



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACION

11262
1
EJ2

TESIS

"IDENTIFICACION DE ACTIVIDAD QUIMIOFACTICA PARA ESPERMATOZOIDES EN
EL LIQUIDO FOLICULAR HUMANO"

QUE PRESENTA:

Marco Antonio Avila Vergara

PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias Médicas

México, D.F.

1993.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

INDICE

	Página
Introducción	1
Antecedentes	3
Objetivos	22
Hipótesis	22
Material y métodos	23
Resultados	28
Conclusiones	40
Comentarios	41
Bibliografía	44

INTRODUCCION.

La fertilización es el proceso por medio del cual dos células sexuales (gametos) se fusionan para formar un nuevo individuo con potenciales genéticos derivados de ambos progenitores (1). En el ser humano, para que este proceso se lleve a cabo en condiciones naturales es necesario que la mujer sana en etapa reproductiva, durante el ciclo menstrual libere un ovocito maduro, lo cual ocurre aproximadamente en cada mitad del ciclo; y por otra parte, que de los millones de espermatozoides depositados en la vagina durante el coito, unos cuantos sean capaces de alcanzar la región ampular de la trompa de Falopio, que es el sitio donde se lleva a cabo la fertilización (2-4). Se han propuesto una serie de mecanismos por medio de los cuales el espermatozoide alcanza el sitio de la fertilización, tales como: la motilidad intrínseca del espermatozoide, la contractilidad uterina y vaginal, los movimientos ciliares y peristálticos de la trompa de Falopio, así como propiedades biofísicas y bioquímicas de las secreciones del aparato genital femenino (5-11); que por sí mismos no explican la eficiencia en el transporte selectivo del espermatozoide dentro del tracto genital femenino, el cual requiere de un incremento en la motilidad intrínseca y orientación de la dirección hacia el ovocito. Esto podría estar dado por factores contenidos en el líquido folicular (12-15). Por otra parte, las evidencias clínicas de migración transperitoneal del espermatozoide y fertilización del ovocito, en pacientes con un solo ovario y trompa contralateral, o en

condiciones en las cuales necesariamente el espermatozoide se traslada a través del peritoneo para alcanzar el sitio de la fertilización (16-22), sugieren la existencia de señales bioquímicas capaces de orientar el movimiento del espermatozoide hacia el ovocito en el humano. El origen de estas señales quimiotácticas podría ser el líquido folicular del ovocito maduro, tal y como ha sido demostrado en otras especies (23-26).

ANTECEDENTES.

TRANSPORTE DEL OVULO AL SITIO DE LA FERTILIZACION.

En la mayoría de los mamíferos, incluyendo al humano, el sitio de la fertilización es la región ampular de la trompa de Falopio (27); sitio al cual deben de arribar por una parte los espermatozoides depositados en la vagina durante el coito, y por otra parte el ovocito (óvulo) desprendido al momento de la ovulación del ovario. ¿Cómo alcanzan los gametos masculino y femenino (espermatozoide y óvulo) el sitio de la fertilización en el humano? Ha sido una pregunta resuelta parcialmente.

Al momento de la ovulación, el desarrollo del ovocito ha alcanzado el estadio de metafase de la segunda división meiótica, y es desprendido del ovario rodeado por la zona pelúcida y células foliculares que constituyen la corona radiada y cumulus oophorus (28). Se admite que las contracciones de las trompas uterinas ponen en estrecho contacto los extremos de la fimbria con la superficie del ovario, de suerte que el óvulo puede ser recogido por la trompa uterina y ser llevado hacia la región ampular por la combinación de las contracciones musculares, movimientos ciliares y circulación de las secreciones tubáricas (29,30), la permanencia del óvulo en la región ampular dura de 1 a 2 días, donde espera el arribo de los espermatozoides (3), y solamente si es fertilizado continuará su desarrollo (4).

TRANSPORTE DE LOS ESPERMATOZOIDES EN EL APARATO GENITAL FEMENINO.

Una vez llevada a cabo la espermatogénesis en los túbulos seminíferos, los espermatozoides son transportados pasivamente por las contracciones musculares, movimientos ciliares y circulación de las secreciones de los túbulos seminíferos hacia la rete testis y epidídimo, donde alcanzan su madurez y capacidad de movimiento (31).

Al momento de la eyaculación unos doscientos ochenta millones de espermatozoides son depositados en la vagina, y solamente unos 800 aproximadamente alcanzarán el sitio de la fertilización (27). La vagina constituye un medio hostil para los espermatozoides debido a su pH ácido, el cual es contrarrestado por la capacidad amortiguadora del moco cervical y plasma seminal, además de la propiedad del plasma seminal de formar un coágulo para mantener un mayor número de espermatozoides congregados cerca del orificio cervical externo, y de esta forma al desintegrarse permitir un mayor número de espermatozoides accesibles al moco cervical (32). El papel de las contracciones vaginales y uterinas, así como la presión negativa durante el coito para favorecer el transporte espermático no es muy claro en el humano (33); ya que aún en ausencia de orgasmo, los espermatozoides son capaces de ascender por el aparato genital femenino, tal y como sucede en los casos de inseminación artificial, en los cuales se han recuperado espermatozoides en la trompa de Falopio a los cinco minutos de efectuada la inseminación (34). Siendo claro que la motilidad propia del espermatozoide de 25-

50 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (35) y los factores mencionados no explican el rápido ascenso de los espermatozoides al sitio de la fertilización.

Transporte a través del cérvix. Las características biológicas y físico-químicas (contenido de leucocitos e inmunoglobulinas, filancia, cristalización, arborización, cantidad, viscosidad, etc) del moco cervical, solamente permiten la entrada de los espermatozoides en la fase folicular tardía y primeros días postovulatorios (36).

Una vez que los espermatozoides han penetrado el moco cervical pueden ocurrir los siguientes eventos:

a). Fase de transporte rápido de los espermatozoides, en la cual inmediatamente después del coito los espermatozoides alcanzan el orificio cervical interno a los 1.5-3 minutos después de la eyaculación, y algunos alcanzan el sitio de la fertilización a los 5 minutos, el transporte es facilitado por la contractilidad uterina y tubaria (34,37).

b). Fase de colonización de los reservorios. se caracteriza por la ocupación de las glándulas endocervicales, y es favorecida por las características fisicoquímicas del moco cervical y por las secreciones del aparato genital (38).

c). Fase de liberación lenta de los reservorios. los espermatozoides son liberados secuencialmente de los reservorios hasta 7 días después de la inseminación o coito (39).

Las funciones del cérvix en el transporte espermático incluyen:

a) Protección de los espermatozoides del medio hostil de la vagina, por medio de la acción amortiguadora del moco cervical sobre el pH ácido de la vagina.

b) Proveer un medio receptivo adecuado para la ocupación de los reservorios glandulares endocervicales por los espermatozoides en el período periovulatorio, y de restricción en otras fases del ciclo.

c) Suministro de los requerimientos energéticos del espermatozoide, por las secreciones cervicales y del aparato genital.

d) Función de filtro o barrera, por medio de la formación de filamentos de mucina en disposición de canales paralelos o de estructuras reticulares.

e) Regulación inmunológica, a través de una disminución de la cantidad de inmunoglobulinas (IgA, IgG), lisozima, lactoferrina, y de células fagocíticas a la mitad del ciclo menstrual.

f) Capacitación espermática.

Estas funciones del cérvix están reguladas fisiológicamente por el estado hormonal estrógeno-progestágeno del ciclo ovulatorio (5,8,9,40).

Transporte a través del útero. Se ha demostrado, en pacientes a quienes se ha efectuado aspiración de la cavidad uterina y conteo de espermatozoides posterior al coito o inseminación artificial, que se encuentra un mayor número de espermatozoides en el período

perioovulatorio, y solamente muy escasos en la fase folicular temprana o fase lútea tardía (10), por lo que además de la motilidad intrínseca del espermatozoide y la contractilidad uterina, influye en el transporte espermático la fase ovulatoria del ciclo menstrual (11).

Transporte en la trompa de Falopio. En el humano no existe un mecanismo de barrera para el ascenso de los espermatozoides en la unión útero-tubárica, a pesar de su diámetro tan reducido (0.1 a 1 mm), y una vez alcanzada la región istmica la mayoría de ellos permanecen ahí, hasta el momento de la ovulación (41); para trasladarse a la región ampular por su propia motilidad. La contractilidad tubaria, movimientos ciliares y flujo de las secreciones tubáricas no parecen ser indispensables para el transporte espermático, ya que en mujeres con enfermedad de Kartagener no hay actividad ciliar y logran embarazos a término (42). Los mecanismos fisiológicos que regulan la actividad muscular, ciliar y secretoria de la trompa uterina manteniendo un medio adecuado para el transporte espermático incluyen:

- a) Hormonas esteroideas (estradiol y progesterona).
- b) Catecolaminas (receptores adrenérgicos alfa y beta).
- c) Prostaglandinas.
- d) Péptidos (oxitocina, VIP, neuropéptido Y, sustancia P).
- e) Otras sustancias (AMPC, GABA) (32).

FUNCION DEL LIQUIDO FOLICULAR EN EL TRANSPORTE Y CAPACITACION DE LOS ESPERMATOZOIDES.

En otras especies de mamíferos, el transporte de los espermatozoides en el aparato genital femenino, es influido por la presencia de productos de la ovulación (óvulo o sus investimentos y líquido folicular) en la trompa uterina (15,43). En la mujer, el mayor número de espermatozoides se encuentra en la trompa uterina, en la cual se localiza el óvulo o lado en que se llevó a cabo la ovulación (Villanueva DC. Comunicación personal). Otros estudios confirman el hallazgo de un mayor número de espermatozoides en la trompa uterina, en presencia de un folículo maduro (11). Así mismo, el efecto del líquido folicular sobre los espermatozoides, fué propuesto desde las primeras observaciones de Yanagimachi y Chang en 1964, en las cuales se demostró el efecto capacitante del líquido folicular sobre los espermatozoides del hamster dorado; al fertilizar in vitro óvulos por espermatozoides obtenidos del epidídimo, en ausencia de secreciones uterinas y del oviducto. Este hallazgo ha sido confirmado en otras especies, incluyendo al humano (13,52,56).

Capacitación espermática. Los espermatozoides de los mamíferos, madurados en el epidídimo y eyaculados, no son capaces de fertilizar el ovocito, deben de permanecer en el aparato genital femenino por un tiempo antes de adquirir su capacidad para fertilizar el ovocito; durante su estancia en el aparato genital femenino sufren algunos

cambios fisiológicos que le permiten fertilizar al ovocito, a estos cambios funcionales se les denomina capacitación espermática (52,53). La capacitación es un proceso continuo que ocurre durante el transporte del espermatozoide a través del aparato genital femenino, y se inicia desde su paso a través del cérvix, y fisiológicamente completado hasta que alcanza el ovocito (a menos que los espermatozoides permanezcan por períodos prolongados en los reservorios del aparato genital femenino) (54,57).

Durante la capacitación espermática se modifica la configuración bioquímica de la membrana celular de la cabeza del espermatozoide, lo cual es indispensable para que se lleve a cabo la reacción acrosomal una vez que el espermatozoide hace contacto con la zona pelúcida del ovocito, resultando en la liberación de las enzimas proteolíticas (Acrosina, Hialuronidasa) contenidas en la vesícula acrosomal, y que le permiten penetrar la zona pelúcida y fertilizar al ovocito. En cuanto a las alteraciones bioquímicas que sufre el espermatozoide durante este proceso, existen dos hipótesis: Una que propone modificaciones en la bicapa de lípidos de la membrana celular; específicamente en el contenido de colesterol y fosfolípidos, lo cual provoca una desestabilización prematura de la membrana celular (58,59). Y otra que propone, que la reacción acrosomal tiene mucha similitud con los eventos de exocitosis de las células somáticas; los estímulos que inician la reacción acrosomal provienen del ovocito o sus productos (líquido folicular) (60-

63), los cuales activan proteincinasas a través de la vía receptor-proteína-G, y la formación de segundos mensajeros que activan la cascada de fosforilación (57). Al mismo tiempo durante la capacitación, se remueven factores "que cubren" (polímeros de galactosa y N-acetilglucosamina) la superficie externa del espermatozoide (56,64,66) y que le permiten reconocer moléculas específicas de la zona pelúcida (67). Por lo que además de las secreciones del aparato genital femenino en el proceso de capacitación espermática, el líquido folicular de los folículos maduros (folículos DeGraaf o folículos terciarios), no solamente tiene una función capacitante del espermatozoide (13,14,44,46), o de incremento en la motilidad y viabilidad de los espermatozoides (12,47,49); sino que también ejercería un efecto quimiotáctico hacia el espermatozoide, como ha sido demostrado en otras especies (50-51).

LIQUIDO FOLICULAR.

Formación de folículos. Aproximadamente, el día 24 de la vida fetal nacen células germinativas en el saco vitelino, más tarde, se desplazan hacia el surco gonadal durante la quinta semana del desarrollo para formar la gónada indiferenciada. Estas células germinativas inicialmente residen dentro de nidos sin estroma interpuesto, conocidos como las células del sicitio. La penetración de estroma entre los ovocitos señala el desarrollo de los folículos primordiales. La maduración del núcleo del ovocito en esta etapa se

detiene en la profase de la primera división meiótica, y la duración de este estado de reposo es variable. Los primeros cambios del desarrollo que tienen lugar cuando los folículos primordiales abandonan su estado inactivo y restablecen el desarrollo, son independientes de la estimulación por gonadotropinas. Morfológicamente, el ovocito aumenta el volumen desde 15 μm hasta 80-100 μm , se forma la zona pelúcida, y las células de la granulosa alrededor proliferan para formar dos o más capas. Estos folículos no tienen antro y se consideran folículos primarios. El proceso tiene lugar durante toda la etapa juvenil prepuberal y reproductora, incluyendo los años del climaterio, y no está afectado por gonadotropinas circulantes o por la dinámica de los esteroides sexuales (68,69). Cuando los folículos primarios maduran, empiezan a formarse pequeñas acumulaciones de líquido alrededor de las células de la granulosa. A medida que progresa el desarrollo, estos pequeños acumulos establecen coalescencia y se forma una cavidad llena de líquido (LIQUIDO FOLICULAR), o sea el antro. Al mismo tiempo que ocurren estos cambios aparece una capa de células de la teca vascular (teca interna), que está separada de las células de la granulosa por la lámina basal, y otra capa de células más externa avascular (teca externa). Estos cambios morfológicos marcan el desarrollo de folículos secundarios y terciarios. Estas etapas del desarrollo son dependientes de gonadotropinas (69-70).

La formación del folículo antral es un indicador de crecimiento

folicular dependiente de gonadotropinas y de capacidad esteroidogénica de las células foliculares. La formación del antro es inducida por la acción de FSH, y no solamente de LH, y presumiblemente refleja cambios en la función secretora de las células de la granulosa, dependientes de FSH, así como el influjo de líquido intersticial (71,72). En la mujer, por cada ciclo menstrual se desarrollan en promedio 28 folículos antrales, de los cuales uno alcanza el mayor volumen de 15 a 20mm de diámetro y es el que madura y libera al óvulo, transformándose posteriormente en cuerpo lúteo productor de progesterona, mientras el resto de folículos sufren atresia (73). Durante el desarrollo del folículo antral las características morfológicas, bioquímicas y esteroidogénicas, varían de acuerdo a su edad y volumen (72-77)

Composición del líquido folicular. El líquido folicular se compone de secreciones del folículo y de exudados del plasma. Su composición refleja cambios en los procesos secretores de las células de la granulosa y teca interna; así como alteraciones en los componentes del plasma secundarios a procesos fisiológicos o patológicos (72). La presencia de líquido folicular en diferentes especies testimonia la importancia en la fisiología del ovario (esteroidogénesis, desarrollo folicular, maduración del óvulo, ovulación), transporte del óvulo, y efectos sobre el espermatozoide (incremento de la motilidad y viabilidad, capacitación, reacción acrosomal). Algunas de las características físicas, componentes

inorgánicos, carbohidratos, mucopolisacáridos, lípidos, proteínas, gonadotropinas, hormonas esteroides y otros compuestos se ilustran en el cuadro I.

El microambiente folicular está determinado, por el estado de desarrollo de cada folículo, integridad de la membrana basal folicular y del ambiente extrafolicular; siendo característicamente variable tanto el contenido, como su estado funcional. En la mujer la magnitud del folículo de De Graaf maduro varía de 15 a 22 mm de diámetro, conteniendo de 1.5 a 5.5 ml de líquido. El líquido folicular humano es ligeramente amarillento y poco viscoso. El contenido electrolítico, la presión osmótica y la cifra de pH son muy similares a los del plasma. La presión de O_2 y CO_2 son de 54mmHg y 35mmHg respectivamente.

Componentes inorgánicos. El contenido de sodio, potasio, magnesio, cloro, calcio, zinc, cobre y fosfatos inorgánicos se encuentran en concentraciones muy parecidas a las del plasma.

Componentes orgánicos de bajo peso molecular. La concentración de glucosa en el líquido folicular corresponde al 40-50% de la del plasma, encontrándose también otros carbohidratos en concentraciones menores a las del plasma. Los aminoácidos, en especial los aminoácidos básicos y el ácido ascórbico están más elevados que en el plasma, el ácido láctico se encuentra en concentraciones menores. También se demuestra la presencia de purinas, AMP-cíclico y prostaglandinas de la serie E y F en concentraciones variables.

Hormonas. Dependiendo de la fase del ciclo menstrual y del tamaño folicular, existen diferencias en la concentración individual de hormonas en el líquido folicular y plasma.

Las gonadotropinas se encuentran en el líquido folicular durante todo el ciclo menstrual en concentraciones más bajas que en el plasma, incrementándose en la fase folicular tardía en folículos mayores de 8mm, no siendo mayor del 60% para FSH y 30% para LH de las concentraciones del plasma. A diferencia de FSH la cual se detecta en todas las fases del ciclo, LH sólo puede ser detectada en los folículos pequeños a la mitad del ciclo.

Prolactina. En promedio las concentraciones son menores que en el plasma, su concentración es significativamente menor en los folículos mayores durante la fase folicular tardía que en los otros estadios del ciclo menstrual, con excepción de los grandes folículos durante la fase lútea temprana. El patrón general de prolactina indica una disminución progresiva en su concentración durante la fase folicular, seguida por un incremento durante la fase lútea.

Hormonas esteroides. A diferencia de las gonadotropinas, las concentraciones de las hormonas esteroides en el líquido folicular son siempre más elevadas que en el plasma. En el curso del desarrollo folicular, el estradiol y la progesterona se incrementan en el líquido folicular mientras que la testosterona disminuye al mismo tiempo, así como la androstenediona. Comparando los niveles de hormonas esteroides: testosterona, estradiol y progesterona en

foliculos terciarios menores de 1 cm, sin signos de luteinización, la razón entre contenido en plasma y líquido folicular sería: 1:800 para testosterona, 1:6300 para estradiol y 1:520 para progesterona. Y para foliculos de De Graaf mayores de 1 cm y con signos de luteinización, la razón es: 1:55 para testosterona, 1:13000 para estradiol y 1:3000 para progesterona.

Androstendiona, la concentración es significativamente menor en la fase proliferativa tardía, a diferencia de los foliculos menores (4-8 mm) en los cuales se encuentra significativamente elevada.

Otras hormonas de naturaleza proteica como: inhibina, activina y folistatina también se han encontrado en el líquido folicular, observandose los mayores niveles de inhibina en la fase folicular tardía y disminución en la fase lútea, y otros péptidos relacionados.

También se ha identificado la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), cuyas concentraciones en el líquido folicular varían entre cada uno de los foliculos, con rangos por arriba y por debajo de las concentraciones de SHBG en plasma.

La oxitocina y vasopresina se encuentran en concentraciones treinta veces mayor que en el plasma.

Polisacáridos. La viscosidad del líquido folicular se debe a la presencia de mucopolisacáridos, el líquido folicular es una fuente importante de estos compuestos que incluyen: condroitin sulfato, ácido hialurónico y sulfato de heparina. La concentración de

condroitin sulfato y sulfato de heparina disminuye con la maduración folicular, mientras el ácido hialurónico se incrementa.

Proteínas. Debido a que la barrera folicular se encuentra sometida a una presión capilar, se encuentran en el líquido folicular la mayor parte de las proteínas plasmáticas menores de 1000000 de peso molecular y por lo tanto las concentraciones de cada una de las proteínas en el líquido folicular dependerá de su volumen y peso molecular. El contenido de proteínas totales en el líquido folicular es el mismo que en el plasma, sin embargo las proporciones son diferentes tanto en el líquido folicular como en el plasma. La albúmina con un peso molecular de 69000, se encuentra en concentraciones mayores que en el plasma. Otras proteínas con pesos moleculares mayores, como las inmunoglobulinas se encuentran en menor cantidad. Las macroglobulinas como la IgM, Alfa 2-macroglobulina y β -lipoproteína están muy bajas o no son detectables. El fibrinógeno, la transferrina y las inmunoglobulinas IgG e IgA, así como las glucoproteínas del complemento se encuentran en concentraciones menores que las del plasma.

Además de las proteínas del plasma en el líquido folicular, se han identificado proteínas producidas por el folículo tanto por las células foliculares como por el ovocito: inhibina, activina, folistatina, inhibidor de maduración del ovocito (OMI), factores de crecimiento (ILFs) y sus proteínas transportadoras, glucoproteínas de la zona pelúcida (ZP1, ZP2, ZP3).

Actividades enzimáticas. Se han identificado las siguientes enzimas: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, 17Alfa-hidroxilasa, C17-20 liasa, 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, 20Alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa, aromatasa, 11 β -hidroxiandrostenediona, proteasas, transaminasas, fosfatasa, aminopeptidasa, endopeptidasa, lisozima, ATPasa, hialuronidasa, Alfa-amilasa, ribonucleasa, metaloproteasas, dismutasa de superóxido. Algunas de estas enzimas muestran en comparación con el plasma cifras más altas.

Algunos componentes celulares del sistema inmune y sus productos como interleucinas y factores de necrosis tisular también se han identificado en el líquido folicular (29, 72-78, 94-118).

PROPIEDADES QUIMIOTACTICAS DEL LIQUIDO FOLICULAR.

El fenómeno de neovascularización durante el desarrollo folicular, ha sido reconocido desde las observaciones de Basset en 1943, como un componente fundamental de la función ovárica; esto implica la proliferación (mitogénesis) y la migración direccional de las células endoteliales (quimiotaxis) en el sitio de desarrollo folicular. Además de las observaciones de Zachariae y Espey de una mayor concentración de leucocitos y plaquetas en los folículos periovulatorios. Se ha demostrado que el líquido folicular humano y de otros mamíferos, tiene propiedades angiogénicas, mitogénicas y quimiotácticas sobre células endoteliales y leucocitos (79-82).

Efecto quimiotáctico del líquido folicular sobre los espermatozoides. La quimiotaxis, reacción en la cual la dirección

Cuadro 1. SUSTANCIAS IDENTIFICADAS EN EL LIQUIDO FOLICULAR HUMANO.

Componentes inorgánicos

Sodio
Potasio
Magnesio
Cloro
Calcio
Zinc
Cobre
Fosfatos inorgánicos

Componentes orgánicos de bajo peso molecular

Glucosa
Fructuosa
Acido ascórbico
Acido láctico
Purinas
AMP_c

Mucopolisacáridos

Proteínas plasmáticas

Albúmina
Alfa₁-globulina
Alfa₂-globulina
Beta₂-globulina
Inmunoglobulinas
IgA
IgG
Complemento
Transferrina
Fibrinógeno
β-Lipoproteínas
Globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG)

Proteínas producidas por el folículo

Inhibina
Activina
Folistatina
Inhibidor de maduración del ovocito (OMI)
Factores de crecimiento (ILFs) y sus proteínas transportadoras
Glucoproteínas de la zona pelúcida (ZP1,ZP2,ZP3)

Enzimas

3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa
17 Alfa-hidroxilasa
C17-20 liasa
17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa
20 Alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa

Continúa

Aromatasa
11 β -hidroxiandrostenediona
Proteasas
Transaminasas
Fosfatasas
Aminopeptidasa
Endopeptidasa
Lisozima
ATPasa
Hialuronidasa
Alfa-amilasa
Ribonucleasa
Metaloproteasas
Dismutasa de superóxido

Hormonas

Hormona folículo estimulante
Hormona luteinizante
Oxitocina
Vasopresina
Insulina
Estradiol
Progesterona
Prolactina
Testosterona
Androstendiona

Otras

Interleucinas
Factores de necrosis tisular
Células del sistema inmune

Referencias: 29,72-78,94-118.

de locomoción de la célula es determinada por una sustancia química, es un fenómeno de importancia en diversos campos de la biología. Fué primeramente descrita desde hace cien años por W. Pfeffer en el proceso reproductivo del helecho (83), desde entonces el reconocimiento de la atracción de gametos por medio de sustancias quimiotácticas en el proceso reproductivo, ha sido demostrado en diversas especies, incluyendo mamíferos (23-26,50). La importancia de este acontecimiento radica en: La atracción a distancia especie-específica del espermatozoide y del óvulo; y en la activación especie-específica del espermatozoide.

Atracción a distancia especie-específica del espermatozoide y el óvulo. En 1978 Richard L. Miller, demostró que los óvulos de *Cnidarian orthopyxis Caliculata*, no sólo secretan un factor quimiotáctico, sino que también regulan el tiempo de su liberación, encontrando que cuando los óvulos no han completado su segunda división meiótica no hay atracción del espermatozoide al óvulo, y que solamente después de que el óvulo ha completado la segunda división meiótica el espermatozoide emigra hacia él (84). Recientemente se ha identificado la naturaleza química de estos factores quimiotácticos en los ovocitos de erizos de mar: SPERACT, un péptido de diez aminoácidos localizados en la zona pelúcida de *Strongylocentrotus Purpuratus* (85); y RESACT, un péptido de catorce aminoácidos, localizados en la zona pelúcida de *Arbacia Punctulata* (86). La acción de estos factores quimiotácticos es

especie-específica y no atrae espermatozoides de otras especies, además se han identificado receptores en la membrana celular del espermatozoide que le permiten desplazarse según un gradiente de concentración de la sustancia quimiotáctica hasta que alcanza el ovocito (87).

Activación especie-específica del espermatozoide. La presencia de receptores en la superficie del espermatozoide para moléculas específicas producidas por el óvulo, no sólo resultan en el reconocimiento especie-específico; sino que también ocasionan cambios morfológicos y funcionales en el espermatozoide, reflejados a través de un incremento en su metabolismo, motilidad, capacitación y activación de los mecanismos de fertilización del ovocito (51).

El reconocimiento del fenómeno quimiotáctico durante el proceso de fertilización en otras especies (50), así como la presencia de receptores en la membrana celular del espermatozoide a productos del óvulo (investimentos y/o líquido folicular) y a sustancias quimiotácticas sintéticas (88), permite formular la siguiente pregunta: ¿Existen en el líquido folicular sustancias que ejercen un efecto quimiotáctico sobre los espermatozoides en el humano?.

En este trabajo se efectúan experimentos para valorar la presencia de actividad quimiotáctica en el líquido folicular hacia los espermatozoides en el humano.

OBJETIVOS.

- 1.- Investigar en el líquido de folículos maduros la presencia de actividad quimiotáctica hacia los espermatozoides en el humano.
- 2.- Validar un modelo in vitro para analizar actividad quimiotáctica hacia espermatozoides.

HIPOTESIS.

Durante el ciclo menstrual de la mujer el líquido del folículo maduro contiene sustancia (s) que ejerce (n) un efecto quimiotáctico sobre los espermatozoides.

MATERIAL Y METODOS.

Líquido folicular. El líquido folicular humano fué obtenido por punción directa de los folículos mayores de un centímetro durante la laparoscopia efectuada a diez pacientes del programa de transferencia tubaria de gametos (GIFT), todas ellas con ciclos ovulatorios hiperestimulados con citrato de clomifeno, gonadotropinas de mujer menopaúsica y gonadotropina coriónica humana (89). Otros líquidos foliculares fueron obtenidos de tres pacientes sanas ovulatorias, sin tratamiento médico durante el último ciclo menstrual el cual fué monitorizado con curva de temperatura basal y a quienes se efectuó minilaparatomía exploradora a la mitad del ciclo siguiente para oclusión tubaria bilateral (programa voluntario de esterilización), previo consentimiento informado y escrito por las pacientes. Los líquidos foliculares fueron clasificados al momento de la recuperación del óvulo en maduros e inmaduros de acuerdo a criterios morfológicos (90). Determinando como líquido folicular maduro, si el folículo puncionado contenía un óvulo preovulatorio; e inmaduro si los folículos puncionados contenían un óvulo inmaduro, atrésico o degenerado. Después de la recuperación del óvulo y transferencia tubaria, cada uno de los líquidos foliculares sin diluir fué centrifugado a 3000 RPM x 10 minutos para excluir los elementos celulares; el sobrenadante fué congelado y almacenado en alícuotas para la subsecuente determinación hormonal (estradiol, progesterona, testosterona y prolactina) y ensayo de quimiotáxis.

Espermatozoides humanos. Las muestras de semen se obtuvieron de tres varones adultos, donadores sanos (promedio de edad 32 años), con fertilidad comprobada. Previo al ensayo de quimiotáxis el semen fué obtenido por masturbación y colectado en un recipiente de vidrio estéril, permitiendo su licuefacción en baño María a 37°C, tomando alícuotas de la muestra para el análisis de semen. Solamente aquellas muestras que reunían los requisitos de normalidad propuestos por la OMS se utilizaron para el ensayo (volumen mayor de 2 ml, número de espermatozoides mayor de 20×10^6 /ml, mayor de 50% de formas móviles, mayor de 50% de formas normales, viabilidad mayor de 50%, etc) (91). Otra alícuota se utilizó para conocer la concentración espermática (número total de espermatozoides por mililitro), utilizando el método del hemocitometro ó cámara de Neubauer (92). Para el cual se requiere hacer una dilución de 1:20 de semen con solución espermicida para poder efectuar el conteo en la cámara de Neubauer, y hacer el cálculo de la concentración espermática según la siguiente fórmula:

Concentración espermática=número de espermatozoides contados x factor de multiplicación (10,000) x factor de dilución.

La muestra que reunió los requisitos previos de normalidad, fué ajustado su volumen final con medio HAM-F10 para obtener una concentración espermática de cuatro millones de células por mililitro. Se dejaron en tubos de ensayo alícuotas de 1 ml colocadas en forma vertical en baño María a 37°C por 30 minutos para permitir

el ascenso de las formas con mayor movilidad, tomando de la muestra solamente las células del sobrenadante para el ensayo de quimiotáxis (50 microlitros conteniendo aproximadamente 200,000 espermatozoides con más del 80% de formas móviles).

Factor quimiotáctico. El péptido quimiotáctico N-Formyl-L-Methoionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanine (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo) fué almacenado a -20°C en forma concentrada (10^{-3}M) en dimetil sulfóxido (DMSO). Hasta el ensayo de quimiotáxis se efectuaron las diluciones de 10^{-4}M a 10^{-12}M con solución PBS 0.01 M ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 1.8 M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 M, NaCl 0.14 M).

Ensayo de quimiotáxis. Los ensayos realizados para valorar la migración celular contra un gradiente de factor quimiotáctico, fueron hechos en una matriz de agarosa de acuerdo al método propuesto por Cutler (93). Se preparó agarosa al 0.8% con solución de Baker (glucosa 0.16 M, Na_2HPO_4 0.04 M, KH_2PO_4 0.7 mM, NaCl 0.03 M, pH 7.8).

Preparación de la agarosa. Se disolvieron 100 mg de agarosa M (LKB-Broma, Sweden) en 125 ml de solución de Baker, calentada en baño María a 56°C durante 10-15 minutos, reponiendo la pérdida de volumen evaporada con solución Baker. Una vez preparada la agarosa, 4 ml fueron agregados a cada laminilla de vidrio de 7.5 cm x 2.5 cm x 1 mm, dejando gelificar al medio ambiente; para efectuar tres pozos en disposición lineal de 8 mm de diámetro cada pozo, con una distancia de centro a centro de 2.5 cm, la agarosa de los pozos fué

removida con una pipeta de Pasteur conectada a un sistema de succión evitando la formación de burbujas o levantamiento de la placa de agarosa. Posteriormente se dejaron por dos horas en baño María a 37°C, ambiente húmedo y CO₂ al 5%. Transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 50 microlitros de la sustancia a probar (líquido folicular) al primer pozo, 50 microlitros de semen (200,000 células) al pozo central y 50 microlitros de las sustancias control al tercer pozo. Las sustancias utilizadas como controles negativos fueron: solución de Baker y solución PBS, descartandose en estudio piloto previo la utilización de HAM-F10 y plasma del donador de semen por no presentar actividad. La sustancia utilizada como control positivo fué el péptido sintético N-Formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanine (fMLP) (88). Las placas fueron incubadas en cámara húmeda a 37°C, ambiente de CO₂ al 5% y O₂ al 95%.

Se valoró la migración celular hacia los pozos periféricos a diferentes tiempos (30 min-24 h) y a diferentes concentraciones de las sustancias a probar y de los controles, para lo cual se fijaron las placas de agarosa con glutaraldehído al 2.5% y observadas posteriormente con el microscopio de luz a una magnificación de 40X. La respuesta consistió en valorar el número de espermatozoides que emigraron hacia los pozos periféricos, para lo cual se calculó el promedio de cinco campos leídos al azar en cada pozo periférico.

La prueba estadística utilizada para el análisis de las diferencias en el número de espermatozoides que emigraron hacia los

pozos periféricos fué la prueba de t pareada para muestras independientes (114-115).

RESULTADOS.

De las trece pacientes estudiadas, se obtuvieron 58 líquidos foliculares de los cuales 20 correspondieron a líquidos foliculares maduros y 38 a inmaduros de acuerdo a criterios morfológicos y bioquímicos. El promedio y la desviación estandar de los valores obtenidos de estradiol, progesterona, testosterona y prolactina para cada estado de madurez del folículo puncionado, se muestran en la figura 1. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de progesterona entre líquido folicular maduro (LFM) y líquido folicular inmaduro (LFI) ($p < 0.001$), testosterona ($p < 0.05$) y prolactina ($p < 0.001$); y no se observaron diferencias en cuanto al contenido de estradiol entre el líquido folicular maduro e inmaduro.

La razón progesterona/estradiol mayor de diez, como indicador bioquímico de madurez folicular fué estadísticamente significativa ($p < 0.05$) figura 2.

Validación del modelo in vitro de quimiotáxis para espermatozoides. Para determinar el número de espermatozoides en cada pozo central, se efectuaron tres experimentos por duplicado para valorar diferentes concentraciones de células por cada 50 microlitros desde 5 a 100 células $\times 10^4$, contra concentraciones de $10^{-4}M$, $10^{-8}M$ y $10^{-12}M$ del quimiotáctico fMLP. Observandose a las 12 horas los siguientes resultados: a una concentración de $10^{-4}M$ del péptido fMLP la concentración de

espermatozoides con máxima respuesta quimiotáctica fué de 50×10^4 células, con un promedio y desviación estandar de 180 ± 100 ; a una concentración de 10^{-8} M del péptido fMLP, la concentración de espermatozoides con máxima respuesta quimiotáctica fué de 20×10^4 células en el pozo central, con un promedio y desviación estandar de 800 ± 300 células; a una concentración de 10^{-12} M del péptido fMLP, la concentración de espermatozoides con máxima respuesta quimiotáctica fué de 5×10^4 células con un promedio de desviación estandar de 145 ± 75 células. Figura 3.

La respuesta quimiotáctica de los espermatozoides a una concentración de 10^{-8} M de fMLP en relación al tiempo fué valorada en diferentes intervalos de tiempo cada 30 minutos las primeras 6 horas y posteriormente cada 6 y 12 horas respectivamente, durante 24 horas. Los resultados de dos experimentos cada uno efectuado por triplicado, mostraron que el número de células que emigraron hacia el pozo con la sustancia control no fué mayor de cien células en los diferentes tiempos; por otra parte, el pozo periférico que contenía el quimiotáctico fMLP presentó el mayor número de células, con un promedio y desviación estandar de 739 ± 270 células. Así mismo se observó la máxima respuesta a los 90 minutos, sin variar significativamente en los siguientes tiempos. Figura 4.

El efecto de diferentes concentraciones del péptido fMLP sobre la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides a las 12 horas se valoró en cinco experimentos efectuados por duplicado, con los

siguientes resultados: a concentraciones de 10^{-11} M hasta 10^{-5} M de fMLP el promedio de células que emigraron hacia los pozos periféricos fué estadísticamente significativo, la mayor actividad del quimiotáctico se alcanzó a la concentración de 10^{-8} M con un promedio y desviación estandar de 915 ± 320 células ($p < 0.001$). No se observaron diferencias a concentraciones de 10^{-12} M, 10^{-4} M y 10^{-3} M de fMLP. En los pozos control el número de células no fué mayor de 100. Figura 5.

Para valorar la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides hacia el líquido folicular maduro se efectuaron dos experimentos cada uno por triplicado, conteniendo el pozo central una concentración de células de aproximadamente 20×10^4 , en un pozo periférico 50 microlitros de líquido folicular maduro y el otro pozo periférico 50 microlitros de solución de Baker. Valorando la respuesta a los siguientes intervalos de tiempo: cada 30 minutos las primeras 6 horas, posteriormente a las 6 y 12 horas respectivamente las primeras 24 horas. La respuesta quimiotáctica de los espermatozoides hacia los pozos con la sustancia control no fué mayor de 150 células en los diferentes intervalos de tiempo, mientras que la mayor migración celular hacia el pozo periférico que contenía el líquido folicular maduro se observó a las 3 horas con un promedio y desviación estandar de 820 ± 240 células ($p < 0.001$). La respuesta en los siguientes intervalos de tiempo no varió significativamente. Figura 6.

El efecto de la concentración del líquido folicular maduro se valoró efectuando diluciones con solución de Baker. La respuesta quimiotáctica de los espermatozoides hacia el líquido folicular maduro a diferentes diluciones, en cinco experimentos por duplicado valorada a las 12 horas fué la siguiente: el promedio y la desviación estandar en el pozo con líquido folicular maduro sin diluir fué de 790 ± 176 células; a diluciones de 1:2, 1:4, 1:8 el promedio de células fué estadísticamente significativo ($p < 0.05$), no observandose diferencias a diluciones de 1:16, 1:32 y 1:64 con respecto al control en el cual el número de células no fué mayor de 150. Figura 7.

La respuesta quimiotáctica de los espermatozoides hacia el líquido folicular inmaduro a diferentes diluciones, se valoró en cinco experimentos efectuados por duplicado. No se observó respuesta quimiotáctica hacia los pozos con líquido folicular inmaduro y su control negativo. Figura 8.

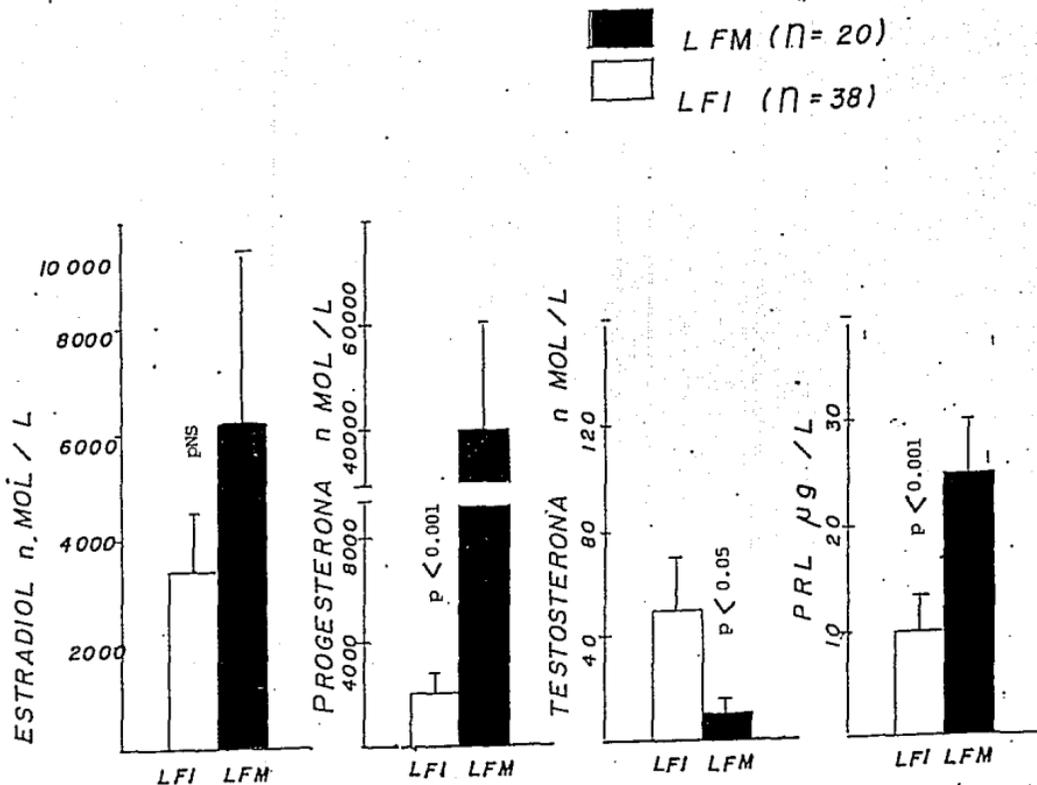


Figura 1.- Valores hormonales de estradiol, progesterona, testosterona y prolactina obtenidos de 58 líquidos foliculares clasificados en maduros e inmaduros de acuerdo a criterios morfológicos. Valores promedio \pm desviación estándar.

NS=No significativa. LFM=Líquido folicular maduro. LFI=Líquido folicular inmaduro.

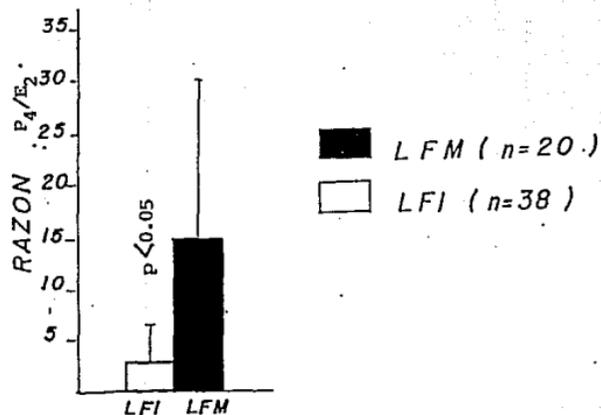


Figura 2.- Razón progesterona/estradiol entre líquido folicular maduro y líquido folicular inmaduro. Valores promedio \pm desviación estandar.

LFM=Líquido folicular maduro. LFI=Líquido folicular inmaduro.

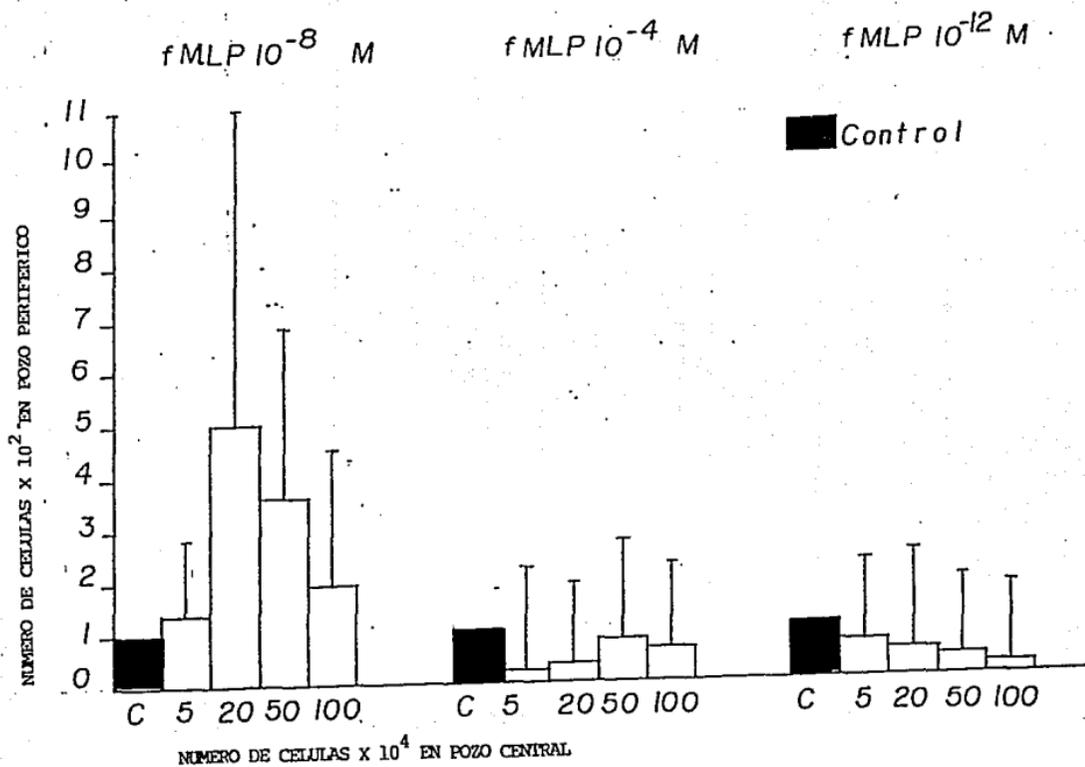


Figura 3.- Efecto sobre la respuesta quimiotáctica de diferentes concentraciones de células y péptido fMLP. Valores promedio \pm desviación estandar.

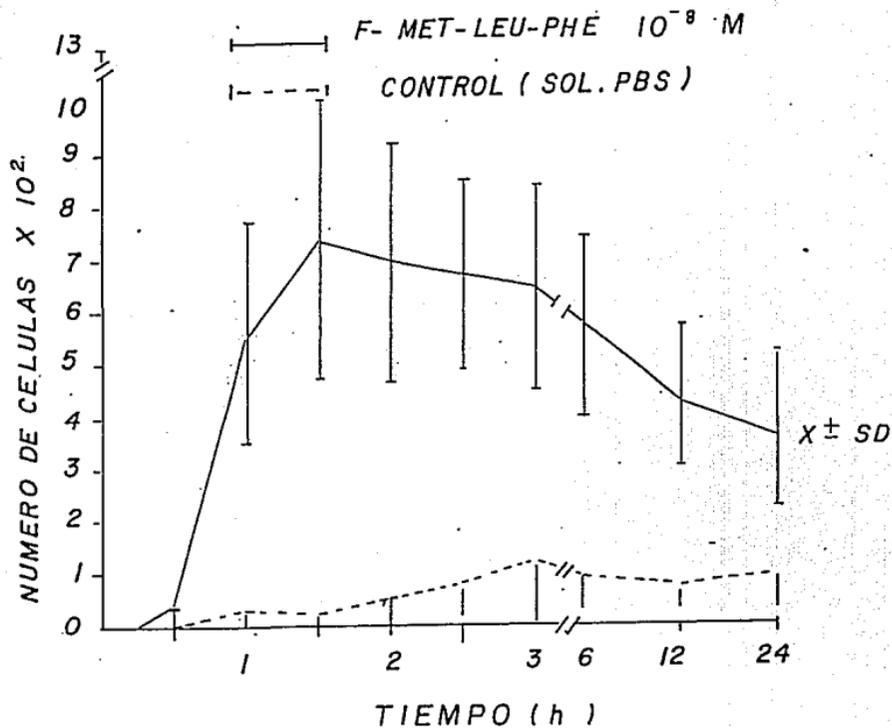


Figura.4. Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides a una concentración de 10^{-8} M del péptido f-Met-Leu-Phe, en diferentes intervalos de tiempo. Valores promedio \pm desviación estandar.

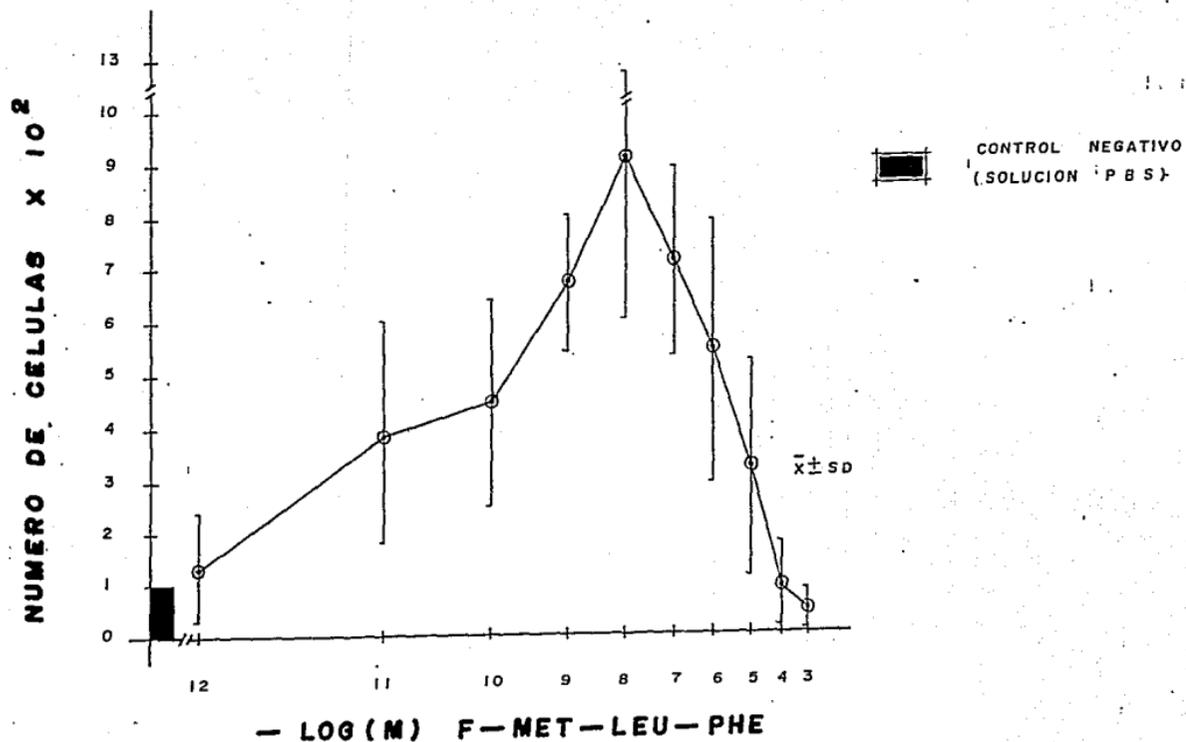


Figura 5.- Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides a diferentes concentraciones del péptido f-Met-Leu-Phe a las 12 horas. Valores promedio \pm desviación estándar.

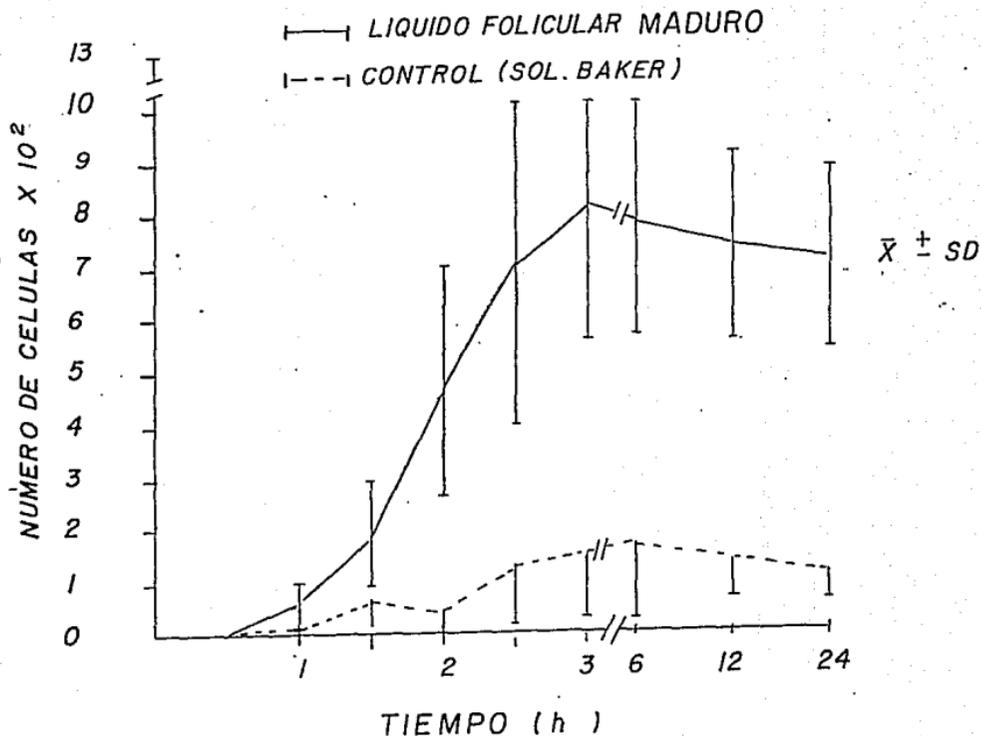


Figura 6.- Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides al líquido folicular maduro; número de células que responden en función del tiempo, comparado con su control negativo (solución PBS). Valores promedio \pm desviación estandar.

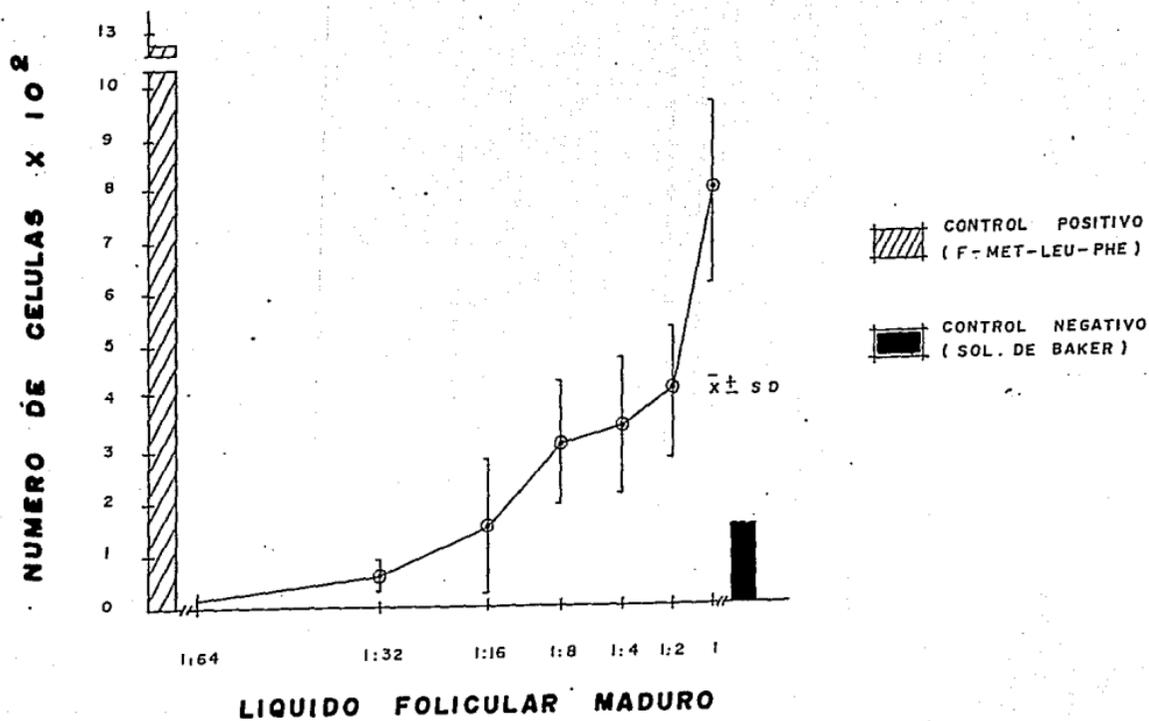


Figura 7.- Efecto de diferentes concentraciones del LFM, sobre la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides a las 12 horas. Valores promedio \pm desviación estandar.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

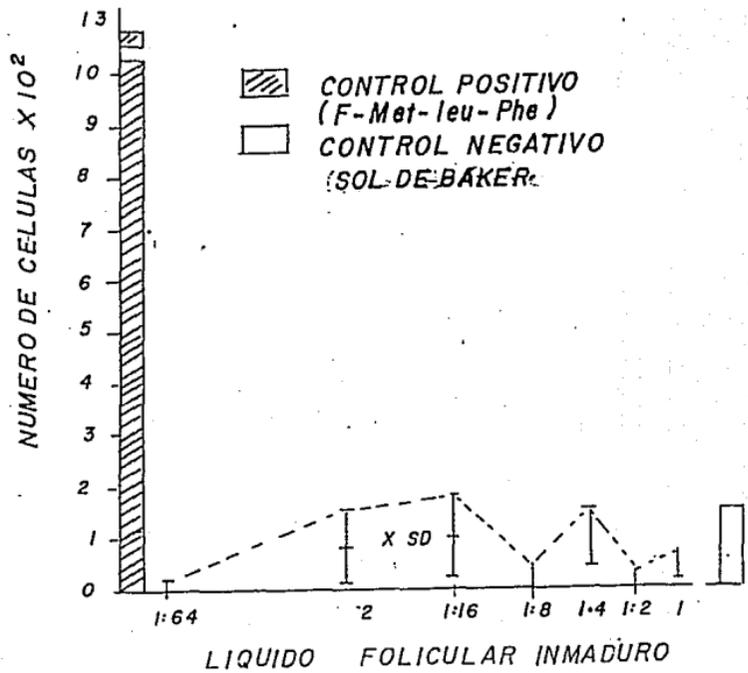


Figura 8.- Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides al líquido folicular inmaduro a diferentes diluciones y su control - positivo f-Met-Leu-Phe a una concentración de 10^{-8} M a las 12 horas. Valores promedio + desviación: estandar.

CONCLUSIONES.

Los diferentes experimentos efectuados demuestran la existencia de una respuesta quimiotáctica de los espermatozoides al líquido folicular clasificado como maduro, de acuerdo a los criterios morfológicos y bioquímicos mencionados, principalmente la razón progesterona/estradiol mayor de diez. También se observa respuesta quimiotáctica al péptido sintético f-Met-Leu-Phe.

La respuesta es dependiente de la concentración, tanto del líquido folicular maduro como del péptido f-Met-Leu-Phe y del tiempo de exposición al estímulo.

El patrón de respuesta de las células al estímulo quimiotáctico es semejante, al de un sistema de saturación de receptores.

No se observa respuesta quimiotáctica al líquido folicular inmaduro y sustancias control negativas (solución de Baker y solución PBS).

COMENTARIOS.

Los valores hormonales obtenidos de los 58 líquidos foliculares analizados mostraron una correlación entre los criterios morfológicos y bioquímicos utilizados como indicadores de madurez folicular. Siendo un buen indicador bioquímico la razón p_4/E_2 mayor de 10 ($p < 0.05$), estos resultados concuerdan con los previamente reportados por Lobo y Seibel (77,78).

La demostración del efecto quimiotáctico de los péptidos sintéticos del grupo N-Formil-Metionil sobre espermatozoides del humano por Gnessi (88), y las ventajas de la utilización de una matriz de agarosa sobre la cámara de Boyden para la valoración de quimiotáxis in vitro (93). Permitted efectuar los experimentos para la validación del modelo in vitro con agarosa, para valorar respuesta quimiotáctica de los espermatozoides. En nuestros resultados se observó que la máxima respuesta se alcanzó a una concentración de 20×10^4 células contra un gradiente de concentración de $10^{-8}M$ del péptido fMLP. Comparando estos resultados con los obtenidos por Gnessi, quien utilizó la cámara de Boyden para valorar la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides a diferentes concentraciones de quimiotáctico sintético del grupo N-Formil-Metionil, encontró que para el péptido fMLP, la máxima respuesta se alcanzó a una concentración de $10^{-9}M$, la cual es muy semejante a nuestros resultados.

La respuesta quimiotáctica de los espermatozoides a una concentración de 10^{-8} M de fMLP, en función del tiempo, mostró que inicialmente existe un incremento gradual en relación al tiempo de exposición al quimiotáctico, la cual se inicia a los 30 minutos; alcanzando su máxima respuesta a los 90 minutos, manteniendo una meseta y posteriormente declinando sin variar significativamente respecto al control hasta las 24 horas. Estas observaciones sirvieron de base para valorar la respuesta a las 12 horas en los siguientes experimentos.

Los experimentos para valorar dosis-respuesta a diferentes concentraciones del quimiotáctico sintético fMLP, sugieren que a bajas concentraciones (10^{-12} M) de fMLP sólo un pequeño número de espermatozoides responden, pero conforme se alcanza el óptimo de 10^{-8} M de fMLP se observa la máxima respuesta de migración celular ($X=915 \pm 320$) y que a concentraciones por arriba del óptimo (10^{-4} M) la respuesta quimiotáctica de las células no varía significativamente respecto al control. Estos hallazgos son compatibles con la hipótesis, de que a dosis por debajo del óptimo del quimiotáctico, las células pueden responder a gradientes en ascenso, pero una vez alcanzadas concentraciones por arriba del óptimo, los receptores se encuentran saturados y la célula es incapaz de responder (83).

La respuesta quimiotáctica de los espermatozoides hacia el líquido folicular maduro, en relación al tiempo y a diferentes

concentraciones, mostró un patrón de respuesta de "línea sigmoidea", semejante a la respuesta quimiotáctica hacia péptidos sintéticos N-Formil-Metionil, lo cual significa que la respuesta es muy sensible a la concentración del sustrato y que responde a un pequeño aumento en éste, con un incremento grande en la actividad; pero que una vez alcanzada la saturación ya no hay respuesta.

La falta de respuesta quimiotáctica en el líquido folicular inmaduro se correlaciona con las observaciones clínicas de que solamente alrededor del período periovulatorio se observa el mayor número de espermatozoides tanto en la trompa uterina como en el líquido peritoneal (10,11).

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Gilbert SF. Developmental biology. 2nd ed. Massachusetts: Sinauer Associates Inc, 1988:30.
- 2.- Austin CR. Fertilization. In: Austin CR, Short RV, eds. Reproduction in mammals. I. Germ cells and fertilization. 1st ed. London: Cambridge University Press, 1972: 103-33.
- 3.- Blandau RJ. Comparative aspects of gamete transport in mammalian oviducts. In: Alexander NJ, ed. Animals models for research on contraception and fertility. New York: Harper and Row, 1978: 200-22.
- 4.- Biggers JD. Fertilization and blastocyst formation. In: Alexander NJ, ed. Animals models for research on contraception and fertility. New York: Harper and Row, 1978: 223-37.
- 5.- Linford E. Cervical mucus: an agent or a barrier to conception?. J Reprod Fertil 1974; 37: 239-50.
- 6.- Beier HM. Oviductal and uterine fluids. J Reprod Fertil 1974; 37: 221-37.
- 7.- Mitchell JA, Nelson L, Hafez ESE. Motility of spermatozoa. In: Hafez ESE, ed. Human semen and fertility regulation in men. St Louis: The CU. Mosby Company, 1976: 83-99.
- 8.- Hafez ESE. Transport and survival of spermatozoa in the female reproductive tract. In: Hafez ESE, ed. Human semen and fertility regulation in men. St Louis: The CU. Mosby Company, 1976: 107-29.
- 9.- Broer KH. Migración de los espermatozoides en el tracto

genital femenino. En: Kaiser R, Schumacher GFB, eds.
Reproducción humana: Fertilidad, esterilidad y contracepción.
Ira ed. Barcelona: Salvat editores, 1986: 107-114.

- 10.- Frenkel DA. Sperm migration and survival in the endometrial cavity. *Int J Fertil* 1961; 6:285-90.
- 11.- Ahlgren M. Number of spermatozoa in the ampulla of the human fallopian tube. VIIth World Congress on Fertility and Sterility, Tokio 1971 (Abstract 41).
- 12.- Mbizvo MI, Burkman LJ, Alexander NJ. Human follicular fluid stimulates hiperactivated motility in human sperm. *Fertil Steril* 1990; 54:708-12.
- 13.- Siegel MS, Paulson RJ, Graczykowski JW. The influence of human follicular fluid on the acrosome reaction, fertilizing capacity and proteinase activity of human spermatozoa. *Hum Reprod* 1990; 5:975-80.
- 14.- Ravnik SE, Zarutskie FW, Muller CH. Lipid transfer activity in human follicular fluid: relation to human sperm capacitation. *J Androl* 1990; II:216-26.
- 15.- Ito M, Smith TT, Yanagimachi R. Effect of ovulation on sperm transport in the hamster oviduct. *J Reprod Fertil* 1991; 93:157-63.
- 16.- First A. Transperitoneal migration of ovum or spermatozoon. *Obstet Gynecol* 1954; 4:431-34.
- 17.- Jones HW, Wheelless CR. Salvage of the reproductive potential of women with anomalous development of the Müllerian ducts: 1868-1968-2068. *Am J Obstet Gynecol* 1969; 104:348-64.

- 18.- Szlachter N, Weiss G. Distal tubal pregnancy in a patient with a bicornuate uterus and segmental absence of the fallopian tube. *Fertil Steril* 1979; 32:602-3.
- 19.- Grunert GH. Late tubal patency following tubal ligation. *Fertil Steril* 1981; 35:406-8.
- 20.- Cartwright PS, Entman SS. Partial ipsilateral tubal pregnancy following partial salpingectomy: a case report. *Fertil Steril* 1984; 42:647-8.
- 21.- Forrler A, Dellenbach P, Nisand I, y col. Direct intraperitoneal insemination in unexplained and cervical infertility. *Lancet* 1986; 119:916-7.
- 22.- Silva PD, Paulson RJ, Anderson RE, Lobo RA. Ectopic pregnancy in unrepaired distal tubal remnant after contralateral tubal anastomosis. *Fertil Steril* 1987; 47:522-3.
- 23.- Miller RL. Chemotaxis during fertilization in the Hydroid *Campanularia*. *J Exp Zool* 1966; 1:23-44.
- 24.- Miller RL. Chemotaxis of the spermatozoa of *Ciona Intestinalis*. *Nature* 1975; 254:244-5.
- 25.- Iqbal M, Shivaji S, Vijayasathy S, Balaram P. Synthetic peptides as chemoattractans for bull spermatozoa. Structure activity correlations. *Biochem Biophys Res Comm* 1980; 96:235-42.
- 26.- Ward GE, Brokaw CJ, Garbers DL, Vacquier VD. Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to Resact, a peptide from the egg jelly layer. *J Cell Biol* 1985; 101:2324-9.
- 27.- Harper MJK. Sperm and egg transport. In: *Reproduction in*

- mammals. I. Germ cells and fertilization, 2nd ed. London: Cambridge University Press, 1982: 102-27.
- 28.- Wasserman FM. The mammalian ovum. In: Knobil E, Neill J, eds. The physiology of reproduction. Vol I. 1st ed. New York: Raven Press, 1988: 69-102.
- 29.- Schumacher GFB. Líquido folicular, proceso de ovulación y transporte del óvulo. En: Kaiser R, Schumacher GFB, eds. Reproducción humana: Fertilidad, esterilidad y contracepción. 1ra ed. Barcelona: Salvat editores, 1986: 91-8.
- 30.- Pauerstein CJ. The Fallopian tube: A reappraisal. Philadelphia: Lea and Febiger, 1974: 81.
- 31.- Bedford JM, Calvin H, Cooper GW. The maturation of spermatozoa in the human epididymis. J Reprod Fertil 1973; 199-213.
- 32.- Harper MJK. Gamete and zygote transport. In: Knobil E, Neill J, eds. The physiology of reproduction. New York: Raven Press, 1988: 103-34.
- 33.- Fox CA, Fox B. A comparative study of coital physiology with special reference to the sexual climax. J Reprod Fertil 1971; 24:319-36.
- 34.- Settlage DSF, Motoshima M, Tredway DR. Sperm transport from the external cervical os to the fallopian tubes in women: A time and quantitation study. Fertil Steril 1973; 24:655-51.
- 35.- Overstreet JW, Katz DF. Semen analysis. Urol Clin North Am 1987; 14:441-49.
- 36.- Moghissi KS. Cyclic changes of cervical mucus in normal and

- progesterin treated women. *Fertil Steril* 1966; 663-75.
- 37.- Sobrero AJ, MacLeod J. The immediate post-coital test. *Fertil Steril* 1962; 13:184-8.
- 38.- Hafez ESE. The comparative anatomy of the mammalian cervix. In: Blandau RJ, Moghissi KS, eds. *The biology of the cervix*. Chicago: University of Chicago Press, 1973: 23-56.
- 39.- Hafez ESE. Transport of spermatozoa in the female reproductive tract. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 115:703-17.
- 40.- Schumacher GFB. Secreciones del tracto genital femenino. En: Kaiser R, Schumacher GFB, eds. *Reproducción humana: Fertilidad, esterilidad y contracepción*. 1ra ed. Barcelona: Salvat editores, 1986: 75-90.
- 41.- Croxatto HB, Faundes A, Medel M y col. Studies on sperm migration in the human female genital tract. In: Hafez ESE, Thibault CG, eds. *The biology of spermatozoa*. Basel: S Karger AG, 1975: 56-62.
- 42.- Afzelius BA, Camner P, Mossberg B. On the function of cilia in the female reproductive tract. *Fertil Steril* 1978; 29:72-3.
- 43.- Harper MJK. Stimulation of sperm movement from the isthmus to the site of fertilization in the rabbit oviduct. *Biol Reprod* 1973; 8:369-77.
- 44.- Ghetler Y, Ben-Nun I, Kaneti H, Jaffe R, Gruber A, Fejgin M. Effect of sperm preincubation with follicular fluid on the fertilization rate in human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1990; 54:944-6.

- 45.- McNutt TL, Killian GJ. Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro. *J Androl* 1991; 12:244-52.
- 46.- Hansen C, Srikandakumar A, Downey BR. Presence of follicular fluid in the porcine oviduct and its contribution to the acrosome reaction. *Mol Reprod Dev* 1991; 30:148-53.
- 47.- Balin H. Follicular and tubal fluids in the reproductive process. *Am J Obstet Gynecol* 1958; 76:30-6.
- 48.- Mendoza C, Tesarik J. Effect of follicular fluid on sperm movement characteristics. *Fertil Steril* 1990; 54:1135-9.
- 49.- Falcone L, Gianni S, Piffaretti YA, Marchini M, Eppenberger U, Balerna M. Follicular fluid enhances sperm motility and velocity in vitro. *Fertil Steril* 1991; 55:619-23.
- 50.- Miller RL. Sperm chemo-orientation in the metazoa. In: Metz CB, Monroy A, eds. *Biology of fertilization*, Vol. 2. New York: Academic Press, 1985: 275-337.
- 51.- Garbers DL. Molecular basis of fertilization. *Annu Rev Biochem* 1989; 58:719-42.
- 52.- Austin CR. Capacitation of spermatozoa. *Int J Fertil* 1967; 12:25-31.
- 53.- Chang MC. The meaning of sperm capacitation. *J Androl* 1984; 5:45-50.
- 54.- Gould JE, Overstreet JW, Hanson FW. Interaction of human spermatozoa with the human zona pellucida and zona-free hamster oocyte following capacitation by exposure to human cervical mucus. *Gamete Res* 1985; 12:47-54.

- 55.- Lambert H, Overstreet JW, Morales P, Hanson FW, Yanagimachi R. Sperm capacitation in the female reproductive tract. *Fertil Steril* 1985; 43:325-7.
- 56.- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill J, eds. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1988: 135-85.
- 57.- Zaneveld LJ, De Jonge CJ, Anderson RA, Mack SR. Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 1991; 6:1265-74.
- 58.- Davies BK, Byrne R, Bedigan K. Studies on the mechanism of capacitation: Albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:1546-50.
- 59.- Davies BK. Timing of fertilization in mammals: Sperm cholesterol/phospholipid ratio as, determinant of capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:7560-4.
- 60.- Lenz RW, Ax RL, Grimek HJ, First NL. Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 106:1092-8.
- 61.- Tesarik J. Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J Reprod Fertil* 1985; 74:383-8.
- 62.- Hansen C, Srikandakumar A, Downey BR. Presence of follicular fluid in the porcine oviduct and its contribution to the

- acrosome reaction. Mol Reprod Dev 1991; 30:148-53.
- 63.- Boatman DE, Robbins RS. Detection of a soluble acrosome reaction-inducing factor, different from serum albumin, associated with the ovulated egg-cumulus complex. Mol Reprod Dev 1991; 30:396-401.
- 64.- Shur BD, Hall NG. Sperm surface galactosyl-transferase activities during in vitro capacitation. J Cell Biol 1982; 95:567-73.
- 65.- Shur BD, Hall NG. A role for mouse sperm surface galactosyl-transferase in sperm binding for the egg zona pellucida. J Cell Biol 1982; 95:574-9.
- 66.- López LC, Bayna EM, Litoff D, Shaper NL, Shaper JH, Shur BD. Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. J Cell Biol 1985; 101:1501-10.
- 67.- Wassarman PM. Zona Pellucida glycoproteins. Ann Rev Biochem 1988; 57:415-42.
- 68.- Nakano R, Mizuno T, Katayama K, Tojo S. Growth of ovarian follicles in the absence of gonadotropins. J Reprod Fertil 1975; 119:879-86.
- 69.- Scott RT, Hodgen GD. El folículo ovárico: Ciclo vital de un reloj pélvico. Clin Obstet Ginec 1990; 4:537-47.
- 70.- Koering MJ. Folliculogenesis in primates: Process of maturation and atresia. In: Alexander NJ, ed. Animals models for research on contraception and fertility. New York: Harper and Row, 1978:187-98.

- 71.- McNatty KP. Follicular fluid. In: Jones RE, ed. The vertebrate ovary. New York: Plenum Press 1978; 215-59.
- 72.- Edwards RG. Follicular fluid. J Reprod Fertil 1974; 37:189-219.
- 73.- Greenwald GS. Comparative aspects of antral follicular development during the menstrual and estrous cycle. In: Alexander NJ, ed. Animals models for research on contraception and fertility. New York: Harper and Row, 1978:176-86.
- 74.- Aragona C, Micara G, Moro M, Verlengia C, Schimberni M, Carena L. Intrafollicular changes in the periovulatory period. Int J Gynecol Obstet 1989; (Suppl 1): 25-34.
- 75.- McNatty KP, Hunter WM, McNeilly AS, Sawers RS. Changes in the concentration of pituitary and steroid hormones in the follicular fluid of human Graafian follicles throughout the menstrual cycle. J Endocr 1975; 64:555-71.
- 76.- Kemeter P, Friedrich F, Breitenecker G. Endocrine profile of preovulatory follicular fluid and blood. In: Hafez ESE, ed. Human ovulation. New York:Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1979: 133-48.
- 77.- Lobo RA, DiZerega G, Marrs RP. Follicular fluid steroid levels in dismature and mature follicles from spontaneous and hyperstimulated cycles in normal and anovulatory women. J Clin Endocrinol Metab 1985; 60:81-87.

- 78.- Seibel MM, Smith D, Dlugi AM, Levesque L. Perioovulatory follicular fluid hormone levels in spontaneous human cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68:1073-7.
- 79.- Frederick JL, Shimanuki T, diZerega GS. Initiation of angiogenesis by human follicular fluid. *Science* 1984; 224:389-90.
- 80.- Herriot DM, Warnes GM, Kerin JF. Pregnancy-related chemotactic activity of human follicular fluid. *Fertil Steril* 1986; 45:196-201.
- 81.- Bryant SM, Gale JA, Yanagihara DL, Campeau JD, diZerega GS. Angiogenic, mitogenic and chemotactic activity of human follicular fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158:1207-14.
- 82.- Watson ED, Sertich PL, Zanecosky HG. Detection of chemotactic factors in preovulatory follicular fluid from mares. *Am J Vet Res* 1991; 52:1412-5.
- 83.- Wilkinson PC, Haston WS. Chemotaxis: An Overview. In: Di Sabato, ed. *Methods in enzymology*. Vol 162. New York: Academic Press Inc, 1988:3-16.
- 84.- Miller RL. Site specific agglutination and the timed release of a sperm chemoattractant by the egg of the *Leptanedusan*, *Orthopyxis caliculata*. *J Exp Zool* 1978; 205:385-92.
- 85.- Hansbrough JR, Garbers DL. Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *J Biol Chem* 1981; 256:1447-52.

- 86.- Ward GE, Brokaw CJ, Garbers DL, Vacquier VD. Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer. *J Cell Biol* 1985; 101:2324-29.
- 87.- Bentley JK, Shinomura H, Garbers DL. Retention of a functional resact receptor in isolated sperm plasma membranes. *Cell* 1986; 45:281-8.
- 88.- Gnessi L, Ruff MR, Fraioli F, Pert CB. Demonstration of receptor-mediated chemotaxis by human spermatozoa. A novel quantitative bioassay. *Exp Cell Res* 1985; 161:219-30.
- 89.- García JE. In vitro fertilization. In: Wynn RM, ed. *Obstetrics and Gynecology Annual*. Norwalk, Connecticut: Appleton Century Crofts. 1985; 14:45-71.
- 90.- Sandow BA. Characteristics of human oocytes aspirated for in vitro fertilization. *Infertility* 1983; 6:143.
- 91.- World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, 2nd edition. Cambridge, The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1987:27.
- 92.- Zaneveld LDJ, Polakoski KL. Collection and physical examination of the ejaculate. In: Hafez ESE, ed. *Techniques of human andrology*. Vol I. Amsterdam: Elsevier/North Holland Inc. 1977, 148-172.
- 93.- Cutler JE. A simple in vitro method for studies on chemotaxis (38367). *Proc Soc Exp Biol Med* 1974; 147:471-4.

- 94.- Ling N, De Paolo LV, Bicsak TA, Shimasaki S. Nuevos péptidos reguladores ováricos: Inhibina, activina y follistatina. Clin Obstet Ginec 1990; 4:669-80.
- 95.- Yen SSC. The human menstrual cycle. In: Yen SSC, Jaffe RB eds. Reproductive endocrinology. Second edition. Philadelphia: WB Saunders Company, 1986:200-36.
- 96.- Robertson DM, Foulds LM, de vos F, Leversha L, de Krester DM. Identification of inhibin and inhibin-related proteins in human follicular fluid. Reprod Fertil Dev 1990; 2:327-35.
- 97.- Fowler PA, Messinis IE, Templeton AA. Inhibition of LHRH-induced LH and FSH release by gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF) from human follicular fluid. J Reprod Fertil 1990; 90:587-94.
- 98.- Sugawara M, Depaolo L, Nakatani A, DiMarzo SJ, Ling N. Radioimmunoassay of follistatin: application for in vitro fertilization procedures. J Clin Endocrinol Metab 1990; 71: 1672-4.
- 99.- Giudice LC, Farrell EM, Phan H, Rosenfeld RG. Identification of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) and IGFBP-2 in human follicular fluid. J Clin Endocrinol Metab 1990; 71:1330-8.
- 100.- Lavy G, Behrman HR, Polan ML. Purine levels and metabolism in human follicular fluid. Hum Reprod 1990; 5:529-32.
- 101.- Castilla JA, Sampalo A, Molina R y col. Mononuclear cell

- subpopulations in human follicular fluid from stimulated cycles. *Am J Reprod Immunol* 1990; 22:127-9.
- 102.- Curry TE, Mann JS, Estes RS, Jones PB. Alpha 2-macroglobulin and tissue inhibitor of metalloproteinases:collagenase inhibitors in human preovulatory ovaries. *Endocrinology* 1990;127:63-8.
- 103.- Lee DW, Shelden RM, Reichert LE. Identification of low and high molecular weight follicle-stimulating hormone receptor-binding inhibitors in human follicular fluid. *Fertil Steril* 1990; 53:830-5.
- 104.- Castilla JA, Molina R, Lopez-Nevot MA, Vergara F, Garrido F, Herruzo AJ. Immunosuppressive properties of human follicular fluid. *Fertil Steril* 1990;53:271-5.
- 105.- Campo SM, Rogers PA, Findlay JK. Sex-hormone-binding globulin in human follicular fluid and serum at the time of oocyte recovery. *Reprod Fertil Dev* 1989; 1:289-97.
- 106.- Amliel ML, Testart J, Benveniste J. Platelet-activating factor-acether is a component of human follicular fluid. *Fertil Steril* 1991; 56:62-5.
- 107.- Messinis IE, Templeton AA. Evidence that gonadotrophin surge-attenuating factor exists in man. *J Reprod Fertil* 1991; 92:217-23.
- 108.- Lee DW, Butler WJ, Horvath Pm, Shelden RM, Reichert LE. Human follicular fluid contains a follicle-stimulating hormone (FSH)

receptor binding inhibitor which has FSH agonist activity, is immunologically similar to FSH, but can be distinguished from FSH. J Clin Endocrinol Metab 1991;72:1102-7.

- 109.- Holownia P, Owen EJ, Hampl R, Jacobs HS, Honoar JW. The determination of 11 beta-hydroxyandrostenedione in human follicular fluid and plasma. J Steroid Biochem Mol Biol 1991; 38: 389-98.
- 110.- Leese HJ, Lenton EA. Glucose and lactate in human follicular fluid: concentrations and interrelationships. Hum Reprod 1990; 5:915-9.
- 111.- Shiotani M, Noda Y, Narimoto K y col. Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the human ovary. hum Reprod 1991; 6:1349-53.
- 112.- Hamori M, Blum WF, Torok A, y col. Insulin-like growth factors and their binding proteins in human follicular fluid. Hum Reprod 1991; 6: 313-8.
- 113.- Daniel WW. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 3ra ed. México:Limusa, 1987.
- 114.- Siegel S. Estadística no paramétrica. 2da ed. México: Trillas, 1972.