

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



CAMBIOS MORFOLOGICOS EN LA MEMBRANA  
PLASMATICA DEL ESPERMATOZOIDE INDUCIDOS *IN*  
*VIVO* POR SECRECIONES DE ENDOMETRIO  
Y CERVIX HUMANOS.

Por

Hilda Magdalena Luna Aranda

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en  
Biología de la Reproducción

Enero, 2005

© 2005

ISBN

0-255

255

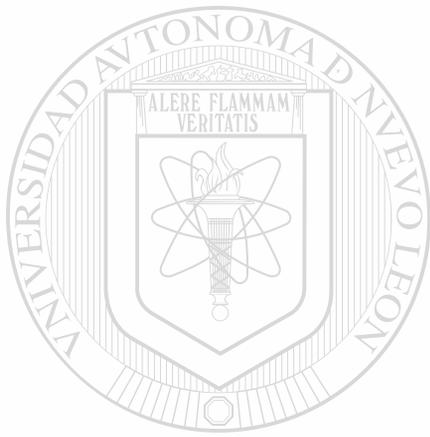
O.C.B.

Hilda

Margdalena

Luna

Aminda



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LA MEMBRANA  
PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE INDUCIDOS *IN*  
*VIVO* POR SECRECIONES DE ENDOMETRIO**

**Y CÉRVIX HUMANOS.**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

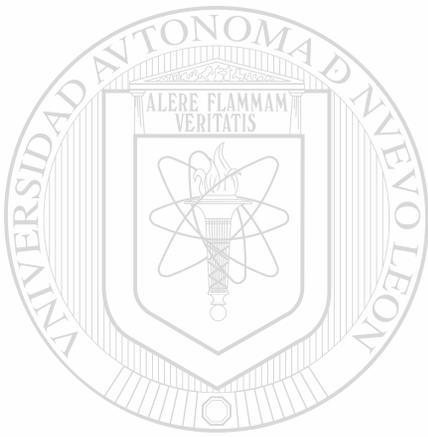
Por

**Hilda Magdalena Luna Aranda**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad en  
Biología de la Reproducción**

**Enero, 2005**

TM  
QP255  
.L8  
2005



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

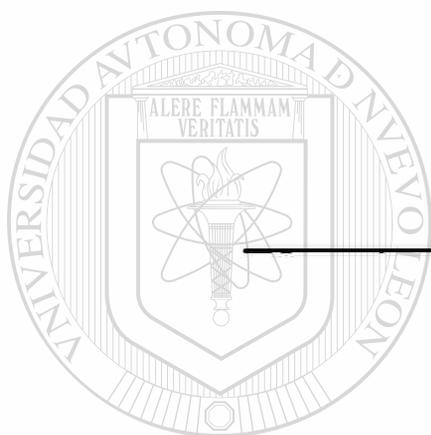
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA  
DEL ESPERMATOZOIDE INDUCIDOS *IN VIVO* POR  
SECRECIONES DE ENDOMETRIO  
Y CÉRVIX HUMANOS**

**Aprobación de la Tesis:**



  
\_\_\_\_\_

**M.C. Martha Merino Ruiz**

**Asesor de la Tesis**

  
\_\_\_\_\_

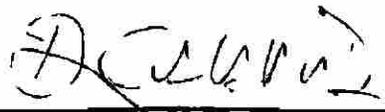
**Dr. Med. Oscar Vidal Gutiérrez**

**Comisión de Tesis**

  
\_\_\_\_\_

**Dr. Juan Manuel Solís Soto**

**Comisión de Tesis**

  
\_\_\_\_\_

**Dr. Dionicio A. Galarza Delgado**

**Subdirector de Estudios de Postgrado**

## *AGRADECIMIENTOS*

Quiero agradecer primero a Dios por haberme permitido iniciar y terminar finalmente esta importante etapa de mi vida profesional.

Al Dr. Rogelio García Flores por el sincero e incondicional apoyo que me brindó para el inicio de este proyecto.

A la M.C. Martha Merino Ruiz, directora y asesora de mi tesis, por su apoyo, por sus valiosos consejos y sugerencias, así como por su amistad y comprensión.

Al Dr. Eloy Cárdenas quién desinteresadamente aceptó asesorarme en una parte importante de este trabajo.

Al Dr. Jesús Ancer Rodríguez, por haberme brindado el apoyo académico, sin el cuál hubiera sido imposible realizar mi postgrado.

Al personal químico, técnico y administrativo del departamento de Biología de la Reproducción de quienes recibí siempre apoyo en los momentos que lo necesité. Ofelia, Paty, Tere, Martha Cruz, muchas gracias.

A mis compañeros de grado, Aurora Garza, Martha Santoyo, Pilar y Polo por su gran amistad y apoyo desde el inicio de nuestras clases.

Y en forma muy especial agradezco a mi familia, mi esposo, mis hijos y a mi madre, quienes además de apoyarme física y moralmente, sufrieron de la ausencia de la esposa, la madre y la hija, durante gran parte del tiempo que dedique a la realización de esta tesis.

## DEDICATORIA

*La presente tesis se la dedico:*

*A mi esposo, Gerardo, quién me brindó siempre comprensión y paciencia, quién respaldó y respetó en todo momento mis inquietudes y anhelos y de quién recibí todo este tiempo, lo que una esposa espera siempre de su esposo, su amor.*

*A mis hijos, de quienes permanecí alejada muchas horas dedicadas a mi trabajo. Gracias por su espera.*

*A mi mamá, quién sin su ayuda y presencia me hubiera sido muy difícil alcanzar este logro que ahora culmino.*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>LISTA DE TABLAS</b> . . . . .	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> . . . . .	<b>ix</b>
<b>NOMENCLATURA</b> . . . . .	<b>x</b>
<b>RESÚMEN</b> . . . . .	<b>xii</b>

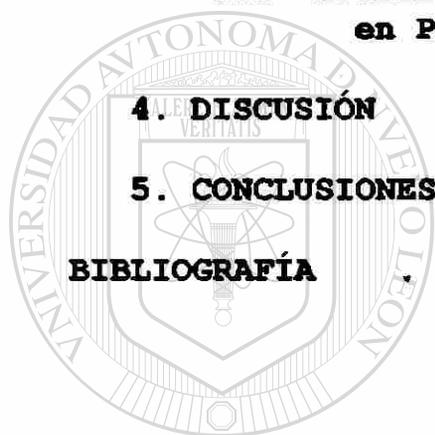
<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCION</b> . . . . .	<b>1</b>
<b>1.1 El Proceso de Capacitación-Fertilización</b> . . . . .	<b>1</b>
<b>1.2 Fisiología de la Capacitación Espermática</b> . . . . .	<b>3</b>
<b>1.2.1 Capacitación</b> . . . . .	<b>3</b>
<b>1.2.2 Reacción Acrosomal</b> . . . . .	<b>3</b>
<b>1.2.3 Cambios Moleculares</b> . . . . .	<b>5</b>
<b>1.2.4 Cambios Morfológicos</b> . . . . .	<b>6</b>
<b>1.3 Justificación</b> . . . . .	<b>9</b>
<b>1.4 Hipótesis de Investigación</b> . . . . .	<b>9</b>
<b>1.5 Objetivos de Trabajo</b> . . . . .	<b>10</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> . . . . .	<b>11</b>
<b>2.1 Estandarización de la Metodología</b> . . . . .	<b>11</b>
<b>2.1.1 Obtención de Muestras</b> . . . . .	<b>11</b>
<b>2.1.2 Técnica de Recuperación e</b> <b>Identificación de Espermatozoides en</b> <b>Secreciones de Cérvix y Endometrio</b> . . . . .	<b>12</b>
<b>2.1.2.1 Secreción de Cérvix</b> . . . . .	<b>12</b>
<b>2.1.2.2 Secreción Endometrial</b> . . . . .	<b>13</b>
<b>2.1.3 Evaluación del Semen por el</b> <b>Espermograma</b> . . . . .	<b>13</b>
<b>2.1.3.1 Examen Macroscópico</b> . . . . .	<b>14</b>
<b>2.1.3.2 Examen Microscópico</b> . . . . .	<b>14</b>
<b>2.1.4 Capacitación Espermática In Vitro</b> . . . . .	<b>14</b>

2.1.5	Prueba de Clorotetraciclina(CTC)	15
2.1.5.1	Reacción con CTC	15
2.1.5.2	Fijación y Montaje	16
2.1.5.3	Evaluación Morfológica de la Membrana Plasmática del Espermatozoide con CTC	16
2.1.6	Inducción de la Reacción Acrosomal con Ionóforo de calcio A23187	17
2.1.6.1	Técnica de Inducción de la Reacción Acrosomal con Ionóforo de calcio A23187	17
2.1.6.2	Tiempo de Reacción del Ionóforo de calcio A23187	18
2.2	Metodología Aplicada a una Población de Estudio	19
2.2.1	Criterios de Inclusión	19
2.2.2	Recuperación Espermática de Secreciones de Cérvix y Endometrio	20
2.2.3	Obtención de Espermatozoides Capacitados In Vitro	20
2.2.4	Prueba con CTC	21
2.2.5	Evaluación Morfológica	21
2.2.5.1	Cambios Membranales	21
2.2.6	Evaluación de la Motilidad	21
2.2.7	Reacción Acrosomal Inducida con Ionóforo de calcio A32187	21
2.3	Análisis Estadístico	22

### 3. RESULTADOS . . . . . 23

3.1	Recuperación e Identificación de Espermatozoides en Secreciones de Cérvix y Endometrio	23
3.2	Estandarización de la Prueba de CTC	27
3.2.1	Clorotetraciclina(CTC)	27
3.2.2	Glutaraldehído	27
3.2.3	Patrones CTC de Perry	28
3.2.3.1	Identificación de los patrones CTC de Perry	28
3.2.3.2	Variabilidad en la Identificación de los patrones CTC	30
3.2.3.3	Patrones CTC en Semen	31
3.2.3.4	Patrones CTC en Espermatozoides Recuperados de Cérvix y Endometrio	31

3.3	Inducción de la Reacción Acrosomal con A23187 . . . . .	32
3.3.1	Reacción Acrosomal Espontánea e Inducida . . . . .	32
3.3.2	Tiempo de Reacción del Ionóforo de calcio A23187 . . . . .	34
3.4	Recuperación Espermática en Parejas de Fertilidad Comprobada . . . . .	35
3.5	Semen de Varones Fértiles y su Respuesta a la Capacitación <i>In Vitro</i> . . . . .	37
3.6	Patrones CTC en Espermias Capacitados <i>In Vitro</i> e <i>In Vivo</i> en Parejas de Fertilidad Comprobada . . . . .	38
3.7	Reacción Acrosomal en Parejas de Fertilidad Comprobada . . . . .	39
3.8	Motilidad, Vitalidad y Morfología Espermática en Parejas de Fertilidad Comprobada . . . . .	41
4.	DISCUSIÓN . . . . .	42
5.	CONCLUSIONES . . . . .	53
	BIBLIOGRAFÍA . . . . .	55



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



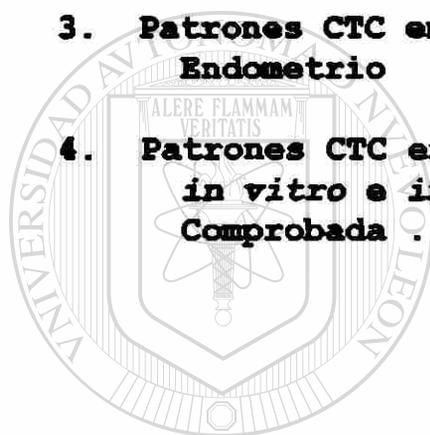
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Recuperación Espermática en Secreción de Cérvix .	23
II. Protocolos de Recuperación Espermática en Secreción de Endometrio . . . . .	24
III. Características de la Recuperación Espermática en Secreción de Endometrio . . . . .	25
IV. Reacción Acrosomal Espontánea e Inducida en Semen Capacitado 1 y 4 horas, en Cérvix y Endometrio de la población de estandarización .	33
V. Reacción Acrosomal en dos Tiempos de Reacción con Ionóforo de calcio A 23187 . . . . .	34
VI. Características del Semen y Moco Cervical en Parejas de Fertilidad Comprobada . . . . .	35
VII. Características de la Obtención de Secreción de Endometrio en Parejas de Fertilidad Comprobada . . . . .	36
VIII. Semen de Varones Fértiles y su Respuesta a la Capacitación In Vitro . . . . .	37
IX. Reacción Acrosomal Espontánea e Inducida en Semen Capacitado 1 y 4 horas y en Cérvix y Endometrio de Parejas de Fertilidad Comprobada . . . . .	40
X. Motilidad, Vitalidad y Morfología en Semen de Parejas de Fertilidad Comprobada . . . . .	41

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>1. Patrones CTC en Espermatozoides Humanos . . .</b>	<b>29</b>
<b>2. Patrones CTC en Semen Capacitado 1 H y 4 H . . .</b>	<b>31</b>
<b>3. Patrones CTC en Espermatozoides de Cérvix y Endometrio . . . . .</b>	<b>32</b>
<b>4. Patrones CTC en Espermatozoides Capacitados in vitro e in vivo de Parejas de Fertilidad Comprobada . . . . .</b>	<b>38</b>



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

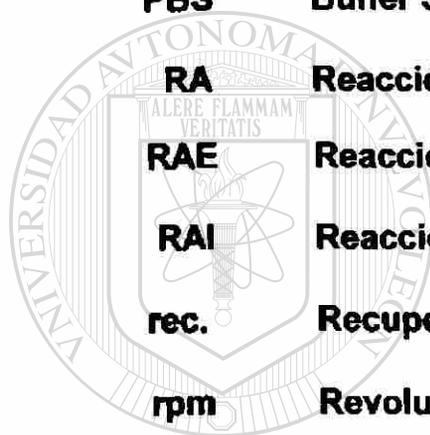
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## NOMENCLATURA

<b>AR</b>	<b>Acrosoma Reactivo</b>
<b>BWW</b>	<b>Medio de Whitten and Whittingham</b>
<b>EBSS</b>	<b>Solución Salina Balanceada de Earle</b>
<b>°C</b>	<b>Grados Centígrados</b>
<b>cols.</b>	<b>Colaboradores</b>
<b>céls.</b>	<b>Células</b>
<b>CP</b>	<b>Patrón de Capacitación</b>
<b>CTC</b>	<b>Corotetraciclina</b>
<b>DABCO</b>	<b>1,4 diazabicyclo [2.2.2.] octano</b>
<b>DP</b>	<b>Posterior Oscuro</b>
<b>DPX</b>	<b>Medio de inclusión para Histología</b>
<b>ECP</b>	<b>CP Temprano</b>
<b>EDP</b>	<b>Posterior Oscuro Temprano</b>
<b>EF</b>	<b>Fluorescencia Temprana</b>
<b>HSA</b>	<b>Albúmina de Suero Humana</b>
<b>LCP</b>	<b>CP Tardío</b>
<b>LDP</b>	<b>DP Tardío</b>
<b>MD</b>	<b>Moco Desfavorable</b>
<b>MF</b>	<b>Moco Favorable</b>
<b>Mm</b>	<b>Mili molar</b>

<b>μm</b>	<b>Micrómetros</b>
<b>μM</b>	<b>Micro molar</b>
<b>mp</b>	<b>Nuestras procesadas</b>
<b>N</b>	<b>Número de muestras</b>
<b>obt.</b>	<b>Obtenidas</b>
<b>OMS</b>	<b>Organización Mundial de la Salud</b>
<b>P</b>	<b>Protocolo</b>
<b>PBS</b>	<b>Buffer Salino de Fosfatos</b>
<b>RA</b>	<b>Reacción acrosomal</b>
<b>RAE</b>	<b>Reacción acrosomal espontánea</b>
<b>RAI</b>	<b>Reacción Acrosomal Inducida</b>
<b>rec.</b>	<b>Recuperación</b>
<b>rpm</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>tpa.</b>	<b>Tiempo pre-aspirado</b>
<b>vol.</b>	<b>Volumen</b>
<b>ZP</b>	<b>Zona pelúcida</b>



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## RESUMEN

**Q.C.B. Hilda Magdalena Luna Aranda    Fecha de Graduación: enero, 2005**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Medicina**

**Título del Estudio: CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE INDUCIDOS *IN VIVO* POR SECRECIONES DE ENDOMETRIO y CÉRVIX HUMANOS.**

**Área de Estudio: Ciencias de la Salud**

**Propósito y Método de Estudio:** La capacitación es un proceso de activación que propicia el desarrollo del potencial de fertilización del espermatozoide y se ha demostrado en estudios realizados *in vitro* y en animales de experimentación y muy pocos refieren experimentos en humanos. No existe en la literatura referencias que confirmen los efectos que ejerce *in vivo* el tracto reproductor femenino humano sobre las modificaciones a nivel de la membrana plasmática del espermatozoide para su activación. En el presente trabajo se implementaron la técnica de recuperación de espermatozoides del tracto reproductor femenino y la técnica de inducción de la reacción acrosomal con ionóforo de calcio A23187. Así mismo se estandarizó la prueba de clorotetraciclina (CTC) para detectar los cambios morfológicos en la membrana plasmática de espermatozoides humanos. Espermatozoides obtenidos de cérvix y endometrio, así como de semen post-capacitación a 1 y 4 horas de parejas de fertilidad comprobada, fueron procesados para evaluar motilidad, morfología, vitalidad e identificación de patrones morfológicos con clorotetraciclina y sometidos a reacción acrosomal inducida con ionóforo A23187.

**Contribuciones y Conclusiones:** Los espermatozoides recuperados de endometrio presentan un estadio de capacitación más avanzado que los obtenidos de cérvix y post-capacitación, que se demuestra al aplicar pruebas funcionales como la Inducción de la Reacción Acrosomal y la prueba de CTC. Estos hallazgos nos sugieren que los tejidos endometrial y cervical humanos promueven la capacitación, son diferentes en cada uno de ellos y progresivos en su ruta biológica.

El presente trabajo fue apoyado por PAICYT S.A. 458-00 (2000/2002)

**FIRMA DEL ASESOR:** \_\_\_\_\_



## CAPITULO 1

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1 El Proceso de Capacitación-Fertilización

El estudio de los procesos fisiológicos involucrados en la reproducción se ha facilitado con el desarrollo científico y tecnológico ampliando en gran medida el entendimiento de la fertilidad humana. El fenómeno de fertilización, es un complejo proceso de comunicación intercelular que requiere la activación de mecanismos morfofisiológicos en los gametos masculino y femenino, mediados por interacciones celulares y del microambiente.

El espermatozoide, después de abandonar los túbulos seminíferos, es transportado y almacenado a través del sistema de conductos del tracto reproductor masculino e inicia una serie de modificaciones que afectan su metabolismo; como consecuencia, la célula alcanza la madurez requerida para lograr la fertilización (1). En los mamíferos, una vez que el ovocito secundario es liberado durante la ovulación está listo para ser fertilizado, mientras que el espermatozoide que es eyaculado requiere ser sometido previamente a una serie de fenómenos moleculares, fisiológicos y morfológicos descritos como capacitación espermática (2,3). La mayoría de los eventos relacionados con la

capacitación se han observado mediante experimentos *in vitro* y apoyados en estudios con animales de experimentación, que aunque son todavía tema de discusión, han brindando las bases para explicar los fenómenos *in vivo*, ayudando enormemente a entender la fisiología reproductiva.

La capacitación espermática inicialmente fue definida como los cambios fisiológicos en el espermatozoide durante el intervalo de tiempo entre su depósito en el tracto reproductor femenino y la fertilización (4,5). Zaneveld la describió en forma más precisa como una cascada de procesos bioquímicos que se inician con la alteración de la membrana plasmática del espermatozoide, cuando éste queda expuesto a los fluidos del tracto reproductor femenino (6), o bien a medios artificiales apropiados, preparándolo para la fertilización (7). El concepto actual de capacitación se describe como un proceso de activación que propicia el desarrollo del potencial de fertilización, el cuál es desencadenado por la interacción de espermatozoides móviles con el tracto reproductor femenino o bien con medios de cultivo apropiados, induciendo cambios en la membrana plasmática, asociados principalmente con la hiperactivación de la motilidad y la capacidad de desarrollar la reacción acrosomal (RA), requerida para lograr finalmente la fertilización (8,9).

## 1.2 Fisiología de la Capacitación Espermática

### 1.2.1 Capacitación

La capacitación espermática puede ser iniciada en forma intrínseca como parte de un proceso de maduración y en forma extrínseca con la eliminación de los factores descapacitantes llamados también moduladores negativos de capacitación, los que son adquiridos por el espermatozoide cuando tienen contacto con el fluido epididimario y el plasma seminal (10). *In vivo*, es posible que estos factores proteicos sean inhibidos o reprimidos por la acción selectiva del tracto reproductor femenino, a través del cuál el espermatozoide asciende e interactúa con su microambiente, desencadenando en él cambios que alteran su metabolismo. Se han descrito una serie de efectos biológicos y moleculares *in vitro* como consecuencia de la capacitación, que incluyen la pérdida o redistribución de factores descapacitantes por eliminación del plasma seminal, reorganización de fosfolípidos y proteínas de membrana, influjo de iones a nivel intracelular que inducen modificaciones bioquímicas, generación de cantidades controladas de diferentes moléculas de O<sub>2</sub> reactivo, desarrollo de hipermotilidad, y finalmente activación de señales complejas de transducción que alteran la función celular (11,12).

### 1.2.2 Reacción Acrosomal

Como resultado de la capacitación, el espermatozoide está preparado bioquímica y morfológicamente para sufrir un fenómeno de excitósis

denominado reacción acrosomal, que se inicia cuando el espermatozoide tiene contacto con la zona pelúcida (ZP) del ovocito(13). Durante éste fenómeno ocurre una fusión progresiva entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa con formación de vesículas que liberan las enzimas acrosomales encargadas de facilitar el pasaje del espermatozoide a través del cumulus oophorus, corona radiada y zona pelúcida; la membrana acrosomal interna es expuesta y ocurren cambios fisiológicos sobre la membrana plasmática del segmento ecuatorial del acrosoma y parte anterior de la región post-acrosomal (14,15). Este proceso, puede ser inducido *in vitro* por fluido folicular y por sustancias como el ionóforo de calcio A23187, que son utilizados en pruebas que evalúan la función espermática, en las que su efecto en la célula refleja la capacidad de desarrollar la RA (16,17 ). Así mismo en forma reciente se han publicado estudios que demuestran *in vitro* la participación de estructuras en el plasma seminal denominadas prostasomas como estimulantes de la reacción acrosomal (40).

Estudios en conejos y ratas han demostrado que la capacitación espermática es un prerrequisito para lograr la fertilización de oocitos (4,5), y fue Edwards en 1969 quién lo logró por primera vez con oocitos humanos y espermatozoides previamente capacitados utilizando fluido folicular humano (16). Las alteraciones que ocurren durante el proceso de capacitación afecta a todos los compartimentos del espermatozoide, es decir la cabeza, la pieza media y el flagelo, e involucran la membrana, el citosol y el citoesqueleto, y en base a extensos estudios *in vitro*, se han descrito algunos modelos para

explicar los mecanismos moleculares y biológicos del proceso. transducción que alteran la función celular (11,12).

### 1.2.3 Cambios Moleculares

La composición bioquímica de los fluidos que contactan al espermatozoide durante su transporte por el tracto femenino, pudiera ser la base molecular que desencadena estos mecanismos *in vivo*; motivo por el cuál los medios de cultivo utilizados para capacitación *in vitro* incluyen ciertos substratos como fuente de energía, una fuente de proteína (usualmente albúmina sérica),  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a(18). Aunque los mecanismos de acción de cada uno de éstos componentes permanecen sin elucidar, se han descrito algunas hipótesis para explicarlos.

El posible papel de la albúmina como promotor de capacitación se basa en su asociación con el colesterol de la membrana plasmática, éste al ser removido vuelve a la membrana más fluida, produciendo cambios en la distribución de antígenos de superficie, además de un incremento en la permeabilidad para pequeñas moléculas y iones como el  $\text{HCO}_3^-$  y el  $\text{Ca}^{2+}$ . El influjo de iones induce a la activación del sistema de transducción de señales, responsable de la fosforilación de proteínas, que se han asociado con la vaina fibrosa del flagelo espermático, y se especula, provocan la hiperactivación de la motilidad (19). Este proceso de hiperactivación fue observado en espermatozoides de animales de experimentación incubados bajo condiciones capacitantes (20) y en los recuperados de la zona ampular de la trompa de

Falopio (21). Se ha sugerido que la función biológica de éste fenómeno puede ser la causa de la separación del espermatozoide del epitelio del tracto reproductor femenino (22), además de brindarle la fuerza necesaria para atravesar el cumulus oophorus y penetrar al ovocito (23).

El movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática puede constituir un marcador para evidenciar el proceso de capacitación, y su medición intra y extracelular puede ser una herramienta útil para evaluar el grado de capacitación desarrollado.

Experimentos en ratones han sugerido que un incremento del calcio intracelular en el espermatozoide capacitado conduce a la fosforilación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T en la membrana plasmática, los cuáles son rápidamente desfosforilados en respuesta al ligando fisiológico de la ZP, iniciando así la RA (24). Como resultado de la RA ocurre liberación enzimática y cambios en la membrana acrosomal interna que permiten la penetración y la fusión con el oolema.

#### 1.2.4 Cambios Morfológicos

La función espermática puede ser evaluada mediante una variedad de pruebas basadas en los cambios morfológicos que sufre el espermatozoide durante la capacitación *in vitro* y han sido consideradas de utilidad como herramienta clínica para el diagnóstico de infertilidad y el pronóstico de los procedimientos de fertilización asistida. En algunas, el espermatozoide es

evaluado en su capacidad para fertilizar ovocitos; otras se basan en la observación de cambios a nivel de membrana, que reflejan el estado de capacitación; y por último aquéllas en las que se evalúa el grado de movilidad espermática. Entre las más utilizadas se encuentran los bioensayos, como la prueba de penetración de óvulos de hamster libre de zona, o de oocitos humanos y las reacciones que evalúan la RA con colorantes específicos o mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales (25,26,27). La mayoría de éstas pruebas, además de no representar adecuadamente los eventos fisiológicos, son poco prácticas para su aplicación en el laboratorio ya que consumen mucho tiempo.

Lambert y cols. mediante pruebas de penetración de oocitos humanos criopreservados y oocitos de hamster libres de ZP, demostraron que los espermatozoides humanos recuperados del moco cervical, después de inseminación artificial, alcanzan un estado de capacitación avanzado (28). En un estudio realizado con co-cultivo de espermatozoides-células del epitelio uterino fue demostrado un aumento en la capacidad de espermatozoides de varones fértiles para lograr la reacción acrosomal y penetrar el oolema de oocitos libres de ZP, sugiriendo que el contacto directo entre las células (co-cultivo) o con sus productos de secreción, inducen en el espermatozoide los cambios funcionales requeridos para la fertilización (29).

La prueba de la Clorotetraciclina (CTC) es una técnica simple y rápida que ha sido adoptada por algunos investigadores para detectar capacitación y RA en espermatozoides de algunas especies animales y en el hombre

(30,31,36). Este reactivo se une específicamente al calcio asociado a la membrana plasmática del espermatozoide, formando un complejo que desarrolla una intensa fluorescencia expresada en forma específica de acuerdo al estado de capacitación alcanzado.

En 1987 Lee y cols. describieron cuatro patrones de fluorescencia con CTC en el semen humano sometido a capacitación *in vitro*, que les permitió cuantificar cambios sobre la membrana de la cabeza del espermatozoide a través del tiempo (32). Perry y cols. reclasificaron los patrones descritos por Lee y describieron cinco grupos con CTC que agrupan ocho patrones de fluorescencia de acuerdo al estado de capacitación espermática desarrollado. Los grupos 1, 2 y 3 identifican los patrones no capacitados, el grupo 4 al marcador de capacitación, y el grupo 5 a los patrones con acrosoma reactivo (33).

Yao y cols. al estudiar los efectos del co-cultivo de espermias-células de oviducto humano y el del medio resultante del cultivo de éstas últimas sobre la función espermática, encontraron que los patrones de capacitación y de acrosoma reactivo detectados con CTC se incrementan, en cambio la incidencia de la RA espontánea no progresa y la RA estímulo-inducida, la unión a la zona pelúcida y la fusión con oocitos disminuyen. Estos hallazgos sugieren que el oviducto puede actuar como un reservorio para el espermatozoide humano (34).

De igual manera que el tejido tubario, se puede sugerir que el cérvix y el útero desempeñan un papel importante durante la capacitación *in vivo*, donde

además del contacto célula-célula, los productos de secreción de dichos tejido (hormonas y proteínas) son responsables de los cambios que sufre el espermatozoide.

### 1.3 Justificación

La mayoría de los estudios que demuestran la activación del proceso de capacitación han sido realizados *in vitro* y en animales de experimentación, y muy pocos refieren experimentos en humanos. No existe en la literatura referencias que confirmen los efectos que ejerce *in vivo* el tracto reproductor femenino humano sobre las modificaciones a nivel de la membrana plasmática del espermatozoide.

El presente trabajo pretende aportar conocimiento básico sobre los cambios morfofisiológicos relacionados con la capacitación del gameto masculino, al interactuar *in vivo* con los tejidos endometrial y cervical humanos y sus secreciones.

### 1.4 Hipótesis de Investigación

- 1.- Los tejidos endometrial y cervical humanos promueven la capacitación, reflejada mediante cambios morfofisiológicos en el espermatozoide.
- 2.- Los estadios de capacitación alcanzados por el espermatozoide después del contacto *in vivo* con el cérvix y el endometrio humanos, son diferentes en cada uno de ellos y progresivos en su ruta biológica.

## 1.5 Objetivos del Trabajo

### Objetivo General

Demostrar el estadio de capacitación alcanzado por el espermatozoide después del contacto *in vivo* con endometrio y el canal cervical humanos.

### Objetivos Particulares

1. Implementar una técnica de recuperación e identificación de espermatozoides en secreciones de endometrio y cérvix después de 4 horas post-coito.
2. Estandarizar la prueba de Clorotetraciclina para detectar los cambios en la membrana plasmática de espermatozoides.
3. Implementar una técnica para inducir la reacción acrosomal con ionóforo de calcio A23187, en espermatozoides capacitados *in vitro* y de secreciones de cérvix y endometrio.
4. Evaluar y comparar la motilidad y los cambios morfológicos detectados con la prueba de CTC en la membrana plasmática, entre espermatozoides capacitados *in vitro*, recuperados de secreciones de cérvix y de endometrio 4 horas postcoito y en respuesta al ionóforo de calcio A23187, en parejas de fertilidad comprobada.

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente trabajo de investigación se realizó en tres etapas, en la primera se procedió a la estandarización e implementación de técnicas y procedimientos, en una segunda etapa se aplicó dicha metodología a una población de estudio y en una tercera se llevó a cabo el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

#### **2.1 Estandarización de la Metodología.**

Se implementaron y evaluaron las técnicas y procedimientos para la obtención, manejo de muestras y pruebas específicas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

##### **2.1.1. Obtención de Muestras.**

Para esta etapa del trabajo las muestras obtenidas provinieron de una población denominada de estandarización, que consistió en mujeres y sus parejas quienes acudieron a la consulta de Biología de la Reproducción para la evaluación de su estado de infertilidad.

Se instruyó a las mujeres, cuyas edades oscilaron entre 25 y 35 años, para acudir al consultorio en etapa preovulatoria después de 4 horas de haber

tenido relaciones sexuales (postcoito). Con la paciente en posición ginecológica, se le colocó un espejo vaginal, se visualizó el cérvix y se introdujo una cánula de inseminación con una jeringa adaptada para la aspiración de la mayor cantidad posible de moco cervical. Inmediatamente después se procedió a la obtención de la muestra de secreción endometrial. Esta se realizó introduciendo a través del canal cervical otra cánula conectada a una jeringa conteniendo solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) e irrigando con ésta el útero, procediendo posteriormente a su aspiración; este procedimiento fue realizado aplicando varios protocolos hasta que se logró obtener la mejor forma de aspiración. Para el espermograma y la capacitación espermática 7 varones con parámetros seminales normales colectaron muestras de semen en dos ocasiones con diferencia de dos semanas. Las muestras de semen se colectaron por masturbación en una pomadera estéril después de una abstinencia sexual de tres a cinco días y se enviaron al laboratorio en un tiempo no mayor de 30 minutos después de su colección.

## 2.1.2 Técnicas de Recuperación e Identificación de Espermatozoides en Secreciones de Cérvix y Endometrio.

### 2.1.2.1 Secreción de Cérvix.

Las muestras de moco cervical obtenidas en cada paciente fueron evaluadas para determinar su calidad, aplicando los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo que permitió clasificarlo como moco favorable (MF) aquél que obtuviera un puntaje de 11 o más y como desfavorable (MD) cuyo puntaje no sobrepasó los 10 puntos (35).

Posteriormente una alícuota fue revisada para evaluar la prueba postcoito, determinando % de motilidad, cuenta y vitalidad espermática; el resto de la muestra se depositó en un tubo de ensayo conteniendo PBS, se mezcló suavemente por inversión e incubó por espacio de 15 a 30 minutos a 37°C, tiempo que permitió a los espermatozoides dejar el moco y que llegaran éstos al sobrenadante. Una alícuota obtenida del sobrenadante se revisó para la identificación de espermatozoides mediante una preparación en fresco observada a 400 X determinando nuevamente % de motilidad, vitalidad y concentración de espermatozoides.

#### 2.1.2.2 Secreción Endometrial.

El volumen obtenido de cada secreción de endometrio se depositó en un tubo conteniendo PBS y se llevaron a incubación por 15 minutos a 37°C, tiempo después del cuál se revisó al microscopio 400 x para la identificación y posterior recuperación de espermatozoides.

A una alícuota de cada suspensión (cérvix y endometrio) se le evaluó motilidad, vitalidad, morfología y concentración espermática, otra se procesó para prueba con CTC y una tercera para inducción de RA con ionóforo A23187. La metodología para recuperación de espermatozoides se confirmó con la identificación de éstos en ambas secreciones.

#### 2.1.3 Evaluación del Semen por el Espermograma

Después de ser colectadas, las muestras de semen se recibieron en el laboratorio y se llevaron a incubación a 37°C. Se evaluaron siguiendo los

críterios de la OMS para el examen del semen humano que incluyó examen macroscópico y microscópico (35).

#### 2.1.3.1 Examen Macroscópico.

Después de 30 minutos posteriores a su colección se evaluaron en el semen los siguientes parámetros: licuefacción, viscosidad, volumen y pH.

#### 2.1.3.2 Examen Microscópico.

Inmediatamente después del examen macroscópico se procedió al microscópico, que incluyó la estimación de la motilidad, vitalidad y presencia de elementos celulares diferentes de los espermatozoides; estos parámetros se evaluaron a los 30 minutos, a la hora y a las dos horas post-eyaculación al microscopio óptico a 400 x. La concentración espermática se realizó en semen licuado directo mediante conteo en la cámara de Makler a 200 x. La morfología espermática se llevó a cabo mediante tinción con Papanicolaou de un frotis de semen licuado, revisado a 1000 x.

#### 2.1.4 Capacitación Espermática *In vitro*.

Simultáneamente con el espermograma, las muestras de semen se procesaron para capacitación *in vitro*. Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo una modificación de la técnica de swim-up descrita por Yanagimachi (20), mediante la cuál los espermatozoides migran hacia la parte superior del medio de cultivo libres de factores descapacitantes y metabólicamente más activos.

Para este procedimiento el semen licuado se dividió en dos volúmenes de 1.3 ml que se depositaron en el fondo de dos tubos de poliestireno estériles de fondo redondo conteniendo cada uno 2.0 ml de medio de cultivo, solución salina balanceada de Earle (EBSS) suplementada con 0.3% de albúmina de suero humano. Los tubos se llevaron a incubación por 1 h a 37°C. Después de la incubación se retiró cuidadosamente el sobrenadante de ambos tubos y se reunieron en otro tubo. A una alícuota de esta suspensión se le evaluó motilidad, vitalidad, morfología y concentración espermática, otra se procesó para prueba con CTC y una tercera para inducción de RA con ionóforo de calcio A23187. La muestra continuó en incubación por tres horas más y se reevaluaron los parámetros antes mencionados.

Cada paciente colectó una segunda muestra de semen dos semanas después y se procesó de igual manera.

### 2.1.5 Prueba de Clorotetraciclina (CTC)

Esta técnica fluorescente se aplicó para evaluar el estado morfofisiológico de la membrana plasmática de los espermatozoides recuperados del tracto reproductor femenino, de los obtenidos después de capacitación *in vitro* y después de la RA estímulo inducida.

#### 2.1.5.1 Reacción con CTC.

Se colocaron 10  $\mu$ l de suspensión de los espermatozoides recuperados de las fuentes ya mencionadas en cada uno de seis tubos Eppendorf de 0.5 ml agregando inmediatamente 10  $\mu$ l de solución de trabajo de CTC, la reacción

toma lugar en forma rápida y al abrigo de la luz. La solución de trabajo de CTC se preparó a diario y se protegió de la luz a temperatura constante de 37°C.

### 2.1.5.2 Fijación y Montaje.

Inmediatamente después de la reacción con la CTC, las muestras se fijaron con 1µl de glutaraldehído al 12.5 % en buffer Tris (pH de 7.8), asegurando una mezcla uniforme. Posteriormente 10 µl de esta mezcla fueron colocados sobre un portaobjetos cubierto con polyisina. En éste momento se le añadió a la preparación una gota de 1,4 diazabicyclo[2.2.2] octano (DABCO) disuelto en PBS con el que se mezcló; ésta última solución evita la pérdida de la fluorescencia. Las preparaciones se cubrieron, se sellaron con DPX y se almacenaron protegidas de la luz a 4°C hasta por 24 horas para su evaluación.

### 2.1.5.3 Evaluación Morfológica de la Membrana Plasmática del Espermatozoide con CTC;

La evaluación se realizó en los seis frotis obtenidos de cada una de las suspensiones de espermatozoides de las muestras de: a) cérvix, b) endometrio, c) a 1 hora de incubación, d) a 4 horas de incubación y e) de las muestras con RA estímulo-inducida. Se examinaron 100 espermatozoides en cada frotis a 400 X en un microscopio de epifluorescencia ZEISS con divisor cromático FT/395, filtro para excitación UV BP-365/12 y un filtro Barrier LP-397 y se aplicaron los patrones de fluorescencia de CTC descritos por Perry. Mediante esta clasificación se procedió a identificar en los espermatozoides ocho patrones de fluorescencia los cuáles incluyen: EF con una banda brillante de fluorescencia en la región postacrosomal; EDP que muestra pérdida de la

banda brillante de fluorescencia del patrón. EF; DP con una región postacrosomal no fluorescente y fluorescencia brillante en la porción anterior de la cabeza; LDP que muestra un decremento en la región postacrosomal no fluorescente del patrón DP para formar una banda delgada; ECP con fluorescencia uniforme y con una región basal no fluorescente; CP que muestra fluorescencia uniforme sobre la cabeza espermática entera y un perímetro y pieza media brillante; LCP con decremento en la fluorescencia sobre la cabeza (punteada o uniforme); y AR que muestra pérdida completa de la fluorescencia sobre la cabeza entera. Se calculó el porcentaje de los diferentes patrones encontrados en cada una de las muestras. Los resultados obtenidos se analizaron para determinar variación intra e interensayo.

## 2.1.6 Inducción de la Reacción Acrosomal con Ionóforo de calcio A23187.

### 2.1.6.1 Técnica de Inducción de la Reacción Acrosomal con Ionóforo de calcio A23187.

Para este procedimiento se colocaron volúmenes iguales en tres tubos de ensayo de poliestireno de 12 x 75 mm., de cada una de las alícuotas de espermatozoides obtenidas para esta prueba: a) cérvix, b) endometrio, c) con 1 hora de incubación y d) con 4 horas de incubación *in vitro*. A dos de estos tubos se les agregó 1µl de una solución de A23187 10mM en dimetilsulfóxido (DMSO) y se diluyó con DMSO para obtener una concentración final de 10µM; el tercer tubo fue el control negativo y solo contenía espermatozoides de cada muestra y DMSO. Los tres tubos se incubaron a 37 °C por quince minutos protegidos de la luz. Para demostrar la RA, las muestras se sometieron

inmediatamente a prueba con CTC. Se promediaron los valores de los dos tubos de prueba. Esta técnica está basada en el método descrito inicialmente por Jamil y White (17) y modificada más tarde por Lee (32).

La prueba de inducción de RA estímulo-inducida se consideró como un control interno con el fin de tener una referencia morfológica para comparar aquéllas reacciones desarrolladas en los espermatozoides bajo condiciones *in vivo*.

#### 2.1.6.2 Tiempo de Reacción del Ionóforo de calcio A23187.

Debido a diferencias metodológicas en la aplicación del ionóforo A23187 por algunos autores, fueron probados dos tiempos de reacción de este reactivo. Para este procedimiento siete muestras de semen con características de normalidad según la OMS, se sometieron a capacitación espermática *in vitro* por 1 hora mediante la técnica de swim-up. Del sobrenadante, conteniendo espermatozoides capacitados, se colocaron volúmenes iguales en seis tubos de ensayo de poliestireno de 12 x 75 mm, a los que se les aplicó la técnica para la inducción de la reacción acrosomal descrita en el apartado siguiente. Tres tubos (dos de prueba y un control) se hicieron reaccionar por 15 minutos, los otros tres permanecieron reaccionando 1 hora. La reacción acrosomal fue demostrada posteriormente con la prueba de CTC, ya descrita, en los tubos de ambos tiempos de incubación.

## 2.2 Metodología Aplicada a una Población de Estudio

En esta etapa del trabajo se aplicaron los métodos y técnicas estandarizados a una población de estudio que comprendió ocho parejas con fertilidad comprobada a quienes se les informó y explicó de los estudios y procedimientos a los que se someterían, contando para ello con su consentimiento.

### 2.2.1 Criterios de Inclusión.

Los criterios de inclusión para las mujeres fueron: edad entre 25 a 35 años, con salpingoclasia, fertilidad comprobada hasta el momento de la misma, además de estar exentas de cualquier enfermedad ginecológica, sistémica o viral por lo menos seis meses antes de la investigación. La fertilidad se comprobó mediante la evaluación de normalidad del: factor ovárico, corroborado mediante medición de progesterona sérica normal en la fase lútea del ciclo; factor endometrial, mediante un patrón menstrual adecuado y una cavidad endometrial normal por ultrasonografía vaginal; factor cervical, demostrado por evaluación macro y microscópica del moco cervical y por una prueba funcional postcoito adecuada. Los criterios de inclusión para los varones fueron: fertilidad comprobada, edad entre 20 a 45 años y parámetros seminales normales.

## 2.2.2 Recuperación Espermática de Secreciones de Cérvix y Endometrio.

Las pacientes acudieron al consultorio en fecha preovulatoria (12 a 14 días de iniciada la menstruación), preparadas para una prueba post-coito, después de 4 horas de haber tenido relaciones sexuales. Las secreciones de cérvix y endometrio se obtuvieron siguiendo las técnicas previamente implementadas. De la suspensión de espermatozoides de cada secreción se tomaron tres alícuotas; la primera para revisión microscópica (cuenta, motilidad, vitalidad y morfología espermática), la segunda se procesó para prueba con CTC y la tercera para inducción de RA con ionóforo de calcio A23187.

## 2.2.3 Obtención de Espermatozoides Capacitados *In Vitro*.

Al semen de los varones se le practicó un espermograma siguiendo los parámetros ya descritos según la OMS. Una vez licuado el semen este se procesó para capacitación *in vitro* por la técnica de swim-up previamente descrita. Al término de una hora de incubación el sobrenadante se retiró y se colocó en otro tubo; de éste se tomaron tres alícuotas, una para la evaluación microscópica (cuenta, motilidad, vitalidad y morfología espermática), otra para prueba con CTC y una tercera para la inducción de la RA con ionóforo de calcio A23187. La suspensión de espermatozoides continuó en incubación por tres horas más, para posteriormente tomar de nuevo tres alícuotas que se procesaron en igual forma.

## 2.2.4 Prueba con CTC

Las alicuotas con espermatozoides de secreciones cervical, endometrial y capacitados *in vitro* a 1 y 4 horas y con RA estímulo-inducida obtenidas de las parejas de fertilidad comprobada fueron sometidas a la prueba estandarizada de CTC.

## 2.2.5 Evaluación Morfológica.

### 2.2.5.1 Cambios Membranales.

Para evaluar los cambios a nivel de membrana plasmática en los espermatozoides de todas las muestras sometidas a prueba con CTC se aplicó la clasificación de los patrones de fluorescencia de CTC descritos por Perry y se calculó el porcentaje de los diferentes patrones desarrollados.

## 2.2.6 Evaluación de la Motilidad.

El grado de motilidad desarrollado fue evaluado siguiendo los criterios de la OMS en las alicuotas separadas para este fin de todas las fuentes de espermatozoides obtenidas: secreciones de cérvix, endometrio y capacitados a 1 hora y 4 horas *in vitro*. Los resultados del grado de motilidad fueron comparados entre las distintas condiciones capacitantes (*in vivo* e *in vitro*).

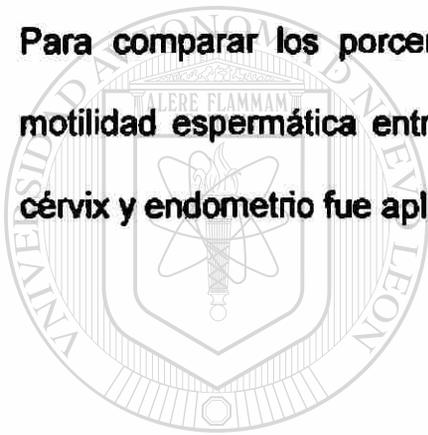
## 2.2.7 Reacción Acrosomal Inducida con Ionóforo de Calcio A23187.

Todas las alicuotas separadas para esta prueba conteniendo espermatozoides recuperados de cérvix, de endometrio y los obtenidos

después de capacitación *in vitro* a 1 y 4 horas, fueron procesadas para inducción de RA con ionóforo de calcio A23187 aplicando la técnica previamente estandarizada.

### 2.3 Análisis Estadístico.

Se aplicó la prueba de  $\chi^2$  (paquete estadístico SPSS) y análisis de varianza para determinar la variabilidad en la identificación de los patrones fluorescentes de Perry como parte de la estandarización de la prueba de CTC. Para comparar los porcentajes de los patrones CTC, la RA inducida y la motilidad espermática entre muestras capacitadas *in vitro* y las obtenidas de cérvix y endometrio fue aplicado el análisis de varianzas.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPÍTULO 3.

### RESULTADOS

#### 3.1. Recuperación e Identificación de Espermatozoides en Secreciones de Cérvix y Endometrio.

En la implementación de la técnica de recuperación espermática en moco cervical se procesaron 47 muestras, de las cuales 22 (46.8%) correspondieron a MF según la clasificación descrita por la OMS y 25 (53.2%) a MD. De éstas últimas, 13 no se procesaron debido a su volumen insuficiente y del resto solo en 10 se logró recuperar espermatozoides. En todas las muestras de MF se recuperaron espermatozoides. En la tabla I se muestran los valores medios de volumen, cuenta y % de recuperación para cada tipo de moco.

**TABLA I**

#### Recuperación Espermática en Secreción de Cérvix

Tipo de moco	n	volúmen * ml	/ml	cuenta x10 <sup>6</sup> * swim-up(1.5 ml)	Recuperación %
MF	22	0.36	1.37	1.12 (0.01- 6)	68.1
MD	10	0.28	1.39	0.41 (0.003- 3.75)	38.7

\*P < 0.05

De acuerdo a estos resultados se encontró diferencia significativa en el volumen y en los valores de cuenta espermática entre MF y MD, con una mejor recuperación en el MF.

Para la implementación de la técnica de recuperación espermática en secreción endometrial se procesaron 36 muestras. En las primeras 12 se aplicó el protocolo I de recuperación que consistió en mantener el PBS dentro del útero entre 1 y 10 minutos antes de ser recuperado, así como la aplicación de vacío para su aspiración; además de provocar sangrado, los porcentajes de recuperación de PBS como de espermatozoides con estas condiciones no fueron muy adecuados. Cuando se aplicó un segundo protocolo, denominado protocolo II de recuperación, se cambió el tiempo pre-aspirado, así como la eliminación del vacío para la aspiración; dicho cambio produjo una gran mejoría en la recuperación tanto de PBS como de espermatozoides, además de disminuir en forma importante el sangrado en la paciente. Este último protocolo fue aplicado en las 24 muestras restantes (ver tabla II).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**TABLA II**

**Protocolos de Recuperación Espermática en Secreción de Endometrio**

<b>P</b>	<b>mp</b>	<b>tpa</b>	<b>vacío</b>	<b>sangrado</b>	<b>rec. PBS (%)</b>	<b>rec. espermática (%)</b>
I	12	1'- 10'	4	mod-ab	8 (66.6)	3 (37.5)
II	24	30''- 60''	no	esc-mod	21 (87.5)	14 (67.0)
<b>Total</b>	<b>36</b>				<b>29 (80.0)</b>	<b>17 (58.6)</b>

De 29 muestras en las que se logró aspirar PBS, en 17, el 58.6% se obtuvo recuperación de espermatozoides, 14 de las cuáles procedían del protocolo II y 3 del protocolo I.

En la tabla III se detalla el volumen de PBS recuperado, número de células (espermatozoides) por volumen de PBS recuperado, el número de células obtenidas después de incubación (swim-up), el número de células después de aplicar concentración-dilución y finalmente el % de recuperación espermática en cada una de las 15 muestras de endometrio procesadas (1 del protocolo I y 14 del protocolo II).

**TABLA III**

**Características de la Recuperación Espermática en Secreción de Endometrio**

N	vol. PBS rec. ml	céls / PBS obt.	céls / swim-up	concentración céls / vol	% rec.
1	0.6	120	110	110/0.6	91.6
2	0.3	90	0	40 / 0.2	44.4
3	0.5	400	400	120 / 0.2	30.0
4	0.6	500	330	300 / 0.2	60.0
5	0.6	30.000	10.000	-----	33.3
6	0.4	0	-----	40 / 0.2	
7	0.5	150	-----	120 / 0.2	80.0
8	0.5	700	-----	550 / 0.2	78.5
9	0.2	1.340	-----	1.340 / 0.3	100
10	0.3	90	80	40 / 0.2	44.4
11	0.4	80	0	40 / 0.2	50.0
12	0.5	50	0	40 / 0.2	80.0
13	0.5	2.000	1.600	-----	80.0
14	0.5	450	400	240 / 0.2	53.3
15	0.6	7.000	6.380	-----	96.6

Dependiendo del número de células obtenidas así como el volumen del aspirado endometrial, se procedió a aplicar el método de recuperación espermática más apropiado que permitiera obtener el mayor número de células. En las muestras 2-4, 6-8, 10-12 y 14 se aplicó como método de recuperación, la concentración, que consistió en centrifugar el PBS aspirado a 1,500 rpm por 15 minutos para posteriormente retirar sobrenadante hasta dejar un volumen de 0.2 ml. Con este procedimiento en la muestra 8, se obtuvo la mayor concentración celular, de estas muestras, que correspondió a 550 células/0.2 ml. Debido a su alta concentración celular, en la muestra 9 se realizó una modificación de la técnica que consistió en diluir el aspirado agregando 0.1 ml de PBS al medio recuperado con lo que se obtuvo una concentración final de 1,340 células/0.3 ml. Las muestras 5, 13 y 15 se trataron en forma directa, es decir sin concentrar ni diluir debido a que el número de células originalmente obtenida, así como al volumen de PBS aspirado fueron suficientes para proseguir con las pruebas que se aplicarían posteriormente. Solo en las muestras 5, 8, 9, 13 y 15 fue posible la aplicación de las pruebas de CTC y RA inducida.

El promedio de recuperación espermática para estas muestras fue de 65.9%, el cuál se obtuvo relacionando la cuenta en el aspirado y la obtenida después del método de concentración en las 15 muestras de endometrio.

## 3.2 Estandarización de la Prueba de Clorotetraciclina (CTC).

### 3.2.1 Clorotetraciclina (CTC)

La CTC es un fluorocromo que requiere condiciones de oscuridad y congelación para su preparación y almacenaje. Además es preparado al momento de su uso para evitar la pérdida de su actividad fluorescente. Fue necesario optimizar la calidad de su filtración con la finalidad de obtener soluciones limpias, libres de ruido visual permitiendo una mejor observación de la reacción. Se probaron filtros de  $0.4\mu\text{m}$  y  $0.2\mu\text{m}$ , resultando estos últimos los ideales para su uso.

### 3.2.2 Glutaraldehído

Reactivo fijador en cuya preparación se observaron reacciones de precipitación y coloración que requirieron ser analizadas para probar su efecto en la prueba de CTC.

Se comprobó que la precipitación impedía la apreciación de la fluorescencia, fenómeno que fue solucionado filtrando el fijador una vez preparado, a través de papel filtro Watman # 40. Por otro lado la coloración amarillo dorado en que se tornaba el reactivo no interfirió con la identificación ni con la reacción de fluorescencia de la CTC. Esto fue probado al hacer reaccionar en espermatozoides capacitados la CTC con y sin el fijador.

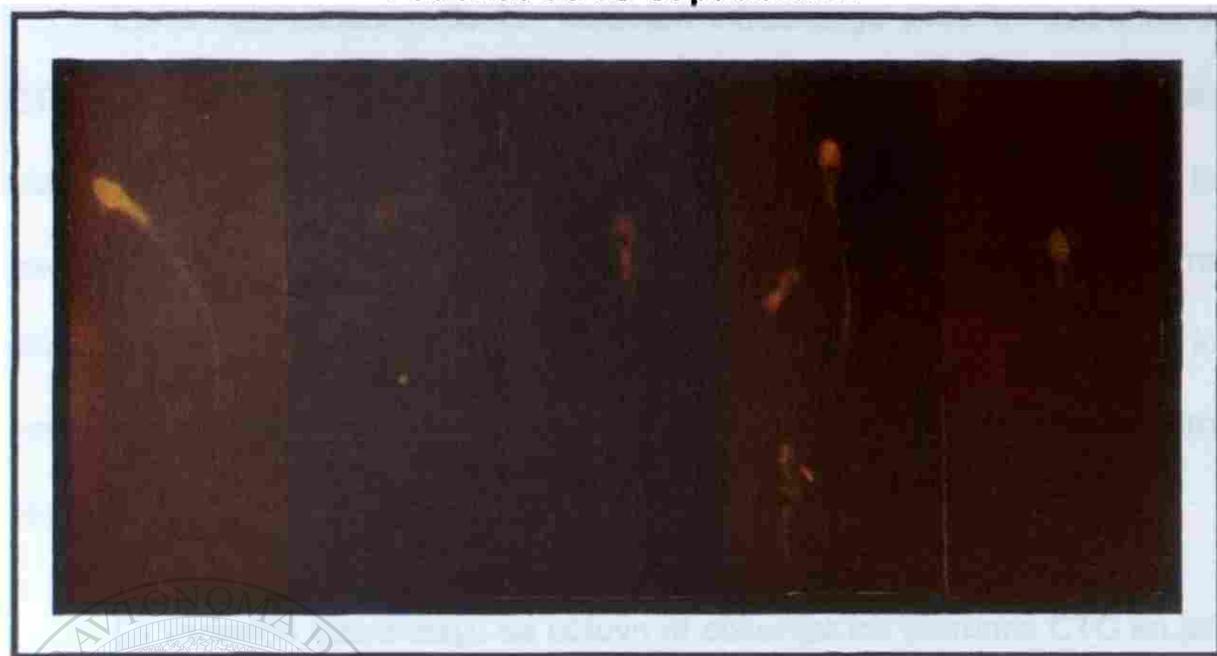
### 3.2.3 Patrones CTC de Perry

Estos patrones fueron primero identificados y posteriormente se cuantificó el porcentaje de cada uno de los 8 patrones al contar 100 células por frotis en las muestras de semen capacitado a 1 y 4 horas de incubación.

#### 3.2.3.1 Identificación de los Patrones CTC de Perry

En el 95% de los espermatozoides contados fueron identificados los ocho patrones de fluorescencia CTC que incluyen: EF con una banda brillante de fluorescencia en la región postacrosomal; EDP que muestra pérdida de la banda brillante de fluorescencia del patrón EF; DP con una región postacrosomal no fluorescente y fluorescencia brillante en la porción anterior de la cabeza; LDP que muestra un decremento en la región postacrosomal no fluorescente del patrón DP para formar una banda delgada; ECP con fluorescencia uniforme y con una región basal no fluorescente; CP que muestra fluorescencia uniforme sobre la cabeza espermática entera y un perímetro y pieza media brillante; LCP con decremento en la fluorescencia sobre la cabeza (punteada o uniforme); y RA que muestra pérdida completa de la fluorescencia sobre la cabeza entera. El restante 5% no se clasificaron en ningún patrón (fluorescencia irregular). Los ocho patrones CTC son mostrados en la figura I

### Patrones de no Capacitación



EF

EDP

DP

LDP

ECP

### Patrón de Capacitación



CP

### Patrones de Acrosoma Reactivo



LCP

RA

**Figura L. Patrones CTC en Espermatozoides Humanos**

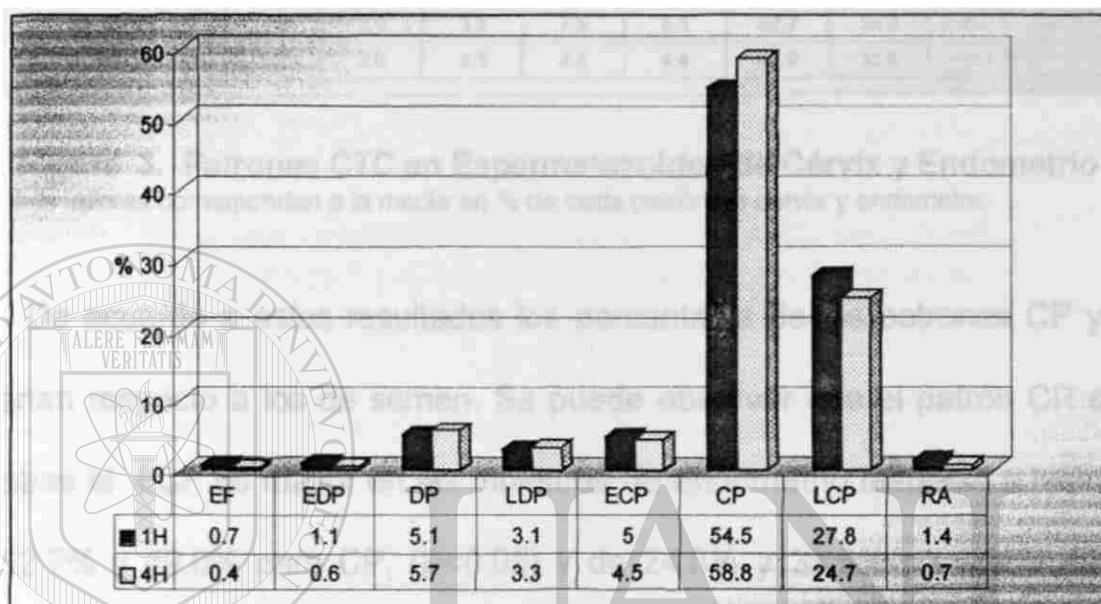
### 3.2.3.2 Variabilidad en la Identificación de los Patrones de CTC

En la determinación de la variación intraensayo para los patrones de CTC se aplicó la prueba  $\chi^2$  a los valores de cada uno de los 8 patrones, observados en los 6 frotis de cada muestra de semen capacitado de los pacientes de estandarización. Los resultados de este análisis no demuestran diferencia significativa entre los % de los valores observados en ninguno de los patrones, lo cuál nos permite demostrar que la frecuencia de cada patrón observado fue detectada con un mínimo de variación.

La variación interensayo se obtuvo al observar los patrones CTC en dos muestras de semen colectadas con diferencia de 15 días en siete varones. Para este análisis se aplicó la prueba de  $\chi^2$  y el análisis de varianzas a las medias de cada patrón CTC observadas en la primera y en la segunda colección. Según el estadístico  $\chi^2$  no se demostró diferencia significativa que indicara variación entre las dos muestras ( $P < 0.05$ ); sin embargo cuando se realizó el análisis de varianzas se encontraron variaciones para la mayoría de los patrones, aunque estas variaciones se presentaron en tres, de los siete varones estudiados. Así mismo los patrones EF y CP fueron los que presentaron variación solo en un paciente. Estos resultados indican cierto grado de variación entre las dos muestras del mismo paciente, lo cuál es aceptable en base a la variación inherente en las características seminales que se espera para un mismo paciente.

### 3.2.3.3 Patrones CTC en Semen

Los valores promedio de los porcentajes de cada patrón CTC encontrados en las muestras obtenidas a 1 hora y a 4 horas de incubación en los 7 pacientes para estandarización son mostrados en la figura 2.



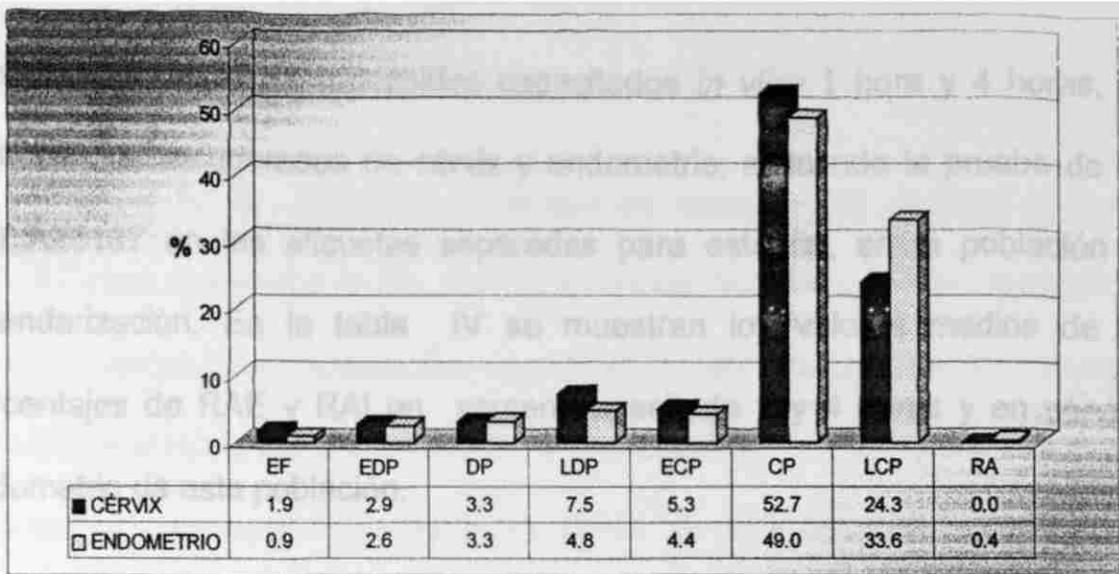
**Figura 2. Patrones CTC en Semen Capacitado 1H y 4 H**

Los valores corresponden a la media en % de cada patrón en semen capacitado

Estos resultados indican un aumento significativo en el patrón CP hacia las 4 horas de incubación, de 54.5 % a 58.5% ( $P < 0.05$ ). El resto de los patrones, con excepción del DP, decrementan sus porcentajes, aunque solo para el patrón LCP, esta disminución es significativa, de 27.8% a 24.7% ( $P < 0.05$ )

### 3.2.3.4 Patrones CTC en Espermatozoides Recuperados de Cérvix y Endometrio.

Los valores promedio de cada patrón CTC demostrados en espermatozoides recuperados de cérvix y endometrio de las muestras de estandarización son presentados en la figura 3.



**Figura 3. Patrones CTC en Espermatozoides de Cérnix y Endometrio**  
Los valores corresponden a la media en % de cada patrón en cérnix y endometrio

De acuerdo a estos resultados los porcentajes de los patrones CP y LCP se invierten respecto a los de semen. Se puede observar que el patrón CP es menor mientras el LCP es mayor en las muestras de endometrio respecto a las de cérnix; de 52.7% y 49.0% para CP, ( $P < 0.05$ ) y de 24.3% y 33.6% para LCP ( $P = 0.3$ ) en cérnix y endometrio respectivamente; aunque esta última comparación no es estadísticamente significativa. El resto de los patrones aunque muestran valores menores en endometrio su diferencia no es significativa.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 3.3 Inducción de la Reacción Acrosomal con

#### Ionóforo de calcio A23187

##### 3.3.1 Reacción Acrosomal Espontánea e Inducida

Con el fin de determinar la detección de la respuesta ante el inductor artificial de la reacción acrosomal (ionóforo A23187) se establecieron las diferencias entre la RA espontánea (RA E), sin inductor y la RA inducida (RAI),

con inductor, en espermatozoides capacitados *in vitro* 1 hora y 4 horas, así como en los recuperados de cérvix y endometrio, aplicando la prueba de RA con A23187 en las alícuotas separadas para este fin, en la población de estandarización. En la tabla IV se muestran los valores medios de los porcentajes de RAE y RAI en semen capacitado 1 y 4 horas y en cérvix y endometrio de esta población.

**TABLA IV**

**Reacción Acrosomal Espontánea e Inducida en Semen Capacitado 1 y 4 horas, en Cérvix y Endometrio de la Población de Estandarización**

	1h *	4hrs. *	Cérvix	Endometrio
<b>RAE</b>	29.3 ± 4.7	25.4 ± 4.8	24.3 ± 2.4	34.0 ± 3.0
<b>RAI</b>	35.5 ± 3.5	33.1 ± 2.0	25.6 ± 3.0	35.4 ± 2.9

\* P < 0.05

De acuerdo a estos resultados se logró detectar respuesta al inductor A23187 en forma significativa en las muestras de semen en ambos tiempos de incubación (P < 0.05). Por otro lado los valores para cérvix y endometrio no muestran diferencia que indique respuesta al inductor. Es importante señalar que los porcentajes de RAE, encontrados específicamente en endometrio, fueron los más altos de estas muestras.

### 3.3.2 Tiempo de Reacción del Ionóforo de calcio A23187.

Con el fin de optimizar el tiempo de reacción del ionóforo de calcio A23187 para desarrollar la RA, fueron probados dos tiempos. Se realizaron 7 ensayos donde espermatozoides capacitados en EBSS durante 1 hora se sometieron a la prueba de RA inducida (por duplicado) probando la reacción a 15 minutos y a 1 hora. Para demostrar la RA se aplicó la prueba de CTC y se observaron los patrones de fluorescencia comparándolos en ambos tiempos. Los porcentajes del patrón RA en cada tiempo de reacción en las seis muestras analizadas se muestran en la tabla V

**TABLA V**

Reacción Acrosomal en dos Tiempos de Reacción con Ionóforo de calcio A23187

15 Minutos (%)	1 Hora (%)
29.0	26.0
35.1	30.4
20.8	20.9
30.3	34.6
25.0	30.0
24.0	27.0
27.2	26.8
$\bar{x} = 27.3 \%$	$\bar{x} = 28.0 \%$

En el análisis de varianzas de estos resultados, aunque no es significativa la falta de diferencia en el desarrollo de la RA, si el ionóforo

reacciona por 15 minutos o por 1 hora ( $P < 0.8$ ), para fines de optimizar tiempos se decidió por la reacción de 15 minutos, tiempo que fue aplicado en todas las pruebas posteriores para Reacción Acrosomal.

### 3.4 Recuperación Espermática en Parejas de Fertilidad

#### Comprobada

De 11 parejas de fertilidad comprobada examinadas, 8 fueron incluidas en esta parte del estudio por presentar características que permitieron obtener una recuperación espermática adecuada para su evaluación posterior (ver tabla VI).

**TABLA VI**

**Características del Semen y Moco Cervical en Parejas de Fertilidad Comprobada.**

	<b>Volumen ml</b>	<b>Cuenta espermática <math>\times 10^6</math>/ml</b>	<b>Motilidad %</b>	<b>Vitalidad %</b>	<b>Morfología %</b>
<b>Semen</b>	<b>3.16</b> (1.9-4.8)	<b>129.8</b> (65-217)	<b>31.6</b> (9-54)	<b>83.4</b> (75-88)	<b>60.4</b> (43-73)

	<b>Tipo de Moco</b>	<b>Cuenta espermática <math>\times 10^6</math>/vol de moco</b>	<b>Cuenta espermática <math>\times 10^6</math>/vol swim-up</b>
<b>Moco Cervical</b>	<b>Favorable</b>	<b>1.3</b> (0.1-4.48)	<b>0.36</b> (0.0008-0.6)

Las variables de volumen, cuenta, vitalidad y morfología espermática en las muestras de semen de esta población se encontraron dentro de los rangos

de normalidad que describe la OMS. En el caso del moco cervical, el 100 % de las muestras presentó características de moco favorable y aunado a la buena calidad del semen se lograron obtener cuentas espermáticas adecuadas para aplicar las posteriores pruebas. La cuenta espermática en swim-up se refiere a las cuentas obtenidas después de someter las muestras de moco al proceso de recuperación con PBS. En la tabla VII se muestran algunas características de la obtención de muestras de secreción endometrial. Todas ellas se obtuvieron aplicando el protocolo II de recuperación, el cuál fue explicado en la parte de estandarización. Debido al reducido número de espermatozoides observados en el fresco de los aspirados de endometrio, en éstos se aplicó la concentración como método de recuperación, hasta dejar un volumen de 0.2 ml, el cuál fue suficiente para obtener cuentas espermáticas que permitieron realizar las siguientes evaluaciones.

**Tabla VII**  
**Características de Obtención de Secreción de Endometrio en Parejas de Fertilidad Comprobada**

<b>N</b>	<b>vol. PBS ml</b>	<b>sangrado</b>	<b>método de recuperación</b>	<b>cuenta espermática recuperada x10<sup>6</sup>/vol.</b>
8	0.38 (0.2-0.5)	escaso	concentración	0.0012 / 0.3 ml (0.0009-0.002)

Los valores corresponden a las medias con los rangos entre paréntesis.

### 3.5 Semen de Varones Fértiles y su Respuesta a la Capacitación *in vitro* .

Las características de las muestras de semen en las parejas de fertilidad comprobada así como su respuesta al proceso de capacitación *in vitro* se muestran en la tabla VIII. De acuerdo a estos resultados todas las muestras responden al tratamiento incrementando la motilidad, la vitalidad y la morfología espermáticas respecto a los valores observados a los 30 minutos después de ser colectadas las muestras.

**Tabla VIII**

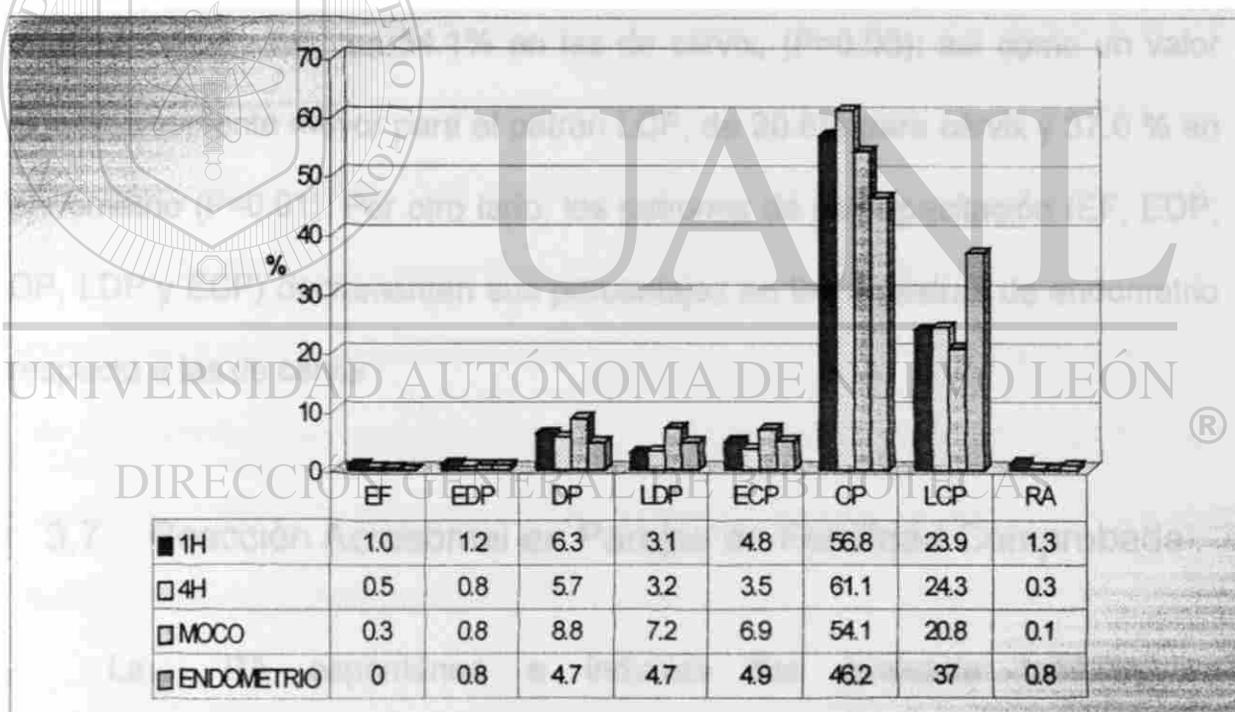
**Semen de Varones Fértiles y su Respuesta a la Capacitación *in vitro*.**

%	capacitado		
	Inicial 30'	1 hora	4 horas
<b>Motilidad</b>	31.6 (9-54)	72.8 (51-97)	57.8 (11-90)
<b>Vitalidad</b>	83.4 (83-88)	92.4 (82-98)	90.4 (75-100)
<b>Morfología</b>	60.4 (43-73)	77.0 (71-82)	80.2 (68-93)

Los valores corresponden a las medias en porciento para cada variable con los rangos entre paréntesis

### 3.6 Patrones CTC en Espermias Capacitados *in vitro* e *in vivo* en Parejas de Fertilidad Comprobada.

Al aplicar las técnicas de capacitación espermática en semen así como las de recuperación de espermatozoides en cérvix y endometrio ya implementadas y estandarizadas, se prosiguió a la evaluación de la membrana plasmática de espermatozoides de dichas muestras en las 8 parejas de fertilidad comprobada. Para este fin las células recuperadas fueron tratadas con la prueba de CTC ya estandarizada, aplicando los patrones de Perry. En la figura 4 se presentan los resultados obtenidos.



**Figura 4. Patrones CTC en Espermatozoides Capacitados *in vitro* e *in vivo* de Parejas de Fertilidad Comprobada.**

Los valores corresponden a la media en % de cada patrón en semen capacitado y en secreciones de moco y endometrio de 8 varones y sus parejas.

Los resultados en semen indican una variación mínima para los patrones de no capacitación EF, EDP, DP y ECP hacia las 4 horas de incubación

respecto a los de 1 hora; esta variación solo es significativa para el patrón ECP ( $P < 0.05$ ). El patrón LDP prácticamente no cambia, con valores de 3.1% a 1 hora y 3.2% a las 4 horas. En forma relevante se puede apreciar el aumento significativo hacia las 4 horas en el patrón de capacitación CP de 56.8 % a 61.1% ( $P = 0.01$ ). El patrón LCP (de acrosoma reactivo) se mantiene prácticamente igual en los dos tiempos de incubación (23.9% y 24.3% a 1 y 4 horas respectivamente); mientras el RA muestra disminución, aunque no significativa (de 1.3% a 0.3%). Con respecto a los especímenes recuperados del tracto reproductor femenino lo más relevante representa el significativo valor menor en el patrón CP observado en las muestras obtenidas de endometrio de 46.2%, comparadas con 54.1% en las de cérvix, ( $P = 0.05$ ); así como un valor significativamente mayor para el patrón LCP, de 20.8% para cérvix y 37.0 % en endometrio ( $P = 0.01$ ). Por otro lado, los patrones de no capacitación (EF, EDP, DP, LDP y ECP) decrecientan sus porcentajes en las muestras de endometrio respecto a las de cérvix

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 3.7 Reacción Acrosomal en Parejas de Fertilidad Comprobada

La RA espontánea e inducida fue evaluada también en espermatozoides capacitados *in vitro* y en los recuperados del tracto reproductor femenino, resultados que se muestran en la tabla IX.

Tabla IX

**Reacción Acrosomal Espontánea e Inducida en Semen Capacitado  
1, 4 horas, en Cérvix y Endometrio de Parejas de Fertilidad  
Comprobada**

	1H*	4H*	Cérvix*	Endometrio
<b>RAE</b>	25.2 ± 4.1	24.7 ± 2.8	20.9 ± 0.8	37.8 ± 5.7
<b>RAI</b>	30.6 ± 2.1	29.3 ± 1.6	27.7 ± 4.4	38.2 ± 1.6

\* P < 0.05

Los resultados anteriores indican una respuesta favorable al inductor A23187 en semen (1hora y 4 horas) así como en las células recuperadas de cérvix, aunque en el endometrio esta respuesta aparentemente no se logró demostrar. Sin embargo cuando se compararon la RA Espontánea y la RA Inducida entre las células obtenidas de cérvix y de endometrio, se demostraron diferencias significativas que respaldan los incrementos porcentuales en las muestras de endometrio respecto a las de cérvix; 20.9 % vs 37.8% para RAE en cérvix y endometrio respectivamente (P<0.001) y 27.7% vs 38.2% para RAI en cérvix y endometrio respectivamente (P< 0.01). Estas diferencias se pueden explicar en base a la diferente acción del tracto reproductor femenino sobre el metabolismo del espermatozoide.

### 3.8 Motilidad, Vitalidad y Morfología Espermáticas en Parejas de Fertilidad Comprobada.

Los valores de motilidad, vitalidad y morfología espermática en semen capacitado *in vitro*, en moco cervical y en endometrio se ven resumidos en la tabla X.

Tabla X

#### Motilidad, Vitalidad y Morfología Espermáticas en Parejas de Fertilidad Comprobada

%	Capacitados <i>in vitro</i>		Capacitados <i>in vivo</i>	
	1 hora	4 horas	Cérvix	Endometrio
<b>Motilidad</b>	72.8 (51-97)	57.8 (11-90) **	33.0 (14-47)	55.5 (30-82)
<b>Vitalidad</b>	92.4 (82-98)	90.4 (75-100)	85.4 (75-95)	86.6 (62-96)
<b>Morfología</b>	77.0 (71-82)	80.2 (68-93) **	81.7 (73-92)	95.0 (94-96) *

\*  $P < 0.05$

\*\*  $P = 0.1$

Los valores corresponden a las medias en % para cada variable con los rangos entre paréntesis.

De acuerdo a estos resultados la motilidad, la vitalidad y la morfología espermáticas presentan diferencias al comparar sus valores en el semen capacitado 1 hora contra los de 4 horas, observando disminución para la motilidad e incremento en la morfología ( $P=0.1$ ); por otra parte los % de motilidad y morfología espermáticas se incrementaron en las muestras de endometrio comparadas con las de cérvix, aunque solo para la morfología este aumento fue significativo, ( $P < 0.05$ ).

## CAPITULO 4

### DISCUSIÓN

Los estudios realizados acerca de los cambios que sufre el espermatozoide durante su trayecto a través del canal cervical y posteriormente del endometrio y de las trompas de Falopio, comprenden desde los bioensayos de Edwards en 1969, quién inicialmente demostró, en conejos, el prerequisite de la capacitación espermática para lograr la fertilización, hasta pruebas de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales para detectar la RA (16,33).

En el presente trabajo de tesis se llevaron a cabo pruebas que lograron evaluar el estado morfofisiológico del espermatozoide que ha sido sometido a capacitación *in vitro* e *in vivo* con la finalidad de demostrar y comparar la acción capacitante de los tejidos cervical y endometrial en el humano.

Se implementaron técnicas que permitieron recuperar espermatozoides a partir de las secreciones de cérvix y endometrio y para ello se procesaron y compararon las concentraciones espermáticas recuperadas en muestras de moco cervical de buena y de mala calidad. Gould y cols. en 1984 describen una técnica de recuperación que donde el moco es incubado hasta por 1 hora bajo

atmósfera de 5% de CO<sup>2</sup> y posteriormente es hidratado en medio BWW, además de ser sometido a centrifugación (37); consideramos que este procedimiento puede afectar notablemente la calidad del espermatozoide. Por otro lado Lambert en su estudio, con el uso de PBS como medio de recuperación de espermatozoides, sugiere que el moco permite un estado avanzado de capacitación y que los efectos difieren *in vivo* de *in vitro*(28). Nosotros utilizamos este mismo medio para la recuperación de espermatozoides al considerarla la mejor forma de mantener las condiciones *in vivo* requeridas para comprobar nuestra hipótesis.

La técnica de recuperación espermática que se utilizó permitió obtener cuentas de  $1.12 \times 10^6$  células/ 1.5 ml, en moco favorable y de  $0.41 \times 10^6$  células/ 1.5 ml en moco desfavorable, además de considerarla más fisiológica y menos agresiva.

La recuperación espermática en secreción de endometrio no ha sido documentada para aplicar pruebas específicas de función espermática. Existe la referencia de una prueba de aspiración uterina como complemento de la prueba post-coito, donde el aspirado solo es revisado sobre un portaobjetos para observar el número y movilidad de los espermatozoides(38). Sin embargo en ella no se describe evaluación de más pruebas de función espermática. La técnica de recuperación en endometrio implementada en el presente trabajo de investigación, demostró su eficacia al lograr aspirar PBS en 29 de 36 muestras (80.0%), 21 de las cuáles fueron obtenidas aplicando el protocolo II de recuperación, de éstas, en 15 se logró recuperación de espermatozoides.

Finalmente solo en 5 de estas 15 se obtuvieron cuentas espermáticas suficientes para aplicar las pruebas de CTC y de RA Inducida .

Cuando se aplicaron estas técnicas ya estandarizadas a las pacientes de fertilidad comprobada, en vista de que se trataban de mujeres con características de ovulación, fue posible obtener cuentas espermáticas adecuadas que permitieron demostrar en las células el estadio de capacitación y de RA alcanzado.

La prueba de Clorotetraciclina CTC, utilizada desde hace años para evaluar y demostrar el estado de capacitación espermática(32,33), fue estandarizada y aplicada en la evaluación del estado fisiológico del espermatozoide capacitado *in vitro* e *in vivo* logrando clasificar los 8 patrones descritos por Perry EF, EDP, DP, LDP, ECP, CP, LCP y RA .

Cuando se analizaron los patrones en semen se encontró que los patrones de no capacitación EF,EDP, LDP y ECP, así como el LCP y el RA decrecientan sus porcentajes hacia las 4 horas de incubación, con respecto a los valores de 1 hora, mientras el patrón de capacitación CP se eleva significativamente. No se han reportado trabajos científicos donde se apliquen los patrones descritos por Perry para observar el estado de capacitación en poblaciones espermáticas con las características de nuestra población de estandarización.

Cuando se evaluó la variación en la identificación de los 8 patrones CTC ésta fue mínima al no encontrarse diferencia significativa entre los porcentajes

de dichos patrones en los 7 pacientes . Por otro lado la variación interensayo encontrada se puede considerar aceptable en base a las diferencias esperadas en muestras de semen según describe Rogers (25) cuando reportó la existencia de cierta variabilidad inter donador, lo que se puede asociar también con la variación demostrada en los valores para cuenta espermática encontrados en un mismo paciente evaluado cada 15 días a lo largo de un período de 2 y medio años, reportado por la OMS(35). Estos resultados permiten aceptar las variaciones encontradas para los patrones de CTC, además de mencionar que se presentó variación inter ensayo en no más de tres pacientes de los 7 que se analizaron, con la relevancia que para el patrón CP esta variación solo se manifestó en una muestra.

Perry y Lee, en una población de varones fértiles, reportan disminución a través del tiempo de todos los patrones de no capacitación (EF,EDP,DP,LDP y ECP) con elevación que se mantuvo hasta las 4 horas de incubación de los patrones de capacitación (CP, LCP y RA) (32,33). En nuestra población de estandarización (pacientes de infertilidad) es posible que características intrínsecas de las células induzcan un comportamiento diferente, lo que explicaría algunas de estas discrepancias.

Al revisar los resultados de la evaluación en espermatozoides recuperados de muestras del tracto femenino, se encontró que el valor del patrón CP es menor y el LCP mayor en las muestras de endometrio comparadas con las de cérvix. La falta de información documentada acerca de

la aplicación de estas pruebas en células recuperadas bajo estas condiciones nos impide comparar estos resultados.

En el uso de la prueba de inducción de la reacción acrosomal se han reportado diferentes tiempos para la reacción del ionóforo de calcio A 23187, que van desde 3 horas hasta 15 minutos(17,31,33). Como parte de la implementación de esta prueba fue optimizado el tiempo de reacción del inductor, comparando 15 minutos contra 1 hora. Cuando se probó la acción del reactivo se decidió por el menor tiempo, en base a que no se encontró diferencia significativa entre ambos. Este tiempo fue aplicado posteriormente en todas las pruebas de Inducción de la RA.

En la detección de la respuesta al Ionóforo de calcio A23187 se analizaron las diferencias entre RA Espontánea e Inducida en espermatozoides de semen capacitado 1 hora y 4 horas, así como en los recuperados de cérvix y de endometrio. Lee utilizó ionóforo A23187 y zona pelúcida de ratón solubilizada con ácido como inductores de la reacción acrosomal, aunque logró detectar respuesta favorable con ambos, solo la aplicó en semen incubado por 3 horas en medio de BWW con 3mg/ml de ASH<sup>+</sup> (32). Así mismo Kholkute detectó incremento significativo entre la RAE y la RAI en semen de hombres normozospermicos, astenozospermicos y oligozospermicos incubados en BWW conteniendo 40 mg/ ml de ASH por cuatro horas(31). Nuestros resultados indican detección de la respuesta al inductor en las muestras de semen a 1 y 4 horas de incubación; la evaluación en estos dos periodos de incubación coincide con los tiempos evaluados con la prueba de CTC en las muestras

capacitadas *in vitro*, así como basados en la referencia de tener un tiempo de capacitación mínimo para lograr la inducción de la RA con A23187. La respuesta en la RAI no se logró detectar en las células obtenidas de cérvix y de endometrio, sin embargo los porcentajes de reacción acrosomal espontánea encontrados en endometrio son los más altos en esta población. Es probable que lo anterior sea debido a las características en el estado de fertilidad de estas pacientes que se reflejó en esta falta de respuesta.

La reacción acrosomal no ha sido estudiada en espermatozoides recuperados de cérvix ni de endometrio humanos, por lo que nuestro trabajo es el primero que logra aplicar esta prueba funcional en dichas células, aportando así información valiosa sobre la fisiología reproductiva.

Con las diferentes técnicas y pruebas estandarizadas se prosiguió a aplicarlas en la recuperación y evaluación morfofisiológica de espermatozoides en cérvix y endometrio, así como de los sometidos a proceso de capacitación *in vitro*, en las muestras de las parejas de fertilidad comprobada.

Las cuentas espermáticas recuperadas en moco cervical oscilaron entre  $0.0008 \times 10^6$  y  $0.6 \times 10^9/1.5$  ml de medio de recuperación, dichas cuentas son comparables con las reportadas por otros autores(28,37) . En base a que estas cuentas celulares fueron suficientes para la realización de las pruebas funcionales subsiguientes (capacitación y RAI), se pueden tomar como referencia para considerar una muestra candidata para evaluación morfofisiológica aplicando pruebas como la de CTC. El porcentaje de muestras

de moco cervical que se lograron incluir con recuperación espermática adecuada, fue del 44.4%, sobrepasando ampliamente el 10 % reportado por Overstreet y Gould, aunque ellos obtuvieron las muestras de moco cervical después de inseminación artificial aplicándolas para pruebas de penetración(37). Lambert y cols., quienes lograron recuperar espermatozoides del moco cervical, también obtenido después de inseminación artificial, no mencionan el número de muestras procesadas (28). Por otro lado es relevante para nuestro trabajo la implementación de una técnica para obtener secreción de endometrio, la cuál es rápida, causa mínima molestia a la paciente y permite recuperar espermatozoides en condiciones adecuadas para someterlos a pruebas específicas. La literatura no describe métodos de recuperación espermática por aspirado de secreción endometrial, que refiera su aplicación en pruebas funcionales, a este respecto nuestros resultados indican la posibilidad del uso de una técnica segura y útil que permite evaluar la función espermática

en células obtenidas de estructuras como el endometrio. Sin embargo es importante señalar que el éxito de la recuperación depende, además de una buena técnica, de un factor seminal (cuenta, y motilidad), cervical y endometrial normales, lo que caracteriza a esta población de estudio.

En forma reciente se han publicado informes del efecto del fluido folicular(39) en la motilidad, la fusión de prostasomas para estimular la reacción acrosomal(40) y una nueva forma de evaluar el estado acrosomal(41) .

Los valores de volumen, cuenta, motilidad y vitalidad y morfología en semen, así como las características de todas las muestras de moco cervical,

clasificadas como moco favorable, fueron las esperadas para una población fértil(35). Se puede considerar que tales condiciones de calidad en todas las muestras estudiadas de esta población permitieron recuperar cuentas espermáticas en moco cervical y en endometrio suficientes para evaluar posteriormente su estado morfofisiológico al aplicarles las pruebas de CTC y RAI.

El método de capacitación espermática utilizado logró mejorar la calidad del semen en todas las muestras estudiadas, esto en base a las mejoras encontradas en los porcentajes de motilidad, vitalidad y morfología post-capacitación. La decisión de evaluar el semen a 1 y 4 horas de incubación tuvo como propósito igualar el tiempo de contacto del espermatozoide en el tracto femenino durante la prueba post-coito semejando las condiciones del tratamiento de capacitación espermática. La otra finalidad consistió en comparar los patrones de CTC en espermatozoides capacitados *in vitro* en esos tiempos de incubación con los obtenidos *in vivo* (de cérvix y endometrio), y de esa forma determinar el estadio de capacitación desarrollado en las distintas condiciones. Perry evaluó la capacitación espermática *in vitro* cada hora durante 8 horas detectando frecuencias características de los distintos patrones CTC en semen de varones fértiles. Sin embargo no se han reportado estudios que apliquen esta prueba (CTC) en espermatozoides recuperados de cérvix o endometrio, que traten de explicar la fisiología de estas células en dichos microambientes.

La aplicación de la prueba de CTC para la evaluación de los cambios a nivel de la membrana plasmática de espermatozoides capacitados *in vitro* e *in vivo* en las parejas fértiles arroja resultados interesantes. En semen se detectó disminución de los patrones de no capacitación (EF,EDP,DP y ECP) que aunque solo fue significativa para el patrón ECP, se considera a este comportamiento comparable con los reportes de Perry para esos patrones (33 ). Los valores de estos patrones observados en el tracto femenino indican de igual manera una tendencia a su disminución en endometrio respecto al cérvix.

En la evaluación de los patrones de capacitación en semen se encontró incremento significativo para el patrón CP hacia las 4 horas ( de 56.8% a 61.1%), mientras el LCP no se modificó y el RA disminuyó aunque sin significado estadístico. Perry reportó elevación para estos tres patrones a través del tiempo, lo que nos permite considerar cierta medida de concordancia con nuestros resultados (33).

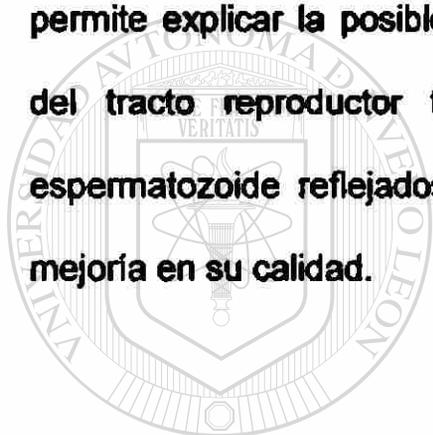
Cuando se evaluaron los porcentajes obtenidos del tracto femenino se encontró que el patrón CP, por el contrario con el semen, presenta valores significativamente menores en endometrio comparados con los de cérvix, mientras el LCP se incrementó en forma considerable. Se puede explicar este comportamiento si deducimos que el tejido endometrial induce a la desaparición del estadio de capacitación CP incrementando a su vez el LCP. Es probable que tales diferencias sean promovidas por las distintas condiciones del microambiente con el que se encuentra en contacto el espermatozoide *in vitro* e *in vivo*, como pueden ser diferente concentración de nutrientes, moléculas y

iones, lo que conlleva a demostrar los diferentes efectos que proveen sobre el espermatozoide los dos tipos de tratamientos.

En la evaluación de la RA fue posible demostrar respuestas favorables al ionóforo A23187 como inductor de la reacción acrosomal tanto en semen como en cérvix, respuesta que en endometrio aparentemente no se detectó. Kholkute y Lee(31,32) en sus reportes describen valores para RA inducida en semen de  $30 \pm 7.2$  y  $31.3 \pm 4.5$  respectivamente y a pesar de que las condiciones de incubación no fueron las mismas, sus valores son comparables con los nuestros. Sin embargo no se han reportado trabajos donde se evalúe la RA en células obtenidas del tracto reproductor femenino de tal manera que nuestros hallazgos a este respecto resultan una aportación científica importante que puede ampliar el conocimiento acerca de la fisiología de este tejido. La falta aparente de respuesta del endometrio hacia el inductor artificial podría tener explicación al considerar que este tejido en forma espontánea pueda inducir una acción importante sobre el acrosoma del espermatozoide, por lo que los valores de RA espontánea detectados mediante la prueba de CTC son más elevados que los observados en semen capacitado *in vitro* y en el cérvix, de tal forma que no es posible incrementarlos más a pesar de la presencia del A23187. Es posible que el mismo endometrio induzca un estado tan avanzado de capacitación que el espermatozoide alcanza a desarrollar estos valores de RA que no habían sido demostrados nunca antes.

Las diferencias estadísticas encontradas para la motilidad, la vitalidad y la morfología espermáticas entre el semen capacitado a 1 hora y a 4 horas

aparentemente no se asocian en forma directa con los cambios en los patrones de CTC en esos mismos tiempos de incubación, pues mientras los patrones de no capacitación disminuyen, el de capacitación (CP) aumenta en forma importante. Sin embargo las tres variables se ven incrementadas en las muestras de endometrio respecto a las de cérvix, lo cuál si se asocia con la desaparición del patrón CP , la elevación del LCP y los valores altos de RA inducida en endometrio; este hallazgo puede representar un posible estado más avanzado de capacitación inducido por ese tejido. Este comportamiento permite explicar la posible acción progresiva promovida por el microambiente del tracto reproductor femenino induciendo cambios bioquímicos en el espermatozoide reflejados en cambios fisiológicos, que se traducen en una mejoría en su calidad.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPITULO 5

### CONCLUSIONES

1. Se logró la innovación de una técnica por aspirado para obtener secreción de endometrio, la cuál es segura, rápida, inocua, causa mínima molestia para la paciente, además de que permite recuperar espermatozoides en condiciones adecuadas para someterlos a pruebas funcionales.
2. Se estandarizó la prueba de CTC para membrana plasmática en espermatozoides, logrando identificar los 8 patrones fluorescentes de Perry..
3. Se implementó la prueba de RA inducida con Ionóforo de calcio A23187 aplicada a espermatozoides capacitados *in vitro* y a recuperados de moco cervical y secreción de endometrio.
4. Los espermatozoides capacitados *in vitro* e *in vivo* desarrollan estadios de capacitación específicos, identificados por los patrones de Perry aplicando la prueba de CTC.
5. Los tejidos cervical y endometrial inducen estadios de capacitación espermática en proporciones diferentes que el tratamiento *in vitro*.
6. El tratamiento de capacitación *in vitro* induce la elevación del patrón de capacitación CP hacia las 4 horas de incubación.

7. El tejido endometrial induce la disminución del patrón CP e incremento del LCP respecto al cérvix.
8. Espermatozoides capacitados *in vitro* y recuperados del cérvix responden favorablemente a la inducción de la RA con ionóforo de calcio A23187.
9. Espermatozoides recuperados de endometrio presentan un estadio de capacitación más avanzado respecto al cérvix, el cuál se demostró por los valores del patrón RA desarrollados en ese tejido en forma espontánea.
10. La calidad en la motilidad, la vitalidad y la morfología espermáticas se incrementa en el endometrio respecto al cérvix .

Estos hallazgos permiten validar la hipótesis de investigación del presente trabajo al comprobarse que los tejidos endometrial y cervical humanos promueven la capacitación, la cuál se demostró aplicando pruebas funcionales como la prueba de CTC y .la inducción de la reacción acrosomal

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Así mismo se logró comprobar que los estadios de capacitación alcanzados por el espermatozoide después de contacto con cérvix y endometrio son diferentes en cada uno de ellos y progresivos en su ruta biológica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Sullivan, R. Interaction Between Sperm and Epididymal Secretory Proteins. The Male Gamete from Basic Science to Clinical Applications. USA. Cache River Press. 1999 ;p93.
  2. Yanagimachi, R. Fertilization and Embryo Transfer. Academic Press Inc. (London) Ltd 1983 ; p65.
  3. Austin, C. R. The capacitation of the mammalian sperm. Nature. 1952;170:326.
  4. Chang, M. C. Fertilizing capacity of sperm deposited in the fallopian tube. Nature. 1981;168: 697-698.
  5. Austin, C.R. Observations on the penetration of sperm into the mammalian egg. Aust. J. Sci. Res. 1952;B54:581-596.
  6. Zaneveld LJ, De Jonge C.J, Anderson RA, Mack SR. Human sperm capacitation and the acrosome reaction. Hum. Reprod. 1991; 6(9): 1265-1274.
- 
7. Oliphant G and Eng L.A. Collection of gametes laboratory animals and preparation of sperm for in vitro fertilization. Fertilization® and Embryonic Development In Vitro. Plenum Press. New York, U.S.A 1981;p11.
  8. Speroff L, Glass R. H., Kase N. Sperm and Transport, Fertilization and Implantation. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 6a Ed. Lippincott William & Wilkins. U. S. A. 1999;p247.
  9. Kopf G, Ping Ning X., Visconti P., Galantino-Hormer H. Signaling Mechanisms Controlling Mammalian Sperm Fertilization Competence and Activation. The Male Gamete from Basic Science to Clinical Applications. U.S.A. Cache River Press. 1999;p105.
  10. Chang M. C. A detrimental effect of rabbit seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. Nature. 1957;179:258-263.

11. O'Rand M.G. Changes in sperm surface properties correlated with capacitation. *The Spermatozoon*. Urban & Scharzenberg, Baltimore- Munich. 1979; p195.
12. De Lamirande E., Leclerc P., Gagnon C. Capacitation as regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol. Hum.Reprod.* 1997, 3(3):175-194.
13. Yanagimachi R. Capacitation and the acrosome reaction. *Gamete Physiology, Sero Symposium, Norewell, Massachusetts, 1990;* p31
14. Bedford J.M. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction Suppl.* 1970;2:128-158.
15. Nagae T, Yanagimachi R., Srivastava P and Yanagimachi H. Acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil Steril* . 1986;45:701-707.
16. Edwards R.G., Bavister B.D. and Steptoe P.C. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature.* 1969;221:632.
17. Jamil K., White I.G. Induction of acrosomal reaction in sperm with ionophore A23187 and calcium. *Arch. Andol.* 1981;7(4):283-292.
18. Kopf G. S., Visconti P.E., Galantino-Homer H. Capacitation of the mammalian spermatozoon. *Adv. Biochem.* 1998; 5:83-107.
19. Pawson T. Scott J.D. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science.* 1997;278:1280-12877.
20. Yanagimachi R. In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility* 1969;18:275-286.
21. Demott R. P. and Suarez S. S. Hiperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol. Reprod.* 1992;46:779-785.
22. Suarez S. Regulation of Sperm Transport in The Mammalian Oviduct. *The Male Gamete from Basic Science to Clinical Applications.* USA. Cache River Press. 1999; p71.
23. Fleming A. D. and Yanagimachi R. Fertile life of acrosome - reacted guinea pig spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 1982; 200:109-115.

24. Arnoult C., Lemos J. R., Florman H. M. Voltage - dependent modulation of T-type calcium channels by protein tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 1997;16:1593-1599.
25. Rogers B.J. Hamster egg: Evaluation of Human Sperm using In Vitro Fertilization. In *In Vitro Fertilization and Embryo Transfer.* Academic Press Inc.(London) Ltd. 1983; p 101.
26. Talbot P., Chacon R.S., A triple technique for evaluating normal reactions of human sperm. *J. Exp. Zool.* 1981;215:201-208.
27. Wolf D.P., Boldt J., Byrd W., Bechtol K.B., Acrosomal status evaluation in human ejaculated sperm with monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.* 1985;32:1157-62.
28. Lambert H., Overstreet J.W., Morales P., Hanson F.W., Yanagimachi R., Sperm capacitation in the human reproductive tract. *Fertil Steril.* 1985;43(2):325-327.
29. Fusi F.M., Viganò P., Daverio R., Bausacca M., Vignali M. Effects of the coculture with human endometrial cells on the function of spermatozoa from subfertile men. *Fertil Steril.* 1994;61(1):160-167.
30. Saling P.M., Storey B.T., Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J. Cell. Biol.* 1979;83(3):544-555.
31. Kholkute S. D., Meherji P., Puri C. P. Capacitation and the reaction acrosome in sperm from men with various semen profiles monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. *Int. J. Androl.* 1992;15(1):43-53.
32. Lee M.A., Trucco G.S., Bechtol K.B., Kofp G. S., Blasco L. Capacitation and acrosome reactions in human spermatozoa monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. *Fertil Steril.* 1987;48(4): 649 - 658.
33. Perry R.L., Naeeni M., Barratt Ch.L.R., Warren M .A., Cooke I.D. A time course study of capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa using a revised chlortetracycline pattern classification. *Fertil Steril.* 1995;64(1):150-159.
34. Yao Y., Ho P. and Yeung W. Sh. Effects of human cell coculture on various functional parameters of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 1999;71(2):232-239.
35. Organización Mundial de la Salud. Recolección y examen del semen

humano. En: Manual de Laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. 3ª Ed. Editorial Médica Panamericana. Argentina 1992; p 3.

36. Merino M, Luna H, Morales A, Saldivar D, Vidal O. Respuesta acrosomal de espermatozoides humanos demostrada con clorotetraciclina. Ginec Obst , Mex. 2004; 72:239-246.
37. Gould J E, Overstreet J W. Assessment of Human Sperm Function After Recovery from the Female Reproductive Tract. Biology of Reproduction. 1984; 31:888-894.
38. Moghissi K S. Importancia del cuello uterino en la infecundidad. En: Clínicas Obstétricas y Ginecológicas. Ed Interamericana, 1979, vol. 1, p.27.
39. Yao Y. and Yeung W S .. Effects of human follicular fluid on the capacitation and motility of human spermatozoa. Fertil Steril. 2000 73 (4):680-686.
40. Palmerini C A, Saccardi C, Carlini E, Fabiani R, Arienti G. Fusion of prostasomes to human spermatozoa stimulates the acrosome reaction. Fertil Steril 2003; 80:1181-1184.
41. Silvestroni L, Mantovani A and Palleschi S. The partial head descondensation test is a new, quick method to assess acrosome status in human spermatozoa. Fertil Steril 2004; 81:1007-1012.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

**Hilda Magdalena Luna Aranda**

Candidata para el Grado de

**Maestra en Ciencias con Especialidad en Biología de la Reproducción**

**Tesis: CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE INDUCIDOS *IN VIVO* POR SECRECIONES DE ENDOMETRIO Y CÉRVIX HUMANOS.**

**Campo de Estudio: Ciencias de la Salud**

**Biografía:**

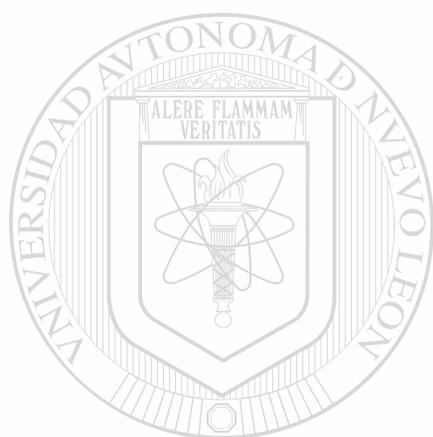
**Datos Personales:** Nacido en Monterrey , N.L. el 5 de agosto de 1961, hijo de Sergio A. Luna Berlanga y Magdalena C. Aranda vda. de Luna.

---

**Educación:** Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Clínico Biólogo en 1983.

**Experiencia Profesional:** Titular del Laboratorio de la Unidad de Biología de Reproducción desde 1983; investigador en el Laboratorio de Biología de la Reproducción desde 1984.

**Organizaciones Profesionales:** Colegio de Profesionales de la Química Clínica de N.L., A.C, Federación Nacional de Colegios de la Química Clínica., A.C.; socio activo desde 1992, socio actual N° 069, membresía 2004.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



