

Instituto Mexicano del Seguro Social
HOSPITAL DE GINECO-OBSTETRICIA No. 3
CENTRO MEDICO LA RAZA



ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL TEST DE SIMS
HÜHNER Y LAS PRUEBAS DE PENETRACION
ESPERMATICA IN VITRO CUANTITATIVAS



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO
UNIVERSITARIO DE ESPECIALISTA EN
GINECO - OBSTETRICIA

P R E S E N T A E L
M E D I C O C I R U J A N O

CONSTANTINO ABDALA SELMEN

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALTA DE CRO

1980



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E . -

	Páginas.-
DEDICATORIA.	3 - 4
INTRODUCCION.	5 - 6
CAPITULO I.- GENERALIDADES.	7 - 22
CAPITULO II.- CONCEPTO.	23 - 32
CAPITULO III.- MATERIAL Y METODOS.	33 - 39
CAPITULO IV.- RESULTADOS.	40 - 45
CAPITULO V.- COMENTARIOS Y CONCLUSIONES.	46 - 49
BIBLIOGRAFIA.	50 - 51

I N T R O D U C C I O N . -

El mecanismo de migración de los espermatozoides a través del cuello uterino, desempeña un papel de enorme importancia en la Biología de la reproducción del ser humano. Los espermios deben de cruzar el canal cervical para seguir un orden de ascenso y lograr la fertilización de un óvulo en la salpínge. El moco cervical juega un papel de actividad muy importante en el control de éste paso. Los cambios cíclicos en las características del moco durante el ciclo menstrual, regulan el ascenso de los espermatozoides por el tracto genital femenino, hasta las Trompas de Falopio. Las deformidades anatómicas del cérvix y anomalías en la interacción moco-esperma, pueden interferir con dicha progresión y ser los responsables de esterilidad (9). Estos factores cervicales están implicados en un pequeño porcentaje de todos los casos (9).

La forma más adecuada de valorar la espermiomigración en el aparato genital femenino, es por medio de los llamados test post-coitales, los cuales son de dos tipos: In vivo (6,7,15) e In vitro (1,14).

Entre los test In vivo, destaca el test intracervical de Sims Hühner, cuya técnica debe de llenar ciertos requisitos y cuya interpretación debe de correlacionarse con las características del moco cervical y del semen (7,14,15).

Los test cuantitativos que miden la verdadera penetración espermática In vitro, simple (Ruiz Velasco I), o cruzados (Ruiz Velasco II), nos indican en donde está la causa de la deficiente migración espermática (14); la cual puede deberse a problemas coito-vaginales; a un moco cervical hostil; a un esperma con deficiente capacidad de penetración; por defecto de ambos: moco y esperma; o por factor inmunológico femenino, masculino o de ambos.

Hasta el momento no se ha correlacionado en estudios prospectivos, el test de Sims HÜhner con las pruebas de penetración espermática In vitro cuantitativas, motivo por el cual elaboramos el presente trabajo, que consiste en un estudio comparativo entre el Test de Sims HÜhner y las pruebas de penetración espermática cuantitativas, simple y cruzadas.

CAPITULO I.-

GENERALIDADES.-

FISIOLOGIA DEL CUELLO UTERINO.-

Participación del cuello uterino en el transporte de los espermatozoides:

El cuello uterino puede compararse con una válvula biológica; en la fase ovulatoria del ciclo menstrual permite la entrada de espermatozoides al útero y en las otras fases impide su ingreso. No es en absoluto un órgano pasivo, sino un participante activo en el proceso de migración de los espermatozoides. Casi todas las funciones del cuello uterino se hacen por medio de la secreción del epitelio cervical.

La migración de los espermios a través del cuello uterino comprende factores distintos aunque interrelacionados (5):

1.- La capacidad del espermatozoide para penetrar el moco por su capacidad intrínseca.

2.- La estructura fibrilar del moco cervical que le permite participar activamente en el proceso del transporte de los espermatozoides.

3.- La configuración morfológica de las criptas y hendiduras cervicales que contribuyen al almacenamiento y conservación del espermatozoide en el conducto cervical y su paso sostenido y duradero en las zonas altas de las vías genitales.

Se ha considerado que las anomalías del cuello uterino y la secreción cervical son el factor causal de aproximadamente 15% de todos los casos de esterilidad. De ésta manera, el mecanismo de penetración del espermatozoide a través del cuello uterino es un factor de enorme importancia en la biología de la reproducción del ser humano y sus alteraciones justifican mayor atención e interés

hacia el tratamiento de la esterilidad.

Durante el coito, aproximadamente 200 a 350 millones de espermatozoides son depositados en el cuello uterino y fondo de saco vaginal posterior; el semen coagula inmediatamente después de la eyaculación y atrapa casi todos los espermios hasta que las enzimas proteolíticas seminales permiten su licuefacción. No obstante, la primera porción del eyaculado contiene la mayor cantidad de espermatozoides y que se calcula en el 75%, que rápidamente encuentran la forma de penetrar el moco cervical y en el endo-cérvix (16). En las mujeres, el contenido vaginal suele ser ácido y tener un pH de 3 a 5. Sin embargo, las secreciones cervicales recubren la zona superior de la vagina y sus fondos de saco y aumentan notablemente la alcalinidad del medio vaginal y hacen que sea favorable para los espermatozoides los cuales de por sí se encuentran contenidos en el líquido seminal con un pH alcalino de 8 a 9 aproximadamente, lo que con la alcalinidad del moco cervical y del líquido seminal se estimula probablemente la motilidad y longevidad espermática.

Los espermios son células muy activas que poseen diversas enzimas necesarias para llevar a cabo las reacciones biológicas que comprenden enzimas metabólicas, glucolíticas y respiratorias. Dependen de su propia motilidad para su función reproductora, a pesar de que obtienen cierta ayuda de las contracciones uterinas durante su ascenso en las vías reproductoras de la mujer.

En el líquido seminal los espermatozoides obtienen su energía de la fructuosa, por fructuólisis anaeróbica. En el conducto cervical posiblemente hay un poco de oxígeno, cuando menos en la proximidad inmediata de la mucosa cervical. El hecho de que en la región periférica del moco dentro de las criptas del cuello uterino se encuentre el mayor número de espermatozoides y no en la masa central, sugiere que durante su paso por el cuello uterino, ocurre respiración aeróbica del espermatozoide que, sin duda, es mucho más eficaz como fuente de energía metabólica que la glucó-

lisis anaeróbica. Una presión parcial muy pequeña de oxígeno en el moco, incluso 1%, sería más que suficiente como fuente energética aeróbica.

FUNCIONES DEL MOCO CERVICAL.-

La secreción del cuello uterino tiene las siguientes funciones:

1.- Introducción del espermatozoide en el momento de la ovulación o muy próximo al mismo e impedir su paso en cualquier otro momento.

2.- Protección de los espermatozoides del medio hostil de la vagina y de ser fagocitados.

3.- Complementar las necesidades de energía del espermatozoide.

4.- Filtrar cualquier espermatozoide anormal por tener poco movimiento y permitir únicamente el paso de espermatozoides con movimientos activos y forma normal, en la zona superior de las vías genitales.

5.- Servir como posible depósito de espermatozoides.

MECANISMO DE TRANSPORTE DEL ESPERMATOZOIDE.-

Los datos actuales indican que el espermatozoide eyaculado penetra rápidamente en el moco cervical mucocíclico. La migración ulterior a través del conducto cervical se hace básicamente por motilidad intrínseca. Puede ser influida también por actividad proteolítica del líquido seminal y del propio espermatozoide, formación de falanges o digitaciones al igual que por la orientación de los cordones del moco cervical (11). Este último fenómeno puede ser la causa del almacenamiento del espermatozoide en las criptas cervicales y su paso gradual por un período largo en el útero y las

trompas de Falopio. El útero es un medio favorable para la supervivencia del espermatozoide y es posible que le suministre fuente de energía.

La retención del espermatozoide en el moco, también lo protege de los fagocitos de las vías genitales de la mujer (6). El moco cervical preovulatorio contiene muy pocos leucocitos si es que los tiene y posiblemente otros fagocitos están separados físicamente del espermatozoide.

Es posible que la acción protectora del moco cervical asegure una liberación constante de espermatozoides móviles en la zona superior de las vías genitales y permite el paso rápido inicial y con ello aumenta la posibilidad de fecundación, teniendo en cuenta la sobrevivencia del óvulo que en promedio es de 24 hrs. (11)

In vitro, la velocidad del espermatozoide en el moco cervical varía de 0.1 a 3 mm. por minuto y es mayor en el moco preovulatorio. El grado de penetración en una muestra dada de moco cervical guarda relación directa con el número y la motilidad de los espermatozoides. No se ha demostrado que el útero aspire el semen durante el coito o en relación con el orgasmo. El espermatozoide deja el cúmulo de semen y penetra por los conductos de líquido entre el material orgánico que está orientado en cordones, por su propia motilidad. El espermatozoide emigra por éstos canales o conductos usando el punto de menor resistencia, que es paralelo a la dirección de alineamiento de la estructura macromolecular del moco. La supervivencia y la migración de los espermatozoides son influidos por el pH y el moco cervical que debe ser óptimo entre 7 y 8.5 y aparecen en la fase preovulatoria. Hay datos de experimentación de que las enzimas proteolíticas del espermatozoide participan en su paso a través del moco en la fecundación. El líquido seminal, con sus características especiales de transporte, el espermato-

zoide y el moco cervical contienen inhibidores de dichas enzimas. En el transporte, capacitación del espermatozoide y fecundación, posiblemente participe una interacción entre dichas enzimas y sus inhibidores.

ANATOMIA DEL CONDUCTO CERVICAL Y SU MOCO.-

El cuello uterino suele estar orientado hacia el fondo de saco posterior, de modo que después de la eyaculación, el orificio externo normalmente está sumergido en el cúmulo de semen depositado en el fondo de saco posterior. En el diámetro del orificio externo y el conducto cervical ocurren alteraciones cíclicas que facilitan el paso de los espermatozoides durante la fase ovulatoria del ciclo (6,11,16). Durante la menstruación el conducto cervical está cubierto y su istmo está atónico. En la fase proliferativa hay un ensanchamiento progresivo del orificio externo que alcanza su anchura máxima en la ovulación y se angosta después de la misma. En la ovulación el orificio externo mide unos 3 mm. de diámetro en comparación de 1 mm. después de la expulsión ovular. Después de la ovulación disminuye el diámetro del orificio externo y aumenta el tono del orificio interno, todo lo cual persiste hasta la fase premenstrual inmediata. El moco cervical aumenta progresivamente en cantidad durante la fase proliferativa, se vuelve abundante y acuoso en la fase proliferativa hasta el máximo en el momento de la ovulación y fluye una cascada de moco en el labio posterior del cuello uterino, al fondo de saco posterior a manera de mecha. Al evolucionar la fase secretora, el moco escasea, se vuelve muy escaso, espeso y opaco.

La mucosa endocervical está dispuesta en un intrincado sistema de criptas o invaginaciones de la mucosa cervical (6) que en la literatura han sido llamadas glándulas cervicales. El término criptas describe con mayor exactitud estas invaginaciones del epitelio cilíndrico del cérvix, que pueden ser oblicuas, transversas o longitudinales y bifurcarse o extenderse hacia abajo.

La estructura y ultraestructura de las criptas cervicales varía con cada especie, edad, paridad, enfermedad y etapa del ciclo sexual, pero no reflejan la actividad ciclica del ovario, tan íntimamente como el endometrio o el epitelio vaginal.

El epitelio cervical comprende tipos distintos de células secretorias ciliadas y no ciliadas; la presencia de éstas células, sus características citológicas e histoquímicas y la naturaleza y abundancia de gránulos secretorios varían en distintas partes del cuello uterino. Las células no ciliadas, posiblemente las de índole secretorio, están cubiertas por microvellosidades que contienen enormes cantidades de gránulos citoplásmicos que pueden acuniar el núcleo y comprimirlo en sentido de la membrana basal. La membrana celular se rompe con la liberación de gránulos secretorios en la luz (15).

Durante la fase de almacenamiento, la membrana celular está completa sobre su superficie luminal que está cubierta por microvellosidades; la actividad secretoria de éstas células disminuye después de la menopausia; sin embargo, la atrofia epitelial es menor en el cuello uterino que en el endometrio, vulva y vagina.

La superficie luminal de las células ciliadas también están cubiertas por microvellosidades bien desarrolladas, cuyo citoplasma contiene unos cuantos gránulos citoplásmicos, mitocondrias, vesículas de Golgi y retículo endoplásmico. Se ha observado que éstos cinocilios tienen un movimiento orientado hacia la vagina, esta acción ciliar no parece tener importancia en el transporte del espermatozoide. El movimiento activo de los cinocilios puede facilitar la orientación y flujo del moco desde la superficie de las células secretorias a la zona superior de la vagina.

La rapidéz de la secreción del moco es función de:

1.- El número de unidades secretoras de moco en el conducto cervical.

2.- El porcentaje de células secretoras del moco por unidad.

3.- La actividad secretora y la capacidad de respuesta de las células secretoras a las hormonas secretantes.

En mujeres normales en edad reproductiva hay unas 100 unidades secretoras de moco en el conducto cervical (6). La producción diaria de moco varía de 60mg. durante la etapa media del ciclo a 20-60 mg. en otros períodos de la misma (6).

El moco cervical no es homogéneo, sino una mezcla heterogénea de secreciones; en el comienzo se pensó que cada cripta producía un tipo único de moco, sin embargo, una cripta puede producir una mezcla del material, si bien la opinión actual es que una sola célula produce un tipo particular de moco cada vez (6).

Los estudios de la ultraestructura con diversas técnicas, indican que este material orgánico se orienta por sí mismo según su función biológica en diversas situaciones endócrinas. En momentos de predominio de estrógenos el moco se encuentra dispuesto en conductos alargados para facilitar el paso de espermatozoides; en tanto que cuando hay influencia progestacional se forma una trampa de moco en enrejado. Estos datos apoyan los conceptos biofísicos que describiremos.

CONSTITUYENTES DEL MOCO CERVICAL.-

El moco cervical contiene aproximadamente 90% de agua. En el período medio del ciclo la cantidad de agua aumenta a más del 95%. Una gran cantidad de agua está unida a la matriz de la mucina, éste hidrogel es la causa del comportamiento reológico volumétrico, como por ejemplo la capacidad de hacer hebras (11).

El moco cervical en forma global, es un hidrogel que está compuesto de una sustancia de gran viscosidad (fase de gel), y otro de poca viscosidad (líquido o plasma cervical). El componente de baja viscosidad contiene principalmente electrólitos, compuestos orgánicos de bajo peso molecular como la glucosa, los aminoácidos y proteínas solubles. El componente de viscosidad elevada consiste en una red de macromoléculas de mucina de la cual dependen básicamente las propiedades biofísicas del moco.

MUCINA CERVICAL.-

El constituyente principal del moco cervical es una glucoproteína rica en carbohidratos llamada mucina. Hay que diferenciar éste material de los mucopolisacáridos que se han definido como macromoléculas, que son unidades repetidas de disacáridos; Ej. la heparina y el ácido hialurónico. Entre las glucoproteínas, las mucinas se caracterizan por su elevada proporción de carbohidratos los que corresponden al 40%, están distribuidos en el núcleo de péptidos en forma de numerosas cadenas laterales. El término mucosida debe de limitarse a las glucoproteínas que contienen, a semejanza de las mucinas, una elevada proporción de carbohidratos pero en forma de unas cuantas cadenas laterales de ramas largas (uromucosida y ovomucosida).

Las cadenas laterales de carbohidratos representan el 70 a 80% del peso molecular, e incluyen diversos azúcares como galactosa y ácido siálico y otros elementos. Estas cadenas laterales de carbohidratos tienen actividades de grupo sanguíneo que tienen el gen secretor ABOHh.

Las pruebas actuales sugieren que la mucina es un sistema fibrilar de proteínas unidas directamente (11) por puentes de disulfuro o posiblemente a través de un polipéptico de cadena cruzada cuya identidad no se ha precisado (11).

COMPONENTES SOLUBLES.-

Los componentes solubles del moco cervical incluyen sales inorgánicas cuya cantidad comprende el 1%; el constituyente principal es el cloruro de sodio (0.7%). También existen cantidades pequeñísimas de potasio, magnesio, calcio, cobre, fosfato, sulfato y bicarbonato. Además hay compuestos orgánicos de bajo peso molecular; por ej.: glucosa, maltosa, manosa, aminoácidos, proteínas, péptidos y lípidos.

Las proteínas solubles constituyen aproximadamente 30% del material no dializable que está disperso en la fase acuosa del gel de moco cervical. Incluyen proteínas séricas y enzimas que pueden provenir de las secreciones cervicales, que son originadas en las zonas más altas de las vías genitales u otros elementos celulares. Los patrones de cambios cíclicos bajo la influencia de hormonas sexuales endógenas o exógenas son semejantes para ambos tipos de proteínas solubles investigadas hasta la fecha, con excepción de algunos datos contradictorios sobre la fosfatasa alcalina (6,11). Los estrógenos disminuyen la concentración de proteínas solubles. No se han dilucidado los mecanismos de acción hormonal que participan en los cambios cíclicos.

En muchos casos no se ha esclarecido la importancia biológica de las proteínas y enzimas solubles de los procesos de la reproducción, en los mecanismos de defensa inespecíficos y en otros aspectos fisiológicos o patológicos. Sin embargo, las inmunoglobulinas y los inhibidores de las proteinasas pudieran participar de manera importante en la penetración del espermatozoide y en la fecundación. El hecho más importante es que las inmunoglobulinas e inhibidores de las proteinasas que son capaces de interactuar con la proteinasa acrosómica del espermatozoide y de la proteinasa del líquido seminal, muestran concentraciones más bajas durante el período de fecundidad del ciclo en el cual el moco cervical presenta la máxima capacidad receptiva a la penetración del espermatozoide.

Estos resultados parecen relacionarse con los aspectos inmunológicos de la migración del espermatozoide y la fecundación, cuya frecuencia y cuya importancia precisa queda por dilucidarse, cuando se creen técnicas diagnósticas inmunológicas más precisas. La presencia o ausencia de inhibidores de las proteínas seminales pudieran ser un factor crítico en los procesos enzimáticos que participan en la concepción; las anomalías de éste mecanismo complejo pudieran manifestarse en ciertos casos de infertilidad (9).

Algunos elementos minoritarios influyen en los sistemas enzimáticos del moco y del espermatozoide. Hay una interrelación compleja entre diversos iones metálicos. Un exceso de algún oligoelemento puede traducir una deficiencia relativa de otro. El Zinc es un componente esencial del semen y en varones infértiles aparecen valores bajos. La concentración de zinc, manganeso y cobre, si se expresa por unidad de peso, alcanza su punto menor en el período medio del ciclo. Las metaloenzimas como la fosfatasa alcalina y la anhidrasa carbónica desempeñan un papel importante en las funciones de las vías genitales.

Aún más, pudiera ser que los mecanismos bioquímicos básicos (11) en la estructura y formación del hidrogel que es el moco cervical, pudiera depender de enzimas, y los elementos minoritarios jugarán una parte importante en éstas reacciones. Se necesita investigar la participación de los elementos minoritarios y su relación con las enzimas; pues pudiera haber estados que se manifiestan en infertilidad, cuando aparezcan anomalías de éstos componentes.

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL MOCO CERVICAL.-

El moco cervical traduce diversas propiedades reológicas que incluyen viscosidad, capacidad de hacer hebra, elasticidad y deformación de la materia. En el caso del moco cervical, no obstante, éste término (características reológicas) se extiende para incluir di-

versas propiedades bioquímicas y algunas características de la física molecular (9).

Viscosidad: En cuanto a ésta característica no podría decirse que el moco cervical es viscoso o tiene una viscosidad sencilla. En realidad tiene una viscosidad cambiante o características viscosas anómalas. La viscosidad del moco es difícil de medir con precisión sin un equipo delicado que, por desgracia, no siempre es adaptable para el empleo clínico, sin embargo muestra un cambio cíclico importante en su viscosidad, que es mínima en el momento de la ovulación, momento en el cual facilita la capacidad de penetración del espermatozoide. La capacidad de hacer hebra o fijancia se refiere a la capacidad del moco para ser retirado en hebras. Esta característica también varía en el moco durante el ciclo menstrual. Hay un aumento gradual en dicha capacidad desde el final de la menstruación hasta la ovulación, en que es poca o mala su capacidad de hacer hebras. Si bien éste parámetro reológico es uno de los más fáciles de medir objetivamente, también es uno de los menos precisos, aunque ha tenido gran aplicación en el diagnóstico de la esterilidad.

La capacidad de hacer hebras puede estimarse en la exploración sistemática o en el momento de realizar la prueba post-coito. Casi todos los investigadores emplean la técnica de Clift (4) simplemente tratando de separar un cubreobjeto de una laminita entre los cuales se ha puesto una gota de moco cervical y al separarlo hace hebra y se mide la longitud de la misma. También puede valorarse al observar la longitud de la hebra al abrir las ramas de una pinza uterina (pinza de Boussetan); éste fenómeno es atribuible a la presencia de moléculas largas en el moco y probablemente depende de las ramificaciones de las cadenas moleculares y de otras fuerzas intermoleculares importantes.

La capacidad de hacer hebra aumenta gradualmente en la fase proliferativa del ciclo y llega a un máximo de 15 cm. a 20 cm. Ince

distintamente después de la fase preovulatoria o junto con la ovulación y aumento de la temperatura basal corporal; al igual que en el fenómeno de arborización hay una disminución interior en la capacidad de hacer hebra que significa el advenimiento del efecto progestacional. La longevidad del espermatozoide en el moco cervical suele ser paralela al grado de hiladura.

Su valoración a menudo se emplea como el momento óptimo para el coito o la inseminación artificial o para la administración de inductores de la ovulación de algunos tipos. La valoración de la filancia también es útil como parámetro biológico de un efecto estrogénico de las glándulas endocervicales.

Elasticidad del moco o retracción del mismo.- Denota la tendencia del moco a asumir su forma original después de la deformación causada por sobrecarga o presión. Esta característica es paralela a la capacidad de filancia, en relación con los cambios del ciclo.

Plasticidad y adherencia.- Son fenómenos físicos del moco que se aprecian básicamente durante el embarazo, la plasticidad denota la característica del moco de ser deformado sin romperse, en tanto que la adherencia es la capacidad de adherirse, que se comprueba al colocar un cubreobjeto sobre una laminilla que contiene moco.

Cristalización.- De todas las propiedades del moco, la cristalización que es la arborización en hebrecho vista al microscopio, es sin duda una de las más sensibles a nivel de hormonas sexuales. Este fenómeno se emplea ampliamente para precisar el momento de la ovulación y valorar la función del cuerpo amarillo, en el diagnóstico temprano de embarazo, e incluso en la amenaza de aborto y para vigilar la inducción de la ovulación. La arborización no es específica del moco cervical, puede observarse en otras secreciones de moco y en casi todos los líquidos corporales, ocurre en todas

Las soluciones que contengan proteína u otros compuestos orgánicos y electrólitos, en especial cloruro de sodio. Si bien no es específico de algún líquido corporal, la arborización del moco cervical depende netamente de la acción del estrógeno y guarda una relación íntima con las propiedades reológicas descritas, la viscosidad y la capacidad de hacer hebra. La extensión de la cristalización del moco guarda relación directa con la receptividad del espermatozoide.

La imagen en helecho aparece durante el comienzo de la fase proliferativa a menudo entre el quinto o sexto día del ciclo de 28 días y aumenta en forma proporcional al estímulo estrogénico, alcanza un máximo en la ovulación y comienza a ser substituida 24 a 72 hrs. más tarde por un cuadro celular característico de la actividad progesterona. La disposición en helecho suele desaparecer por completo por el vigésimo segundo día del ciclo. El embarazo y la administración de progesterona produce el mismo cuadro cualitativo que se observa en la fase luteínica del ciclo normal. La arborización máxima suele observarse en el momento de la capacidad máxima de hacer hebra y a menudo precede al cambio de la temperatura basal corporal, en 24 a 48 hrs. Los picos de la arborización y la capacidad de hacer hebra también coinciden con la receptividad máxima para el espermatozoide y su mayor penetrabilidad.

La prueba de la cristalización en helecho suele tener enorme importancia para estudio de la mujer estéril. Es un medio útil que indica el grado relativo de la actividad de estrógenos endógenos. Puede sospecharse un estado hipoestrogénico si el orificio cervical es pequeño y tiene algo de moco y si la disposición en helecho es atípica o no se observa en el período mesocíclico. De manera semejante el moco acuoso abundante con buena capacidad de hacer hebra y que forma imágenes en helecho, fácilmente se obtiene de mujeres que tienen una buena respuesta al tratamiento estimulante de la ovulación con gonadotropinas. Sin embargo no puede detectarse la hiperestimulación por

el empleo de estos parámetros físicos.

Hasta la fecha no ha sido posible la medición precisa de la arborización, si bien se ha sugerido el uso de algunos criterios semicuantitativos y precisos con una graduación basada esencialmente en la proporción de cristales observados en la laminilla. No obstante, una valoración cualitativa del grado de arborización en helecho guarda una buena correlación con el grado de estimulación de la mucosa endocervical por los estrógenos, pero su cantidad no aumenta una vez que se ha llegado al nivel óptimo de respuesta estrogénica.

La aparición máxima de la arborización en helecho se relaciona con la formación de cristales en sentido perpendicular, en cuatro ángulos entre sí. Aún más, el espesor del frotis de moco se debe de hacer no excesivo, ni acelerar ni retardar la rapidez de secado de dicho frotis.

Hay que seguir algunas precauciones al hacer la prueba de la arborización en helecho. El moco debe obtenerse del interior del conducto endocervical. Hay que evitar el traumatismo en el cuello uterino, pues la sangre altera la cristalización. El espéculo vaginal y los demás instrumentos usados para obtener la muestra de moco no pueden ser conservados en solución salina, o lavarse en ésta substancia ya que ella por sí misma tiene capacidad de cristalización por el cloruro de sodio.

CARACTERÍSTICAS DE LOS ESPERMATOZOIDES.-

Motilidad espermática.- La motilidad de los espermios es esencial para facilitar el paso de ellos a través del cérvix.

Consecuentemente se necesita para poder hacer la valoración de las propiedades del esperma, valorar la interacción moco-esperma. Muchos factores pueden afectar la motilidad espermática (Cuadros I y II).

FACTORES ENDOGENOS

Edad.
Tiempo entre eyaculaciones.
Maduración espermática.
Capacidad energética.
Proteínas contráctiles.
Anticuerpos antiespermatozoide.

CUADRO I

FACTORES EXOGENOS

Factores fisiológicos.
Fluidos seminal, epididimal y moco cervical.
Inhibidores y estimuladores de la espermátogénesis.
Pululantes en el medio ambiente.

CUADRO II

Los cuadros anteriores son solamente una lista parcial pero importante de los factores, algunos de los cuales deben de tenerse en consideración cuando se estudia a la pareja estéril. Por Ej.- La motilidad de los espermios disminuye después de los 40 años de edad. En hombres subfértiles, largos períodos de abstinencia sexual pueden disminuir el porcentaje de motilidad y la calidad de los movimientos.

Teniendo en cuenta lo anterior, se nos hace difícil una conclusión sobre el tiempo ideal entre las emisiones, necesario

para una buena calidad del semen. Como corolario se recomiendan 48 hrs. de abstinencia sexual previa, para realizar análisis de semen o test post-coitales, o en su defecto la abstinencia natural de la vida sexual de la pareja en estudio.

Por otro lado la mayor parte de los reportes encuentran una progresiva disminución en la motilidad espermática posterior a la eyaculación, ésta disminución se ha encontrado de una a tres horas posterior a la emisión espermática. La importancia del tiempo con respecto a los cambios del espermatozoide es considerado para la valoración espermática en las pruebas clínicas y de investigación.

CAPITULO II.-

C O N C E P T O . -

Para valorar la capacidad de penetración cervicoespermática, que en realidad está determinando la espermionigración en el moco cervical, se necesitan una serie de pruebas funcionales, dinámicas y combinadas, en las que intervienen los dos factores: Moco y semen.

Con ésto no se quiere decir que deben de eliminarse del estudio las características propias por separado del moco y del semen, sino que deben de conocerse todos los datos para poder hacer una correlación final y obtener mejores resultados.

Dichas pruebas o test post-coitales en las que se pone en contacto el moco de la esposa y los espermatozoides del marido para ver cual es el comportamiento de ambos en su conjunción, pueden ser de dos tipos: In vivo e In vitro.

Test post-coital In vivo es aquel en el que se determina en el aparato genital femenino el paso de los espermios depositados en el mismo y se realiza siempre como su nombre lo indica, posterior al coito.

Si bien es cierto que los test In vitro, son mal llamados post-coitales por no existir coito previo, la terminología marcada por el uso así ha convenido llamarlos; en esta pruebas se mide la capacidad de penetración de los espermatozoides al moco cervical, en dispositivos especiales, ideados específicamente para dicho fin.

TEST POST-COITALES IN VIVO.-

1.- Test de Sims Hühner.-

La prueba de penetración espermática obtenida después del coito, fué ideada por primera vez por Marion Sims en 1868, pero no se popularizó sino hasta 1913 cuando Hühner la difundió. A partir de

dicha fecha, ésta prueba se generalizó rápidamente hasta ser en la actualidad una prueba obligatoria en el estudio de toda pareja estéril.

La importancia de este test estriba en que nos aclarara en un gran porcentaje de casos, cuando existe un factor cervicocespermatóico de esterilidad; factor que alcanza del 30 al 50% de las causas de esterilidad (7,13,15). En el momento actual ésta prueba se complementa con la espermatobioscopia post-coito o indirecta y la determinación de los caracteres del moco cervical simultáneamente.

2.- Test fúndico.-

Es también llamado test de Palmer, por ser él que lo difundió el Dr. Palmer, está diseñado para determinar la espermio migración al fondo uterino una vez pasada la barrera cervical; conociendo no solo si se produjo la progresión de los espermatozoides, sino también con que velocidad lo hicieron y sobre todo la presencia de espermios activos. Para la prueba hay que disponer de la cánula de Palmer, que es una cánula de 22 cm. de largo, ligeramente curva, con un mandril interior que impide que la cánula se rellene durante la penetración a través del conducto cervical. El test consiste en la introducción de la cánula hasta el fondo uterino, una vez que se alcanza éste, se procede a aspirar por medio de la jeringa conectada a la parte externa de la cánula. Se extrae dicha cánula, se procura la expulsión de su contenido sobre una laminilla, presionando el émbolo de la jeringa y se observa al microscopio a 400 diámetros de aumento, la presencia de espermatozoides activos y sobre todo la calidad de movimientos de los mismos. La maniobra debe de hacerse en plenas condiciones asépticas, con la misma técnica con la que se realiza una histerometría, retirando el mandril al llegar al fondo y realizando en éste momento la aspiración (14). El autor recomendaba la aspiración antes de las 24 hrs. después del coito (16), pero nuestra experiencia nos ha demostrado que se debe

de practicar lo más tarde a las 3 hrs. y actualmente sugerimos que puede practicarse al mismo tiempo que el test de Sims Kühner, estimando que se trata de una alteración espermática importante, así al cabo de dichas horas no se encuentran espermios vivos en la sección fúndica.

3.- Test Post-coital inmediato.-

Sobrero y MacLeod (16) desde hace años preconizan el efectuar el test post-coital inmediatamente después del coito ya que como se sabe, 90 neg. después del acto sexual, ya hay espermios en el moco cervical. Aunque ellos piensan que de esta forma se simplifica la prueba, sin necesidad de esperar, la correlación de los datos obtenidos y la migración espermática es igual que en la prueba a las dos horas, nosotros no consideramos eso real. Debemos conocer el comportamiento de los espermatozoides en el moco en un lapso de tiempo prudente (por lo menos dos horas), para valorar su comportamiento y su capacitación, siendo más real éste en cuanto más frecuentemente se sostiene que se lleva a cabo en el moco cervical.

4.- Lavado endometrial.-

En algunas clínicas, especialmente en los Estados Unidos, se ha preconizado el lavado post-coital de endometrio, con un sistema "Jet-Washer" con el objeto de recolectar espermatozoides vivos de 12 a 24 hrs, después del coito y relacionar el hallazgo con la prueba cervical. Ellos señalan que les es de mucha utilidad y para considerar que una espermimigración es normal debe de ser positiva ésta prueba. Personalmente hemos hecho éste test ocasionalmente con resultados negativos y autores como Sobrero (16), tampoco le dan mucha validéz, ya que rara vez encuentran suficientes espermatozoides. Consideramos que debe de tenerse más experiencia al respecto.

5.- Test por inseminación.-

Tratando de eliminar el factor vaginal en la prueba post-coito, Seguy y Vincoux (14) efectúan la inseminación artificial del cérvix con el semen obtenido por masturbación y 24 hrs. después -

determinan la presencia de espermios, así como su vitalidad. Lo consideramos poco útil y sobre todo poco veráz, ya que elimina lo que realmente acontece en una pareja durante el coito. No tenemos experiencia con este test.

Es conveniente aclarar que todos estos test, se pueden modificar con la toma de ciertos preparados, en especial hormonales y que igualmente cuando se determina en una pareja estéril que está siendo tratada con inductores de ovulación, tipo clomiféno, su programación en relación a los días del ciclo debe cambiar, necesitándose hacerles en fechas un poco más avanzadas, como por ejemplo los días 15 o 16 del ciclo.

TEST POST-COITALES IN VITRO.-

Son las pruebas más simples y más antiguas los llamados test de penetración in vitro cualitativos, es decir, que solo determinan si hay penetración espermática, sin cuantificar dicha penetración.

1.- Test de Kurarock Miller.-

Consiste en colocar una laminilla caliente y sobre ella, una gota del esperma del marido, obtenido por masturbación o coito interrumpido, en contacto con una gota de moco cervical de la esposa, obtenido en la parte media del ciclo, cuando el moco cervical se encuentra en las mejores condiciones de aceptabilidad. Se tapa con un cubreobjeto y se incuba por unos minutos a 37°C. A continuación se observa al microscópio la progresión de los espermatozoides dentro del moco, que se presenta adoptando puntos de penetración o falanges. Cuando es negativo no se aprecia dicha penetración, existiendo una línea de demarcación entre moco y esperma. Con posterioridad se hicieron éstas pruebas en forma cruzada, con esperma de donador y el moco problema y con moco de mujer fértil en contacto con el esperma problema (9). En la ac-

tualidad ya casi nadie practica ésta prueba, pues a pesar de ser muy sencilla, no es de valor por ser sumamente rudimentaria.

2.- Test de penetración en capilares o similares.-

Desde hace bastantes años, diversos autores han pensado que como una de las características espermáticas que más están en relación con su poder de penetración, es su progresión, basta con medir dicha progresión para indirectamente presumir la capacidad de penetración. El recurso más socorrido ha sido el de valorar dicha progresión en un conducto o capilar el cual se llena con el moco cervical en estudio. Actualmente ésta prueba ha recibido el nombre de Test de Kramer.

Esta prueba mide la progresión y concentración de los espermatozoides que partiendo de un recipiente que contiene el semen, asciende por un tubo capilar, colocado sobre una escala, de tal forma que observando con un microscopio de bajo aumento 80 X, se puede apreciar cada determinado tiempo, hasta donde han progresado los espermatozoides y que concentración de ellos existe.

Al igual que el test de Kurgrock Miller, también se complementa ésta prueba con el test cruzado, por lo que también se ha llamado prueba doble.

Estas pruebas cualitativas no son de gran valor cuando se trata de averiguar el porque de una mala penetración espermática en el moco cervical, ya que solo nos indica la velocidad de ascenso de los espermatozoides más veloces y no la capacidad de penetración en general del esperma en estudio (como acontece con los test cuantitativos) y sobre todo el comportamiento del semen del marido en el moco de la mujer en condiciones similares a las fisiológicas.

3.- Test de penetración cuantitativa simple (Ruiz Velasco I).-
Consiste en colocar en contacto in vitro el moco cervical y el

esperma de la pareja problema, en un modelo artificial del cuello uterino, para hacer un verdadero test post-coital in vitro (10,11, 12,13,14)

Por medio de la determinación cuantitativa de penetración se constituye un test que al practicarse con el esperma y moco de ambos conyugues, determina certeramente la participación del binomio semen-moco, en la esterilidad de una pareja. (La descripción del método se lleva a cabo en Material y Métodos).

4.- Test de penetración cuantitativa cruzado (Test de Ruiz Velasco II).-

Esta prueba es la que se propuso inicialmente llamar test - cruzado de penetración cuantitativa, la hacemos con el objeto de dilucidar cual de los dos factores del binomio semen-moco es el causante de la falta de penetración en la pareja, si se trata de uno o ambos conyugues o si se trata de un problema inmunológico (10,11,12,13,14).

APLICACION CLINICA DE LOS TEST DE RUIZ VELASCO I y II.

La importancia y utilidad clínica de estos test, es que sobre todo deben de practicarse en casos de parejas estériles, que presentan una prueba de Hühner negativa, ya que en ellos es indispensable conocer la causa de ésta mala espermiación.

En primer lugar se lleva a cabo el test de penetración cuantitativa simple colocando en la jeringuilla el moco de la esposa y en el tubo de ensayo el semen del marido, para verificar si ahora hay ascenso de espermatozoides, lo que en caso positivo nos indica que el moco tiene una buena aceptabilidad y el esperma buena penetración y que la causa de la falla de la progresión espermática in vivo es causada por otros factores como defectos anatómicos o malposiciones del cérvix, problemas vaginales, hipospadias, deficiente técnica coital, así como administración de medicamentos.

Por otra parte cuando el resultado del test simple es negativo, es decir si la penetración es nula o cer debajo de los límites considerados como normales, es indispensable efectuar el test de penetración cuantitativa cruzado, para determinar donde está la falla de la penetración espermiática del moco cervical, si es del semen o del moco. Para ello se pone en contacto el moco de la esposa con un moco de buena penetración ya conocida previamente.

Todas las parejas estudiadas por esterilidad deberían tener como parte de su valoración, test postcoitales (1). En la mayoría de los casos es posible encontrar cuando menos un buen Sime - Hühner si la investigación es practicada durante la fase folicular tardía (2). Por bueno se refiere que si es practicado adecuadamente es fácil de interpretar. El moco cervical abundante con buena cristalización y buena filancia y abundantes espermatozoides móviles puede ser equilatado con factores cervicales normales (3).

Frecuentemente los resultados de los test post-coitales no son concluyentes porque el número de espermatozoides puede ser bajo o porque la motilidad de estos espermios esté disminuida o ausente. Estas pacientes requieren de más intenso estudio de su factor de esterilidad específicamente del cervical y de su penetrabilidad por los espermatozoides, especialmente cuando se han descartado los factores endocrino-ovárico, tuboperitoneal y otros y ya se han demostrado ovulación y buena permeabilidad tubaria (4), es en estos casos cuando se encuentran indicadas las pruebas de penetración espermiática in vivo y posteriormente los test de penetración cuantitativos. Todos los estudios in vivo evalúan la capacidad de los espermios para invadir el moco cervical y su habilidad de éste para recibir a los espermatozoides (5).

Las pruebas in vitro se llevan a cabo en el laboratorio y tienen la ventaja de que el experimento puede ser controlado. Aunque éste tipo de evaluación es objetivo y reproducible, debe de ser en

tendido que puede haber artefactos técnicos que alteren la orientación física del moco y el problema es que algunos casos pueden no ser bien interpretados si no se tiene la experiencia suficiente en realizar test in vitro y puede no reflejar la verdadera situación fisiológica adaptable a la situación in vivo (6).

En todos los casos de esterilidad pero especialmente cuando un factor cervicospERMÁTICO se ha visto implicado en la etiología, el factor masculino debe de investigarse a fondo y cuidadosamente (7). Son necesarios los exámenes del semen, que a pesar de no ser una determinación absoluta del factor masculino de esterilidad, si nos dan parámetros de importancia para determinar parcialmente la esterilidad de origen en el varón.(4).

Entre los estudios de investigación del semen, nos interesa la concentración de espermias, su motilidad y viabilidad y entonces debemos correlacionar nuestros hallazgos con el número de embarazos reportados en las mujeres de los hombres estudiados. Así como los test postcoitales, los análisis del semen son difíciles de interpretar porque no hay uniformidad en la terminología ni medios uniformes para determinar la morfología espermática, la motilidad o la viabilidad.

Los parámetros de mayor importancia con respecto a la calidad de los espermatozoides con mayor frecuencia reportados por el laboratorio y de importancia para la clínica son la motilidad, la cuenta espermática y sus formas normales y anormales.

Los componentes de la motilidad espermática son de mayor importancia: La rapidez de los espermatozoides y el porcentaje de dichas células que muestran progresión. Los estándares aceptables requieren cuando menos de 40% de espermatozoides con buena progresión. Obviamente, las caracterizaciones de la motilidad espermática son enteramente subjetivas y las comparaciones entre un investigador y otro son difíciles de correlacionar (9).

Los cambios en la morfología espermática pueden indicar un defecto basal en los mecanismos de la espermatogénesis. Existe una estrecha relación entre la motilidad y la morfología espermática. Los espermios con pobre morfología tienen pobre motilidad y poca habilidad para penetrar la barrera del moco cervical. Actualmente existen en investigación métodos para la valoración más exacta de la funcionalidad espermática, determinando todas sus características incluyendo su rapidéz de movimientos; siendo el porcentaje de espermios que han mostrado máxima progresión el 5.7% en los pacientes sin sospecha de anomalías en los espermatozoides y en pacientes de parejas estériles se ha encontrado disminuído al 2.5% (6).

Nosotros hemos comparado los resultados de los análisis del semen en hombres fértiles e infértiles (12). Las concentraciones de espermios y su motilidad son diferentes en ambos grupos. A pesar de que la velocidad, concentración y motilidad de espermatozoides en ambos grupos, son estadísticamente significativas, son de valor pronóstico. Se ha reportado que menos del 10% de eyaculaciones de hombres fértiles contienen menos de 20 millones de espermatozoides por ml. (6).

El 42% de un grupo fértil tuvo 90 millones de espermios por ml. o más, contra 23% en el grupo infértil. Menos del 10% en eyaculaciones de hombres fértiles tuvieron menos del 60% de motilidad, contra 48.2% en el grupo infértil (6). Finalmente la determinación de la velocidad de los espermios en micras por seg. demostró una velocidad de 20 milimicras/seg. en más del 10% en hombres fértiles y mucho menos en los infértiles (6).

Una proporción significativa de hombres a quienes se les diagnosticó a sus esposas factor cervical de esterilidad, se les encontró en las muestras de semen, espermatozoides con mucho menos de las características óptimas para fecundar, siendo

éstos hombres catalogados como sub-fértiles. Esto confirma la convicción de que se necesitan parámetros más objetivos para evaluar la fertilidad potencial necesaria en el varón.

Un proceso importante para una buena valoración de afinidad moco cervical-semen y determinar la potencialidad de los espermatozoides en su paso por el moco, son las pruebas de penetración espermática In vivo e In vitro, motivo de nuestro actual trabajo.

El presente trabajo pretende evaluar la importancia clínica de los test post-coitales y su utilidad para diagnóstico del factor cervico-espermático de esterilidad, haciendo un estudio comparativo entre el test intracervical de Sims Hühner y las pruebas de penetración espermática In vitro cuantitativas simple y cruzadas.



De la consulta externa del servicio de Esterilidad e In fertilidad del Hospital de Gineco-Obstetricia No.- 3 CMR INSS, se estudió del 10. de marzo de 1978 al 31 de diciembre del mismo año, 30 pacientes tomadas al azar, con esterilidad, independientemente del factor causal de la misma, fueron citadas en meses consecutivos para practicárseles el test de Sims Hühner y simultáneamente con él se practicó el estudio del fondo de saco vaginal y la espermatobioscopia indirecta y en el segundo mes se practicaron las pruebas de penetración espermática in vitro simple y cruzadas; exámenes practicados en su totalidad en las instalaciones del HGO-3. Posteriormente se llevó a cabo una correlación global de todos los resultados, siendo un total de 180 las pruebas realizadas, dado que fueron 6 por paciente.

Métodos.-

Test de Sims Hühner:

Se eligió para ello los días centrales del ciclo menstrual, que casi siempre correspondieron del 12 al 16, sin embargo en pacientes con alteraciones en el ritmo menstrual, se calculó aproximadamente el día supuesto en que debería de ocurrir la ovulación, rastándole 14 días a la fecha probable de próxima menstruación y llevando curva de temperatura basal. Se le recomendó a los matrimonios que tuvieran una abstinencia sexual de 3 a 5 días y se indicó realizar un coito el día de la prueba, debiendo quedarse la esposa en decúbito supino durante 5 a 10 minutos, con los muslos juntos, después de lo cual debería de colocarse en cuclillas y recoger el escurrimiento vaginal en una caja de Petri. Esta muestra fué estudiada a los 30 y 60 minutos de obtenida, practicándose una espermatobioscopia indirecta completa; la forma en que se lleva a cabo la cuenta de espermatozoides en el laboratorio de Biología de la reproducción de nuestra unidad es la siguiente:

El líquido obtenido en la caja de Petri se recoge en una pipeta de Thoma hasta el 0.5, se afora hasta 1 con una solución de bicarbonato con fenol y agua, siendo las cantidades del compuesto: Bicarbonato de sodio 4 g. Fenol 1g. y agua destilada 100 ml.; posteriormente la muestra obtenida en la pipeta, se agita en aparato especial, hasta homogeneizar la muestra, se tiran las dos primeras gotas y la tercera se coloca en una cámara de Neubauer, se cuentan los espermatozoides en los cuadros pequeños, en recta o diagonal y a dicha cuenta se le suman seis ceros, lo que nos da el total de espermatozoides por ml. A continuación se toma una gota del líquido, se pone en una laminilla y con el cubreobjeto se presiona levemente hasta formar una capa uniforme, después de lo cual se observa al microscopio, buscando en primer lugar el número de espermatozoides activos e inactivos en diez campos y posteriormente se obtiene el promedio, determinando el porcentaje de espermios y su motilidad por campo (7, 14).

Igualmente se clasifica la motilidad en movimientos de traslación, que a su vez pueden ser: rápidos, moderados y lentos; y los movimientos in situ que son de reptación, pendulares o vibrátiles. Por último se hace la determinación porcentual de zoospermios móviles en la primera hora, la apreciación de la calidad de los movimientos espermáticos en igualdad de tiempo y la duración máxima de los movimientos espermáticos apreciada en las horas subsiguientes. Al final se cuenta el porcentaje global de formas anormales y la ubicación de éstas anomalías, que pueden ser en cabeza, segmento o cola. Por último se aprecia la vitalidad en relación al tiempo pasado después de la emisión.

Los siguientes caracteres fisicoquímicos del esperma fueron estudiados exhaustivamente, habiéndoseles determinado unas cifras arbitrarias de normalidad para lograr una concepción; consideramos como valores mínimos los siguientes:

- 1.- Volumen del eyaculado: 1.5 a 2 c.c.
- 2.- Espermios por ml. : 50 millones.
- 3.- Formas normales: 70 %
- 4.- Móviles: 70 %
- 5.- Vitalidad: 50 %
- 6.- Calidad de movimientos: ++ a +++.
- 7.- pH: 7 a 8.

CARACTERES DEL ESPERMA (14)

Volumen del eyaculado.

Viscosidad.

pH.

Presencia de leucocitos, bacterias y parásitos.

Características de los espermatozoides:

- a).- Número por ml.
- b).- Porcentaje de formas anormales.
- c).- Porcentaje de formas móviles.
- d).- Calidad de movimientos.
- e).- Vitalidad.

CUADRO III.

CLASIFICACION DE LA MOTILIDAD (14).

- I.- Movimientos ondulantes, lentos sin progresión.
- II.- Movimientos lentos con escasa progresión o en forma de círculo que no progresan.
- III.- Movimientos activos progresantes, que logran cruzar el campo microscópico.
- IV.- Movimientos rápidos y que progresan aceleradamente a través del campo microscópico.

CUADRO IV.

A las dos horas post-coito se lleva a cabo la toma cervical, con la paciente en posición ginecológica, se coloca un espejo vaginal sin lubricante y se toma el pH vaginal y el pH cervical con el pHydron, después de haber observado la cantidad, aspecto, color y fluidéz del moco; en seguida se hace la toma de moco cervical (del endocérvix) con pinza uterina, para la medición de la filancia en cm. , después de lo cual se extiende en una laminilla para posteriormente verlo al microscópio en pequeño aumento, buscando la cristalización y número de células. Igualmente hacemos otra extensión para buscar el cambio de color a la aplicación de calor; a continuación con un hisopo estéril se toma una muestra del contenido vaginal y otra endocervical previa limpieza del exocérvix, muestras que generalmente acostumbramos tomar con pipeta de Papanicolaou.

De ésta forma al igual que en el semen, se estudian en el moco cada una de sus características físico-químicas, para valorar como influyen en la migración espermática.

Así tenemos las condiciones óptimas del moco cervical:

- 1.- Cantidad: Abundante.
- 2.- Aspecto: Claro transparente (Hialino).
- 3.- Fluidéz: Abundante contenido en agua (90%).
- 4.- Filancia: Más de 10 cm.
- 5.- Cristalización: Formación de helechos finos y abundantes +++ o ++++ dependiendo de sus ramas formadas.
- 6.- pH: Alcalino.
- 7.- Pureza: Deben de estar ausentes tanto los gérmenes espermaticidas, como los leucocitos y las células.
- 8.- Color al calentamiento: Blanquecino.

Posteriormente se procede a la limpieza del exocérvix con una torunda seca, eliminando todo el moco exocervical y con una pipeta de Papanicolaou se aspira el moco endocervical, el cual se coloca en una laminilla no fría y con un cubreobjetos se extiende, haciendo poca presión para evitar destruir los espermios. Se

coloca inmediatamente al microscopio a un aumento de 400 diámetros y se estudian 10 campos y la cuenta promedio es el resultado del número de espermatozoides por campo; se ve la motilidad y el tipo de movimientos, traslación o in situ; porcentaje de espermatozoides anormales, así como el tipo de la anomalía; acostumbramos anotar el día del ciclo en que se hace la toma, el período de abstinencia y el horario.

La interpretación del test de Sims Kühner es variable y depende de cada autor, sin embargo en la mayoría de los centros de investigación, incluyendo el nuestro, se clasifican los resultados obtenidos, en la siguiente forma:

- 1.- Negativo: No existen espermatozoides.
- 2.- Pobre: Existen espermatozoides pero ninguno móvil.
- 3.- Regular: Espermatozoides en número menor de 5 por campo, con motilidad traslativa o mayor número con motilidad lenta o poco progresiva.
- 4.- Bueno: Seis a 15 espermatozoides por campo de actividad traslativa.
- 5.- Excelente: Más de 15 espermatozoides por campo con motilidad traslativa.

†
La valoración del Kühner se hace en base a los mejores campos microscópicos.

Pruebas de penetración espermática In vitro simple.- Test de Ruiz Velasco I :

Consiste en poner en contacto In vitro, el moco cervical y el espermatozoide de la pareja problema, en un modelo artificial de cuello uterino, para hacer un verdadero test coital In vitro.

Descripción del método: Una vez limpia la vagina y exocérnix, se procede a recolección del moco endocervical, por medio de una pipeta de cristal terminada en punta roma, de 1/2 cm. de diámetro y de una capacidad total de un c.c., la cual se

una con un tubo de goma de 15 a 20 cm. de longitud (que nos permite toda clase de movimientos, de la jeringa sin que se mueva la pipeta una vez colocada) unida a una jeringa de 20 cm.; en resumen, un artificio para extraer el moco cervical por medio de una aspiración más o menos intensa.

El moco así recolectado se coloca en la parte inferior de una jeringuilla de insulina o tuberculina (nosotros utilizamos jeringas desechables estériles, una para cada test) en lo que será la cámara de moco de 0.2 ml. de capacidad. Esto se logra fácilmente adaptándole a la jeringuilla en la base del émbolo un anillo de plástico de una altura tal que logra que al descansar el émbolo sobre él, la punta del mismo alcanza a formar la cámara de 0.2 ml. a la punta de la jeringa se le adapta la cabeza de una guja número 18, cuyo conducto tiene un calibre de 14x igual al del pivote de la jeringa, con lo que se tiene un tubo capilar uniforme de dos centímetros de longitud, para en conjunto formar un similitud de cuello uterino y éste funciona como tal, ya que elimina como el cérvix a los espermatozoides anormales.

La jeringuilla con su cámara llena con el moco cervical de la esposa, se introduce en un tubo de ensayo que contiene el semen del marido. Todo el aparato es llevado a una estufa para ser incubado a 37°C, durante una hora. Una vez pasado el tiempo indicado, se retira la cabeza de la aguja y del contenido de la jeringuilla se vacía una gota en una cámara cuenta glóbulos blancos, se agita la muestra mezclándola con una solución de bicarbonato de sodio, fenol y agua destilada, hasta hacerla homogénea, posteriormente se coloca una gota en la cámara de Neubauer y se observa al microscopio contando el número de espermatozoides que se encuentran en los cuadros centrales de la cámara, en forma horizontal, vertical o diagonal y al número encontrado de espermatozoides se le añaden tres ceros y nos da el total de espermatozoides por ml. ; debiendo de haber más de cinco mil, para que sea un porcentaje aceptable de espermatozoides.

Es conveniente repetir el conteo en la cámara opuesta con otra gota y sacar el promedio. Para saber el número de espermios que se encuentran en total, en la cámara de la jeringa, es decir el total que penetraron, basta multiplicar por mil el número de espermios contados en las cuadrículas centrales, ya que éstas tienen un volumen de 0.1 ml.

De ésta manera, por medio de la determinación cuantitativa de penetración espermiática en el moco cervical, se constituye un test que al practicarse con el esperma y moco de los cónyuges, determina certeramente la participación del binomio semen-moco, en el estudio de la esterilidad de una pareja.

Test de penetración espermiática cuantitativa In vitro cruzada.-

Test de Ruiz Velasco II :

Consiste simplemente , en hacer el test de penetración cuantitativa separadamente para cada factor, es decir, colocando el esperma en estudio en contacto con moco de donadora de normal aceptación y por su parte el moco de la esposa se monta sobre un tubo que contenga un semen de penetración conocida.

Como donadores utilizamos en el trabajo, a los pacientes citados para practicárselos espermatobioscopia directa, con cuenta normal y para la donación de moco a las pacientes citadas para pruebas de penetración espermiática simple, que presentáran moco de características normales.

CAPITULO IV.-

RESULTADOS.-

Del estudio practicado a las 30 pacientes, en quienes se llevaron a cabo los test post-coitales In vivo e In vitro, los que incluyen el test intracervical de Sims Hühner y las pruebas de penetración espermática cuantitativas simple y cruzadas, espermatobioscopía indirecta y estudio post-coital de fondo de saco, hicieron un total de 180 pruebas.

En el cuadro V podemos apreciar el número de pruebas positivas y negativas que se encontraron en nuestro grupo de estudio, como se puede apreciar, encontramos similar el número de pruebas positivas entre sí, así como similar el resultado de las pruebas negativas; fueron 26 Hühner positivos y 4 negativos; 19 pruebas de penetración simple positivas y 11 negativas; penetración cruzada moco esposa-esperma donador 21 positivas y 9 negativas; penetración cruzada moco donadora-esperma esposo 21 positivas y 9 negativos; fondo de saco 25 positivos y 5 negativos; espermatobioscopía indirecta 20 positivos y 10 negativos.

Lo anterior nos habla de una estrecha correlación clínica entre los test post-coitales In vivo y las pruebas cuantitativas In vitro, las que al hacerse en nuestras pacientes ayudan a detallar el diagnóstico del factor cervico-espermático de esterilidad y ser más finos en el manejo del mismo; asimismo podemos apreciar que existe similitud en la espermionigración a través del cérvix, como en nuestros dispositivos esplendos para realizar el trabajo, también encontramos una estrecha relación entre el estudio del contenido del fondo de saco vaginal y la espermatobioscopía indirecta, la cual a pesar de tener menos positivos que el Hühner, se encontró que había mayor penetración In vivo, ésto debido al hecho de que no hay una constante bien establecida de espermatozoides que deben de encontrarse para rebasar y penetrar al cérvix; ya que como es bien sabido cada día se establece un número menor de espermios que deben de existir en el eyaculado por milímetro cúbico para poder penetrar al

cérvix, pero también es cierto que es más importante el número de formas normales que la cantidad (5).

La edad de las pacientes no seleccionadas, sino tomadas al azár, fué de 20 a 30 años en 21 casos, lo que correspondió al 70% y de 21 a 40 años 9 pacientes que correspondió al 30%; el promedio de edad fué de 30 años (Cuadro VI).

	ESTUDIOS	
	Positivos	Negativos
Sims Hühner	26	4
Fondo de saco	25	5
Espermatobioscopia indirecta	20	10
In vitro simple	19	11
Cruzada esposa-donador	21	9
Cruzada esposa-donadora	21	9

CUADRO V.

EDAD	
20 a 30 años.	21 a 40 años.
21	9

CUADRO VI.

El moco cervical es de importancia primordial en los test de penetración espermática In vitro e In vivo, ya que como se anotó en los primeros capítulos, es el medio por el cual los espermatozoides cruzarán en su ascenso hacia las salpinges; y los datos que obtuvimos al estudiar las principales propiedades del moco cervical, encontramos de importancia que 20 pacientes presentaban excelente cristalización de +++ y ++++; 22 pacientes estudiadas con excelente filancia de 6 a 15 cm. y aspecto claro 21, lo anterior es muy demostrativo en cuanto a que en mejor moco, es decir, a mejores propiedades reológicas del moco cervical, es todavía mejor la penetrabilidad espermática a través del mismo, ésto

debido al adecuado estímulo estrogénico, lo que nosotros confirmamos en los resultados anotados en el cuadro V en que van de acuerdo el número de positivos, con el número de casos con excelentes propiedades reológicas del moco, cuadro VII, siendo éste aún más didáctico en los test de penetración in vitro, ya que en los test in vivo tuvimos mayor penetrabilidad con respecto a las propiedades reológicas del moco, esto explicable en el hecho de que tuvimos 6 casos con propiedades reológicas buenas sin llegar a excelentes, pero sin embargo capaces de ser penetrados por los espermatozoides, esto nos lleva de la mano a encontrar que para los test in vitro, el moco debe de encontrarse en condiciones excelentes para ser penetrado y no necesariamente en los test in vivo, en que es suficiente con que el moco se encuentre con buenas características sin llegar a tener propiedades negativas (cuadro VII).

CRISTALIZACION				
Neg.	1+	2+	3+	4+
3	1	6	13	7
FILANCIA				
Neg.	1 a 5 cm.		6 a 10 cm.	11 a 15 cm.
3	6		15	6
ASPECTO				
	Hialino		Claro	Blanco
	6		21	3

CUADRO VII.

En nuestro estudio encontramos que las propiedades reológicas del moco cervical (Cuadro VII) como son cristalización, filancia y aspecto, no tienen la misma respuesta al nivel estrogénico inicial, así podemos apreciar que lo primero en presentar respuesta es el aspecto seguido de la filancia y por último la cristalización, no habiendo relación directa entre ellos al inicio de la fase folicular, pero sí en la etapa periovulatoria, esto traducido en nuestro trabajo en que al haber mayor filancia y mejor aspecto, la cristalización es mejor, lo que puede ser motivo de adecuada penetración espermática In vivo e In vitro.

Con respecto al tiempo de esterilidad, encontramos en nuestros casos que el mayor tiempo fué de 3 a 5 años en pacientes con vida sexual activa y sin uso de métodos de control de la fertilidad (Cuadro VIII). Encontramos un caso con un año de esterilidad, que se encontraba mal canalizada al servicio, ya que se trataba de una paciente joven, con un año de VSA y dentro de nuestras normas del servicio, consideramos esterilidad después de haber pasado dos años con VSA frecuente y sin uso de métodos temporales de control de la fertilidad.

TIEMPO DE ESTERILIDAD						
1 año	2 años	3 años	4 años	5 años	8 años	10 años
1	4	8	6	6	3	2

CUADRO VIII.

Una vez analizados todos los datos obtenidos en nuestro estudio, desglosamos el cuadro V, que es la meta final de nuestra investigación, así tenemos el cuadro IX que muestra los datos obtenidos en el test de Sims Hühner o test endocervical post-coito y el cuadro X en el que se conjuntan todos los resultados obtenidos en nuestro estudio.

El cuadro X se encuentra formado por 30 columnas que son una por cada paciente estudiada y por nueve renglones, siendo las pruebas de que se tratan las siguientes:

- 1.- Sims Hühner: Zoospermes por campo.
- 2.- Cuantitativa simple: Resultados en miles.
- 3.- Cuantitativa cruzada esposa-donador: Resultados en miles.
- 4.- Cuantitativa cruzada donadora-esposo: Resultados en miles.
- 5.- pH de endocérvix.
- 6.- pH de fondo de saco.
- 7.- Porcentaje de espermios anormales.
- 8.- Porcentaje de formas móviles.
- 9.- Contaminación de la muestra, que se reporta con una crúz.

CONTENIDO ENDOCERVICAL POST-COITO					
Negativo	Pobre	Regular	Buena	Excelente	Total
2	2	0	2	24	30

CUADRO IX.

El cuadro X nos muestra una correlación global de los resultados que encontramos en nuestro estudio y que pueden ser valorados en su conjunto, podemos apreciar que no existe una relación directa entre el pH del cérvix y la penetración espermática en todos los casos, como nosotros quisieramos encontrarlo, pero si hay 10 casos en que el pH alcalino fué penetrado adecuadamente por los espermios. Sólo encontramos motilidad espermática ideal en 5 casos que no es posible correlacionar con el resto de los estudios, ya que hemos concluido que se trata del hecho de que las pacientes tardaron más de lo conveniente entre el coito y su asistencia al Hospital, ya que de otra forma con los espermios móviles que encontramos no hubiese sido posible su penetración cervical y en los casos de test de penetración In vitro, si fueron adecuados los resultados comparativamente con la penetración In vivo. No logramos obtener el índice útil de penetración espermática, por el hecho de baja motilidad espermática en nuestros estudios, teniendo en cuenta que dicho índice es la relación que hay entre el número de espermios que penetran en el dispositivo especial y el número de móviles que había por c.c. y que para ser positiva debe de dar uno que penetre por cada cinco mil, es decir una relación de 1:5000.

No encontramos ningún caso sospechoso de factor inmunológico, que sería la máxima utilidad de los test de penetración espermática In vitro, pero baste con decir que el camino para llegar al diagnóstico de factor inmunológico de esterilidad es el NHüner negativo con pruebas de penetración in vitro negativas y una o ambas cruzadas positivas, posteriormente se dosificarán inmunoglobulinas en semen, moco cervical, y suero del varón y la mujer.

No. de Pacientes.-

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
1.-	20-	30-	13-	70-	55-	50-	20-	30-	0	0	4	22-	2-	90-	76-	80-	70-	80-	80-	50-	60-	55-	30-	20-	20-	40-	70-	15-	70-	30	
2.-	10-	N	12-	N	N	14-	8-	4-	N	N	N	14-	N	10-	5-	5-	6-	N	22-	6-	5-	6-	9-	6-	3-	3-	1-	5-	6-	8	
3.-	22-	N	14-	N	N	14-	6-	N	5	N	N	14-	N	6	10-	6-	7-	N	9-	8-	7-	5-	6-	6-	7-	8-	7-	N	8-	7	
4.-	5-	N	14-	N	10-	8-	5-	N	6	N	N	10-	7-	6	20-	9-	18-	N	10-	14-	8-	10-	5-	10-	15-	7-	2-	N	N	12	
5.-	8-	5	5-	6-	6-5-5-	8-	8-	8	8	8	5	6	7-	6-5-	7-	7-	7-	6-	6-	6-	7-	6-	8-	8-	5-	6-	8-	5-	5-	6	
6.-	5-5-5-	7-	7-	7-	5-	6-	6-	7	8	8	5	5	5	5	5-	5-	5-	6-	6-	6-	7-	6-	5-	5-	5-	6-	7-	8-	7	-7-	6
7.-	40-	10-	34-	10-	14-	40-	5-	4-	10-	20-	12-	20-	12-	30-	5-	18-	57-	13-	40-	14-	5-	4-	10-	20-	12-	20-	10-	30-	15-	15	
8.-	0-0	0-60-	0-	0-	0-	0-	16-	0	0	0	20-	0	75-	0	57-	24-	0-	0-	0-	0-	0-	20-	0-	0-	60-	0-	60-	0-	0-	0	
9.-		+		+	+			+		+	+	+					+														

N= Negative.

+ Centinaesifn.

I.- Son las pruebas de penetración espermática In vitro cuantitativas simple y cruzadas, métodos adecuados para afinar el diagnóstico del factor cervicoespermático de esterilidad, ya sospechado previamente con el Test de Sims Hühner.

II.- La importancia primordial de los Test de penetración espermática In vitro, radica en el hecho de practicarlas cuando el Test de Hühner es negativo, ya que no tendría objeto practicarlas cuando el Sims Hühner fuera positivo.

En nuestros resultados podemos apreciar que existe un margen de similitud entre el Hühner y las pruebas de penetración espermáticas. Es indispensable un moco óptimo y espermatozoides en condiciones adecuadas y afinidad de ambos para lograr la positividad de las pruebas post-coitales In vivo e In vitro.

III.- El test de Sims Hühner tiene importancia especial en el estudio de la pareja estéril, ya que puede orientarnos sobre la técnica coital, la presencia de espermios en el moco cervical en el endocérvix, la presencia de espermatozoides en el fondo de saco vaginal y además indirectamente estudiamos al esposo al practicar la espermatobioscopia indirecta, la cual es de ayuda fundamental, ya que dependiendo de la misma será necesario o no practicar la directa y posteriormente Test de penetración espermática In vitro cuantitativos. Cuando encontremos un Hühner positivo, no indicamos los test in vitro; cuando el Hühner es negativo es necesario valorar si hay o no una espermatobioscopia directa normal, en caso de ser así deberán de practicarse los Test In vitro simples, si són positivos ya no es necesario practicar los cruzados, pero si el simple es negativo es inminente para el diagnóstico final practicar las pruebas cruzadas y dependiendo de los resultados deberá de ser el manejo posterior.

IV.- Cuando el factor de esterilidad es el inmunológico, el

tratamiento debe de ser específico, aunque es bien sabido que el pronóstico para la fertilidad futura es malo, sobre todo cuando es la esposa o ambos los portadores del factor inmunológico.

V.- Es indispensable para que se logren resultados óptimos en los test post-coitales, seguir las normas ya establecidas en otros capítulos de éste trabajo, para lograr la fidelidad máxima posible, ya que si el tiempo del coito en relación con la entrada al laboratorio no es el indicado, podrían falsearse los resultados y llevarnos a consideraciones diagnósticas equivocadas.

VI.- No pretendemos que los test de penetración espermática In vitro cuantitativos sean un substitute del Test de Sims Hühner, ya que consideramos es éste, estudio básico de pareja estéril, más sin embargo, si es necesario que los test de penetración espermática In vitro sean siempre practicados cuando se tiene un Hühner negativo; ahora bien, de todos los test post-coitales in vitro, los cuantitativos son los únicos que realmente nos llevan a conclusiones adecuadas ya que nos dan la verdadera penetración espermática en el moco cervical y no tan sólo resultados subjetivos. Pero si desearamos substituir el test de Sims Hühner por las pruebas de penetración espermática cuantitativas, éste sería factible y nos daría adecuadas conclusiones y nos llevaría de la mano al diagnóstico del factor cervico-espermático de esterilidad por otro camino fuera del convencional y no habría diferencia en los resultados obtenidos y los que se obtuvieran por la vía acostumbrada.

VII.- Los resultados de los test de penetración espermática cuantitativos In vitro los correlacionamos en la siguiente forma: Si el test de Hühner es positivo se descarta el factor cervicoespermático, así como si el test simple fuera positivo. Si el Hühner es negativo y el simple positivo se deben buscar factores locales masculinos o femeninos o investigar la técnica coital que podría ser inadecuada. Si el Hühner es negativo y el test simple negativo se procede a practicar los test cruzados y se pueden presentar las siguientes posibilidades en los resultados:

A.-

- 1.- Moco esposa-esperma donador : Negativo.
- 2.- Moco donadora-esperma esposo: Positivo.
FACTOR FEMENINO.

B.-

- 1.- Moco esposa-esperma donador; Positivo.
- 2.- Moco donadora-esperma esposo: Negativo.
FACTOR MASCULINO.

C.-

- 1.- Moco esposa-esperma donador; Negativo.
- 2.- Moco donadora-esperma esposo: Negativo.
FACTOR MASCULINO Y FEMENINO; Inmunológico en ambos.

D.-

- 1.- Moco esposa-esperma donador; Positivo.
Moco donadora-esperma esposo: Positivo.
FACTOR INMUNOLOGICO ESPECIFICO AL CONYUGUE.

VIII.- De todo lo anterior y basados en nuestros resultados, llegamos a las siguientes conclusiones:

- 1.- El test de Sims Hühner es estudio básico de pareja estéril.
- 2.- Los test de penetración espermiática In vitro simples, nos dan resultados similares al test de Hühner.
- 3.- Los test de penetración espermiática In vitro cruzados, solamente deben practicarse cuando existe test simple negativo.
- 4.- Las pruebas de penetración espermiática In vitro cuantitativas son indispensables para completar adecuadamente el diagnóstico de factor cervico-espermiático de esterilidad.
- 5.- Los test post-coitales son técnicamente más fáciles de realizar que el test de Hühner, en el cual además de ser necesario el

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

coito previo a una hora incómoda, requiere de mayor manejo de la paciente, no así en los test in vitro, en los que solo necesitamos roce cervical y esperma.

6.- Sin los test de penetración espermiática in vitro cuantitativos, cualquier diagnóstico de factor cervicoespermiático de esterilidad fundamentado exclusivamente en el Test de Sims Hüner, sería erróneo y llevaría a conclusiones falsas y manejo inadecuado.

Para finalizar, podemos decir, que en la forma indicada se puede esclarecer la causa y por lo tanto instituir el manejo adecuado del factor cervico-espermiático desde el punto de vista de la etiopatogenia de dicho factor y brindar a la pareja estéril un mejor pronóstico o evitar esperanzas falsas y mal fundamentadas a la pareja, que llevaría a deterioro en la adaptación conyugal, más aún embargo, si se estudian adecuadamente los factores de esterilidad de la pareja, lograremos posiblemente el embarazo y un equilibrio en su estado Biopsicosocial.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- Bergman, P.; Perbas, E.; A test for sperm migration analysis in an artificial medium.
Internat. J. Fertil.
6:279, 1961.
- 2.- Botella Llusia, J.; Ruiz Velasco, V. ; Test post-coital "In vitro".
Acta Ginecol. de Madrid.
10:209, 1959.
- 3.- Botella Llusia, J.; Ruiz Velasco, V.; Post-coital test "In vitro".
Internat. J. Fertil.
5:301, 1960.
- 4.- Clift, A.T.; Proceedings of the Royal Society of Medicine.
39:1, 1945.
- 5.- Covelli, H.; La calidad quinética de los espermios, determinada por el test de masa de progresión espermática a diferente altitud.
Acta Gynecol. de Madrid.
10:417, 1959.
- 6.- Elstein, M.; Cuello uterino y su moco.
Temas actuales de Gineco-Obstetricia.
2:347, 1974.
- 7.- Hühner, M.; Sexual disorders. Cap. The Hühner test.
Ed. Davis, Philadelphia, 1945.
- 8.- Kremer, J. ; A simple sperm penetration test.
Internat. J. of Fertil.
10:209, 1965.
- 9.- Ruiz Velasco, V.; Un nuevo test de penetración espermática.
Estudio sobre esterilidad. México.
9(1):43, 1958.
- 10.- Ruiz Velasco, V.; Penetración espermática cuantitativa en el moco cervical.
Estudio sobre esterilidad. México.
9(3):38, 1958.
- 11.- Kururok, R. Miller, E.G.; Biochemical studies of human semen and its relation to mucus of the cervix uteri.
Am. J. Obst. and Gynecol.
15:56, 1928.
- 12.- Ruiz Velasco V.; A quantitative spermatic penetration test.
Internat. J. Fertil.
7:11, 1962.
- 13.- Ruiz Velasco, V. ; Pruebas para determinar la espermionigración en una pareja estéril.
Estudios sobre esterilidad. México.
16:107, 1965.

- 14.- Ruiz Velasco. V.; Matute R.M.; Test Post-coitales.
Reproducción.
3:43, 1976.
- 15.- Sims, J.M.; On the microscope, as an aid in the diagnosis
and treatment of sterility.
N.Y. state. J. Med.
8:393, 1869.
- 16.- Sobrero, A.J.; McLeod, J.; The immediate post-coital test.
Fertil and Steril.
13:184.
-