



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

“EFECTO *in vitro* DE LA PROGESTERONA,
LA TESTOSTERONA Y EL ESTRADIOL SOBRE LA
MOVILIDAD DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO”

BO 1411/98
E.1

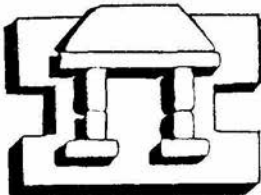
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

SANCHEZ MARTINEZ MARIBEL



IZTACALA

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. CARLOS A. VILLANUEVA DIAZ

MEXICO, D. F.

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS ESPECIALMENTE DEDICADA A :

MIS PADRES:

Por su cariño, confianza y apoyo incondicional.
Por ser un ejemplo de unión y lucha constante.
Por haberme dado una carrera universitaria.
Mismos que me dan fuerzas para seguir adelante.

Los quiero mucho.

DIOS:

Por haberme brindado la vida.
Por seguir iluminando mi camino.

FIDEL G.:

Por formar parte mi vida.
Por tú apoyo, cariño y confianza,
que me brindas día a día.

Te amo.

MIS HERMANAS:

Por haberme dado todo su apoyo.

GRACIAS

MI AGRADECIMIENTO PARA:

DR. CARLOS VILLANUEVA D.:

Por haberme aceptado en su area de trabajo.
Por haber aceptado ser director de este trabajo.
Por su apoyo.

DEPARTAMENTO DE ANDROLOGIA:

Por su enseñanza y apoyo.
Por haber contribuido a realizar el trabajo.

AMIGOS:

Por haberme brindado su amistad.
Por la ayuda incondicional para realizar este trabajo.

***LOS MOMENTOS MAS FELICES QUE MI CORAZON CONOCE
SON AQUELLOS EN QUE DERRAMA SU AFECTO SOBRE
UNAS CUANTAS PERSONAS ESTIMADAS***

THOMAS JEFFERSON

I N D I C E

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
ANTECEDENTES.....	6
JUSTIFICACION.....	10
OBJETIVOS.....	11
HIPOTESIS.....	11
MATERIAL Y METODO.....	12
Progesterona.....	13
Estradiol.....	14
Testosterona.....	14
RESULTADOS.....	15
FIGURA 1.- Efecto de la progesterona sobre la VCL.....	19
FIGURA 2.- Efecto de la progesterona sobre la VSL.....	20
FIGURA 3.- Efecto de la progesterona sobre la ALH.....	21
FIGURA 4.- Efecto de la progesterona sobre el BCF.....	22
FIGURA 5.- Efecto de el estradiol sobre la VCL.....	23
FIGURA 6.- Efecto de el estradiol sobre la VSL.....	24
FIGURA 7.- Efecto de el estradiol sobre la ALH.....	25
FIGURA 8.- Efecto de el estradiol sobre el BCF.....	26
FIGURA 9.- Efecto de la testosterona sobre la VCL.....	27
FIGURA 10.-Efecto de la testosterona sobre la VSL.....	28
FIGURA 11.-Efecto de la testosterona sobre la ALH.....	29
FIGURA 12.-Efecto de la testosterona sobre el BCF.....	30
DISCUSION.....	31
CONCLUSIONES.....	37
REFERENCIAS.....	38
APENDICE.....	43

RESUMEN

Las hormonas esteroideas desempeñan un papel esencial en la regulación de múltiples procesos biológicos en los mamíferos. Un aspecto interesante es el posible efecto diferencial de la progesterona, el estradiol y la testosterona sobre las distintas características de la movilidad de los espermatozoides, cuando son incubados con estas hormonas *in vitro*. El objetivo de este estudio fue observar el efecto de la progesterona (P4), el estradiol (E2) y la testosterona (T) sobre la velocidad curvilínea (VCL) y velocidad lineal (VSL), desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y batimiento flagelar (BCF) de los espermatozoides humanos. Las muestras de semen fueron sometidas al proceso de separación "swim-up" para ser incubadas con las diferentes concentraciones de P4 (0.78-50 $\mu\text{g/mL}$), E2 (0.78-50 pg/mL) y T (75-3600 pg/mL) durante 30 min. a 37° C. La progesterona incremento la VCL en el rango de (3.125 \pm 3.1, 6.25 \pm 3.4, 12.5 \pm 3.3 $\mu\text{g/mL}$ $p < 0.05$), el estradiol solo en (0.78 \pm 3.5 pg/mL $p < 0.05$) y la testosterona en (900 \pm 2.1, 1800 \pm 2.1, 3600 \pm 2.9 pg/mL $p < 0.001$), también la testosterona tuvo una disminución en CBF (900 \pm 2.4, 1800 \pm 1.0, 3600 \pm 1.2 pg/mL $p < 0.001$). Los esteroides sexuales tienen efectos diferentes sobre VCL, VSL, ALH y BCF de los espermatozoides, a las concentraciones que se encuentran el líquido folicular de folículos preovulatorios, siendo para la progesterona una movilidad quimiotáctica, para el estradiol quimiocinética y la testosterona inhibitoria solo en el bateo del flagelo.

INTRODUCCION

El espermatozoide esta constituido por tres regiones: cabeza, pieza intermedia y flagelo. La cabeza del espermatozoide posee dos componentes principales: el núcleo y el acrosoma (Stevens y col., 1990). La pieza intermedia es una estructura citoplasmática que mantiene unida la cabeza espermática al flagelo, coordinando los movimientos flagelares. Esta formada por el capitulum, nueve columnas estriadas, la fosa de implantación y por el centriolo. Este último, se encuentra en el interior y esta formado por nueve tripletes periféricos, de tal manera que, se le atribuye la organización del ensamble de los microtúbulos axonemales. Así mismo, al centriolo se le considera el iniciador de los movimientos del flagelo. El flagelo se encuentra constituido por el axonema y los órganos accesorios (la vaina fibrosa y las fibras densas externas). El axonema es un complejo microtúbular axial que corre por todo el flagelo y es el encargado de transformar la energía química, indispensable para la movilidad del flagelo (Vaclaou, 1988).

Uno de los eventos centrales en la movilidad del espermatozoide es el cambio en el sistema de adenil-protein-cinasas causado por el aumento en NaHCO_3 , que da como resultado el incremento del AMPc y Ca^{++} , desencadenándose así, los eventos de fosforilación en proteínas del axonema, y la formación de energía por la dineína a partir del ATP. La dineína además estabiliza la unión de las proteínas actina y tubulina que producen el movimiento por deslizamiento en un mecanismo similar al que ocurre en el músculo estriado (Foresta y col., 1995).

Sin embargo, este no parece ser el único mecanismo bioquímico regulador de la movilidad del gameto masculino dado que se han descrito otros acontecimientos en experimentos *in vitro*. Otro de los fenómenos que se ha descrito es el influjo de calcio que involucra la participación de receptores en la membrana plasmática, los cuales activan las proteínas G. El resultado final de estos eventos es la generación de una onda de movimiento que espacialmente se proyecta a la cola del espermatozoide en sentido longitudinal y en forma espiral.

El movimiento del espermatozoide parece tener diferentes componentes durante la migración en el aparato genital debido a que en su desplazamiento se adhiere a la superficie de las células epiteliales del endometrio y trompa de Falopio pero en forma alterna se desprende para migrar con movimientos circulares en los fluidos que ocupan la luz de estas estructuras anatómicas. De hecho en estudios en los que se ha analizado por medio de la tecnología del análisis computarizado se demuestra que esta célula tiene por lo menos 26 patrones diferentes de movimiento (Cheng y Boettcher, 1979; Vantman y col., 1989; Revelli y col., 1992).

Los factores que influyen interna o externamente en la movilidad del espermatozoide son múltiples, algunos encargados de asegurar su migración a través del moco endocervical y otros que posiblemente están relacionados con la migración dirigida hacia o alrededor del ovocito. Los primeros en un efecto puramente quimiocinético y el segundo en lo que se conoce como quimiotaxis. Dentro de estos factores que se encargan de modular la movilidad del espermatozoide se encuentran las hormonas esteroides que se han relacionado con efectos de ambos tipos cuando se han estudiado en experimentos *in vitro* (Villanueva y col., 1992 y 1995).

Las hormonas esteroides desempeñan un papel esencial en la regulación de múltiples procesos biológicos en los mamíferos, entre los que destacan la homeostasis hidroelectrolítica, la regulación del metabolismo, el dimorfismo sexual y el sostén de la gestación. La mayor parte de estas hormonas se biosintetizan en algunas glándulas de secreción interna (suprarrenal, el ovario y el testículo) y en otros órganos con actividad esteroidogénica como la placenta y el hígado fetal (Loza, 1988).

La progesterona es la responsable de la preparación morfofuncional del endometrio para la nidación del huevo fertilizado, el mantenimiento de la gestación y el desarrollo alveolar de la glándula mamaria, siendo esencial para la lactancia. Además, en forma conjunta con los estrógenos, modula un número importante de efectos primordiales en el sistema nervioso central y en órganos periféricos durante la vida reproductiva. La testosterona es una hormona androgénica que favorece el fenotipo masculino durante la vida intrauterina, la virilización, la espermatogénesis y el desarrollo de las estructuras

sexuales masculinas en el adulto. El estradiol es la hormona responsable de conferir el fenotipo femenino en la etapa pospuberal, al estimular el desarrollo de las estructuras sexuales secundarias. En asociación con la progesterona, los estrogénos aseguran la función reproductiva de la hembra (Pérez y col., 1988; Montoya y col., 1988).

Estas hormonas se concentran de manera importante en diferentes órganos y tejidos de la mujer durante el ciclo reproductivo y parecen tener alguna relación con los procesos que regulan la maduración del folículo ovulatorio y la atresia de folículos ováricos que no alcanzan la madurez. El líquido folicular de los mamíferos contiene una mezcla variada de los esteroides sexuales y sus concentraciones absolutas y relativas varían de acuerdo a las etapas del ciclo menstrual. Los esteroides que se encuentran en el líquido folicular han sido implicados en diversas acciones locales en el aparato reproductor, pero también parecen jugar algún papel fisiológico en la fertilización debido a que ejercen diversos efectos en la movilidad y metabolismo del espermatozoide (Calvo y col., 1989; Bastias y col., 1993; Fusi y col., 1994; Villanueva y col., 1995).

En estudios *in vitro* se ha observado que el líquido folicular humano crudo ejerce efectos sobre los espermatozoides que se traducen en incremento de su capacidad fecundante. Algunos de estos efectos se relacionan con un aumento de la movilidad y del consumo de oxígeno de los espermatozoides (Beck y col., 1976). Las acciones del líquido folicular sobre el espermatozoide podrían ser atribuidos a los esteroides sexuales como lo sugieren diferentes estudios que demuestran que la incubación de espermatozoides con estradiol origina cambios semejantes a los indicidos por el líquido folicular crudo. También se ha observado que la progesterona facilita la capacitación espermática, la reacción acrosomal y es posible que tenga acciones similares a las de un agente quimiotáctico (Mbizvo y col., 1990; Morales y col., 1992; Perinaud y col., 1992; Villanueva y col., 1995).

En algunas publicaciones se ha reportado que los esteroides sexuales modifican la movilidad del espermatozoide humano *in vitro* (Mbizvo y col., 1990), han mostrado que el estradiol aumenta la velocidad progresiva, la movilidad lineal y la longevidad del espermatozoide, mientras que la progesterona reduce la linealidad del movimiento de esta célula porque produce hiperactivación con movimiento predominantemente curvilíneo. Sin

embargo, estos experimentos se han realizado en condiciones que no semejan a las condiciones fisiológicas encontradas en el aparato genital femenino en la etapa de la ovulación-fertilización. De acuerdo con la evidencia presentada por Andersen y col. (1990), las concentraciones de progesterona y estradiol libre que se encuentran en suero alrededor de la ovulación son mayores a las que probaron Mbizvo y cols. en sus experimentos *in vitro*.

El presente trabajo pretende averiguar los efectos *in vitro* sobre la movilidad del espermatozoide, de los esteroides sexuales individuales, utilizados en el rango de concentraciones que se encuentran en el líquido folicular de folículos preovulatorios.

ANTECEDENTES

Las hormonas esteroides se secretan a la circulación general o al sistema linfático, en donde se unen a proteínas transportadoras para distribuirse en los diferentes órganos de la economía. Posteriormente, en función de su constante de disociación, la velocidad del flujo sanguíneo y su captación selectiva, las hormonas son compartamentalizadas en los tejidos de los órganos blanco en donde ejercen su acción biológica.

En la célula, los esteroides ejercen su acción después de la unión a proteínas intracelulares que funcionan como receptores, formando así, complejos esteroide-receptor. Se han identificado receptores intracelulares para estrógenos (RE), progesterona (RP), andrógenos (RA), glucocorticoides (RG) y mineralocorticoides (RM). La importancia de estas macromoléculas receptoras, topográficamente ubicadas en el citoplasma y/o en el núcleo celular, reside en que al unirse a la hormona esteroide correspondiente, se forma un complejo esteroide-proteína "activado". Este complejo, tiene afinidad por varios sitios de unión en el núcleo (particularmente por un sitio aceptor en el DNA), lo cual permite a la hormona modificar la expresión génica. Estos sitios aceptores están localizados en o muy cercanos a las secuencias del DNA cuya transcripción es hormono-regulada. Los cambios moleculares que ocurren como resultado de la interacción esteroide-receptor incluyen la transcripción génica específica, el procesamiento del mRNA precursor y la traducción a nivel ribosomal en proteínas específicas, que son capaces de modificar la función celular (Loza y col., 1988; Pérez y col., 1988; Montoya, 1988; Díaz y col., 1995).

Además de sus efectos a nivel nuclear, los esteroides tienen acciones directamente a nivel de la membrana plasmática. Publicaciones de los años 80 revelan que la acción esteroidea; capaz de modular la excitabilidad de la membrana plasmática de las células del sistema nervioso central es responsable de los efectos sedantes e hipnóticos, así como de las acciones que modulan la conducta sexual. La acción membranar de los esteroides también ha quedado manifiesta en experimentos *in vitro* en los que se ha demostrado que los esteroides

sexuales modulan la contractilidad del músculo liso en diversos órganos como son el útero, el epidídimo y los vasos deferentes (Gee y col., 1988; Bastias y col., 1993; Fusi y col., 1994).

El primer estudio experimental reportado de la influencia de esteroides en el espermatozoide humano, se relaciona, con el consumo de oxígeno y la producción de lactato, cuando se incuban los espermatozoides con 17- β estradiol (Hicks y col., 1972; Beck y col., 1976; Cheng y Boettcher, 1979).

Los efectos de la aglutinación espermática, que es inducida por la adición de progesterona o testosterona y disminuida con el estradiol (Boettcher y Kay, 1973). Estos mismos efectos fueron demostrados con diferentes concentraciones de estrógeno y progesterona presentes en las secreciones del tracto genital femenino, los cuales inducen efectos distintos en el espermatozoide humano (Suárez y col., 1986; Siegel y col., 1990).

Además la incubación de espermatozoides con estradiol incrementa la penetración espermática en la prueba de ovocito de hámster y en el de rata (Chan y col., 1983). Algunos estudios parecen indicar que la progesterona presente en las secreciones genitales femeninas estimula la reacción acrosomal (Osman y col., 1989) y la hiperactivación (Uhler y col., 1992). Los fluidos del sistema reproductor femenino, pueden influir en algunas de las funciones de esta célula, lo cual pudiera relacionarse con la concentración de esteroides presentes en ellos. Por ejemplo, el fluido folicular ejerce un efecto en la movilidad del espermatozoide humano y en la reacción acrosomal (Suárez y col., 1986; Calvo y col., 1989; Siegel y col., 1990; Falcone y col., 1991; Revelli y col., 1992).

Estos efectos desaparecen cuando al fluido folicular se le quitan los esteroides por elución en una columna de cromatografía o con carbon-dextran (Mbizvo y col., 1992; Morales y col., 1992).

Otras investigaciones señalan que entre las hormonas esteroides la progesterona es la posible responsable de la hiperactivación espermática. En un estudio con el fluido folicular y la combinación de precipitados orgánicos separados por cromatografía por columna (HPLC) Osman y col. (1989) concluyeron que la progesterona y la 17-hidroxiprogesterona presentes en el fluido folicular, son las sustancias responsables de la hiperactivación e inducción de la

reacción acrosomal del espermatozoide, aunque Uhler y col. (1992) han encontrado que los efectos antes descritos solamente se presentan con la progesterona.

Los datos indirectos que permiten sugerir un efecto fisiológico de estas hormonas en la reproducción de los mamíferos, se derivan de experimentos en los que se ha reconocido que el líquido folicular, induce la capacitación espermática, y que esta se relaciona con la concentración de progesterona, pero no con la de otros esteroides (Morales y col., 1992). Otras acciones de la progesterona *in vitro* parecen implicarla como un agente quimiotáctico (Parinaud y col., 1992; Villanueva y col., 1992, 1995). De hecho, Tesarik y col. (1992) propone que en la superficie del espermatozoide humano existen receptores específicos para la progesterona.

Las acciones *in vitro* de los esteroides sexuales plantea incógnitas interesantes con respecto de su posible impacto fisiológico, ya que por una parte, se ha demostrado que la longevidad y movilidad de los espermatozoides se encuentran relacionadas con las concentraciones de esteroides en el aparato genital femenino. Sin embargo, se ha demostrado que el líquido folicular y sus componentes no enriquecen a las secreciones del oviducto, por lo que sugiere que los esteroides del líquido folicular no tienen acciones fisiológicas en el espermatozoide (Mbizvo y col., 1990).

Otro aspecto interesante es el posible efecto diferencial de los esteroides en la movilidad y longevidad de los espermatozoides debido a que, como se ha reportado previamente, las características de la movilidad espermática se modifican cuando se incuban espermatozoides con distintas mezclas de estradiol y progesterona.

La tecnología del análisis de imágenes por computadora es una herramienta de gran valor para analizar los complejos mecanismos que se encuentran involucrados en la movilidad del espermatozoide, debido a que tiende a minimizar el error que se produce por su estudio subjetivo de esta característica del gameto masculino. Todos los instrumentos diseñados con este fin se basan en el análisis de la trayectoria de espermatozoides, en un campo microscópico. Con estos métodos se ha llegado a establecer un patrón que define el estado de hiperactivación, el cual depende de la medición de la velocidad lineal (VSL), la velocidad curvilínea (VCL), el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), el batimiento

flagelar (BCF), la linealidad (LIN), y la rectitud (STR) de acuerdo con lo expresado por Burkman (1991). Utilizando el sistema de Hamilton Thorn (HT) los criterios que definen la hiperactivación del espermatozoide humano son: $LIN \geq 65\%$, $VCL \geq 100 \mu\text{m/s}$, y $ALH > 7.5 \mu\text{m}$. Existen otros sistemas CASA (computer-aided sperm analysis) como son el Cellsoft system, Speed-sperm system, CellTrack/S, SM-CMA Strömberg-Mika y Labscan VI system (Macleod y col., 1994; Zhu y col., 1994; Burkman y col., 1991); sin embargo, el sistema HT ha sido el más utilizado. Aunque estos sistemas se han empleado para estudiar el comportamiento de la movilidad espermática en el estado de hiperactivación, hasta el momento no se ha producido información de los efectos, que pudieran tener los esteroides sexuales a su concentración en los folículos preovulatorios, sobre los espermatozoides humanos.

JUSTIFICACION

En los últimos años el estudio de la fertilización en los humanos, ha despertado gran interés, debido a la necesidad de entender y manipular estos procesos con fines de incrementar la fecundidad en parejas que sufren de esterilidad. Un aspecto importante en este fenómeno se refiere a estudiar la concentración de esteroides en folículos preovulatorios y el efecto que tienen sobre la movilidad del espermatozoide humano, para así poder ayudar a las parejas con esterilidad.

Se ha sugerido, que los esteroides sexuales tienen un papel fisiológico en este proceso, específicamente en la penetración del moco cervical y en la capacitación espermática. Sin embargo, hasta el momento no se ha definido con certeza el efecto que pudieran tener *in vitro* concentraciones fisiológicas de esteroides similares a las que se encuentran en el líquido folicular de folículos preovulatorios, sobre las distintas características del movimiento del espermatozoide humano.

El estudio de las acciones de las hormonas esteroides; progesterona, testosterona y estradiol, en espermatozoides humanos ofrece la posibilidad de identificar mecanismos que puedan ser intervenidos con la finalidad de aumentar la fertilidad, en cuanto se refiere a los programas de fertilización *in vitro* que existen o de desarrollar métodos de anticoncepción.

OBJETIVOS

GENERAL:

Analizar el efecto de los diferentes esteroides sexuales sobre las características de movilidad del espermatozoide humano, entre ellas: la velocidad curvilínea (VCL), y velocidad lineal (VSL), desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), y batimiento flagelar (BCF).

PARTICULARES:

Describir la acción de la progesterona, estradiol y testosterona a distintas concentraciones sobre VCL, ALH, VSL y BCF del espermatozoide.

Analizar las diferencias entre el efecto de estos esteroides en los parámetros de la movilidad espermática (VCL, VSL, ALH y BCF).

HIPOTESIS

Los espermatozoides humanos incubados con estradiol, testosterona y progesterona en presencia de concentraciones semejantes a las que se encuentran en el líquido folicular de folículos preovulatorios, pueden producir modificaciones específicas en la velocidad curvilínea y lineal, cambios en la frecuencia de batido del flagelo y la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza. Estos cambios se relacionan con la concentración y tipo de esteroide usado.

MATERIAL Y METODO

Las muestras de semen fueron colectadas en recipientes desechables estériles en el Laboratorio de Andrología del Instituto Nacional de Perinatología, por masturbación, después de una abstinencia sexual de 3-7 días. Fueron incubadas durante una hora a 37° C o hasta que ocurrió la licuefacción, se transfirieron en condiciones de esterilidad en tubos cónicos de policarbonato de 15 mL. Los especímenes fueron analizados macroscópicamente y microscópicamente de acuerdo a los lineamientos propuestos por la OMS (1992), registrando sus características fisicoquímicas (volumen, aspecto, consistencia y coloración) y las características de concentración, movilidad y morfología de espermatozoides.

El análisis objetivo de la movilidad espermática en las muestras basales (semen fresco) se llevó a cabo colocando una alícuota de 13.5 μL en un portaobjetos utilizando un cubreobjetos de 24 x 40 mm. En el caso de las muestras separadas por "swim-up", la lectura se realizó en alícuotas de 7.5 μL con cubreobjetos de 18 x 18 mm. Las lecturas en el autoanализador Hamilton-Thorn se realizaron con los siguientes parámetros: cuadros analizados: 30; frecuencia de adquisición de imágenes: 60Hz /s; contraste mínimo: 7-30; tamaño mínimo: 5; tamaño de partícula: 0.5-1.8; intensidad de partícula: 0.4-1.6; tamaño de las cabezas no móviles: 10; intensidad de las células no móviles: 20. Para el análisis se seleccionaron 5 campos al azar en los cuales se registró la concentración de espermatozoides, la movilidad total. El análisis cualitativo de la movilidad, se llevó a cabo con los siguientes criterios: A.-Espermatozoides con movilidad progresiva rápida y lineal, B.-Espermatozoides con movimiento lineal o no lineal lento., C.- Espermatozoides con movilidad *in-situ*, D.- Espermatozoides inmóviles (OMS, 1992). También se evaluarán las siguientes características de movilidad: VCL.- Velocidad curvilínea ($\mu\text{/s}$), VSL.- Velocidad rectilínea ($\mu\text{/s}$), ALH.-Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μ), BCF.- Frecuencia de cruce en el tiempo (ciclos/s) (HTM-IVOS, 1992).

SEPARACIÓN DE CÉLULAS MÓVILES

Las muestras seleccionadas (parámetros normales de la OMS) para el estudio, fueron sometidas al proceso de separación por el método de "swim-up". Brevemente, el semen se mezcló (v/v) proporción (1:1) con medio de cultivo HTF (Fluido Tubario Humano, IRVINE SCIENTIFIC, Santa Ana CA.), suplementado con 10 mg/mL de albúmina humana filtrada y esterilizada (IRVINE SCIENTIFIC, Santa Ana, CA.) y fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 8 min. El sobrenadante se desechó y el paquete celular fue resuspendido en 1mL del mismo medio de cultivo repitiendo este procedimiento. Al final se adicionaron 0.5 mL y el tubo, se incubó a 37° C inclinado en un ángulo de 45° de 30 a 45 min. "swip-up". Terminada la incubación, fue extraído aproximadamente del 60 al 80% del sobrenadante y colocado en un tubo estéril de 15 mL (Windt y col., 1990).

A partir de la cifra de concentración de espermatozoides obtenida de la lectura del HT en la sección B y del volumen del sobrenadante, se realizaron cálculos para fraccionarlo en tubos Eppendor de 1.5 mL en las que fueron incubados a una concentración aproximada de 10 millones de espermatozoides/mL con diferentes concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol (Villanueva y col., 1995).

PROGESTERONA

Se pesaron 20 mg de progesterona (P4), (SIGMA) los cuales fueron diluidos en 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO, SIGMA), la concentración de progesterona en el líquido folicular extraído de folículos preovulatorios, es de 18µg/mL (Villanueva y col., 1995), de esta solución se tomaron 80µL que fueron diluidos en 15.920mL de medio de cultivo HTF en agitación lenta y en campo estéril. La concentración final obtenida de esta solución fue de 100 µg/mL en un volumen de 16mL (solución madre). A partir de esta solución se prepararon las diluciones necesarias para alcanzar las siguientes concentraciones: 0.78, 1.156, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL de P4. Los espermatozoides seleccionados fueron incubados con las diferentes concentraciones por 30 min. a 37° C y al final del periodo de incubación fueron analizados en el Hamilton-Thorn.

ESTRADIOL

Se pesaron 5 mg de estradiol (E2), (SIGMA) que fueron disueltos en 1 mL de DMSO (SIGMA). La concentración de E2 en el líquido folicular de ovulos preovulatorios, es de 4.3 - 14.3 pg/mL (Bomse y col., 1979). Las concentraciones seleccionadas a probar fueron: 0.78, 1.156, 3.156, 6.26, 12.5, 25, 50 pg/mL. De la solución de 5mg/mL de DMSO se tomaron 25µL los cuales fueron disueltos en HTF para alcanzar la concentración final de 100 pg/mL a partir de la cual se prepararon las concentraciones antes mencionadas. La preparación de células móviles se incubaron en igualdad de condiciones que las que se mencionan para la progesterona.

TESTOSTERONA

Se pesaron 5 mg de testosterona (SIGMA) los cuales fueron disueltos en 1mL de (DMSO, SIGMA). La concentración de T en el líquido folicular es de 200-600 pg/mL (Kaiser, 1988). Las concentraciones seleccionadas a probar fueron: 75, 150, 300, 600, 900, 1800, 3600, pg/mL. De la solución de 5mg/mL de DMSO se preparo una solución con 1200 pg/mL, de estradiol de la cual se partió para preparar las soluciones de trabajo. Los procedimientos de incubación y análisis se realizaron de manera similar a los experimentos que se describen anteriormente.

Los ensayos de incubación se llevaron a cabo utilizando como control la muestra basal con DMSO a la misma concentración empleada para la solubilizar los esteroides.

El tiempo de incubación fue de 30 minutos por un estudio previo en donde se encontró que a partir de los 40 minutos la movilidad decae (datos no reportados).

El análisis estadístico se realizó por medio de la prueba de ANOVA simple y la comparación de medias, por la prueba de LSD, con un valor de significancia de $p < 0.05$ en un total de 15 experimentos para cada una de las hormonas mencionadas, comparando el estado basal con el efecto de las diferentes concentraciones para cada hormona.

RESULTADOS

Las muestras seminales utilizadas en los ensayos que se describen arriba fueron obtenidas de pacientes que acuden a la clínica de Andrología del INPer, todas ellas con características normales de acuerdo a los criterios de la OMS. En ninguno de estos se encontró aglutinación o disminución de la viabilidad como índice de la presencia de alteraciones inflamatorias específicas o inespecíficas del aparato genital masculino. No se apreció tampoco disminución de la viabilidad de los espermatozoides, situación que pudiera afectar el resultado de los experimentos.

Las células fueron separados por el método de “swim-up” que regularmente se utiliza en nuestro laboratorio para la obtención de la fracción móvil de espermatozoides para la reproducción asistida. El porcentaje de recuperación de espermatozoides con este método es de aproximadamente 30% y la fracción móvil habitualmente contiene entre 80-100% de espermatozoides con movilidad progresiva (tipos A y B). En los ensayos con esteroides se utilizaron células con estas características.

En la tabla No. 1, 2 y 3 se observan los valores promedio y desviación estandar de los parámetros de movilidad del espermatozoide después de la incubación *in vitro* con las diferentes concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol con un total de 15 ensayos.

En la figura 1 se presenta la curva de concentraciones respuesta de la acción de la progesterona sobre la VCL. Como puede observarse, la progesterona originó un incremento importante en todas las concentraciones analizadas con respecto a su estado basal, alcanzando los valores de 66.20 ± 3.4 en la concentración de $6.25 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0.001$) siendo el pico mas alto. Sin embargo, el perfil de la curva muestra un incremento que se inicia desde la concentración de $3.125 \mu\text{g/mL}$ y termina en la concentración de $12.5 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$) (ver figura 1). En el análisis estadístico de los diferentes tratamientos no se encontraron cambios en las variables de VSL, BCF y ALH con la progesterona. (ver figura: 2, 3, 4)

PROGESTERONA

DOSIS ($\mu\text{g/mL}$)	Control	0.78	1.156	3.125	6.25	12.5	25	50
VCL ($\mu\text{m/s}$)	58.8	60.4	61.6	61.3	66.2	61.4	61	60.9
DESV \pm	2.6	3.7	2.6	3.1	3.4	3.3	4.4	3.8
VSL ($\mu\text{m/s}$)	11.4	11.9	12.6	12.4	13.2	12.8	11.8	12.4
DESV \pm	1.8	2.1	2.8	2.5	2	1.7	2.4	1.8
ALH (μm)	2.2	2.3	2.4	2.4	2.5	2.3	2.3	2.3
DESV \pm	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3
BCF (Hz/s)	44.7	44.4	4.7	44.9	43.8	44.5	44.4	44.1
DESV \pm	2.8	2.5	3	2.5	2.9	2.6	2.6	2.9

Tabla No. 1.- Valores promedio y desviación estándar de los parámetros de movilidad de los espermatozoides, post-incubación *in vitro* con las diferentes concentraciones de progesterona, con una N = 15.

ESTRADIOL

DOSIS (pg/mL)	Control	0.78	1.156	3.125	6.25	12.5	25	50
VCL ($\mu\text{m/s}$)	57.9	60.8	56.6	58.8	59.1	59.5	60.1	59.7
DESV \pm	3	3.6	3.5	3.5	3.3	3.6	3.2	3.1
VSL ($\mu\text{m/s}$)	9.7	9.7	9.4	9.9	10	9.4	10.6	11
DESV \pm	1.7	1.9	2	1.6	2	2.5	2.1	1.7
ALH (μm)	2.1	2.4	2.4	2.4	3.5	2.4	2.5	2.4
DESV \pm	0.5	0.5	0.5	0.5	0.9	0.5	0.4	0.4
BCF (Hz/s)	48.2	47.2	47.2	48.4	47.7	47.6	47.4	47.2
DESV \pm	2.3	2.2	2.2	1.4	2.1	2.2	1.7	2

Tabla No. 2.- Valores promedio y desviación estándar de los parámetros de movilidad de los espermatozoides, post-incubación *in vitro* con las diferentes concentraciones de estradiol, con una N = 15.

TESTOSTERONA

DOSIS (pg/mL)	Control	75	150	300	600	900	1800	3600
VCL ($\mu\text{m/s}$)	57	58.8	58.1	46.3	45.5	59.2	59.4	60.9
DESV \pm	2.9	2.7	3.3	3.1	2.1	2.3	2.1	3.6
VSL ($\mu\text{m/s}$)	11.2	11.2	10.6	11.3	11.3	11.6	11	11.8
DESV \pm	2.3	1.8	1.5	2.1	1.7	1.9	2.4	2.3
ALH (μm)	2.5	2.6	2.3	2.3	2.3	2.2	2.3	2.3
DESV \pm	0.5	0.3	0.3	0.4	0.2	0.3	0.3	0.3
BCF (Hz/s)	46.9	46.9	46.7	46.3	45.5	43.5	44.6	45.5
DESV \pm	2.7	1.2	2.6	2.8	2.4	2.4	1	1.2

Tabla No. 3.- Valores promedio y desviación estándar de los parámetros de movilidad de los espermatozoides, post-incubación *in vitro* con las diferentes concentraciones de testosterona, con una N = 15.

La incubación con concentraciones crecientes de estradiol produjo cambios en la VCL (figura 5) que solamente fueron significativos en la concentración de 0.78 pg/mL ($p < 0.05$). El perfil de esta curva muestra, que a esa concentración la VCL disminuyó para regresar a los valores basales a la concentración de 6.25 pg/mL. Como en el caso de la progesterona, el estradiol no produjo cambios significativos en VSL, BCF y ALH. (figura: 6, 7, 8)

La testosterona originó cambios estadísticamente significativos en la VCL (figura 9) y en la BCF (figura 12). La VCL incrementó entre las concentraciones de 900 pg/mL y 3600 pg/mL, siendo en esta última concentración en que alcanzó su valor más alto con respecto del basal ($57.00 \pm 2.9 \mu\text{m/seg}$ vs $60.90 \pm 3.60 \mu\text{m/seg}$; $p < 0.001$). Este cambio se acompañó de una disminución de la frecuencia de batido del flagelo con valores de $43.50 \pm 2.40 \text{ Hz}$ ($p < 0.001$); $44.60 \pm 1.00 \text{ Hz}$ ($p < 0.001$) y $45.50 \pm 1.20 \text{ Hz}$ ($p < 0.001$) respectivamente para las concentraciones de 900 pg/mL, 1800 pg/mL y 3600 pg/mL. No se encontraron diferencias estadísticas para VSL y ALH. (figura 10, 11)

La figura 2, 6 y 10 resumen los datos de la velocidad lineal de los espermatozoides después de ser incubados con las hormonas. En este caso no se encontraron diferencias significativas. Aunque, se aprecia una tendencia hacia valores más altos de la VSL con la progesterona. La VSL fue de $12 \pm 1.8 \mu\text{m}/\text{seg}$, $11 \pm 1.6 \mu\text{m}/\text{seg}$, $10 \pm 1.5 \mu\text{m}/\text{seg}$ para progesterona, testosterona y estradiol respectivamente.

Con respecto a la ALH (figura 3, 7 y 11) el perfil de comportamiento para las 3 hormonas fue casi igual, por lo tanto no se encontraron diferencias significativas. Los valores promedio de la ALH para progesterona, estradiol y testosterona fueron: $2.3 \pm 0.3 \mu\text{m}/\text{seg}$, $2.58 \pm 0.5 \mu\text{m}/\text{seg}$, $2.3 \pm 0.3 \mu\text{m}/\text{seg}$.

Los valores de la frecuencia de batido de flagelo (figura 4, 8 y 12) fueron más altos para los espermatozoides que se incubaron con estradiol ($48 \pm 2.3\text{Hz}$) seguidos por la testosterona ($46 \pm 2.4 \text{Hz}$) y los de progesterona ($44 \pm 2.6 \text{Hz}$).

En cuanto al análisis estadístico para esta variable, solo se encontraron diferencias significativas en la incubación de espermatozoides con testosterona en las concentraciones más altas.

Como podemos observar los espermatozoides incubados con testosterona fueron los que presentaron diferencias significativas en dos de sus variables de movilidad (VCL y BCF) en comparación con la progesterona y estradiol que solo mostraron diferencias significativas en VCL.

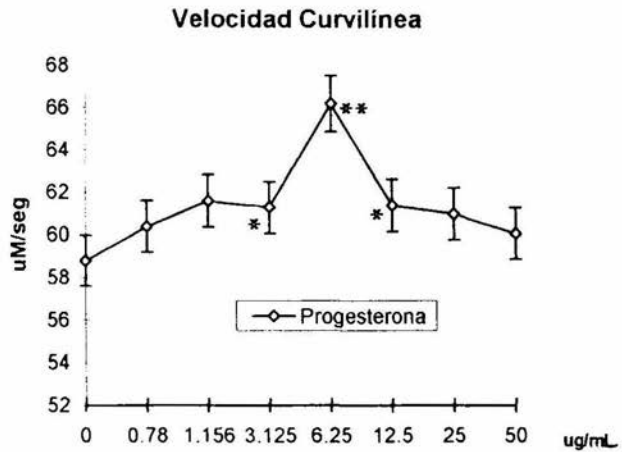


Figura 1. Efecto de la progesterona sobre la velocidad curvilínea de los espermatozoides. Los valores se representan en $\bar{X} \pm D.E.$ con una $N= 15$, observando diferencias significativas con respecto a su control ($P < 0.05$ y $P < 0.001$)

*** $P < 0.05$**

**** $P < 0.001$**

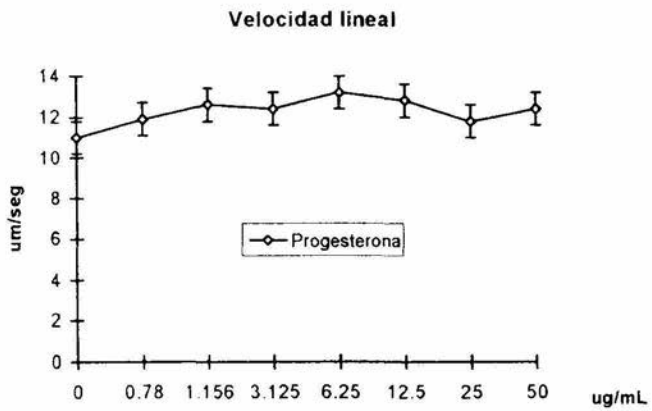


Figura 2. Efecto de la progesterona sobre la velocidad lineal de los espermatozoides. Los valores se representan en $\bar{X} \pm D.E.$ con una $N=15$, no se encontraron diferencias significativas.

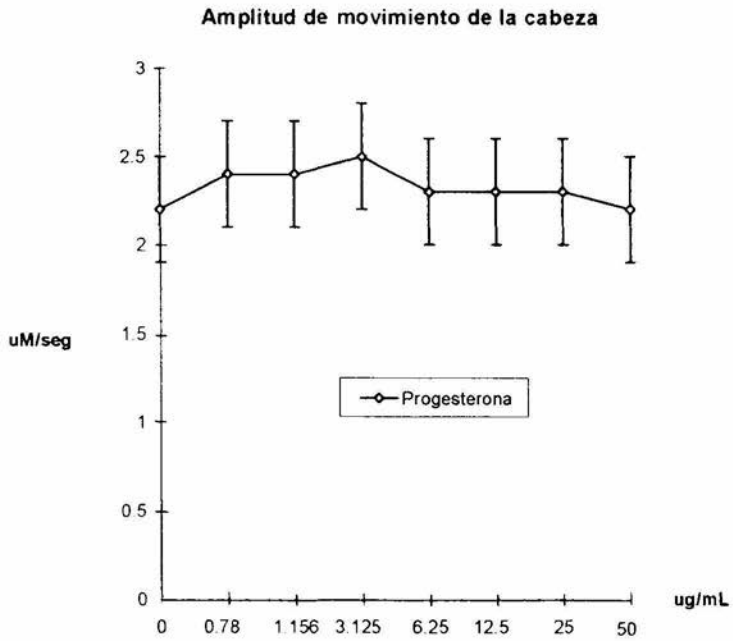


Figura 3. Efecto de la progesterona sobre la amplitud de movimiento de la cabeza de los espermatozoides. Los valores se representan en $\bar{X} \pm D.E.$ con una N= 15, no se encontraron diferencias significativas

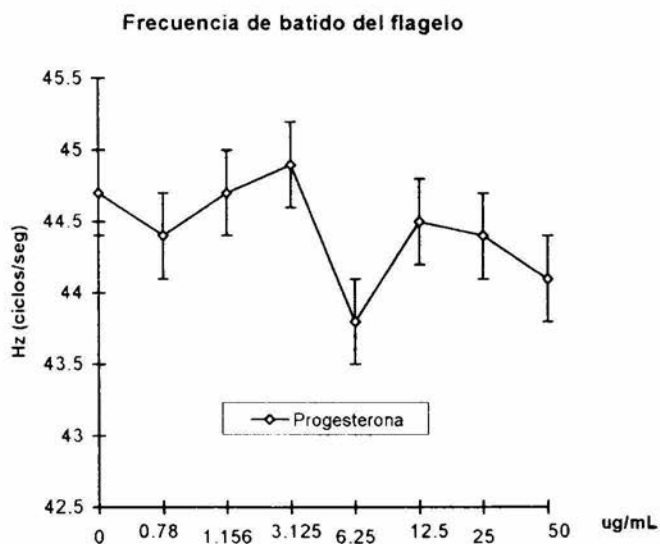


Figura 4. Efecto de la progesterona sobre el bateo del flagelo de los espermatozoides. Los valores se representan en $\bar{X} \pm D.E.$ con una $N= 15$, no se encontraron diferencias significativas

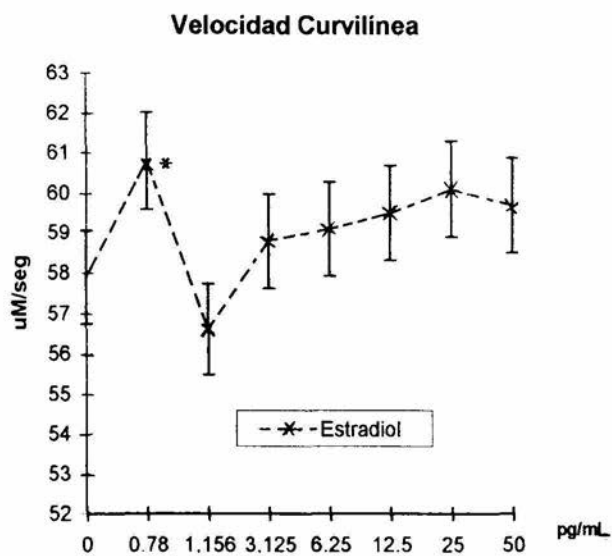


Figura 5. Efecto del estradiol sobre la velocidad curvilinea de los espermatozoides. Los valores se representan en $\bar{X} \pm D.E.$ con una $N= 15$, observando diferencias significativas con respecto a su control ($P < 0.05$)

* $P < 0.05$

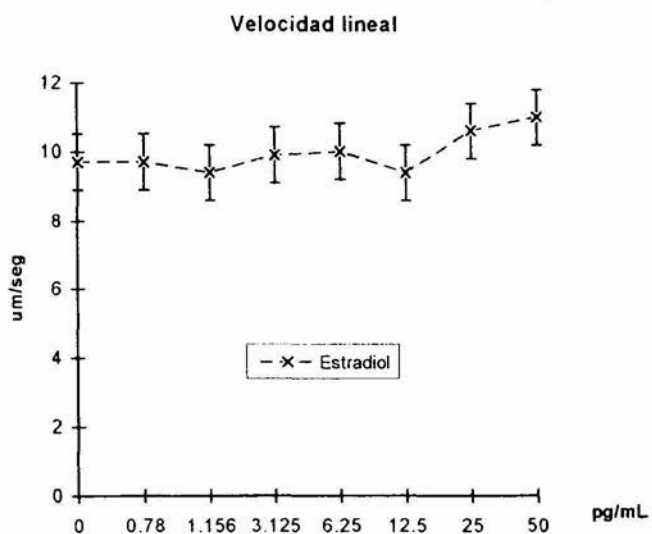


Figura 6. Efecto del estradiol sobre la velocidad lineal de los espermatozoides. Los valores se representan en $\bar{X} \pm D.E.$ con una $N=15$, no se encontraron diferencias significativas.

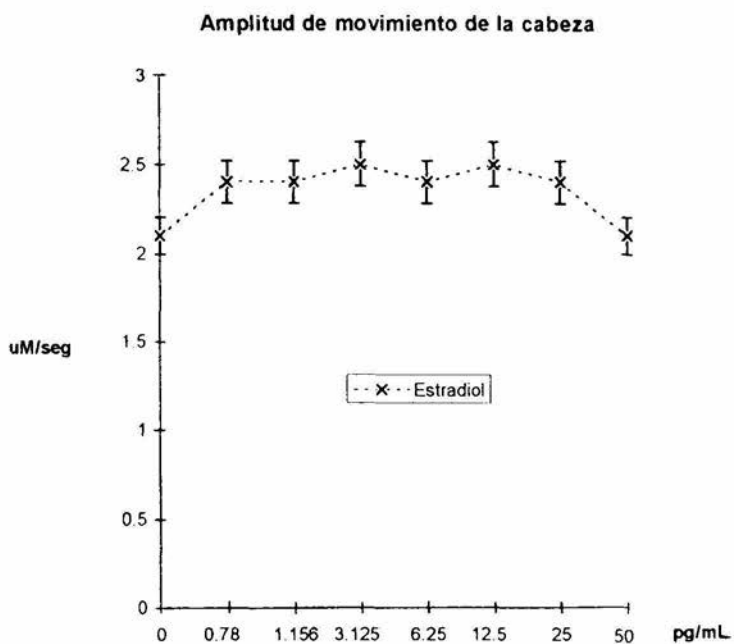


Figura 7. Efecto del estradiol sobre la amplitud de movimiento de la cabeza de los espermatozoides. Los valores se representan en $\bar{X} \pm D.E.$ con una $N= 15$, no se encontraron diferencias significativas

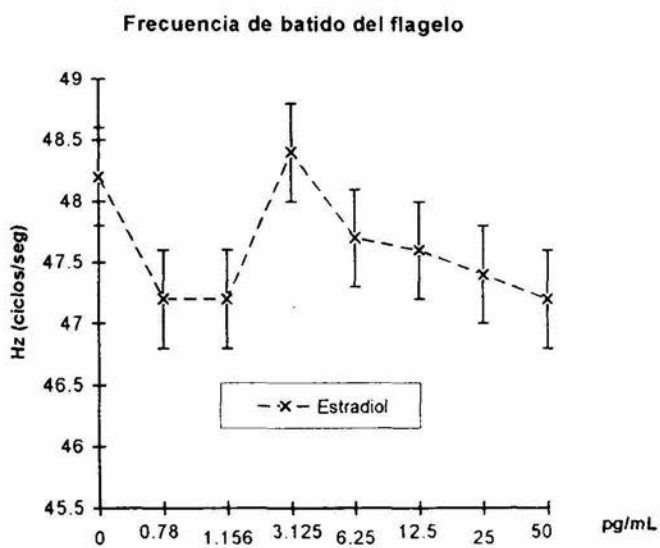


Figura 8. Efecto del estradiol sobre el bateo del flagelo de los espermatozoides. Los valores se representan en $\bar{X} \pm D.E.$ con una $N= 15$, no se encontraron diferencias significativas

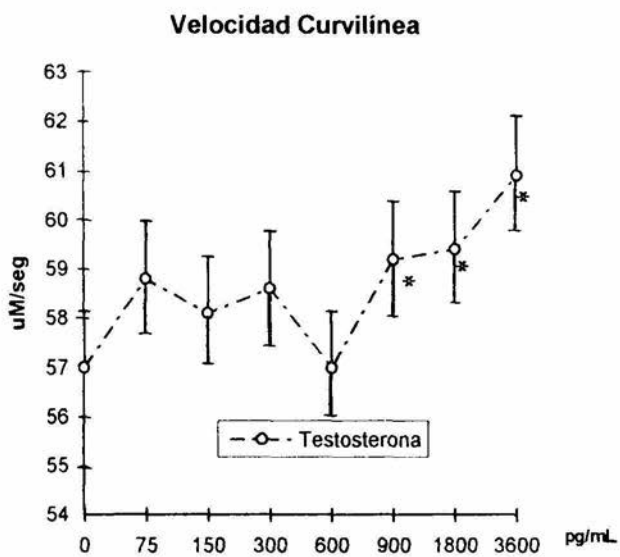


Figura 9. Efecto de la testosterona sobre la velocidad curvilínea de los espermatozoides. Los valores se representan en $\bar{X} \pm D.E.$ con una $N= 15$, observando diferencias significativas con respecto a su control ($P < 0.001$)

* $P < 0.001$

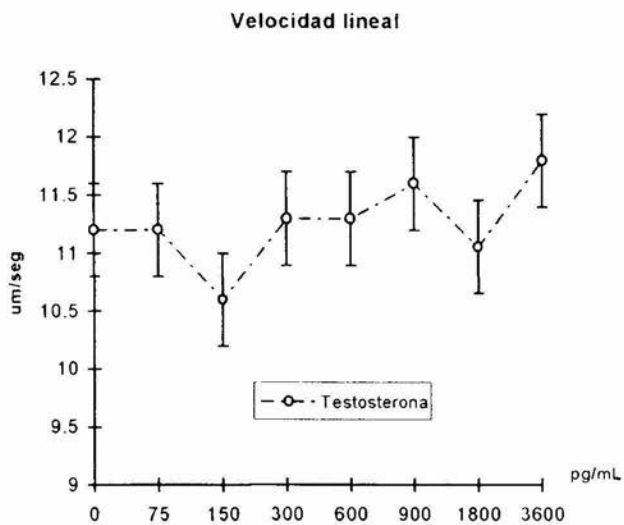


Figura 10. Efecto de la testosterona sobre la velocidad lineal de los espermatozoides. Los valores se representan en $\bar{X} \pm D.E.$ con una $N= 15$, no se encontraron diferencias significativas.

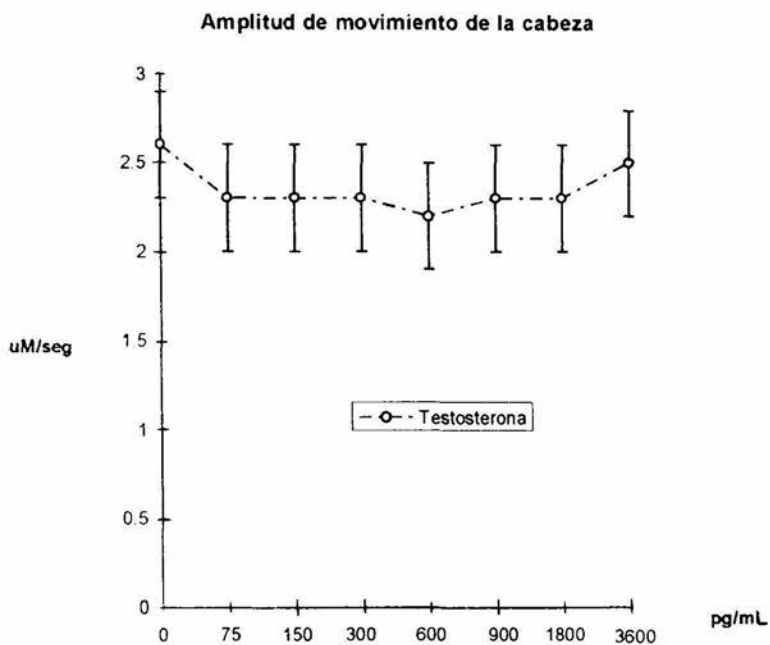


Figura 11. Efecto de la testosterona sobre la amplitud de movimiento de la cabeza de los espermatozoides. Los valores se representan en $\bar{X} \pm D.E.$ con una N= 15, no se encontraron diferencias significativas.

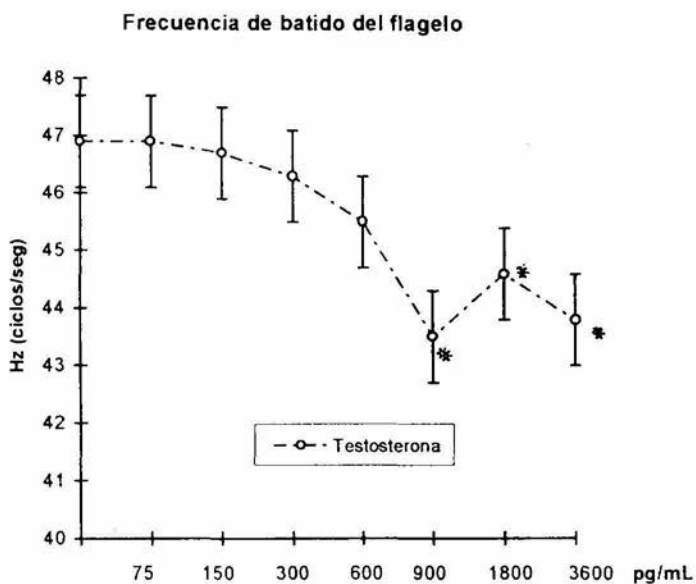


Figura 12. Efecto de la testosterona sobre el bateo del flagelo de los espermatozoides. Los valores se representan en $\bar{X} \pm D.E.$ con una $N= 15$, encontrando diferencias significativas con respecto a su control ($P < 0.001$)

* $P < 0.001$

DISCUSION

El presente trabajo se centra en el análisis del efecto *in vitro* de los esteroides sexuales en la movilidad de los espermatozoides humanos. Este aspecto de la fisiología espermática, se ubica en el contexto de los fenómenos que ocurren cuando los gametos masculinos invaden el aparato genital femenino y migran a través del útero para encontrar al ovocito en el tercio distal de la trompa de Falopio. El estudio de estos procesos adquiere particular importancia porque se sabe que los estrógenos inducen cambios en la actividad metabólica de los gametos masculinos y recientemente se han involucrado a estas hormonas, particularmente a la progesterona, en dos eventos que juegan un papel preponderante en la fertilización y que aparentemente se encuentran ligados: la quimioatracción y la reacción acrosomal (Uhler y col., 1992).

La calidad de movimiento de los espermatozoides humanos se analizó con el equipo computarizado Hamilton-Thorn después de la incubación *in vitro* con los diferentes esteroides sexuales, a concentraciones equivalentes a las que se encuentran en el líquido folicular de folículos preovulatorios. Con el uso de este tipo de instrumentos se han identificado diferentes patrones de la movilidad espermática, que aparentemente se relacionan con los cambios fisiológicos que ocurren mientras los espermatozoides adquieren su capacidad fecundante. En estudios previos se ha caracterizado al estado de hiperactivación espermática, descrito inicialmente con el microscopio de luz. Este se manifiesta por la pérdida de la linealidad en el desplazamiento de los espermatozoides y se asocia con cambios específicos como son el incremento de la velocidad curvilínea (VCL), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y de la frecuencia de batido del flagelo (BCF) (Zhu y col., 1994).

En nuestros experimentos la progesterona originó un incremento en la VCL a todas las concentraciones probadas; además, en el intervalo de concentraciones entre 3.125 y 12.5 µg/mL ocurrió un incremento significativo en este parámetro de movilidad. Los valores

máximos de la VCL se presentaron con la concentración de 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, alcanzando $66.2 \pm 3.4 \mu\text{m}/\text{seg}$. La progesterona no produjo ningún cambio en la velocidad lineal, frecuencia de batido del flagelo ni en el desplazamiento lateral de la cabeza a las concentraciones probadas.

De acuerdo con la experiencia de Falcone y col., 1991; Uhler y col., 1992; y Fusi y col., 1994, parece ser que la progesterona es importante para mantener la viabilidad de los espermatozoides en el aparato genital femenino y para incrementar la probabilidad de contacto con el ovocito. Por otra parte, se ha relacionado claramente a este esteroide con los mecanismos de activación de la reacción acrosomal. Todos estos efectos de la progesterona parecen estar mediados por su interacción con receptores membranales dado que se presentan en un tiempo muy corto, y aparentemente no son inhibidos por la conjugación del esteroide con macromoléculas que no atraviesan la membrana celular del espermatozoide, por lo que estos mecanismos son concentración-dependiente.

El efecto *in vitro* de la progesterona en la VCL ocurre, como lo demuestran los experimentos realizados, también en forma concentración-dependiente y en un periodo corto (15 minutos) lo cual apoya también la idea de que este efecto es mediado por receptores en la membrana celular, de manera similar a lo que se ha descrito para la reacción acrosomal y la hiperactivación. La especificidad de este efecto no pudo ser demostrada en los experimentos que aquí se presentan, pero la información en la literatura indica que las acciones que se producen por la interacción de este esteroide en la superficie del gameto masculino no son compartidas por otros esteroides que guardan una conformación estereoquímica similar (Morales y col., 1992).

Con los resultados obtenidos en los experimentos que se describen arriba y el análisis de la información en la literatura, podrían plantearse tres situaciones diferentes: una es la posibilidad de que tanto la quimioatracción como la activación de los espermatozoides, tengan lugar por la interacción de la progesterona en el mismo sitio receptor. Dos, que los efectos de la progesterona, que implican probablemente la activación de las cinasas encargadas de la fosforilación de las proteínas de la cola del espermatozoide, sean mediados por receptores diferentes de aquellos que se encuentran involucrados en un proceso mas

complejo como es la reacción acrosomal. Tres, que ambos fenómenos (quimiotaxis y reacción acrosomal) son regulados por el mismo sitio receptor en forma concentración-dependiente. A este respecto, se ha observado que la reacción acrosomal es inducida por la progesterona a concentraciones alrededor de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Morales y col., 1992). En cambio, Uhler y col. (1992) demostraron que el patrón de hiperactivación puede ser inducido a concentraciones tan bajas como 3.1 ng/mL y que el incremento a concentraciones hasta de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no modifica el porcentaje de células que presentan este patrón. En el presente trabajo el incremento máximo de la VCL se observó en el intervalo entre las concentraciones de 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que es el rango de dosis en el que ocurre el fenómeno de quimiotaxis.

Si se analizan los datos de estudios en los que se han manejado condiciones semejantes a las que se utilizaron en estos experimentos (Zhu y col., 1994) el cambio en el patrón de movilidad de los espermatozoides humanos inducido por la progesterona, no se parece a lo reportado para el estado de hiperactivación. El perfil de hiperactivación se caracteriza por un incremento de la VCL ($> 90 \mu\text{m}/\text{seg}$), disminución de la LIN ($< 65\%$) e incremento de la ALH ($> 7.5 \mu\text{m}$). El patrón de movilidad espermática que se encontró en nuestros experimentos corresponde al patrón que se ha denominado como "progresivo" por Zhu y col. (1994). Esto podría interpretarse como una evidencia de que a las concentraciones de progesterona que se encuentran en el líquido folicular de folículos preovulatorios, los efectos que causa este esteroide serían promotores de la quimiotaxis y quimioquinesis.

La respuesta de la movilidad espermática a la incubación con estradiol se caracterizó por un incremento de la VCL que alcanzó su máximo a la concentración de 0.78 pg/mL ; llegando a los valores basales que se observaron con la incubación con progesterona. A concentraciones de 1.156 pg/mL , el estradiol produjo una inhibición de la VCL pero a las concentraciones entre 3.125 pg/mL y 50 pg/mL su efecto fue estimulador de la VCL, pero no alcanza los valores que se obtuvieron con la progesterona, por lo consiguiente el movimiento que presentaron los espermatozoides es aparentemente de una

quimiocinesis. Como en el caso de la progesterona, el estradiol no modificó la velocidad lineal, el desplazamiento de la cabeza del espermatozoide ni la frecuencia de batido del flagelo.

Los efectos *in vitro* de la testosterona a concentraciones similares a las que se encuentran en el líquido folicular de folículos preovulatorios, fueron el aumento de la VCL en las concentraciones de 900 pg/mL, 1800pg/mL y 3600 pg/mL que alcanzaron los valores basales de la progesterona, también se observa una disminución de la frecuencia de batido de flagelo en una forma concentración-dependiente. Sin embargo, no se encontraron diferencias para la velocidad lineal y desplazamiento lateral de la cabeza.

El resultado de los experimentos de incubación *in vitro* de los diferentes esteroides concuerda satisfactoriamente con los resultados de experimentos que hemos realizado para estudiar el efecto quimiotáctico de la progesterona (Villanueva y col., 1995). En estos estudios, la progesterona a concentraciones entre 6.25 µg/mL y 12.5 µg/mL se comporta como un agente quimiotáctico, el estradiol a dosis similares a las que se probaron *in vitro* aquí, produce un efecto que se puede catalogar como quimiocinético; y la testosterona no se relaciona con ninguno de estos efectos, de hecho parece inhibir la migración espermática a concentraciones altas de 900pg/mL a 3600pg/mL observandose específicamente en la frecuencia de bateo del flagelo.

Estos datos no son similares a lo reportado por Beck y col. (1976) en su estudio en el que valora la distancia de migración de espermatozoides en un tubo capilar con diferentes esteroides naturales y sintéticos. De acuerdo con los datos de este autor, la migración de espermatozoides incubados en estradiol es mayor que la que se aprecia con progesterona, testosterona, norgestrel, lynestrenol y estriol. Estas diferencias podrían ser en las concentraciones de los esteroides probadas por estos autores, ya que fueron las que se encuentran en el suero de la mujer en el ciclo menstrual, y las que nosotros utilizamos son del líquido folicular de folículos preovulatorios.

No existen reportes de la concentración de las hormonas esteroides que se encuentra en la luz de las trompas de Falopio o del útero en la etapa periovulatoria por lo que es difícil establecer el rango de las concentraciones que deben ser probadas en experimentos *in vitro*

para semejar las condiciones a las que se enfrenta el espermatozoide durante su migración.

Recientemente Shwa y col. (1994) en estudios de quimiotaxis *in vitro* reporta datos que son congruentes con los que encontramos en nuestros experimentos dado que observa que la migración de espermatozoides, estudiada en un sistema de doble cámara, es estimulada por la progesterona pero no por el estradiol ni la testosterona, todos estos a concentraciones parecidas a las que nosotros probamos. Estos autores analizaron la respuesta a tiempos prolongados (1-5 Horas) por lo que resulta un poco difícil comparar lo que ellos encontraron sean efectos mediados por los esteroides.

Asumiendo, como ya se dijo, que los efectos de las hormonas esteroides aquí reportados fueran regulados por receptores de membrana (Tesarik y col., 1992), surge una pregunta interesante en relación a la interacción de los diferentes esteroides y su efecto final en la movilidad del espermatozoide. Existe la posibilidad de que *in vivo*, los efectos finales de estas sustancias sobre los espermatozoides, sean la expresión de un efecto combinado en el que podrían también verse implicadas otras sustancias presentes en el líquido folicular y/o en el aparato genital. También resulta interesante analizar la posibilidad de que algunas de estas sustancias se secreten o concentren de manera distinta dependiendo del sitio del aparato genital que se estudie (endometrio, trompa de falopio) y que finalmente estos efectos modifiquen el patrón de migración de espermatozoides en el aparato genital de la hembra.

Evidencias recientes apuntan a que las células del endometrio y sus productos de secreción modifican el patrón de movimiento de los espermatozoides humanos y a que estos efectos muy probablemente se relacionan con los esteroides (Bastias y col., 1993; Fusi y col., 1994).

Mbizvo y col.(1990) al estudiar el efecto de diferentes mezclas de E2 y P4, sobre la movilidad del espermatozoide humano, encontró diferencias significativas en mezclas con concentraciones bajas de E2 y P4, en cuanto a la movilidad progresiva, linealidad y longevidad del espermatozoide en comparación con las otras mezclas. Al incubar solo estradiol en diferentes concentraciones, observó también un mayor porcentaje de movilidad lineal y longevidad al compararlas con las de progesterona y los controles. Estos datos

sugieren que en condiciones *in vivo* se combinan los efectos de ambos esteroides y producen un estado que favorece, por una parte, mayor longevidad de los espermatozoides y por otra los cambios que acompañan a la capacitación espermática.

Sería pertinente realizar en el futuro estudios *in vitro* con tiempos de incubación cortos y prolongados con diferentes mezclas de los esteroides, que se encuentran en el aparato genital femenino para tratar de averiguar el comportamiento del gameto masculino en situaciones similares a las que puede encontrar en su migración hacia el sitio de fertilización.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha demostrado, mediante el análisis de la movilidad espermática en un sistema computarizado, que los esteroides sexuales testosterona, estradiol, progesterona, a las concentraciones que se encuentran en el líquido folicular de folículos preovulatorios tienen efectos diferentes en la VCL, VSL, ALH y BCF.

El efecto de la progesterona se caracterizó por un aumento de la velocidad curvilínea.

El estradiol induce también un incremento de la velocidad de desplazamiento del espermatozoide pero de menor magnitud que el que produce la progesterona.

El efecto de la testosterona se observó a concentraciones altas en VCL siendo estimulada y en BCF fue principalmente de tipo inhibitorio

Todos estos datos implican que la interacción de los diversos esteroides en el aparato genital femenino con el espermatozoide es compleja por lo que sería interesante analizar a diferentes tiempos de incubación, el efecto de diferentes mezclas de progesterona y estradiol tratando de simular las condiciones que el espermatozoide encuentra durante su migración hacia el sitio de la fertilización.

REFERENCIAS

- Bastias, M.C., Kamijo y Osteen, K.G. 1993. Assessment of human sperm functional changes after *in-vitro* coincubation with cells retrieved from the human female reproductive tract. *Hum Reprod.*; **8** :1670-1677
- Beck, K.J., Herschel, S., Hungershofer, R. y Schwinger, E. 1976. The effect of steroid hormones on motility and selective migration of X- and Y-bearing human spermatozoa. *Fertil Steril.*; **27**:407-412.
- Boettcher, V. y Kay, D.J. 1973. Agglutination of spermatozoa by human sera with added steroids. *Androl.*; **5**:265-271.
- Bomsel, H.O., Gougeon, A., Thebault, A., Saltarelli, D., Milgrom, E., Frydman, R. 1979. Healthy and atretic human follicles in the preovulatory phase: differences in evolution of follicular morphology and steroid content of follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab.*; **48**:686--94.
- Burkman, L.J. 1991 Discrimination between non hiperactivated and classical hiperactivated motility patterns in human spermatozoa using computerized analysis. *Fertil Steril.*; **55** :363-371.
- Calvo, L., Vantman, D., Banks, S.M., Tezon, J., Koukoulis, G.N., Dennison, L. y Sherins, R.J. 1989. Follicular fluid-induced acrosome reaction distinguishes a subgroup of men with unexplained infertility not identified by semen analysis. *Fertil Steril.*; **52**:1048-1054.
- Chan, S.Y.W., Tang, L.C.H. y Ma, H. 1983. Stimulation of the zona-free hamster ova penetration efficiency by human spermatozoa after 17beta-estradiol treatment. *Fertil Steril.*; **39**:80-84.
- Cheng, C.Y. y Boettcher, B. 1979. The effect of steroids on the *in vitro* migration of washed human spermatozoa in modified Tyrode's solution of in fasting human blood serum. *Fertil Steril.*; **32**:566-570.

- Díaz P. M., Zárate, G.M.; Sánchez, M.M., Flores, R.A. y Villanueva, D.C. 1995 Factores que alteran los resultados del análisis computarizado del semen. *Perinatol Reprod Hum*; **9**:208-15.
- Falcone, L. Soldati, G., Piffaretti-Yañez, A., Marchini, M., Eppemberger, U. y Balerna, M. 1991. Follicular fluid enhances sperm motility and velocity *in vitro*. *Fertil Steril* ; **55**:619-623.
- Foresta, C., Fossato, M.D. y Virgilio, F. 1995 Differential modulation by protein kinase C of progesterone activated responses in human sperm. *Biochem Biophys Res Commun*; **206** : 408-413
- Fusi, F.M., Viganò, P., Daverio, R., Busacca, M. y Vignali, M. 1994. Effects of the coculture with human endometrial cells on the function of spermatozoa from subfertile men. *Fertil Steril*; **61**:160-167
- Gee, K.; Bolger, M., Brinton, R., Corini, H. y McEwen, B. 1988. Steroid modulation of the choride ionophore in rat brain: structure-activiti requirements, regional dependence and mechanism of action. *J. Pharm Exp Therap*; **246**: 803-812.
- Hicks, J.J., Pedron, N. y Rosado, A. 1972. Modifications of human spermatozoa glycolysis by cyclic adenosine monophosphate (cAMP), estrogens, and follicular fluid. *Fertil Steril*; **23**:886-893.
- HTM-IVOS Motility analyzer. 1992. Operations manual. Hamilton Thorn Research Inc: Beverly Mass.
- Kaiser, R. y Schumacher, B. 1986. Reproducción Humana. Salvat, Barcelona , España, pp 406
- Lowther, C.R., Mathew, J.T. y Cooke, J.D. 1993. Prognostic significance of computerized motility analysis for *in vivo* fertility. *Fertil. Steril*; **60** :520-524.
- Loza, Arredondo, M.C., Lemus, A.E., Pérez, Palacios, G. (1988). Metabolismo de las hormonas esteroides. En Hicks, J.J.,Diaz, Z.J. Bioquímica e Inmunología. Facultad de Medicina UNAM., México, D.F., vol 2, pp 153-92

- Macleod, I.C., Irvine, D.S., Masterton, A., Taylor, A. y Templeton, A. 1994. Assessment of the conventional criteria of semen quality by computer-assisted image analysis: evaluation of the Hamilton-Thorn motility analyser in the context of a service andrology laboratory. *Hum Reprod*; **9**:310-319.
- Mbizvo, M.T., Burkman, L.J. y Alexander, N.J. 1990. Human follicular fluid stimulates hyperactivated motility in human sperm. *Fertil Steril*; **54**:708-712.
- Mbizvo, M.T., Thomas, S., Fulgham, D. y Alexander, N. 1990. Serum hormone levels affect sperm function. *Fertil Steril*; **54**: 113-119
- Montoya, E. 1988. Hormonas hipotálamo-hipofisarias, hormonas tiroideas, hormonas de la cápsula suprarrenales y control hormonal del metabolismo de calcio y fósforo. En Bioquímica, Herrera, E., Interamericana, Madrid, España, pp 907-32
- Morales, P., Llanos, M., Gutiérrez, G., Kohen, P., Vigil, P. y Vantman, D. 1992. The acrosome reaction-inducing activity of individual human follicular fluid samples is highly variable and is related to the steroid content. *Hum Reprod*; **7**:646-651.
- OMS (1992) Manual de laboratorio para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Buenos Aires, Argentina. Medica Panamericana, S.A.
- Osman, R.A., Adria, M.L., Jones, A.D. y Meizel, S. 1989 Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun*; **160**:828-833.
- Parinaud, J., Labal, B. y Vieitez, G. 1992. High progesterone concentrations induce acrosome reaction with low cytotoxic effect. *Fertil Steril*; **58**:599-602.
- Pérez, P.G., Larrea, F., Cerbón, M.A., Vilchis, F. 1988. Mecanismo de acción de las hormonas esteroides. En Hicks, J. J., Diaz, Z.J. Bioquímica e Inmunología. Facultad de Medicina UNAM, Mexico, D.F., vol. 2, pp 93-125
- Revelli, A., Soldati, G., Stamm, J., Massobrio, M., Topfer, P.E. y Balerna, M. 1992. Effect of volumetric mixtures of peritoneal and follicular fluid from the same woman on sperm motility and acrosomal reactivity *in vitro*. *Fertil Steril*; **57**:654-660.

- Russell, O.D., Rothmann, S., Overstreet, J.W. 1992. Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. *Fertil Steril*; **57** :648-653.
- Shwa, L. 1995. Effect of some sex steroid hormones on human spermatozoa migration in vitro. *Eur.J. Obst. & Gyn. Reprod. Biol.*; **58**: 173-175.
- Siegel, M.S., Paulson, R. J. y Graczykowski, J.W. 1990. The influence of human follicular fluid on the acrosome reaction, fertilizing capacity and proteinase activity of human spermatozoa. *Hum Reprod*; **5**:975-980.
- Stevens, W. R., 1990. Basic spermatozoon Anatomy and Physiology for the Clinician. En Acosta, A.A., Swanson, R.L., Ackerman, S.B. (Eds.) *Human Spermatozoa, in Assisted Reproduction*. Williams y Wilkins, Baltimor, Maryland, pp, 678.
- Suárez, S.S., Wolf, D.P. y Meizel, S. 1986. Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamet Res*; **14**:107-121.
- Tesarik, M.D., Mendoza, C., Moos, J. y Carreras, A. 1992. Selective expression of a progesterone receptor on the human sperm surface. *Fertil Steril*; **58**: 784-792.
- Uhler, M.L., Leung, A., Chan S.Y.W. y Wang, C. 1992. Direct effects of progesterone and antiprogesterone on human sperm hyperactivated motility and acrosome reaction. *Fertil Steril*; **58**:1191-1198.
- Vaclau, Insteu. 1988. Mechanisms of fertilization in mammals. En Mastroianni L. Biggers, J. D. (Eds.) *Fertilization and Embryonic Development in vitro*. New York, Plenum Press. **81**:187
- Vantman, D.M., Banks, S.M., Koukoulis, G.M., Dennison, L.B. y Sherins, R.M. 1989. Assessment of sperm motion characteristics from fertile and infertile men using a fully automated computer-assisted semen analyzer. *Fertil Steril*; **51** :156-161.
- Villanueva, D.C., Arias, M. J., Bustos, L. H. y Vadillo, O. F. 1992. Novel model for study of human sperm chemotaxis. *Fertil. Steril* ; **58**: 392-5.
- Villanueva, D.C., Arias, M.J., Martínez, B.L. y Ortega, V.F. 1995. Progesterone induces human sperm chemotaxis. *Fertil. Steril*; **64** :1183.-1184.

- Windt, Marie L. 1990. Spermatozoa Separation. En Acosta, A.A., Swanson, R.L., Ackerman, S.B., (Eds.) Human Spermatozoa In Assisted Reproduction. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, pag. 85-90.

- Zhu, J.J., Pacey A.A., Barratt, C.L.R. y Cooke, I.D. 1994. Computer-assisted measurement of hyperactivation in human spermatozoa: differences between European and American version of the Hamilton-Thorn motility analyser. *Hum Reprod*; **9**:456-462.

A P E N D I C E

STAT.GENERAL MANOVA	MAIN EFFECT: CONCNTRA (tesmar.sta) 1-CONCNTRA			
depend. variable	Mean sqr Effect	Mean sqr Error	F (df1,2) 7,112	p-level
VCL Progesterona	66.08453	11.92262	5.542786	0.000017 *
VSL Progesterona	7.047622	4.92738	1.430297	0.200152
ALH Progesterona	0.1379	0.14948	0.922587	0.491947
BCF Progesterona	1.40846	7.55863	0.186339	0.987743

Cuadro 1. Análisis estadístico ANOVA simple de la progesterona sobre las características de movilidad de los espermatozoides.

* Diferencias significativas $p < 0.05$

MANOVA	LSDtest; variable VCL progesterona (tesmar.sta) Probabilities for Post Hoc Test MAIN EFFECT: CONCNTRA.							
CONCNTRA ug/mL	Control	0.78	1.156	3.125	6.25	12.5	25	50
	58.86666	60.4	61.6	61.33333	66	61.46667	61	60.93333
Control		0.2226491	0.032283*	0.052909	0.00000*	0.041508*	0.0934224	0.103991
0.78	0.2226491		0.343227	0.460694	0.000011*	0.399353	0.635088	0.673104
1.156	0.032283*	0.343227		0.83288	0.000402*	0.915969	0.635088	0.598022
3.125	0.052909	0.460694	0.83288		0.000190*	0.915969	0.791975	0.751643
6.25	0.00000*	0.000011*	0.000402*	0.000190*		0.000278*	0.000072*	0.000059*
12.5	0.041508*	0.399353	0.915969	0.915969	0.000278*		0.711986	0.673104
25	0.0934224	0.635088	0.635088	0.791975	0.000072*	0.711986		0.9579225
50	0.103991	0.673104	0.598022	0.751643	0.000059*	0.673104	0.9579225	

Cuadro 2. Comparación de medias mediante la prueba LSD de la progesterona sobre la VCL.

* Diferencias significativas $p < 0.05$.

STAT.GENERAL MANOVA	MAIN EFFECT: CONCNTRA (tesmar.sta) 1-CONCNTRA			
depend. variable	Mean sqr Effect	Mean sqr Error	F(df1,2) 6,98	p-level
VCL Estradiol	30.81905	12.78503	2.410557	0.0322423 *
VSL Estradiol	5.39683	3.96463	1.361245	0.237892
ALH Estradiol	0.16965	0.27159	0.624654	0.710147
BCF Estradiol	3.57587	6.20558	0.576235	0.748421

Cuadro 3. Análisis estadístico ANOVA simple del estradiol sobre las características de movilidad de los espermatozoides.

* Diferencias significativas $p < 0.05$

STAT GENERAL	LSDtest; variable VCL estradiol (tesmar.sta) Probabilities for Post Hoc Test MAIN EFFECT: CONCNTRA.							
MANOVA								
CONCNTRA pg/mL	Control	0.78	1.156	3.125	6.25	12.5	25	50
	57.93333	60.83333	68	56.73333	58	59.53333	60	59.73333
Control		0.0145645*	0.030479	0.360302	0.959381	0.223338	0.116669	0.171143
0.78	0.373027*		0.879457	0.360302	0.675986	0.342589	0.875643	0.675234
1.156	0.030479	0.879457*		0.002215	0.034461	0.334357	0.541474	0.415925
3.125	0.360302	0.124267	0.002215		0.034461	0.034461	0.014006	0.023103
6.25	0.959381	0.675986	0.034461	0.034461		0.243081	0.128787	0.1874
12.5	0.223338	0.342589	0.334357	0.034461	0.243081		0.721541	0.878569
25	0.116669	0.875643	0.541474	0.014006	0.128787	0.721541		0.838587
50	0.171143	0.675234	0.415925	0.023103	0.1874	0.878569	0.838587	

Cuadro 4. Comparación de medias mediante la prueba LSD del estradiol sobre la VCL.

* Diferencias significativas $p < 0.05$.

STAT.GENERAL MANOVA depend. variable	MAIN EFFECT: CONCNTRA (tesmar.sta) 1-CONCNTRA				
	Mean sqr Effect	Mean sqr Error	F(df1,2) 6,98	p-level	
VCL Testosterona	24.4381	7.44286	3.283429	0.00327	*
VSL Testosterona	1.98095	4.10357	0.482739	0.845407	
ALH Testosterona	79.0919	79.55931	0.994125	0.439345	
BCF Testosterona	27.468722	5.21645	5.265785	0.000032	*

Cuadro 5. Análisis estadístico ANOVA simple de la testosterona sobre las características de movilidad de los espermatozoides.

* Diferencias significativas $p < 0.05$

STAT GENERAL MANOVA	LSDtest; variable VCL testosterona (tesmar.sta) Probabilities for Post Hoc Test MAIN EFFECT: CONCNTRA.							
CONCNTRA pg/mL	Control	75	150	300	600	900	1800	3600
	57.06667	58.86666	58.13334	58.66667	57.06667	59.2	59.4	60.93333
Control		0.073463	0.286582	0.111061	1.000001	0.034400*	0.020933*	0.000176*
75	0.073463		0.463183	0.841245	0.73463	0.738545	0.593451	0.040317*
150	0.286582	0.463183		0.593451	0.286582	0.286582	0.206178	0.005836*
300	0.111061	0.841245	0.593451		0.111061	0.593451	0.463183	0.024788*
600	1.000001	0.73463	0.286582	0.111061		0.034400*	0.020933*	0.000176*
900	0.034400*	0.738545	0.286582	0.593451	0.034400*		0.841245	0.08461
1800	0.020933*	0.593451	0.206178	0.463183	0.020933*	0.841245		0.126574
3600	0.000176*	0.040317	0.005836	0.024788	0.000176*	0.08461	0.1226574	

Cuadro 6. Comparación de medias mediante la prueba LSD de la testosterona sobre la VCL.

* Diferencias significativas $p < 0.001$.

STAT GENERAL	LSDtest; variable testosterona BCF (tesmar.sta) Probabilities for Post Hoc Test MAIN EFECT: CONCNTRA.							
MANOVA								
CONCNTRA pg/mL	Control	75	150	300	600	900	1800	3600
	46.94	46.62667	46.74667	46.30667	45.55333	43.57333	44.68	43.8
Control		0.707845	0.817101	0.449204	0.099168	0.000099*	0.007789*	0.000267*
75	0.707845		0.885848	0.701927	0.200749	0.000385*	0.0221369*	0.000968*
150	0.817101	0.885848		0.598828	0.155247	0.000232*	0.014702*	0.000598*
300	0.449204	0.701927	0.598828		0.368307	0.001395*	0.053617	0.003271*
600	0.099168	0.200749	0.155247	0.368307		0.019291*	0.97269	0.037762*
900	0.000099*	0.000385*	0.000232*	0.001395*	0.019291*		0.187219	0.786285
1800	0.007789*	0.0221369*	0.014702*	0.053617	0.97269	0.187219		0.2293615
3600	0.000267*	0.000968*	0.000598*	0.003271*	0.037762*	0.786285	0.2293615	

Cuadro 7. Comparación de medias mediante la prueba LSD de la testosterona sobre el BCF.

* Diferencias significativas $p < 0.001$.