción protectora de la proteína del fluido seminal (SFP) a través de la supresión del metabolismo espermático y a la reducción de la peroxidación lipídica debida a la función redox de las proteínas que contiene (Boquest *et al.*, 1999).

2) El tiempo de contacto entre los diferentes segmentos estudiados con los espermatozoides no fue el suficiente, ya que la infusión de éstos al interior de cada segmento prosiguió con el registro de los datos casi de inmediato; en consecuencia, quizá no ocurrió la interacción esperada y no se presentaron los eventos bioquímico-moleculares que podrían hacerse manifiestos en los registros.

3) Se ha señalado que la sola presencia de los espermatozoides es suficiente para generar una respuesta de las células epiteliales de la tuba uterina, los cuales responden con la posible secreción de un péptido (Yao *et al.*, 2000) y otras secreciones (Murray y Smith, 1997; Boquest *et al.*, 1999) que afectan la motilidad espermática probablemente a través de la modificación en los balances de  $Ca^{2+}$ , del AMPc o del pH (Yao *et al.*, 2000). Así al

no darse una interacción suficiente quizá no hubo secreción de estos fluidos ni tampoco una respuesta electromotriz.

Al comparar los tratamientos de espermatozoides capacitados contra espermatozoides sin capacitar, las diferencias entre segmentos para ambos tratamientos no fueron significativas, en las dos actividades: eléctrica (frecuencia y voltaje) y mecánica en las tres categorías en que fueron agrupados los valores.

Por lo cual la hiperactivación, dada por los espermatozoides capacitados, es determinante para que éstos se despeguen de las células epiteliales y estén listos para fecundar; asimismo, la concentración de calcio intracelular (Kawakami, 2001) y la probable presencia de la glucoproteína fucoídina son potentes inhibidores de la unión de los espermatozoides con las células epiteliales del órgano (Green *et al.* 2001). Una de las interrogantes era si un aumento en la motilidad en la tuba uterina ocasionaría el proceso de desprendimiento de espermatozoides de las células epiteliales. Esta situación no fue comprobada en este trabajo, aunque el aumento en la motilidad para la tuba uterina (TU) fue menor que en los otros segmentos (UTE y UTB) con espermatozoides sin capacitar y sin variación para los capacitados.

Entonces, es necesario probar con distintos intervalos de tiempo para comprobar si en esta especie en particular, debido a un proceso de ovulación inducida, se retrasa el proceso de interacción entre células. En apoyo a este punto de vista, Rovasio (2004) observó espermatozoides más aptos para fertilizar después de 24 horas de cópula que a las 16 horas.

El análisis de la correlación entre la actividad eléctrica (voltaje y frecuencia) y la fuerza de contracción cuando fueron administrados espermatozoides capacitados a los tres segmentos estudiados del aparato reproductor de la coneja, mostró una correlación significativa en varios segmentos. La variable frecuencia se manifiesta en esta fase como un factor evidente en la correlación entre actividad eléctrica y mecánica, esto esta de acuerdo a lo reportado por Martínez de Juan *et al.* (2000) que detectaron una correlación significativa entre la frecuencia de la corriente y la motilidad intestinal en frecuencias superiores a los 2 Hz para ese órgano en perros; en nuestro caso, las frecuencias encontradas fueron menores a 0.1 Hz.

Para espermatozoides sin capacitar no se encontró correlación entre las tres variables estudiadas, lo cual nos hace pensar en el posible efecto de los espermatozoides sobre el endometrio y miometrio como un estímulo sobre el aumento de la actividad eléctrica (frecuencia) y por ende de la actividad mecánica, comprobación que escapa a este trabajo y que sería recomendable continuar.

Recapitulando, en los tratamientos de la fase 1, la monta natural no produjo diferencias significativas, exceptuando la frecuencia de la corriente que fue casi el doble respecto a los otros tratamientos. En plasma seminal, las diferencias se dieron en la variable frecuencia con los otros dos tratamientos y en la correlación fuerza/voltaje se observaron los mayores cambios. Para PBS, los hallazgos son mínimos y aislados (correlación fuerza/frecuencia) por lo tanto no determinantes para la respuesta electromotriz. Las diferencias encontradas entre los tratamientos monta natural, plasma seminal y PBS, son debidas principalmente a la variable frecuencia, esto quiere decir que la frecuencia de la corriente influye sobre la respuesta en algunos de los tres segmentos (UTE y TU) del tracto reproductivo de la coneja.

En la fase 2, en el tratamiento de espermatozoides sin capacitar, UTE fue diferente de los otros segmentos en voltaje y fuerza; en el tratamiento de espermatozoides capacitados la variable frecuencia fue diferente entre segmentos para TU. Entre los dos tratamientos no se observaron diferencias para las variables ni para los segmentos. En cuanto a las correlaciones significativas, se observaron sólo en espermatozoides capacitados entre todas las variables; esto es relevante, probablemente se debe a algún factor presente en los espermatozoides capacitados y que sería recomendable seguir estudiando.

## **8. Conclusiones.**

El modelo experimental empleado en este trabajo para demostrar la actividad electromotriz del tracto reproductivo de la coneja, es una alternativa de experimentación *in vivo*. Se puede afirmar que el modelo experimental desarrollado es adecuado para el propósito de este trabajo y que algunas inconsistencias encontradas pueden ser explicadas por la dinámica del modelo.

1) En la fase 1 las diferencias encontradas entre los tratamientos monta natural, plasma seminal y PBS, son debidas principalmente a la variable frecuencia, esto quiere decir que la frecuencia de la corriente influye sobre la respuesta en algunos de los tres segmentos (UTE y TU) del tracto reproductivo de la coneja.

Para el tratamiento con plasma seminal, hubo diferencias significativas de la actividad mecánica y la actividad eléctrica entre UTE y los otros dos segmentos. En el caso de la correlación entre la actividad eléctrica (voltaje) y la fuerza de contracción no fue significativa para ciertos valores.

Para el tratamiento PBS la correlación entre fuerza y frecuencia fue significativa. Esto demuestra que se lleva a cabo primero la actividad eléctrica y luego la consiguiente contracción muscular. Para monta natural de manera general no se encontró una correlación significativa entre las variables frecuencia, voltaje y fuerza.

2) En la fase 2 la presencia de espermatozoides sin capacitar y capacitados causó diferencia en la contractibilidad de los tres diferentes segmentos del tracto reproductivo. El aumento de la contractilidad del segmento UTE sobre los otros segmentos se explicaría por una mayor masa muscular presente en el segmento UTE o algún factor presente en espermatozoides sin capacitar o capacitados que estimula la masa muscular prominente del UTE.

Al comparar los tratamientos de espermatozoides capacitados contra espermatozoides sin capacitar, las diferencias entre segmentos para ambos tratamientos, en la mayoría de los casos, no fueron significativas por lo que se puede establecer que no hubo influencia de los tratamientos en la actividad mecánica y eléctrica de los diferentes segmentos del útero de coneja. En cuanto a la correlación entre las distintas variables para espermatozoides

capacitados se observaron para todas las variables. La variable frecuencia se manifestó en esta fase como un factor determinante en la correlación entre la actividad eléctrica y mecánica; los valores de frecuencias encontradas fueron menores a 0.1 Hz.  $\lambda$

## 9. Referencias

1. **Abney T.O., Williams W. L.** Inhibition of sperm capacitation by intrauterine deposition of seminal plasma decapacitation factor. *Biology of reproduction* 2: 14-17, (1970)
2. **Akruk S.R., Humpherys W.J., Williams W.L.** In vitro capacitation of ejaculated rabbit spermatozoa. *Differentiation*. 13: 125-31, (1979)
3. **Anzaldúa S.R., Pérez-Martínez M, Cerbón M.A., Camacho A. I.** Actividad secretora del oviducto de mamíferos domésticos durante la fertilización y el desarrollo embrionario temprano. *Ciencia Veterinaria* 9,(2003)
4. **Baldi E., Luconi M., Bonaccorsi L., Krausz C., Forti G.** Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: Role of calcium protein phosphorylation and lipid remodeling pathways. *Frontiers in Bioscience* 1 : 189-205, (1996)
5. **Berne R. Levy M.** Fisiología. Ed. 1a. edición editorial Harcourt-Mosby. Madrid (2001)
6. **Boquest, la A. C., Smith J. F., Briggs R. M., Duganzich D. M. Summers P. M.** Effects of bovine oviductal proteins on bull spermatozoal function *Theriogenology* 51:583-595, (1999)
7. **Bosch P. Wright R.W.** The oviductal sperm reservoir in domestic mammals. *Arch. Med Vet.* 37: 95-104, (2005)
8. **Brackett B., Oliphant G.** Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro* *Biology of Reproduction* 12 : 260-274, (1975)
9. **Breitbart H.** Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology* 187 : 139–144, (2002)
10. **Buhimschi C, Garfield R.E.** Uterine contractility as assessed by abdominal surface recording of electromyographic activity in rats during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 174 :744-753, (1996.)
11. **Cavaco-Gonçalves et al.** Increased cervical electrical activity during oestrus in progestagen treated ewes: possible role in sperm transport. *Animal Reproduction Science* article in press (2005.)
12. **Cunningham.** Fisiología Veterinaria. 2a edición McGraw-Hill Interamericana. Mexico (1999.)
13. **Chang Chan H, Xian Q.S., Xi C, Fei X., Ming W., Ying W., Jun Ai, Ni Y., Ying Y.** Critical role in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm. *Molecular and Cellular Endocrinology.* Article in press (2006)
14. **Chang M.C.** The meaning of sperm capacitation. A historical perspective. *Journal of Andrology* 5:45-50, (1984)
15. **Chen Y., Simkin J. Li, M. E., Yang X., Il Foote R.** Fertility of fresh and frozen Rabbit Semen Inseminated at Different Times Is Indicative of Male Differences In capacitation time. *Biology of Reproduction* 41 : 848-853, (1989)
16. **Fateh El-Bab A.Z., Hassan, A A.. Al-Bashary and MA. El-Habashy.** Effects of unilateral ovariectomy on the numbers of sperm in the oviducts, uterus and cervix of rabbits. *Theriogenology* April 19 : 527, (1983)
17. **Flores G. H. F.** Efecto del enfriado lento hasta – 5° C previo a la congelación sobre la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide porcino. Tesis de Maestría. FES Cuautitlán UNAM. (2005)

18. **Gadella B.M., Rathi R., Brouwers J.F.H.M , Stout T.A.E., Colenbrander B.** Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science* 68 : 249–265 (2001)
19. **García D.C.** Evaluación del efecto del fluido de la tuba uterina de la cerda sincronizada sobre la capacitación espermática de los espermatozoides criopreservados. Tesis de maestría en ciencias de la salud y la producción animal. UNAM (2006)
20. **García-Macedo R., Rosales A.M. , Hernández-Pérez O, Cavaría M.E. Reyes A. Rosado A.** Effect of bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar (V-type) proton ATPases, on the capacitation of rabbit spermatozoa. *Andrologia* 33: 113-121, (2001)
21. **Garfield R. E., Maner W. L., MacKay L. B., Schlembach D., Saade G.R.** Comparing uterine electromyography activity of antepartum patients versus term labor patients. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 193: 23–9, (2005)
22. **Giojalas L.C., Djanogly S.** Timing of sperm capacitation appears to be programmed according to egg availability in the female genital tract. *Fertility and Sterility* 82: (2004)
23. **Green C. E. , Bredl J., Holt W. V. , Watson P. F. Fazeli. A.** Carbohydrate mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cells in vitro. *Reproduction* 122: 305–31, (2001)
24. **Gosalvez, L. F.; Alvaríño, J. M.; Díaz, P. Y Tor, M.** Influencia de la edad, estímulo con PMSG o flushing por sobre alimentación en la respuesta ovárica. *Boletín de Cunicultura* 17: 41, (1994.)
25. **Harrison R.A.P., Gadella B.M.** Bicarbonate induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 63: 342-351, (2005)
26. **Heidi L. Shafford, R.R., Strittmatter J.C., Schadt.** A novel electrode design for chronic recording of electromyographic activity. *Journal of Neuroscience Methods* 156: 228–230, (2006)
27. **Hewitt D.A. , England G.C.W.** An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Animal Reproduction Science* 51 : 321–332, (1998)
28. **Hirsbrunner G., Reist M., Cuoto S., Steiner A., Snyder J., Van Leeuwen E., Liu I.** An in vitro study on spontaneous myometrial contractility in the mare during estrus and diestrus. *Theriogenology* 65 : 517-527, (2006)
29. **Horoba K., Jezewski J., Wrobel J., Graczyk S.** Algorithm for detection of uterine contractions from electrohysterogram. *Proceedings of the 23<sup>rd</sup> Annual EMBS International Conference, October 25-28, Istambul, Turkey* (2001)
30. **Karsdon J., Garfield R., Shi SQ., Maner W., Saade G.** Electrical inhibition of preterm birth: Inhibition of uterine contractility in the rabbit and pup births in the rat. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 193: 1986-93, (2005)
31. **Kawakami E., Kashiwagi C., Hori T., Tsutsui T.** Effects of canine oviduct epithelial cells on movement and capacitation of homologous spermatozoa in vitro. *Animal Reproduction Science* 68 : 121–131, (2001)
32. **Kervancioglu M. E., Saridogan E. Aittaken J.R..** Importance of sperm to epithelial cell contact for the capacitation of human spermatozoa in fallopian tube epithelial cell cocultures. *Fertility and Sterility* 74: 780-784, (2000.)
33. **Khalifa, R. M.** Cambios hormonales. *Boletín de cunicultura.* 17 :41, (1994)
34. **Koehler J.K.** Changes in antigenic site distribution on rabbit spermatozoa after incubation in capacitating media. *Biology of Reproduction* 15 : 444-456, (1976)

- 35. Langendijk P., Soede N.M., Kemp B.** Uterine activity, sperm transport, and the role of boar stimuli around insemination in sows *Theriogenology* 63 : 500–513, (2005)
- 36. Lambert R.D. and Sirard M.A.** Factors influencing in vitro capacitation of ejaculated rabbit spermatozoa. *Laboratoire de Genetique Moleculaire Theriogenology* 21: 245, (1984)
- 37. Lee M.B., Duby R.T. Robl J. M.** Rabbit sperm function after co-culture with uterine epithelial cells *Theriogenology* 34 :113-125, (1990)
- 38. Leman H., Marque C.** Rejection of the Maternal Electrocardiogram in the Electrohysterogram Signal *IEEE transactions on biomedical engineering*, 47: 1010-1016, (2000)
- 39. Manjunath P; Therien I.** Role of seminal phospholipid binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology* 53 : 109-119, (2002)
- 40. Martínez M. R. Suaste G. E.** Diseño de un opto-electrodo con cristales líquidos, con propósitos biomédicos. *Memorias del II Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica. Habana, Cuba, 23-25 Mayo* (2001)
- 41. Martinez de Juan J.L., Saiz J, Meseguer M., Ponce J.L.** Small bowel motility: relationship between smooth muscle contraction and electroenterogram signal. *Medical Engineering & Physics* 22 189-199, (2000)
- 42. Minelli A, Liguori L., Collodel G., Latataioli P., Castellini C.** Effects of the purified IGF-I complex on the capacitation and acrosome reaction of rabbit spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology* 290:311-317, (2001)
- 43. Muñoz R., Leija L., Alvarez J. Reyes J.L., Flores J., Hdez P-R., Minor A., Sierra G.** Evaluation of electrical impedance of Pt-Ir epimysial electrodes under implantation in muscles. *Sensors and Actuators A* 101 : 117-122, (2002)
- 44. Parish J J; Susko-Parish J; Winer M A ., First N L .** Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction* 38 :1171-1180, (1988)
- 45. Rebollar P.G., Milanés A. , Pereda N. , Millán P. , Canoc P., Esquifino A.I. , Villarreal M. , Silván G. , Lorenzo P.L.** Oestrus synchronisation of rabbit does at early post-partum by doe–litter separation or ECG injection: Reproductive parameters and endocrine profiles *Animal Reproduction Science* 93 : 218–230, (2006)
- 46. Rodríguez P.H.** Aspectos Reproductivos en las Conejas. *Servicio de Extensión Agrícola. Universidad de Puerto Rico*, 1-13 (1999)
- 47. Rovasio R.A., Fabro G., Gakamasky A., Eisenbach M.** Timing of sperm capacitation appears to be programmed according to egg availability in the female genital tract. *Fertility and Sterility* 82: (2004)
- 48. Scott M.A.** A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Animal Reproduction Science* 60–61 : 337–348, (2000)
- 49. Seitz H.M. Jr., Rocha G., Brackett B.G., Mastroianni L Jr.** Influence of the oviduct on sperm capacitation in the rabbit. *Fertil Steril.* 21: 325-8, (1970)
- 50. Shafik A., El Sibai O., Shafik A.A., Ahmed I., Mostafa R.M.** The electrovaginogram: study of the vaginal electric activity and its role in the sexual act and disorders *Arch Gynecol Obstet* 269:282–286, (2004)
- 51. Shenbaga D., Ravindran G.** Non invasive monitoring of foetal cardiac activities and uterine contractile activities. *18th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* 5.4.5: ECG Measurement and Monitoring, Amsterdam (1996)

- 52. Spilman C.H., Bergstrom K.K., Forbes A.D.** Effects of 19-hydroxy-prostaglandins on oviductal and uterine motility. Fertility research. The Upjohn Company, Kamalazoo, Mich49001. USA
- 53. Suarez S. S.** Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. *Reproduction, Fertility and Development*, 19 : 103-110, (2007)
- 54. Suarez S.S.** The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. Minireview. *Biology of reproduction* 58 : 1105-1107, (1998)
- 55. Troedsson M.H.T.; Liu I. K.M.; Crabo B.G.** Sperm transport and survival in the mare. *Theriogenology*, 49 : 905-915, (1998)
- 56. Troedsson M.H.T., Ddesvouges A., Alghamdi A.S., Dahms B., Dow C.A., Hayna J., Valesco R.** Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science* 89 : 171-186, (2005)
- 57. Visconti P.E., Kopf G.** Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. Minireview *Biology of Reproduction* 59 : 1-6, (1998)
- 58. Wray S.** Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. *Am J Physiol Cell* 264: C1-C18, (1993)
- 59. Yao Yuan-Q., Ho Pak-C., Shu-biu W. Y.** Human oviductal cells produce a factor(s) that maintains the motility of human spermatozoa in vitro. *Fertility and Sterility* 73 : (2000)

## 10. Anexos.

### Anexo 1

Cuadro 1. Composición del Medio TALP

Químico	ml
NaCl (0.5 M)	19.2
NaHCO <sub>3</sub> (0.25 M)	6.0
Na Hepes pH 7.58 (0.2 M)	10.0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O (0.1 M)	0.3
KCl (0.5 M)	0.62
MgSO <sub>4</sub> (0.1 M)	0.4
Glucosa (0.5 M)	1.0
CaCL <sub>2</sub> (1 M)	0.46
Lactato (60 % syrup)	0.312
Rojo fenol (2 mg/mL) + amikacina (10 mg/mL)	1.0
Agua miliQ cbp	100.0

(Parish JJ *et al.*, 1988)

Hasta antes de experimentar se adicionó lo siguiente:

1. Gasificar CO<sub>2</sub> al 5 % hasta que vire el color rojo de la solución a naranja
2. Adicionar albúmina de suero bovino (BSA) 5 mg/mL
3. Piruvato de sodio (0.2 M) 5 µL/mL
4. Ajustar pH a 7.4

Se llevó a cabo un muestreo en los diferentes momentos arriba mencionados para corroborar el tiempo de la capacitación de espermatozoides de conejo. Esto se hizo por medio de la tinción modificada de clortetraciclina (CTC) descrita por Green y Watson (2001). Para la técnica de tinción con CTC se realizó la preparación de los siguientes reactivos:

Primero es necesario preparar una solución buffer, para diluir las sales. La solución amortiguadora del CTC se preparó con:

20 mmol de TRIS

130 mmol de NaCl

1000 ml agua destilada

El buffer se filtró a través de filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  (Gelman Sciences, Norhampton, UK) y se almacenó a 4° C. La solución de CTC se preparó con:

5 ml de solución amortiguadora CTC

805 mmol de CTC (Sigma)

5 mmol de Cisteína (Sigma)

El pH de la solución se ajustó a 7.8 y se almacenó a 4° C

Ya preparada la tinción de CTC se lleva a cabo el siguiente procedimiento para la tinción de la muestra seminal:

1. A 100  $\mu\text{L}$  de CTC se adicionan 100  $\mu\text{L}$  de semen diluido con medio TALP
2. A la mezcla anterior se agregan 22  $\mu\text{L}$  de solución en agua de gluteraldehído (0.2 % v/v)
3. Se toman 10  $\mu\text{L}$  de la solución anterior y se depositan en un portaobjetos, se agrega 1 gota de solución 1,4-diazabicyclo (2.2.2) octano  $\text{I}^{-1}$  (DABCO; Sigma) diluido en glicerol (glicerol PBS 9:1) con el fin de retrasar la pérdida de fluorescencia (Green y Watson, 2001; Kaneto, 2002).

Se coloca un cubreobjetos y se retira el excedente con un papel absorbente

## Anexo 2

La preparación de la tinción de Eosina-Nigrosina se realiza de la siguiente manera:

Eosina B        5 g

Nigrosina       40 g

Agua destilada 500 mL

Se agregó la nigrosina al agua caliente a 85° C, se mezcló y se agitó hasta disolver, se agregó la eosina y se agitó hasta uniformar, se guardó en refrigeración 4° C.

La técnica de tinción con eosina-nigrosina se desarrolló de la siguiente forma:

1. Se coloca una gota de semen ya diluido en solución de TALP sobre un portaobjetos.
2. Junto al semen se coloca una gota de tinción de eosina-nigrosina
3. Se mezclan ambas gotas y se extiende en el portaobjeto con el fin de obtener una película muy delgada que se seca al aire inmediatamente.
4. Se procede a la observación directa en microscopio de luz a 400 aumentos, aquellos espermatozoides que se observan en color claro (blancos) es decir sin coloración, indica que la membrana plasmática está intacta y ha impedido la entrada de colorante a su interior; aquellos que están teñidos se consideran con daño en la membrana. Se contaron 100 espermatozoides y el resultado se expresó en porcentaje.

### Anexo 3

Cuadro 3. Efecto del plasma seminal (14 unidades experimentales con 3 repeticiones) sobre la contractilidad y actividad eléctrica en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). Comparando los tres tipos de valores empleados para el análisis, basales (BAS), experimentales (EXP) y diferencias entre estos dos últimos (DIF).

Variable	Frecuencia (Hz)			Voltaje (mV)			Fuerza (g)		
	BAS	EXP	DIF	BAS	EXP	DIF	BAS	EXP	DIF
UTE	0.037 ± 0.009	0.043 ± 0.011	0.005 ± 0.01	0.159 ± 0.103	0.08 ± 0.045	-0.079 ± 0.08 <sup>a</sup>	9.71 ± 3.87	13.28 ± 5.72	3.57 ± 7.22
UTB	0.048 ± 0.011	0.047 ± 0.013	-0.001 ± 0.01	0.084 ± 0.058	0.058 ± 0.024	-0.025 ± 0.043 <sup>b</sup>	11.98 ± 3.87	9.19 ± 3.57	-2.79 ± 4.75
TU	0.059 ± 0.028	0.049 ± 0.017	-0.009 ± 0.015	0.085 ± 0.04	0.089 ± 0.073	0.004 ± 0.04 <sup>b</sup>	9.38 ± 2.84	8.58 ± 2.87	-8.02 ± 1.68

Los valores son promedios ± desviación estándar. Letras diferentes dentro de columnas indican diferencias estadísticas (P<0.05).

Cuadro 4. Efecto del PBS (12 unidades experimentales con 3 repeticiones) sobre la contractilidad y actividad eléctrica en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). Comparando los tres tipos de valores empleados para el análisis, basales (BAS), experimentales (EXP) y diferencias entre estos dos últimos (DIF).

Variable	Frecuencia (Hz)			Voltaje (mV)			Fuerza (g)		
	BAS	EXP	DIF	BAS	EXP	DIF	BAS	EXP	DIF
UTE	0.052 ± 0.012	0.046 ± 0.008	-0.006 ± 0.011	0.155 ± 0.095	0.083 ± 0.011	-0.072 ± 0.095	9.73 ± 5.22	8.81 ± 6.88	-0.925 ± 7.33
UTB	0.05 ± 0.008	0.055 ± 0.011	-0.004 ± 0.016	0.098 ± 0.032	0.095 ± 0.058	-0.003 ± 0.04	7.45 ± 3.36	7.85 ± 4.19	0.401 ± 3.09
TU	0.045 ± 0.015	0.045 ± 0.008	0.00001 ± 0.011	0.158 ± 0.133	0.151 ± 0.104	0.007 ± 0.052	10.19 ± 6.65	10.95 ± 6.97	0.762 ± 1.95

Los valores son promedios ± desviación estándar. No hubo diferencias significativas (P>0.05).

Cuadro 5. Efecto de la monta natural (11 unidades experimentales con 3 repeticiones) valores experimentales (EXP) sobre la contractilidad y actividad eléctrica en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). Comparando los tres tipos de valores empleados para el análisis, básales (BAS), experimentales (EXP) y diferencias entre estos dos últimos (DIF).

Segmento	Frecuencia (Hz)	Voltaje (mV)	Fuerza (g)
UTE	0.076 ± 0.028	0.129 ± 0.045	5.75 ± 2.07
UTB	0.109 ± 0.083	0.103 ± 0.039	6.80 ± 4.55
TU	0.077 ± 0.018	0.110 ± 0.066	8.68 ± 3.92

Los valores son promedios ± desviación estándar. No hubo diferencias significativas (P>0.05).

Cuadro 6. Valores básales (BAS) de 26 unidades experimentales en la contractilidad y actividad eléctrica (voltaje y frecuencia) en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU).

Segmento	Frecuencia	Voltaje	Fuerza
UTE	0.044 ± 0.012	0.158 ± 0.095	9.72 ± 4.34
UTB	0.049 ± 0.009	0.090 ± 0.047	9.89 ± 4.21
TU	0.052 ± 0.023	0.119 ± 0.098	9.76 ± 4.75

Los valores son promedios ± desviación estándar.

Cuadro 7. Comparación de valores experimentales (EXP) de tres diferentes tratamientos plasma seminal (14 unidades experimentales con 3 repeticiones), PBS (12 unidades experimentales con 3 repeticiones) y monta natural (11 unidades experimentales con 3 repeticiones) y su efecto en la contractilidad y actividad eléctrica (frecuencia y voltaje) en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU).

Tratamiento	Plasma			PBS			Monta		
	Frecuencia	Voltaje	Fuerza	Frecuencia	Voltaje	Fuerza	Frecuencia	Voltaje	Fuerza
UTE	0.043 ± 0.011 <sup>a</sup>	0.080 ± 0.045	13.28 ± 5.7	0.046 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.083 ± 0.011	8.81 ± 6.8	0.076 ± 0.028 <sup>b</sup>	0.129 ± 0.045	5.75 ± 2.07
UTB	0.047 ± 0.013	0.058 ± 0.024	9.19 ± 3.5	0.055 ± 0.011	0.095 ± 0.058	7.85 ± 4.1	0.109 ± 0.083	0.103 ± 0.039	6.80 ± 4.5
TU	0.049 ± 0.017 <sup>a</sup>	0.089 ± 0.073	8.58 ± 2.8	0.045 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.151 ± 0.104	10.95 ± 6.9	0.077 ± 0.018 <sup>b</sup>	0.110 ± 0.066	8.68 ± 3.9

Los valores son promedios ± desviación estándar. Letras diferentes en filas con la misma variable indican diferencias estadísticas (P<0.05).

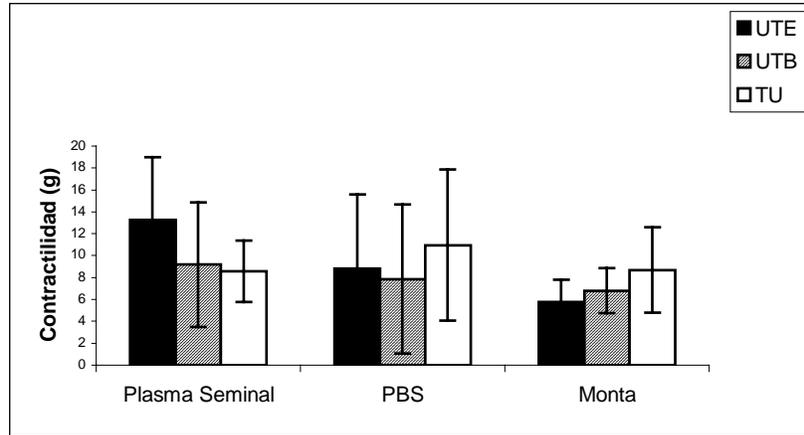


Figura 13. Comparación de los valores experimentales (EXP) de tres tratamientos, plasma seminal, PBS y monta natural ( 14,12 y 11 unidades experimentales respectivamente con 3 repeticiones) sobre la contractilidad en 3 diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). No se encontraron diferencias

Cuadro 8. Comparación de la diferencia entre el valor basal y experimental (DIF) de dos diferentes tratamientos plasma seminal (14 unidades experimentales con 3 repeticiones) y PBS (12 unidades experimentales con 3 repeticiones) y su efecto en la contractilidad y actividad eléctrica (voltaje y frecuencia) en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU).

Tratamiento	Plasma Seminal			PBS		
	Frecuencia (Hz)	Voltaje (mV)	Fuerza (g)	Frecuencia (Hz)	Voltaje (mV)	Fuerza (g)
UTE	0.005 ± 0.01	-0.082 ± 0.07	3.57 ± 7.22	-0.006 ± 0.01	-0.072 ± 0.09	-0.925 ± 7.33
UTB	-0.001 ± 0.01	-0.018 ± 0.06	-2.79 ± 4.75	0.004 ± 0.02	-0.002 ± 0.05	0.099 ± 2.95
TU	-0.009 ± 0.02	0.008 ± 0.05	-0.802 ± 1.68	0.00001 ± 0.01	-0.007 ± 0.05	0.762 ± 1.95

Los valores son promedios ± desviación estándar. No hubo diferencias significativas (P>0.05).

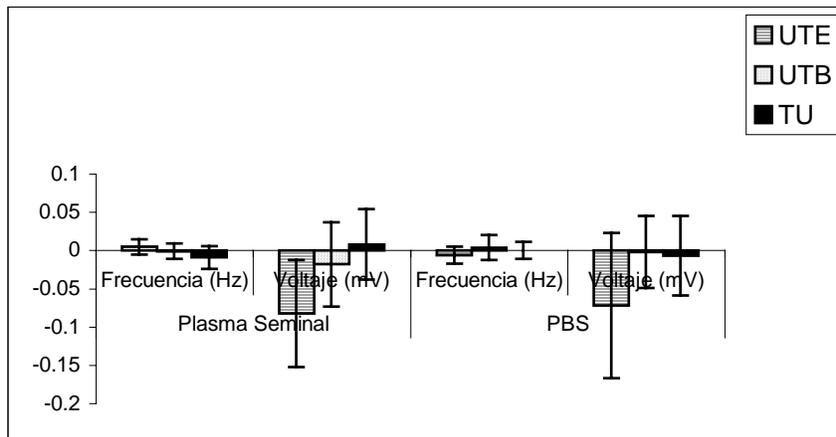


Figura 14. Comparación de los valores de las diferencias entre valores basales y experimentales (DIF) de dos tratamientos, plasma seminal y PBS (14 y 12 unidades experimentales respectivamente con 3 repeticiones) sobre la actividad eléctrica en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, , útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). No se encontraron diferencias (P>0.05), los valores son promedios ± desviación estándar

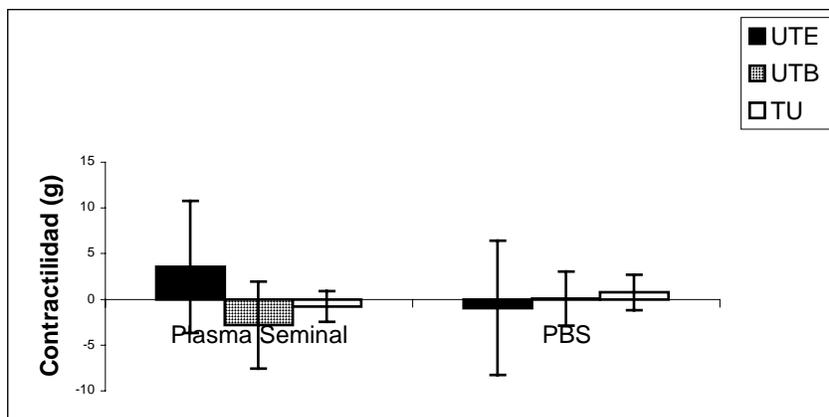


Figura 15. Comparación de los valores DIF de dos tratamientos, plasma seminal (14 unidades experimentales con 3 repeticiones) y PBS (12 unidades experimentales con 3 repeticiones) sobre la contractilidad en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). No se encontraron diferencias ( $P>0.05$ ), los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar

Cuadro 9. Comparación entre tratamientos plasma seminal (14 unidades experimentales con 3 repeticiones) y PBS (12 unidades experimentales con 3 repeticiones) considerando los valores experimentales (EXP) cuando se agruparon los tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU).

	Segmentos Agrupados UTE+UTB+TU		
	Frecuencia (Hz)	Voltaje (mV)	Fuerza (g)
Monta Natural	$0.087 \pm 0.051^a$	$0.114 \pm 0.049$	$7.08 \pm 3.66$
Plasma Seminal	$0.046 \pm 0.014^b$	$0.074 \pm 0.053$	$10.35 \pm 4.55$
PBS	$0.049 \pm 0.010^b$	$0.102 \pm 0.064$	$8.60 \pm 5.93$

Los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar de los valores experimentales. Letras diferentes dentro de columnas indican diferencias estadísticas ( $P<0.05$ ).

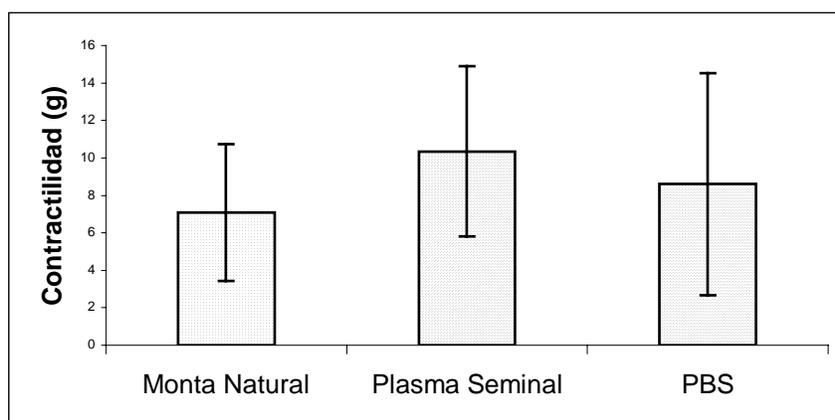


Figura 17. Diferencias entre tratamientos, monta natural, plasma seminal y PBS (14 y 12 unidades experimentales respectivamente con 3 repeticiones) de los valores experimentales (EXP) sobre la contractilidad de segmentos agrupados del tracto reproductivo de la coneja. No se encontraron diferencias ( $P>0.05$ ), los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar

Cuadro 10. Valores de correlación entre la contractilidad y la actividad eléctrica (frecuencia y voltaje) de valores experimentales (EXP) con monta natural, PBS y plasma seminal (14, 12 y 11 unidades experimentales respectivamente con 3 repeticiones) en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU).

	Monta Natural		Plasma Seminal		PBS	
	r	P	r	P	r	P
UTE						
Fuerza/frecuencia	0.142	0.78	-0.10	0.81	-0.02	0.10
Fuerza/voltaje	-0.25	0.62	-0.28	0.53	-0.94	0.26
Frecuencia/voltaje	-0.54	0.26	-0.42	0.33	-0.08	0.87
UTB						
Fuerza/frecuencia	-0.08	0.87	0.67	0.09	0.08	0.87
Fuerza/voltaje	-0.42	0.39	-0.64	0.11	0.25	0.62
Frecuencia/voltaje	0.02	0.95	-0.53	0.21	0.02	0.95
TU						
Fuerza/frecuencia	0.48	0.32	-0.57	0.18	-0.48	0.32
Fuerza/voltaje	0.02	0.95	-0.07	0.87	-0.37	0.46
Frecuencia/voltaje	0.37	0.46	0	0	-0.37	0.46
Segmentos Agrupados						
Fuerza/frecuencia	0.17	0.49	-0.01	0.93	-0.10	0.66
Fuerza/voltaje	-0.24	0.33	-0.2	0.38	-0.02	0.91
Frecuencia/voltaje	-0.07	0.76	-0.34	0.12	-0.20	0.40

Cuadro 13. Efecto de la presencia de espermatozoides sin capacitar (20 unidades experimentales con 3 repeticiones) sobre la contractilidad y actividad eléctrica de tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). Comparando los tres tipos de valores empleados para el análisis, basales (BAS), experimentales (EXP) y diferencias entre estos dos últimos (DIF).

Variable	Frecuencia			Voltaje			Fuerza		
	BAS	EXP	DIF	BAS	EXP	DIF	BAS	EXP	DIF
Segmento									
UTE	0.077 ± 0.036	0.058 ± 0.02	-0.019 ± 0.025	0.09 ± 0.66	0.101 ± 0.068 <sup>ab</sup>	-0.008 ± 0.045	6.41 ± 3.01	10.7 ± 8.94	2.84 ± 6.28 a
UTB	0.072 ± 0.025	0.059 ± 0.02	-0.012 ± 0.022	0.104 ± 0.048	0.059 ± 0.039 <sup>a</sup>	-0.045 ± 0.052	6.11 ± 1.86	5.06 ± 2.56	-0.80 ± 2.65 b
TU	0.067 ± 0.026	0.075 ± 0.025	0.008 ± 0.019	0.113 ± 0.074	0.109 ± 0.059 <sup>b</sup>	-0.004 ± 0.044	7.29 ± 3.79	6.82 ± 3.79	-0.87 ± 1.79 b

Los valores son promedios ± desviación estándar. Letras diferentes dentro de columnas indican diferencias estadísticas (P<0.05).

Cuadro 14. Efecto de la presencia de espermatozoides capacitados (20 unidades experimentales con 3 repeticiones) sobre la contractilidad y actividad eléctrica de tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). Comparando los tres tipos de valores empleados para el análisis, basales (BAS), experimentales (EXP) y diferencias entre estos dos últimos (DIF).

Variable	Frecuencia			Voltaje			Fuerza		
	BAS	EXP	DIF	BAS	EXP	DIF	BAS	EXP	DIF
UTE	0.054 ± 0.015 <sup>a</sup>	0.048 ± 0.011	-0.005 ± 0.011	0.144 ± 0.089	0.082 ± 0.059	-0.045 ± 0.078	5.93 ± 2.6	9.87 ± 8.18	2.19 ± 4.45
UTB	0.067 ± 0.022 <sup>ab</sup>	0.054 ± 0.014	-0.012 ± 0.023	0.169 ± 0.235	0.090 ± 0.041	-0.024 ± 0.104	5.53 ± 2.51	5.59 ± 3.1	-0.335 ± 2.61
TU	0.07 ± 0.022 <sup>b</sup>	0.066 ± 0.025	-0.004 ± 0.018	0.137 ± 0.09	0.126 ± 0.079	-0.010 ± 0.04	5.29 ± 1.99	5.19 ± 1.8	-0.095 ± 1.63

Los valores son promedios ± desviación estándar. Letras diferentes dentro de columnas indican diferencias estadísticas (P<0.05).

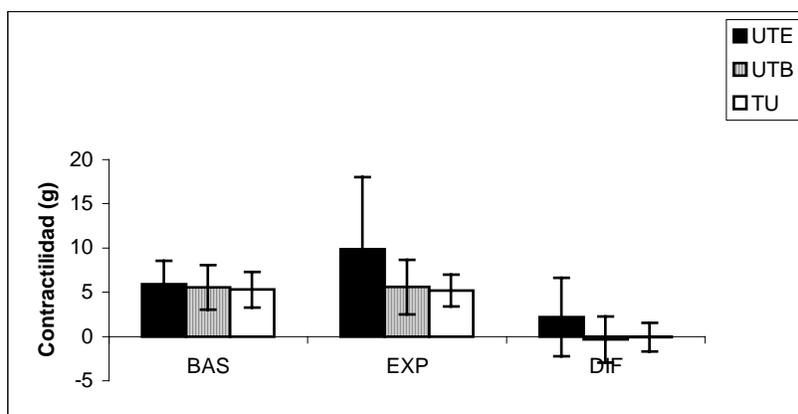


Figura 21. Comparación de valores basales (BAS), experimentales (EXP) y diferencias entre estos dos últimos (DIF) de la contractilidad de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU) con espermatozoides capacitados (20 unidades experimentales con tres repeticiones). No se encontraron diferencias (P>0.05), los valores son promedios ± desviación estándar

Cuadro 15. Valores básicos (BAS) de 40 unidades experimentales con 3 repeticiones sobre el efecto en la contractilidad y actividad eléctrica (frecuencia y voltaje) en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU).

Segmento	Frecuencia (Hz)	Voltaje (mV)	Contractilidad (g)
UTE	$0.066 \pm 0.030$	$0.118 \pm 0.081$	$6.17 \pm 2.75$
UTB	$0.069 \pm 0.023$	$0.877 \pm 3.32$	$5.82 \pm 2.17$
TU	$0.130 \pm 0.272$	$0.118 \pm 0.325$	$6.08 \pm 3.27$

Los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar.

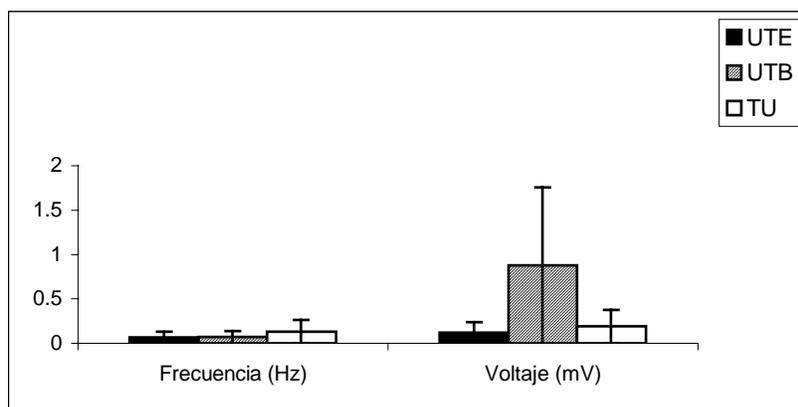


Figura 22. Valores básicos (BAS) de 40 unidades experimentales con 3 repeticiones sobre la actividad eléctrica de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ), los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar

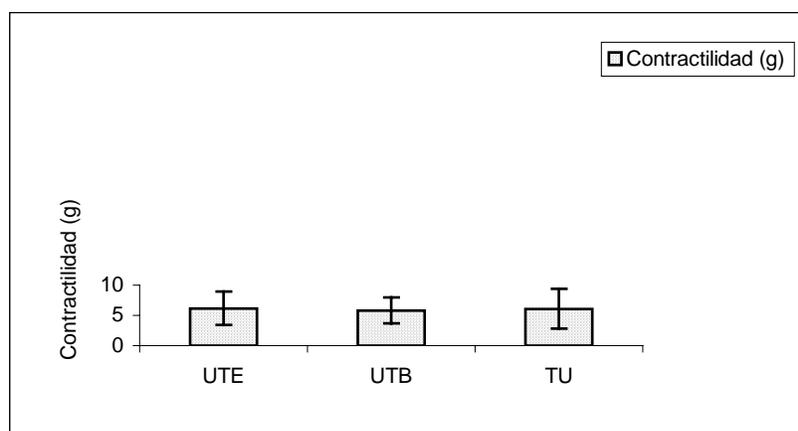


Figura 23. Valores básicos BAS de 40 unidades experimentales con 3 repeticiones sobre la contractilidad de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ), los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar

Cuadro 16. Comparación de valores experimentales (EXP) de dos diferentes tratamientos espermatozoides capacitados y sin capacitar (20 unidades experimentales para cada tratamiento con 3 repeticiones) y su efecto en la contractilidad y actividad eléctrica (frecuencia y voltaje) en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja. útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU).

Tratamiento	Espermatozoides Sin Capacitar			Espermatozoides Capacitados		
	Frecuencia (Hz)	Voltaje (mV)	Fuerza (g)	Frecuencia (Hz)	Voltaje (mV)	Fuerza (g)
UTE	0.058 ± 0.02	0.101 ± 0.068	10.7 ± 8.9	0.048 ± 0.011	0.082 ± 0.059	9.87 ± 8.2
UTB	0.059 ± 0.02	0.059 ± 0.039	5.06 ± 2.6	0.054 ± 0.014	0.090 ± 0.041	5.59 ± 3.1
TU	0.075 ± 0.025	0.109 ± 0.059	6.82 ± 3.8	0.066 ± 0.025	0.126 ± 0.079	5.19 ± 1.8

Los valores son promedios ± desviación estándar. No hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).

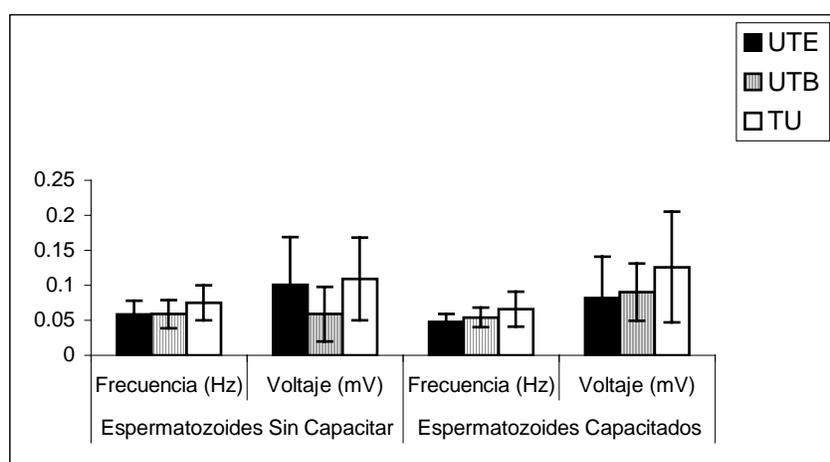


Figura 24. Comparación de los valores EXP de dos tratamientos espermatozoides sin capacitar y capacitados (20 unidades experimentales para cada tratamiento con 3 repeticiones) sobre la actividad eléctrica de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ), los

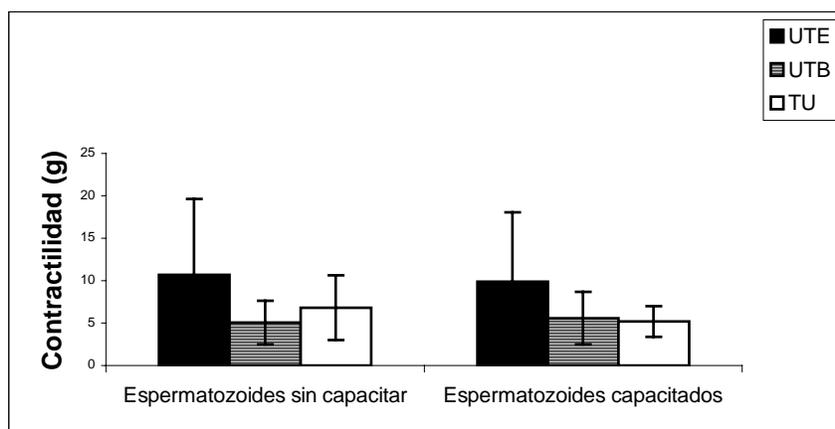


Figura 25. Comparación de los valores EXP de dos tratamientos espermatozoides sin capacitar y capacitados (20 unidades experimentales para cada tratamiento con 3 repeticiones) sobre la contractilidad de tres segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ), los valores son promedios ± desviación estándar

Cuadro 17. Comparación de valores DIF de dos diferentes tratamientos: espermatozoides capacitados y sin capacitar (20 unidades experimentales para cada tratamiento con 3 repeticiones) y su efecto en la contractilidad y actividad eléctrica (frecuencia y voltaje) en tres diferentes segmentos del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU).

Tratamiento	Espermatozoides Sin Capacitar			Espermatozoides Capacitados		
	Frecuencia (Hz)	Voltaje (mV)	Fuerza (g)	Frecuencia (Hz)	Voltaje (mV)	Fuerza (g)
UTE	-0.019 ± 0.025	0.008 ± 0.045	2.84 ± 6.28	-0.005 ± 0.011	-0.045 ± 0.07	2.19±4.45
UTB	-0.012 ± 0.022	-0.045 ± 0.052	-0.8 ± 2.65	-0.012 ± 0.023	-0.024 ± 0.104	-0.335±2.61
TU	0.008 ± 0.019	-0.004 ± 0.044	-0.871±1.79	-0.004 ± 0.018	-0.01 ± 0.04	-0.095±1.63

Los valores son promedios ± desviación estándar. No hubo diferencias significativas ( $P>0.05$ ).

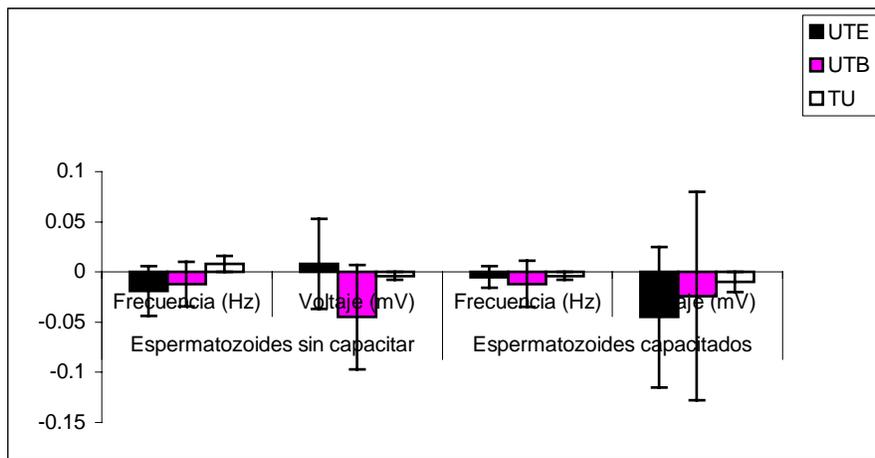


Figura 26. Comparación de los valores DIF de dos tratamientos espermatozoides sin capacitar y capacitados (20 unidades experimentales para cada tratamiento con 3 repeticiones) sobre la actividad eléctrica de tres segmentos del tracto reproductivo de coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). No se encontraron diferencias ( $P>0.05$ ), los valores son promedios ± desviación estándar

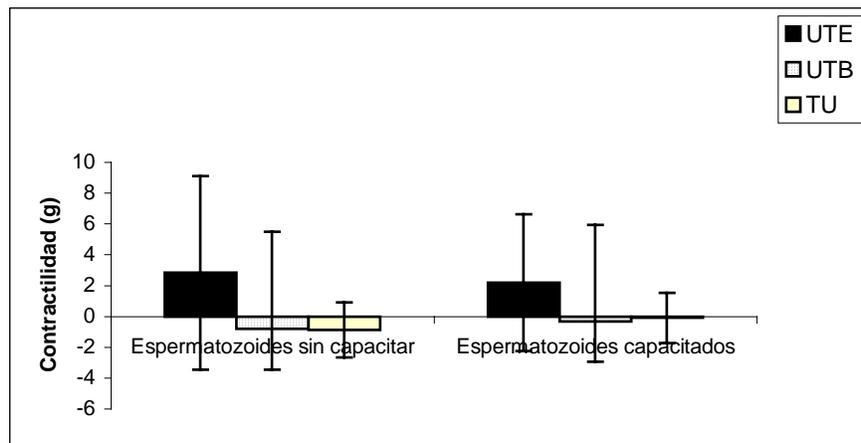


Figura 27. Comparación de los valores DIF de dos tratamientos espermatozoides sin capacitar y capacitados (20 unidades experimentales para cada tratamiento con 3 repeticiones) sobre la contractilidad de tres segmentos del útero de coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). No se encontraron diferencias ( $P>0.05$ ), los valores son promedios ± desviación estándar

Cuadro 18. Comparación entre los tratamientos espermatozoides capacitados y sin capacitar (20 unidades experimentales para cada tratamiento con 3 repeticiones) considerando los valores experimentales cuando se agruparon los segmentos del útero de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU).

	Segmentos Agrupados UTE+UTB+TU		
	Frecuencia (Hz)	Voltaje (mV)	Fuerza (g)
Capacitados	0.056 ± 0.018	0.099 ± 0.063	6.88 ± 5.42
Sin capacitar	0.064 ± 0.022	0.090 ± 0.059	7.53 ± 6.08

Los valores son promedios ± desviación estándar. No hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).

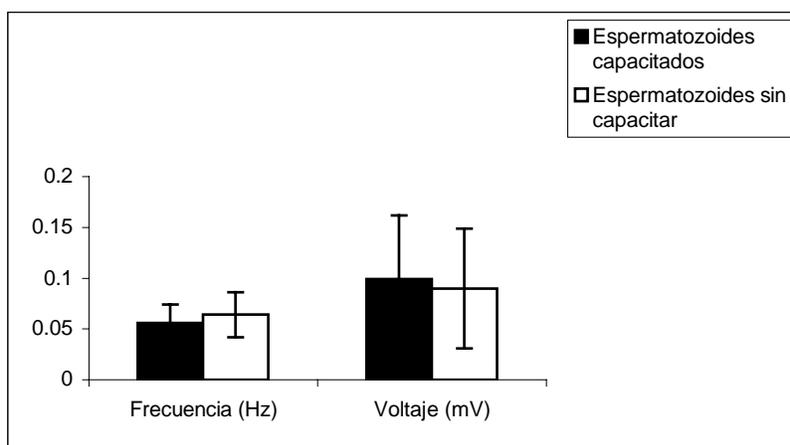


Figura 28. Diferencias entre tratamientos espermatozoides sin capacitar y capacitados (20 unidades experimentales para cada tratamiento con 3 repeticiones) de valores EXP sobre la actividad eléctrica de segmentos agrupados del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ), los valores son promedios ± desviación estándar

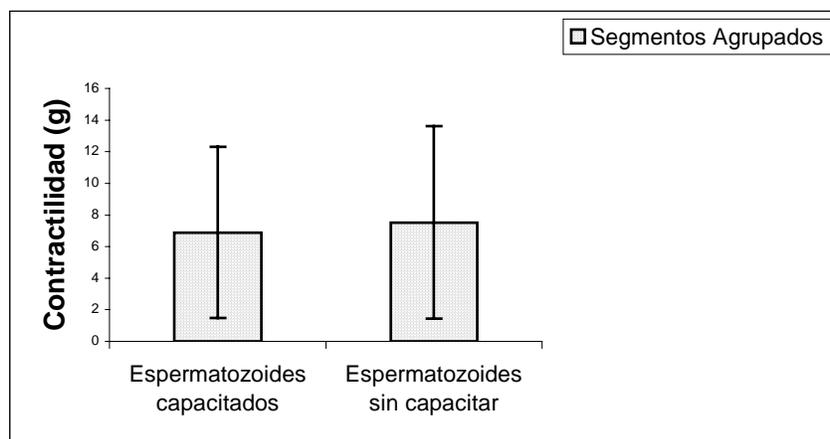


Figura 29. Diferencias entre tratamientos espermatozoides sin capacitar y capacitados (20 unidades experimentales para cada tratamiento con 3 repeticiones) de valores EXP sobre la contractilidad de segmentos agrupados del tracto reproductivo de la coneja, útero (UTE), unión útero-tubal (UTB) y tuba uterina (TU). No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ), los valores son promedios ± desviación estándar