

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**



División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Maestría en Biología de la Reproducción Animal

**POSIBLE PARTICIPACIÓN DE LOS OVOCITOS DEGENERADOS  
CON LOS OVOCITOS VIABLES EN HEMBRAS HÁMSTER  
ADULTAS**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA DE  
LA REPRODUCCIÓN ANIMAL QUE**

**P R E S E N T A**

**Biól. Exp. Nancy Flores Guillén**

Director de Tesis

**Dr. Demetrio Alonso Ambríz García**

Asesora

**Dra. María del Carmen Navarro Maldonado**

Asesor

**Dr. Alfredo Trejo Córdova**

Ciudad de México, Noviembre 2016

## **COMITÉ DE TUTORES**

### **DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. Demetrio Alonso Ambriz García**

**Departamento de Biología de la Reproducción, D. C. B. S. UAM-I**

**Correo: [deme@xanum.uam.mx](mailto:deme@xanum.uam.mx)**

### **ASESORES**

**Dra. María del Carmen Navarro Maldonado**

**Departamento de Biología de la Reproducción, D. C. B. S. UAM-I**

**Correo: [carmennavarro2006@yahoo.com.mx](mailto:carmennavarro2006@yahoo.com.mx)**

**Dr. Alfredo Trejo Córdoba**

**Departamento de Biología de la Reproducción, D. C. B. S. UAM-I**

**Correo: [atrejo109@hotmail.com](mailto:atrejo109@hotmail.com)**

## **JURADO DE EXÁMEN**

### **PRESIDENTA**

**Dra. María del Carmen Navarro Maldonado**  
Departamento de Biología de la Reproducción, D. C. B. S. UAM-I  
Correo: [carmennavarro2006@yahoo.com.mx](mailto:carmennavarro2006@yahoo.com.mx)

### **SECRETARIO**

**Dr. Mario Pérez Martínez**  
Departamento de Morfología  
Facultad de Medicina Veterinaria, CU. UNAM  
Correo: [perezmtzmario@yahoo.com.mx](mailto:perezmtzmario@yahoo.com.mx)

### **VOCALES**

**Dr Alejandro Córdova Izquierdo**  
Departamento de Producción Agrícola y Animal D. C. B. S. UAM-X  
[Correoacordova@correo.xoc.uam.mx](mailto:Correoacordova@correo.xoc.uam.mx)

**Dr. Alfredo Trejo Córdova**  
Departamento de Biología de la Reproducción, D. C. B. S. UAM-I  
Correo: [atrejo109@hotmail.com](mailto:atrejo109@hotmail.com)

## **AGRADECIMIENTOS**

**El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Reproducción Animal Asistida (S-234) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.**

**La Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT número de registro 003797.**

**Se agradece el financiamiento por CONACYT número de becario 302992.**

**Número de CVU: 570748.**

## MIEMBROS DEL JURADO

Los miembros del jurado designado por la **División de Ciencias Biológicas y de la Salud**, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada

**Posible participación de los ovocitos degenerados con los ovocitos viables en hembras hámster adultas**

El día: 15 de Noviembre 2016



---

PRESIDENTA

Dra. María del Carmen Navarro Maldonado



---

SECRETARIO

Dr. Mario Pérez Martínez



---

VOCAL

Dr. Alejandro Córdova Izquierdo



---

VOCAL

Dr. Alfredo Trejo Córdova

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Dedico esta tesis en especial a quien ha demostrado ser toda una guerrera, mi hermosa princesa Merith, eres lo más bello que me ha ocurrido en la vida, quien me enseña a ser cada vez más fuerte, mantener la calma en los momentos más difíciles y a sonreír en los momentos tristes. Gracias Dios por darme la mayor bendición, mi Merith.

A mi sobrinita, Mía Alexandra mi otra pequeña princesa, quien también ha demostrado ser muy fuerte.

A mis padres Lucia y Antonio gracias a he logrado llegar hasta esta meta que me propuse, me han apoyado siempre en cada decisión que tomo, guiándome y acompañándome en cada meta propuesta, sueño logrado y en los momentos difíciles. Gracias por ser mi pilar incondicional.

Benito gracias por creer en mí, por tus consejos cuando más lo necesito y amor.

A Lorena mi hermana y confidente de mis sueños. Gracias por brindarme tu ayuda y consejos cuando más lo he necesitado.

A mis tíos Hortensia, Ángel e Hilda y primos, Tania, Briseida, Dante, Cetl e Iván por su apoyo. A mis abuelitos †María Sandoval; sin ti no hubiese empezado toda esta historia en la UAM, †Alejo, Matilde y †Rigoberto, sin duda muchas gracias por su apoyo, los recuerdo siempre con mucho amor, siempre están en mi mente y mi corazón.

A amigos y compañeros de laboratorio; Paola, Alma Delia, Ivonee, Araceli, Roberto, Tania, Estrella, Sarahí, José Luis, Alejandro, Adriana, Zaira, Lorena y Ernesto.

A los Doctores María del Carmen Navarro Maldonado, Demetrio Ambriz García, Alfredo Trejo Córdova por su especial apoyo en la realización de este proyecto.

Al Dr.Pablo Damián Matzumura por su ayuda y apoyo en este proyecto.

A la MVZ Tania Jiménez Cabrera por las fotografías de las Figuras 2 y 3, de aparato reproductor de hámster.

A la MVZ Rocío González Vieyra, responsable del bioterio de la UAMI, por las facilidades para el cuidado de los hámsteres.

Al personal de los talleres de mantenimiento en UAMI por la fabricación de las micro cámaras de microcanal.

## INDICE GENERAL

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>I.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	<b>5</b>
2.1. EL OVOCITO Y SU DESTINO .....	5
2.2. MADUREZ SEXUAL DE LA HEMBRA HÁMSTER.....	6
2.3. EL TRANSPORTE OVOCITARIO OVIDUCTAL.....	7
2.4. EL ESPERMATOZOIDE .....	9
2.5. CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA Y REACCIÓN ACROSOMAL .....	10
<b>III.- ANTECEDENTES</b>	<b>12</b>
3.1. CAMBIOS QUE OCURREN CON EL ENVEJECIMIENTO DE LOS OVOCITOS .....	12
3.1.1. CAMBIOS MORFOLÓGICOS DEL OVOCITO .....	12
<b>3.1.2. CAMBIOS NUCLEARES DEL OVOCITO</b> .....	<b>15</b>
3.1.3. CAMBIOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES ASOCIADOS A APOPTOSIS EN OVOCITOS.....	16
3.2. OVOCITOS DEGENERADOS .....	18
3.3. PRESENCIA SIMULTÁNEA DE OVOCITOS DEGENERADOS CON OVOCITOS VIABLES .....	20
3.4. QUIMIOTAXIS ESPERMÁTICA.....	21
<b>IV.- JUSTIFICACIÓN</b>	<b>25</b>
<b>V.- HIPÓTESIS</b>	<b>26</b>
<b>VI.- OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>VII.- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
7.1. ANIMALES .....	27
7.2. CONDICIONES DE BIOTERIO .....	27
7.3. OBTENCIÓN DE OVOCITOS .....	27
7.4 DEPÓSITO DE OVOCITOS EN CÁMARAS DE MICROCANAL .....	29
7.5. OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS.....	32
7.6. EVALUACIÓN ESPERMÁTICA .....	32
7.7. DEPÓSITO DE ESPERMATOZOIDES EN CÁMARA DE MICROCANAL .....	33
7.8. CONTEO DE ESPERMATOZOIDES EN POZOS DE SALIDA DE LA CÁMARA DE MICROCANAL.....	34
7.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	34
<b>VIII. RESULTADOS</b>	<b>35</b>
8.1. OBTENCIÓN DE OVOCITOS .....	35
8.2. EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS .....	36

8.3 ESPERMATOZOIDES QUE MIGRARON A LOS POZOS DE SALIDA .....	36
<b>IX. DISCUSIÓN</b>	<b>40</b>
<b>X. CONCLUSIÓN</b>	<b>47</b>
<b>XI REFERENCIAS</b>	<b>48</b>

## **ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

BSA	Albúmina Sérica Bovina (Bovine Serum Albumin)
OD	Ovocitos Degenerados
OV	Ovocitos Viables
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógenos (Mitogenic Activated Protein Kinase)
MPF	Factor Promotor de Maduración (Maturation Promoting Factor)
PAF	Factor Activador de Plaquetas (Platelet Activation Factor)
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species)
HTF	Fluido Tubal de Humano (Human Tubal Fluid)

## **INDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

Figura 1. Relación anatómica del ovario y oviducto.	4
Figura 2. Ovario y segmento oviductal en la bursa ovárica .	8
Figura 3. Relación anatómica del ovario, ovocito y útero	9
Figura 4. Ovocitos recién ovulados y envejecidos	13
Figura 5. Características de ovocitos recién ovulados y envejecido	14
Figura 6. Cambios cromosómicos de ovocitos	16
Figura 7. Ovocitos Degenerados del ámpula oviductal	18
Figura 8. Ovocitos degenerados de cuernos uterinos	19

Figura 9. Ovocitos viables con ovocito degenerado	20
Figura 10. Ovocitos Viables y Ovocitos Degenerados	28
Figura 11. Ovocitos Viables y Ovocitos Degenerados	28
Figura 12. Cámara de microcanal	29
Figura 13. Medidas de cámara de microcanal	29
Figura 14. Pozos de de entrada de cámara microcanal	31
Figura 15. Cámaras de microcanal en cajas Petri	31
Figura 16. Pozo de entrada en cámara de microcanal	34
Figura 17. Hembras con ovocitos viables y degenerados	35
Figura 18. Promedio de ovocitos viables y degenerados	36
Figura 19. Promedio de espermatozoides en pozos de salida OV vs OD	37
Figura 20. Promedio de espermatozoides en pozos OV vs Sin ovocitos	38
Figura 21. Promedio de espermatozoides en pozos OD vs Sin ovocitos	39
Tabla 1. Comparación de promedio de espermatozoides migrados	39

## Resumen

En las hembras hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*) el número promedio de ovocitos ovulados es de 10, los cuales tienen una vida fértil máxima de 13 horas. En hembras jóvenes (de 2 a 5 meses de edad), los ovocitos ovulados permanecen alrededor de 96 horas en el oviducto, donde envejecen y comienzan un proceso degenerativo, luego pasan al útero y de ahí son expulsados rápidamente al exterior por la vagina durante la micción. Sin embargo, en las hembras nulíparas adultas (más de 8 meses de edad) se ha observado en los oviductos la presencia de ovocitos degenerados (OD) provenientes de ovulaciones previas, simultáneamente a la de los ovocitos viables (OV) producto de la ovulación reciente; sin que se conozca el significado o efecto fisiológico de este fenómeno. Por ello, en este estudio se investigó si los OD pueden colaborar en la atracción de los espermatozoides. Para ello se utilizó un sistema de microcanal conteniendo medio HTF, que consistió en un dispositivo conformado por un pozo de entrada y dos pozos de salida conectados entre sí por microcanales formando una “Y”, emulando el aparato reproductor femenino. En los pozos de salida (A o B) se colocaron de manera independiente 4 OD, o 4 OV, o sin ovocitos, y se incubaron durante 2 horas. Posteriormente se colocaron 140,000 espermatozoides epididimarios capacitados en el pozo de entrada (C) y se volvió a incubar. A los 15 minutos se contaron los espermatozoides que migraron hacia los pozos A y B, encontrando que los que tienen mayor atracción son los ovocitos degenerados, seguidos de los viables (124 vs 113 espermatozoides, respectivamente,  $P > 0.05$ ) y ambos fueron mayores que los migrados donde no había ovocitos (30% vs. 11%,  $P > 0.05$ , respectivamente). Se concluye que la migración espermática inducida por los OD de hembras hámster adultas, puede contribuir en la fecundación.

## Abstract

In Syrian Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) females, the average number of oocytes ovulated is 10, which have a maximum of 13 hours of fertile life. In young females (2 to 5 months old), oocytes remain around 96 hours in the oviduct, where they begin a degenerative process and then reach the uterus to be expelled outside the vagina during urination. However, in adult nulliparous females (more than 8 months old) it has been observed the presence in oviducts of degenerated oocytes (OD) coming from the last ovulation, at the same time of viable oocytes (OV) product of the recent ovulation; without knowing the meaning or physiological effect of this phenomenon. That is why the present study research the chemotactic effect of OD toward spermatozoa. It was used a microchannel system containing HTF, which consisted on a culture dish with one input well and two output wells connected each one by microchannels forming a "Y", emulating the female reproductive tract. There were placed 4 OD, or 4 OV, or no oocytes into the output (A or B), and then incubated during 2 hours. Subsequently, there were settled 140,000 epididymary capacitated spermatozoa into the entry well (C) and incubated again. After 15 minutes of incubation, spermatozoa recovered and counted from A and B wells, showed an increased chemotactic effect of OD toward spermatozoa, when compared with OV (124 vs. 113 spermatozoa, respectively,  $P > 0.05$ ) and both results increased when compared with the well without oocytes (30% vs. 11%,  $P > 0.05$ , respectively). It concluded that spermatoc migration induced by OD from adult female hamster, might contribute to fertilization.

## I.- INTRODUCCIÓN

Las hembras de hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*) alcanzan la pubertad hacia el mes y medio de edad, en tanto que a los 6 meses se consideran adultas y a partir de los 10 meses senescentes (Soderwall *et al.*, 1960). Durante la ovulación, cada hembra libera en promedio 10 ovocitos viables (OV), los cuales dentro del oviducto tienen una vida fértil máxima de 13 horas, al cabo de las cuales comienzan a envejecer sufriendo cambios a nivel morfológico, celular y molecular (Liang *et al.*, 2009) que los conducen a la muerte celular, ocasionando una fragmentación del citoplasma, del núcleo y la distensión de la zona pelúcida.

Cuando estos signos son más manifiestos, al paso del tiempo, a estos ovocitos se les denomina ovocitos degenerados (OD) (Takase, 1995). Los OD fueron descritos inicialmente por Parkening en 1976, en hembras de hámster Sirio Dorado de 14 a 17 meses de edad y en ratonas de 12 a 17 meses, observándolos dentro del oviducto (área ámpulo-ístmica), determinando que permanecen junto a los ovocitos viables, es decir a aquellos correspondientes a la ovulación en curso, atribuyendo a esto un mal funcionamiento del transporte ovocitario debido a cambios propios de la edad avanzada de las hembras.

En otros trabajos, se ha descrito también la presencia de OD dentro del oviducto, en hembras de otros mamíferos como en la yegua, la burra (Steffenhagen *et al.*, 1972 y David, 1975) y la murciélaga (Rasweiler, 1979), donde se ha establecido que existe un transporte ovocitario y embrionario oviductal diferencial respondiendo a moléculas relacionadas con la activación del transporte oviductal procedentes de los ovocitos o embriones.

En el laboratorio donde se realizó el presente trabajo, también se había observado la presencia de OD simultánea a la de OV en hembras de hámster Sirio Dorado mayores de 8 meses de edad (Ambríz *et al.*, 2013), sin embargo, poco se ha avanzado para esclarecer el significado biológico y fisiológico de esta presencia simultánea de ovocitos degenerados con ovocitos viables más allá de un fallo vinculado con la edad de las hembras.

En relación a los ovocitos degenerados que se presentan en oviductos de hembras de edad avanzada, el argumento generalizado es que dicha hembra ha comenzado a presentar

trastornos reproductivos (Ej: producción de hormonas, formación y función de receptores, integración del eje hipotálamo hipófisis-gónada, arreglos cito arquitectónicos, calidad ovocitaria, unión y funcionalidad de la células cúmulus), que indican una disminución de la eficiencia reproductiva de las hembras conforme la edad avanza (Vantman y Vega, 2010).

En contraste es bien conocido que en hembras de menor edad (2 a 5 meses), los ovocitos viables y posteriormente envejecidos en caso de no fecundarse, permanecen en el tracto reproductor femenino por un tiempo, siendo finalmente expulsados, para que en la siguiente ovulación, los ovocitos viables tengan la oportunidad de fecundarse (Croxatto, 2002).

Las pocas investigaciones sobre esta temática, de la presencia simultánea oviductal de ovocitos viables y degenerados, no han profundizado sobre este fenómeno (Rasweiler, 1979)

El oviducto con sus múltiples funciones, entre las cuales podemos mencionar el tránsito de espermatozoides y ovocitos, la ambientación para el sitio de fecundación y el proveer lo necesario para el desarrollo embrionario temprano, es clave para entender este proceso fisiológico (Fig. 1), así como las moléculas ovocitarias y embrionarias involucradas. Debiendo conocer en primer lugar, cuál podría ser la función de la presencia simultánea de ovocitos degenerados y viables.

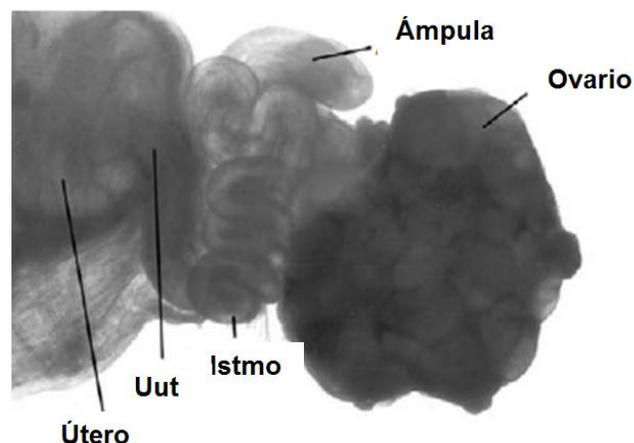


FIGURA 1 Relación anatómica entre el ovario, el oviducto (ámpula e istmo), la unión útero tubaria (Uut) y el útero, en la hembra hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*). Microscopio de disección 70X (Tomado de Wassarman y Albertini 1994).

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. El ovocito y su destino

En mamíferos, la formación del ovocito comienza durante la vida fetal. Este gameto femenino continuará su crecimiento y maduración en las diferentes edades del individuo, alcanzando su plenitud cuando la hembra sea adulta y sexualmente madura. Durante la vida fetal, las ovogonias ( $2n$ ) se dividen varias veces por mitosis, hasta convertirse en ovocitos primarios ( $2n$ ), en los cuales se inicia la primera división meiótica, la cual queda detenida en estadio de diploteno de la profase I. En la mayor parte de los mamíferos, dicha etapa continúa después del nacimiento y hasta que la hembra alcanza la pubertad. En este periodo de profase I, al núcleo del ovocito se le conoce como vesícula germinal (Wassarman y Albertini, 1994 y Betancourt *et al.*, 2003).

Después de la pubertad, los ovocitos primarios completan la meiosis I, produciendo un ovocito secundario que posee característicamente un primer cuerpo polar, entonces este ovocito secundario comienza la meiosis II, siendo ovulado en la etapa de metafase II. En la ovulación, el ovocito secundario abandona el folículo ovárico, es captado por la fimbria y pasa al oviducto a través del *ostium*, recorriendo pausadamente el primer segmento oviductal: el ámpula, hasta la unión con el segundo segmento: el istmo. En caso de ocurrir el apareamiento y depósito seminal, el ovocito puede entonces ser fecundado por el gameto masculino y completar así la meiosis II, produciendo en consecuencia el segundo cuerpo polar e iniciando su recorrido por el resto del oviducto, el proceso de desarrollo embrionario temprano, y al término pasará al útero donde se implantará y continuará su desarrollo fetal hasta ocurrir el nacimiento.

En caso de no haber fecundación, por ausencia de apareamiento, semen, o algún otro proceso reproductivo involucrado, el ovocito, que tiene característicamente una vida media corta (alrededor de 13 horas para el hámster) comenzará a envejecer y terminará por degenerar siendo expulsado hacia el útero, vagina y de ahí al exterior comúnmente a través de la micción (Tórtora *et al.*, 2006 y Liang *et al.*, 2009). En el siguiente ciclo reproductivo la hembra estará en la posibilidad de ovular otros ovocitos, para reintentar el proceso de fecundación (Croxatto, 2002).

## 2.2. Madurez sexual de la hembra hámster

El hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*) es, dentro de las especies de mamíferos de bioterio, la que tiene el menor tiempo de duración de la gestación con tan solo 16 días. Al igual que otros roedores, presenta precocidad para su madurez sexual. En la hembra hámster Sirio Dorado, la madurez sexual ocurre a los 3 meses de edad, cuando alcanza un peso promedio de 100 gramos. El ciclo estral en esta especie tiene una duración de cuatro días, con un particular rápido desarrollo y regresión del cuerpo lúteo (Magalhaes, 1970 y Centro de Estudios Agropecuarios, 2001).

Se sabe que las hormonas gonadotrópicas hipofisarias, de manera semejante a lo que ocurre en otros mamíferos, regulan la maduración y ovulación de los folículos ováricos. Bivin *et al.*, en 1987, señalaron que el inicio del estro en el hámster ocurre durante las primeras 8 horas de la ovulación y que, al igual que en la rata y ratón, es evidenciado por la conducta de lordosis. Cuando el fotoperiodo controlado proporciona luz de las 6 am a las 6 pm, la ovulación ocurre de la media noche a la 1 am. El número promedio de ovocitos ovulados es de 10, con un tamaño aproximado de 70  $\mu\text{m}$  de diámetro y vida fértil máxima de 13 horas (Hoosier y Mc Pherson, 1987).

Las hembras hámster presentan pubertad hacia los 35 días de edad. Cuando las hembras están en presencia de machos con capacidad fértil, las gestaciones suelen ocurrir al segundo o tercer ciclo estral, dado que los primeros ciclos estrales tienden a ser silentes o anovulatorios. El que esta especie tenga la posibilidad de gestar a edades tempranas, no significa que ha alcanzado la madurez reproductiva, antes bien, este término ha sido utilizado en situación controlada de bioterio, en donde, si se retarda el momento de apareamiento y en consecuencia de la gestación hacia el tercer mes, así la hembra tendrá mejor rendimiento reproductivo, prolificidad y tasa de sobrevivencia de las crías, razón por la cual en el manejo intensivo de esta especie en situación controlada de bioterio, se prefiere el primer apareamiento de las hembras hámster al cumplir su tercer mes de vida (Centro de Estudios Agropecuarios, 2001).

Desde el primer parto y hasta el quinto, la hembra hámster va aumentando el número de crías al nacimiento y al destete, el cual ocurre a los 21 días de edad. A partir del quinto parto la prolificidad va mermando subsecuentemente (Magalhaes, 1970).

En el bioterio se tiene estimado que la vida media del hámster es de dos años y en términos comparativos convencionales se sugiere que cada dos semanas de vida de un hámster equivalen a un año de edad de un humano (Centro de Estudios Agropecuarios, 2001).

### **2.3. El transporte ovocitario oviductal**

El oviducto de los mamíferos es un órgano tubular simple, con secreción activa de fluidos que proporcionan el entorno necesario e indispensable para la maduración de los gametos, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Anzaldúa *et al.*, 2003, Croxatto, 2002).

El transporte oviductal es fundamental para el paso de los ovocitos y los embriones hacia el útero, además dicho transporte es altamente conservado entre diferentes especies de mamíferos y se reconoce como un proceso fisiológico sincronizado de manera muy precisa (Croxatto, 2002).

A la vez que ocurre el desarrollo embrionario preimplantacional en el oviducto, el tejido uterino se prepara para la implantación, para lo cual existen numerosas señales moleculares provenientes del ovocito, tejido oviductal y del ovario, que interactúan de manera intensa para entre todas ellas, lograr el éxito en la implantación (Zhaojing *et al.*, 2013).

Existen algunos factores que modifican este proceso fisiológico de transporte ovocitario por el oviducto, entre los cuales figuran la edad avanzada de la hembra, la cual ocasiona que la eficiencia en el proceso reproductivo disminuya (Vantman y Vega, 2010). Es por ello que hembras de mamíferos de edades avanzadas tienden a tener menores tasas de éxito reproductivo. Dada la complejidad del proceso y la gran cantidad de factores involucrados, se ha destacado que, a pesar de los grandes adelantos en el área médica que han permitido incluso aumentar en mucho la expectativa de vida de los mamíferos, en contraparte, el reloj

reproductivo no ha podido ser modificado substancialmente, especialmente de las hembras, aunque cabe aclarar que la reproducción asistida ha permitido grandes logros en casos complejos de infertilidad (Vantman y Vega, 2010).

En el caso del hámster, el recorrido del ovocito por el primer segmento del oviducto (de la fimbria a la unión ampulo-ístmica), ocurre en aproximadamente 18 horas, que es semejante a lo ocurrido en la rata y el ratón. Sin embargo el recorrido por el segundo segmento (istmo) hasta alcanzar la unión útero-tubaria, lleva entre 72 y 96 horas, dependiendo de si son transportados ovocitos o embriones (Croxatto y Ortíz, 1975). En el caso del tránsito por el segundo segmento oviductal, en la rata es más rápido para los ovocitos que para los embriones, en tanto que en el hámster, de manera contraria el recorrido es más rápido para los embriones. Esto se ha explicado a través de la producción mayor, en esta especie, del Factor Activador de Plaquetas (PAF), que se ha demostrado que produce el embrión de hámster, el cual es la señal que favorece la contracción peristáltica de la musculatura lisa del istmo, que a su vez permite el avance más rápido de los embriones. Esta misma señal (PAF), está involucrada en el paso de los embriones desde el istmo oviductal hacia el útero, por la unión útero-tubaria, razón por la cual el umbral del esfínter (en la región útero-tubaria), ha sido relacionado con el contenido de PAF (Velásquez y Croxatto, 1995). Es importante mencionar que los embriones que producen mayor cantidad de PAF son los de 8 blastómeros y las mórulas (Figuras 2 y 3).



FIGURA 2 Ovario y segmento oviductal dentro de la bursa ovárica de hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*), se muestra también el tejido adiposo adyacente. Microscopio de disección 70X.

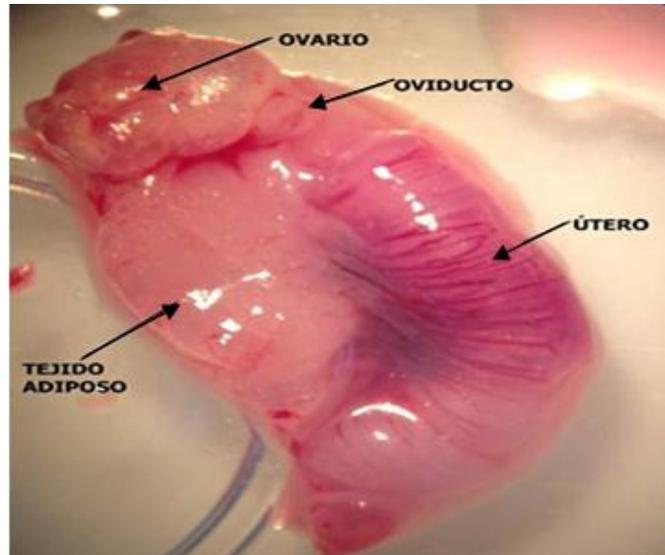


FIGURA 3 Relación anatómica del ovario, oviducto y útero de hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*). Sobre el ovario, algunos cuerpos hemorrágicos indican la ovulación reciente. Microscopio de disección 70X.

## 2.4. El espermatozoide

El espermatozoide es el gameto masculino, se forma mediante el proceso de división meiótica denominado espermatogénesis que está controlada hormonalmente por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Está formado por cabeza, pieza media y flagelo. Dentro de la cabeza está el núcleo, la vesícula acrosomal y un centriolo (Darszon *et al.*, 2008).

El espermatozoide testicular que ha sufrido espermatogénesis y espermiogénesis, ha comenzado a madurar desde el punto de vista morfológico, pero no ha adquirido aún la movilidad progresiva ni la capacidad fisiológica para fecundar al ovocito. En muchas especies, la movilidad progresiva y la competencia de fecundación se adquieren durante el tránsito epididimal del espermatozoide, pero la capacidad de fecundación completa *in vivo*, solo se consigue dentro del tracto reproductor femenino durante un periodo determinado de tiempo. Los eventos moleculares y fisiológicos que confieren a los espermatozoides la capacidad de

fecundar durante su permanencia en el tracto femenino se conocen conjuntamente como capacitación (Visconti *et al.*, 1998 y Olivera *et al.*, 2006).

## **2.5. Capacitación espermática y reacción acrosomal**

Para que el espermatozoide de mamífero pueda mostrar su habilidad de fecundación debe pasar inicialmente, como se ha mencionado, por un proceso de capacitación, el cual lleva a cambios importantes en la remodelación de moléculas de su superficie que le permitirán hacer altamente específicos los sitios de unión y prepararlo para otros cambios membranales importantes, tales como la fusión de la membrana acrosomal interna con la citoplásmica, lo cual permitirá a su vez, la liberación de las enzimas acrosomales necesarias para dispersar las células *cúmulus* que rodean y protegen al ovocito, así como digerir con enzimas proteolíticas la zona pelúcida e ir internalizándose hasta contactar con el citoplasma ovocitario y, en su caso, realizar la fecundación (Darszon *et al.*, 2008).

El proceso de capacitación espermática se lleva a cabo en el interior del tracto reproductor femenino en el tiempo en que el espermatozoide es trasladado, preferentemente de manera pasiva, por mecanismos de movimiento del útero y del oviducto. Gracias a una presión negativa, movimiento muscular peristáltico o por el batimiento de las células ciliadas, viaja desde donde ha sido depositado (fondo de vagina principalmente), hacia las zonas de reservorios, como las criptas endometriales y pliegues oviductales, y de ahí hasta el sitio de fecundación (unión ámpulo-ístmica) (Olivera *et al.*, 2006).

Durante el proceso de capacitación espermática también ocurren cambios metabólicos importantes tales como, un aumento en el consumo de oxígeno y la redistribución intracelular del calcio (Olivera *et al.*, 2006)

Además, en la capacitación espermática se presentan cambios en el patrón de movimiento, proceso conocido como hiperactivación, es decir, un movimiento vigoroso y progresivo del espermatozoide con coordinación del batimiento flagelar que lo propulsa hacia adelante. Es

importante mencionar que, cuando el espermatozoide se encuentra próximo al ovocito, este movimiento es modificado hacia uno conocido como de estrella, en el cual el movimiento de látigo o movimiento vigoroso de la pieza terminal hacia el final del flagelo, provoca el cambio de dirección frecuente, dibujando con ello la forma de una estrella, teniendo por resultado poco avance y mucho movimiento en el mismo sitio. Este movimiento facilita el encuentro con el ovocito en la región oviductal ya señalada (Darszon *et al.*, 2008 y Suárez *et al.*, 1992)

Cuando el espermatozoide es eyaculado, lo acompaña el líquido seminal proveniente de las glándulas sexuales accesorias tales como, próstata, bulbouretrales, seminales y, en su caso, coagulantes. Estos componentes traen consigo moléculas descapacitantes para proteger al espermatozoide frente a las condiciones inhóspitas en que será recibido en el interior de la vagina (Ej. pH ácido). Además de que, cuando el espermatozoide inicia el proceso de capacitación y llega al estado de hiperactivación, su vida media se acorta considerablemente, en contraposición, en tanto que permanezca en contacto con los factores descapacitantes del líquido seminal o desprovisto de ellos pero no llegue a la hiperactivación, su vida media puede alargarse (Arenas *et al.*, 2010 y Olivera *et al.*, 2006).

Entre algunas de las moléculas importantes para la ocurrencia del proceso de capacitación y, en especial, de la reacción acrosomal en el entorno fisiológico oviductal, se encuentran la progesterona y el calcio, que forman un gradiente de distribución desde la parte proximal de los ovarios y hasta el útero, siendo más manifiesto a lo largo de los oviductos, en donde ocurre principalmente el proceso de capacitación e hiperactivación del espermatozoide (Olivera *et al.*, 2006).

Dentro del oviducto, los movimientos musculares de la región del istmo están coordinados para orientar y facilitar el tránsito de los espermatozoides hacia la región de la unión ámpulo-istmica, colaborando así con el encuentro de los espermatozoides y el ovocito, el cual espera en el esfínter de la región anteriormente mencionada, llevado hasta ahí básicamente por movimientos ciliares de las células del interior del ámpula, pero en mayor consideración por el flujo del líquido oviductal formado desde la bolsa ovárica (en los roedores) y la región más apical del ámpula (Croxatto, 2002).

### III.- ANTECEDENTES

#### 3.1. Cambios que ocurren con el envejecimiento de los ovocitos

El tiempo estimado de viabilidad para la fecundación eficiente de un ovocito a partir de la ovulación, va de 12 horas para el ratón (Liang *et al.*, 2009), 13 horas en hámster Sirio Dorado ( Hoosier Van y Mc Pherson, 1987), 14 horas en rata, y un poco más de 24 horas en mono *Rhesus* y en humano (Austin, 1974). Después del tiempo mencionado, los ovocitos en condiciones *in vivo* e *in vitro* que no fueron fecundados, pasan por un proceso en el que la calidad de ambos se ve afectada debido a un deterioro, este proceso es llamado “envejecimiento del ovocito” (Liang *et al.*, 2009 y Takahashi *et al.*, 2013). Tomando en cuenta que el envejecimiento tanto *in vivo* e *in vitro* de los ovocitos post-ovulados está asociado a cambios en varias vías moleculares involucradas en mecanismos de señalización intracelulares, éstos comparten propiedades que a continuación se describen (Takahashi *et al.*, 2013).

##### 3.1.1. Cambios morfológicos del ovocito

Se ha observado que los ovocitos envejecidos tienen cambios en la estructura del oolema, mostrando un espacio perivitelino grande, un endurecimiento y distensión de la zona pelúcida, desplazamiento periférico de los gránulos corticales provocando exocitosis parcial de éstos. La distribución característica de los lisosomas periférica y distante de los cromosomas, permite diferenciar ovocitos normales o viables de los envejecidos que tienen una distribución de lisosomas agregada preferentemente cerca de los cromosomas (Figura 4) (Liang *et al.*, 2009 y Takahashi *et al.*, 2013).

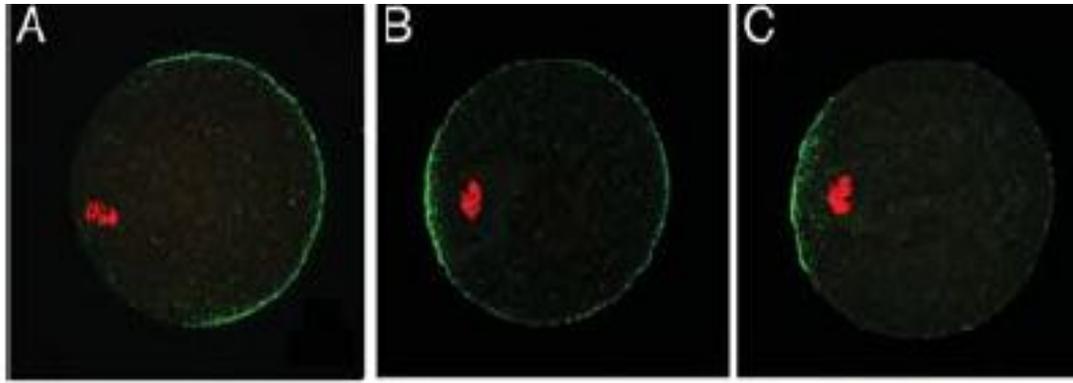


FIGURA 4 Ovocitos recién ovulados (viables) en comparación con ovocitos envejecidos de ratona, que muestran la distribución de los gránulos corticales (verde) opuestos a la posición de los cromosomas (rojo). En A) la posición correcta de los gránulos corticales en ovocitos viables, B) y C) Se observa la distribución anormal de los gránulos corticales cerca de los cromosomas en los ovocitos envejecidos (Tomado de Liang *et al.*, 2009).

Por otro lado, se ha señalado que los ovocitos envejecidos presentan la formación de pequeños complejos de vesículas en las mitocondrias. También se ha reportado que el potencial de membrana mitocondrial disminuye, dando lugar a la inflamación de la matriz mitocondrial. También ocurre el desplazamiento y la degeneración del primer cuerpo polar, aumentando la distancia entre éste y el huso meiótico (Liang *et al.*, 2009 y Takahashi *et al.*, 2013). Cabe recordar que el huso meiótico es una estructura celular muy importante para asegurar la distribución cromosomal normal.

El envejecimiento de los ovocitos causa un rompimiento y pérdida de la agrupación del huso meiótico en animales experimentales y en humanos. Los microtúbulos gradualmente son separados del huso meiótico. Estos cambios llevan a la separación prematura de los cromosomas, proceso que está fuertemente asociado con problemas de aneuploidía (Takahashi *et al.*, 2013).

En la Figura 5 se resumen los principales cambios morfológicos y celulares que tienen lugar durante el envejecimiento del ovocito.

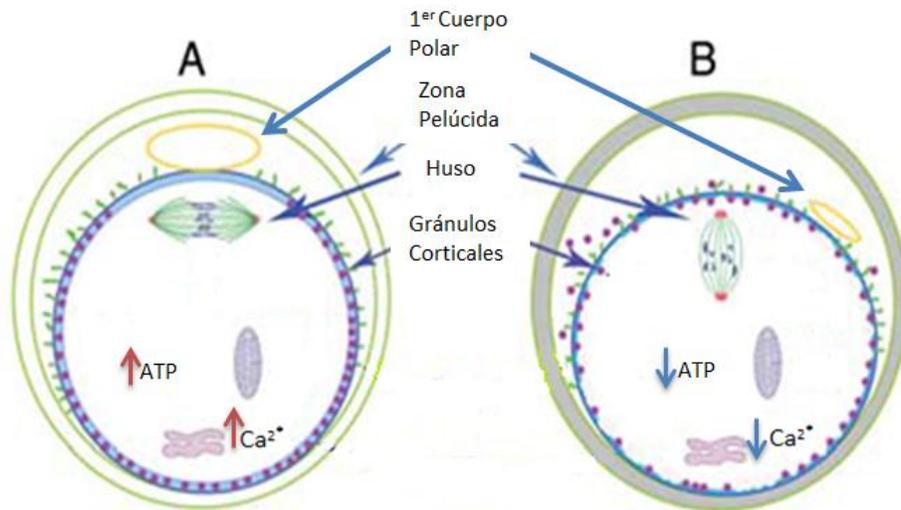


FIGURA 5 A) Características de un ovocito recién ovulado. B) cambios morfológicos y celulares en el ovocito después de 12 horas de haber sido liberado hacia el oviducto (Modificado de Liang *et al.*, 2009).

Se ha relacionado a la mitocondria con los cambios celulares ocurridos durante el proceso de envejecimiento, en virtud a modificaciones en el proceso de generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Además, como parte de estos cambios está el desbalance mitocondrial, es decir, la modificación en el patrón del proceso de fusión y fisión mitocondrial. Así, se forman de manera anormal mitocondrias extremadamente grandes o demasiado pequeñas, las cuales poseen una actividad metabólica deficiente, teniendo en consecuencia un aumento en la producción de ERO, además de una disminución en el potencial de membrana mitocondrial con pérdida de homeostasis del calcio y liberación de moléculas apoptogénicas (Simons *et al.*, 2009).

Cabe hacer mención que, las ERO son moléculas con un electrón desapareado y por ello tienen alta capacidad de reaccionar para procurar completar el electrón faltante, el cual sustraen ávidamente de otra molécula próxima y disponible, generando con ello una reacción en cascada con consecuencias en las moléculas que permanecen inestables por esta condición de electrones desapareados. Entre las ERO más importantes se encuentra el anión o radical superóxido ( $O_2^-$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ). En tanto que el peróxido de hidrógeno

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no es un radical libre como tal, aunque si es un importante generador de ellos (Domínguez 2010).

El (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) es la primer ERO que se produce en la mitocondria, producto de la reducción del O<sub>2</sub> por el electrón desapareado, luego con la superóxido dismutasa II o de manganeso, presente en la matriz mitocondrial, o por la superóxido dismutasa I, que contiene Cobre-Zinc, presente en el espacio intermembranal. Dicho radical será transformado en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que, como ya se mencionó, por no ser un ERO es mucho más estable que el anterior, éste puede fácilmente atravesar las membranas de la mitocondria o ser transportado por aquaporinas. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede ser eliminado por enzimas antioxidantes en el citosol, tales como las catalasas, peroxidases y tioredoxinas, o afectar vías de señalización como segundo mensajero, afectando vías de transducción de señales involucradas en la regulación del ciclo celular, capacidad de respuesta al estrés, balance redox y posiblemente otras más. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede, en presencia de metales, participar de la reacción de Fenton, donde el resultado será la formación de otro ERO, el (OH<sup>-</sup>) (Kowaltowski *et al.*, 2009).

### **3.1.2. Cambios nucleares del ovocito**

En la siguiente Figura (Fig. 6), en el panel B1 se muestra la alineación normal de los cromosomas, la cual es comparada con las alteraciones que llegan a presentarse en el huso mitótico durante el proceso de envejecimiento ovocitario. Se observan los tipos de desplazamiento del huso mitótico (descrito en los siguientes incisos) ocasionando la desalineación de los cromosomas (Liang *et al.*, 2009).

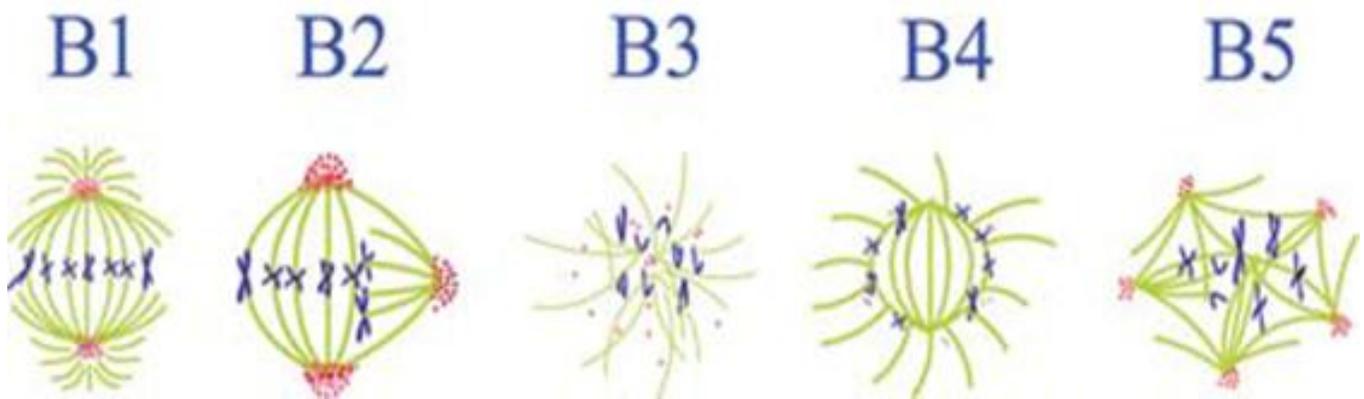


FIGURA 6 Cambios que presentan los cromosomas de los ovocitos después del tiempo óptimo de fecundación. B1) Cromosomas con alineación normal. B2) Huso tripolar. B3) El huso está altamente desorganizado con centrosomas y cromosomas dispersos. B4) El huso está irregular con tubulina densa, con la cromatina unida a los bordes exteriores del huso en forma de rosetas. B5) Huso multipolar (Liang *et al.*, 2009).

Fissore *et al.* (2002) señalaron que, los ovocitos envejecidos de ratona, muestran características anormales morfológicas como son, la desaparición de la zona de microfilamentos sobre el huso meiótico y la desorganización de la cromatina.

### 3.1.3. Cambios bioquímicos y moleculares asociados a apoptosis en ovocitos

Los cambios antes mencionados que ocurren en ovocitos post-ovulados, parecen ser consecuencia de la disminución de las actividades del Factor Promotor de Maduración (siglas en inglés MPF) y de la Proteína Cinasa Activada por Mitógenos (Siglas en inglés MAPK). Dichos cambios se presentan más rápido en el oviducto *in vivo* que lo que ocurren en condiciones *in vitro*. Este deterioro progresivo lleva a la fragmentación del ooplasma en ausencia de la fecundación. Cambios morfológicos como éste fueron observados por Takase *et al.* 1995, quienes mostraron mediante cultivos de ovocitos no fecundados de ratona mantenidos durante amplios períodos, que éstos experimentan fragmentación citoplásmica,

acompañados por fragmentación del ADN. Evidenciado mediante la técnica de TUNEL (Terminal Transferase DUTP Nick End Labelling) (TdT), mostrando signos clásicos de muerte celular programada o apoptosis.

Takahashi *et al.* (2013) mencionan que, hay cambios en la disminución de los niveles intracitoplasmático de glutatión (GSH), disminuyendo la función de protección de ovocitos en el daño que sufren por las especies reactivas de oxígeno (ERO). Además de que existe un aumento del nivel de peroxidación lipídica (indicador del grado de estrés oxidativo), en ovocitos de ratón *in vivo*. Inclusive reportaron una disminución del nivel intracitoplasmático de ATP. Los mismos autores mencionaron además que, hay una disminución de la expresión de BCL-2, (proteína antiapoptótica), alteración que ocurre en ovocitos de ratona tanto *in vivo* como *in vitro*. Aunado a esto, se ha reportado que los ovocitos de ratona expresan varias caspasas, proteasas responsables del desmantelamiento de las células, además varios de los miembros anti y pro-apoptóticos que son miembros de la familia de genes BCL2 y del linfoma celular B2 (Fissore *et al.*, 2002).

BCL2 es una familia de proteínas reguladores clave del proceso de apoptosis, las cuales ejercen su función a nivel mitocondrial mediante la regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa. La mayoría de las proteínas de la familia BCL2 poseen un dominio transmembranal C-terminal (TM), lo que permite su anclaje en las membranas mitocondriales, así como a las membranas de otros organelos celulares tales como, el retículo endoplásmico (ER) y la envoltura nuclear. Se han encontrado varios miembros de la familia BCL2 que se expresan en ovocitos de mamíferos (Boumela *et al.*, 2011). Estos miembros anti-apoptóticos actúan bloqueando la liberación de citocromo C, un componente de la cadena respiratoria mitocondrial, que induce la activación de caspasas cuando se libera en el citosol, mientras que los miembros pro-apoptóticos de la familia promueven la liberación de este factor (citocromo C) (Fissore *et al.*, 2002).

Ya que han ocurrido los cambios celulares moleculares y bioquímicos en los ovocitos envejecidos post-ovulados no fecundados, entonces, son sometidos a la fragmentación

citoplasmática espontánea. Takahashi *et al.* (2013), proponen que estas células están predispuestas a presentar apoptosis debido a la disminución de la expresión de BCL-2.

### 3.2. Ovocitos Degenerados

Parkening en 1976, reportó la presencia de ovocitos degenerados junto con embriones preimplantados, presentes en el ámpula oviductal, en la mañana de la ovulación en hembras multíparas de hámster Sirio Dorado, así como en ratonas senescentes. Dicho autor observó que el vitelo de todos los ovocitos degenerados de estos roedores estaban en un estado avanzado de deterioro, mostrando una zona pelúcida íntegra y aumentada en su tamaño, además de encontrar al ovocito en diferentes etapas de fragmentación, los cuales fueron más fácilmente identificados debido a que estaban rodeados de células *cúmulus*. Posteriormente estas células fueron removidas con hialuronidasa y se determinó que dichos ovocitos habían sido ovulados en varios ciclos estrales anteriores y que no fueron fertilizados (Figuras 7 y 8).



FIGURA 7 Ovocitos degenerados recuperados del ámpula (lado izquierdo) e istmo (lado derecho), de oviducto de hembra hámster Sirio Dorado senescente, en la mañana de la ovulación. Microscopio de Nomarski a 225X. (Parkening, 1976).



FIGURA 8 Ovocitos degenerados recuperados de cuernos uterinos de hámster senescente, a los tres días de preñez. Microscopio de Nomarski a 225X. (Parkening, 1976).

Posteriormente, Rasweiler en 1979 reportó haber encontrado en los oviductos de hembras murciélago (*Glossophaga soricina*), ovocitos en la zona del ámpula, con característicamente una zona pelúcida intacta y en su interior sólo detritos celulares.

Estos ovocitos retenidos en los oviductos habían sido ovulados en anteriores ciclos reproductivos no fértiles y fueron clasificados como ovocitos degenerados. El número de éstos dentro del oviducto varió de 0 a 4 y parecían estar en diferentes etapas de degeneración, por lo que se sugirió que habían sido ovulados en diferentes momentos, en especial porque esta especie de murciélago solo ovula un ovocito por ciclo. En algunas hembras murciélago en las que encontraron blastocistos implantados, se observó también la presencia de ovocitos degenerados dentro del oviducto, a través de los cuales el embrión había pasado, lo que indicó que los oviductos en esta especie podían distinguir de alguna manera, entre embriones sanos y ovocitos muertos o una zona pelúcida vacía, para permitir el paso de los primeros y retener a los segundos. Además, se estableció que los oviductos eran funcionalmente normales.

Dado que los ovocitos degenerados solo se han encontrado en hembras hámster y ratones de edades avanzadas, Rasweiler (1979) sugirió que este fenómeno de retención puede ser el resultado de desbalances en los mecanismos de señalización para el transporte ovocitario

oviductal o deficiencias hormonales propias de edades avanzadas de las hembras y que repercuten en el correcto funcionamiento oviductal.

### 3.3. Presencia simultánea de ovocitos degenerados con ovocitos viables

Como se ha visto, la etapa de envejecimiento ovocitario precede a la de degeneración, en esta última se ha descrito fragmentación celular, nuclear y la distensión de la zona pelúcida. Este tipo de ovocitos (degenerados), se distinguen fácilmente de los ovocitos viables. En la siguiente Figura (Fig. 9) se muestran estos dos tipos celulares.



FIGURA 9: Ovocito degenerado con el citoplasma extruído y la zona pelúcida de mayor diámetro (izquierda): Ovocitos viables (el inferior con un cuerpo polar), obtenidos por lavado del oviducto de una hembra hámster adulta de edad avanzada (mayor de 8 meses) y en estro (derecha). Microscopio Invertido 200X.

Los ovocitos envejecidos y degenerados, serán desalojados del oviducto por los movimientos de las células ciliadas y los fluidos propios de ese conducto (Ambríz *et al.*, 2013). Es decir que, aquellos ovocitos que no hayan sido fecundados, comenzarán su proceso de envejecimiento y degeneración y en condiciones fisiológicas, serán expulsados del oviducto, permitiendo, en las siguientes ovulaciones que los ovocitos viables ocupen su lugar.

En el laboratorio de Reproducción Animal Asistida de la UAMI, se han estudiado desde hace tiempo, los efectos de la edad avanzada de las hembras hámster sobre la reproducción. Así, se ha reportado que en hembras de hámster Sirio Dorado adultas (mayores a 8 meses de edad) ocurre un retraso y una asincronía en el desarrollo embrionario, lo cual es contrario a lo observado en hembras jóvenes (2 meses de edad) en las que sus embriones se desarrollan sincrónicamente (Trejo *et al.*, 2005 y 2008). También se ha observado que, en oviductos de hembras hámster adultas nulíparas de 8 meses de edad, existen ovocitos degenerados provenientes de ovulaciones previas, los cuales permanecen en el tracto oviductal en presencia simultánea con ovocitos viables de la ovulación reciente. Es decir, en estas hembras de edad avanzada, de manera aún poco clara, los ovocitos que no fueron fecundados no son expulsados del oviducto, sino que son acumulados durante más de un ciclo estral (Ambríz *et al.*, 2013).

### **3.4. Quimiotaxis espermática**

En mamíferos se ha demostrado que tanto el líquido folicular, como los ovocitos, producen sustancias capaces de atraer a los espermatozoides favoreciendo su transporte, capacitación y poder fecundante. Entre las sustancias quimioatrayentes involucradas se señala al líquido folicular, el péptido atrial natriurético, la heparina, la epinefrina, la adrenalina, la oxitocina, la calcitonina, la acetilcolina, el RANTES (Quimiocin Regulador en Activación Normal T Expresado y Secretado), la progesterona, el estradiol, el Factor Activador de Plaquetas (PAF), el óxido nítrico y las glicoproteínas que conforman la zona pelúcida (Barros *et al.*, 1996 y Gómez, 2004).

La quimiotaxis ha sido ampliamente demostrada en especies animales de fecundación externa, además de otras de fecundación interna tales como, humanos, ratones, conejos, cerdos (Zhaojing *et al.*, 2013) y caballos (Navarro *et al.*, 1998). Sin embargo, no debe soslayarse que la quimiotaxis de los espermatozoides hacia los ovocitos en mamíferos, es aún considerado un tema controversial (Lan *et al.*, 2010). Básicamente por dos cuestiones, la primera por el hecho de que el depósito seminal es realizado en el interior del tracto

reproductor femenino y la segunda por la complejidad de los sistemas empleados para su estudio y validación (Gómez, 2004).

A este respecto, la progesterona ha sido ampliamente estudiada, la cual es liberada durante la ovulación que está presente en el líquido folicular y es uno de los factores quimiotácticos potenciales que induce el aumento de la concentración intracelular de calcio y el movimiento flagelar de los espermatozoides (Coy *et al.*, 2012). Además de activar la proteína G que se acopla con los receptores que conducen a la activación de la membrana espermática por la adenilato ciclasa y el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Zhaojing *et al.*, 2013). Cabe mencionar que también se ha utilizado el término quimioactivación para definir no solo la posibilidad de que una célula responda a la atracción de alguna molécula, sino que ésta active parte de los mecanismos móviles involucrados del espermatozoide y que, a partir de ellos, pueda aproximarse con mayor fuerza e intensidad al punto de emisión de la molécula o centro de atracción (Lan *et al.*, 2010). Además de la quimoatracción y quimocinesis, se señala al fenómeno de atrapamiento como importante en los mecanismos de regulación de atracción espermática por señales hacia el ovocito. Dicho atrapamiento es la acumulación de espermatozoides en reservorios o regiones específicas del tracto reproductor femenino (Gómez, 2004). Los tres procesos son de gran relevancia dado que, aproximadamente del 10 al 12% de los espermatozoides de un eyaculado, son sensibles a ellos y, además, ocurren de manera continua, es decir, poco a poco la población espermática va siendo sensible a los estímulos (Gómez, 2004).

Cuando los ovocitos comienzan su proceso de envejecimiento, ocurren diversos cambios moleculares y celulares como son la disminución de proteínas anti apoptóticas BCL-2, la función mitocondrial, cambios en la zona pelúcida, cambios en el cuerpo polar, así como a nivel nuclear. Debido a estos cambios, hay un aumento en la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) que se va exteriorizando. Respecto a esto, se sabe, en contraparte que, los espermatozoides necesitan de la presencia de ERO en el aparato reproductor femenino para su adecuada capacitación (Fissore *et al.* 2002). Por lo que se piensa que las concentraciones secretadas de ERO por los ovocitos degenerados (OD),

posiblemente pueden contribuir al movimiento de los espermatozoides induciendo cambios bioquímicos, promoviendo la capacitación, ocasionando un aumento en la movilidad y sensibilidad para alcanzar la reacción acrosomal. También se piensa que la presencia en el oviducto de ovocitos con zonas pelúcidas, puede servir como atrayente de los espermatozoides, es decir que, los componentes estructurales de los ovocitos pueden generar la respuesta de atracción, como señalan Ito *et al.*, en 1991, cuando demostraron que la cantidad de espermatozoides que llegan al sitio de fecundación en el oviducto de hembras hámster, tiene relación directa con el número de ovocitos presentes y señales emitidas por ellos.

El papel de la quimiotaxis o algún otro proceso de atracción espermática *in vivo*, ha sido difícil de demostrar, quedando aun la especulación sobre si el proceso de fecundación obedece más a un efecto de colisión por azar o si en realidad existe un proceso de comunicación entre el ovocito y el espermatozoide, antes de su unión por medio de señales bioquímicas que, permitan la selección de gametos óptimos para la fecundación (Gómez, 2004).

La contracción del oviducto mueve líquidos desde el istmo hacia el ampulla y la sensibilidad del espermatozoide capacitado aumenta la posibilidad de que, *in vivo* la actividad quimiotáctica no sea ejercida en muchos espermatozoides sino en una población selectiva (Eisenbach, 1999).

El sitio preciso en que este proceso ocurre en el oviducto de los mamíferos no está claro, pero hay evidencias de que solo los espermatozoides capacitados son liberados desde el istmo hacia el ampulla, esto puede ser significativo debido al pequeño número de espermatozoides que son liberados desde el sitio de almacenamiento. En este lugar parecen estar atrapados por los pliegues de la mucosa oviductal o adheridos al epitelio, de manera que debe existir un mecanismo o una señal que los libere o que ejerza una atracción como la quimiotáctica (Gómez, 2004).

Sin embargo, el oviducto presenta movimientos contráctiles que parecen mover el fluido folicular en dirección contraria al transporte del fluido oviductal. También el transporte espermático depende de los movimientos ciliares, aquí es poco probable que haya un gradiente químico, así que la quimiotaxis puede suceder en la proximidad del ovocito, por lo

que es probable que el gradiente se produzca dentro de las células del *cúmulus* (Gómez, 2004). Estas células secretan *in vitro* sustancias que modifican el patrón de movilidad espermática, preferentemente con patrones erráticos o de estrella y, cuando fueron retiradas las células *cúmulus*, el patrón de movimiento fue direccional y también ocurrió un atrapamiento selectivo por las células del *cúmulus*.

Así, el proceso de quimiotaxis parece ser un proceso que solo ocurre en la vecindad del ovocito y que sean las células del *cúmulus* las que formen un gradiente, ya que solamente espermatozoides capacitados penetran estas células, o que el ovocito sea el que secrete el atrayente, o que ambos fluidos, el folicular y el oviductal, sean quimiotácticamente activos (Gómez, 2004).

Como se ha mencionado previamente, la presencia simultánea de ovocitos degenerados y viables en el oviducto de hembras hámster de edad avanzada, podría tener un efecto benéfico para la atracción de espermatozoides y posterior fecundación de los ovocitos viables, para compensar la baja eficiencia reproductiva característica de las hembras en edad avanzada (senescentes), lo que ocasiona que los ovocitos envejecidos o degenerados, no sean desalojados como lo haría el oviducto de una hembra joven.

#### IV.- JUSTIFICACIÓN

La presencia simultánea de ovocitos viables y ovocitos degenerados dentro del oviducto de hembras hámster de edad avanzada (mayores de 8 meses de edad), sugiere la posibilidad de que los ovocitos degenerados contribuyan a la fecundación de los ovocitos viables. Es probable que el material citoplásmico extruído o la zona pelúcida de estos ovocitos degenerados, actúen como atrayentes o activadores de los espermatozoides, hacia la región oviductal donde ocurre la fecundación y donde aguardan los ovocitos viables. Este trabajo de tesis es pionero en la temática, pues después de hacer una exhaustiva revisión de la literatura especializada, solo se menciona que en sistemas de maduración *in vitro* de ovocitos, hay ovocitos que degeneran, en tanto que otros alcanzan su maduración, pero no se explica el significado fisiológico de la presencia de los ovocitos degenerados simultáneos a los ovocitos viables, en oviductos de hembras en edad avanzada.

## V. HIPÓTESIS

Los ovocitos degenerados presentes en la región ampulo-ístmica del oviducto de hembras hámster Sirio Dorado nulíparas mayores de 8 meses de edad, pueden atraer o favorecer la llegada de los espermatozoides, contribuyendo así en la fecundación de ovocitos viables.

## VI. OBJETIVOS

### General

Determinar el posible efecto de los ovocitos degenerados sobre los espermatozoides en un sistema *in vitro*, en el hámster Sirio Dorado.

### Específicos

- 1.- Estandarizar el sistema de cámara de microcanal para el estudio de atracción de los espermatozoides hacia los ovocitos.
- 2.- Comprobar si la presencia de ovocitos degenerados tiene efecto sobre la atracción de los espermatozoides y compararlo con el que tendrían los ovocitos viables.

## **VII. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1. Animales**

Se utilizaron 28 hembras de hámster Sirio Dorado adultas, de 8 a 12 meses de edad, con un peso promedio de  $179 \pm 11$  gr, a las cuales desde los 2 meses de edad se les revisó la estricta regularidad de sus ciclos estrales, a través de la observación de la ocurrencia de la secreción vaginal postovulatoria, la cual se presentó cada 4 días. Además, se utilizaron 32 machos de fertilidad comprobada de  $132 \pm 16$  gr de peso promedio y de 4 a 6 meses de edad.

### **7.2. Condiciones de bioterio**

Las hembras fueron colocadas en grupos de 6 individuos en cajas de acrílico (32 x 40 x 22 cm), con cama sanitaria que se cambió dos veces a la semana, con agua y alimento peletizado a libertad. La permanencia en el grupo fue desde el momento del destete y hasta que fueron utilizadas. El bioterio conservó una temperatura promedio de 26°C. El cuarto de alojamiento de los hámsteres permaneció con un fotoperiodo de 14 horas luz (4 am a 6 pm) por 10 horas de oscuridad. Los machos permanecieron en grupos de 6 individuos y fueron mantenidos en las condiciones ya descritas. Estos machos fueron utilizados también en la colonia de reproducción para comprobar su fertilidad, con un periodo mínimo de 7 días de abstinencia para utilizarlos en el presente experimento.

### **7.3. Obtención de ovocitos**

En la tarde del estro, las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical (protocolo aprobado por Comisión de Ética de la División Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa). Posteriormente, mediante disección con abordaje por la línea media se obtuvieron

los ovarios y oviductos. Se realizó la perfusión de cada uno de los oviductos desde la fimbria con 1ml de medio HTF (Human Tubal Fluid, In Vitro S, A.), suplementado con 0.3% de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma) bajo el microscopio estereoscópico, en caja de poliestireno de 4 pozos Nunc y con la ayuda de una jeringa de insulina con aguja calibre 29, ésta última sin bicel y con un ángulo de 45° en la punta. Los ovocitos viables y degenerados (Figuras 10 y 11) fueron colectados y lavados con medio fresco suplementado (HTFs) por tres ocasiones, utilizando una pipeta Pasteur de punta alargada a la cual se le conectó una manguera de hule y una boquilla.



FIGURA 10 Ovocitos viables y ovocitos degenerados obtenidos de una hembra hámster adulta. Microscopio de disección a 70X.



FIGURA 11 Ovocitos viables y ovocitos degenerados obtenidos de hembra hámster adulta a mayor amento. Microscopio invertido a 200X.

#### 7.4 Depósito de ovocitos en cámaras de microcanal

Se colocaron los ovocitos en las cámaras de microcanal para la migración espermática. Éstas fueron elaboradas en el Taller de Mantenimiento (Torno) de la UAM Iztapalapa (Figura 12) utilizando como soporte una base de acrílico de 0.5 pulgadas de espesor y excavada con fresa de 3 mm de diámetro a una profundidad de 2mm. Los brazos (canales) de salida con una longitud de 5.8 mm, el canal de entrada de 9.4 mm de longitud y un diámetro de 3.2 mm (Figura 13). Se tomó como base para el diseño una adaptación de las cámaras construidas por Xie *et al.* (2010). Las cámaras fueron lavadas antes de cada experimento con agua destilada y posteriormente fueron secadas.

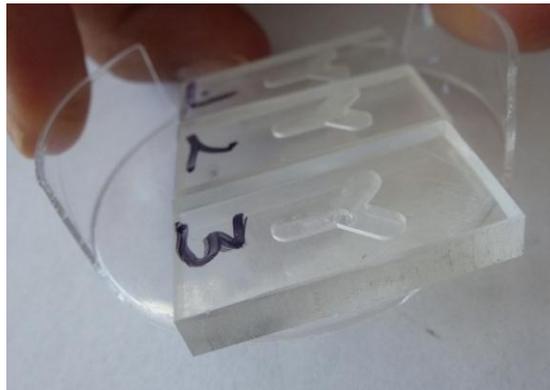


FIGURA 12 Se observan tres cámaras de microcanal en forma de “Y” elaboradas en UAMI, dispuestas para su llenado.

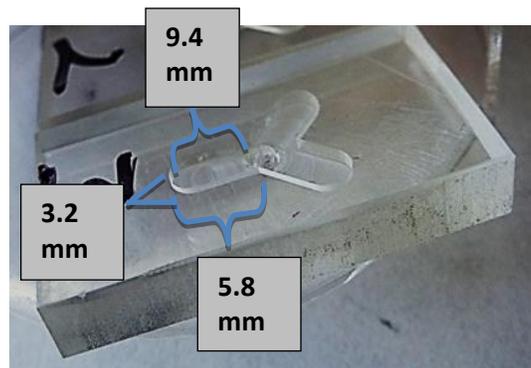


FIGURA 13 Medidas de las cámaras de microcanal elaboradas en la UAMI.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Se colocaron 4 ovocitos viables (OV) o 4 ovocitos degenerados (OD) en cada uno de los pozos de salida, considerando para ello la probable cantidad de ovocitos que tendría una hembra hámster adulta en cada uno de sus oviductos (Parkening 1976). También se dejaron pozos sin ovocitos para comparar la migración espermática sin esa variable (Figura 14), alternando aleatoriamente los siguientes tratamientos:

### **Experimento 1                      Ovocitos Viables vs Ovocitos Degenerados**

Pozo A	4 Ovocitos Viables
Pozo B	4 Ovocitos Degenerados
Pozo A	4 Ovocitos Degenerados
Pozo B	4 Ovocitos Viables

### **Experimento 2                      Ovocitos Viables vs Sin Ovocitos**

Pozo A	4 Ovocitos Viables
Pozo B	Sin Ovocitos
Pozo A	Sin Ovocitos
Pozo B	4 Ovocitos Viables

### **Experimento 3                      Ovocitos Degenerados vs sin Ovocitos**

Pozo A	4 Ovocitos Degenerados
Pozo B	Sin Ovocitos
Pozo A	Sin Ovocitos
Pozo B	4 Ovocitos Degenerados

Las cámaras de microcanal a su vez fueron colocadas dentro de una cámara húmeda conformada por una caja Petri de vidrio de 10 cm de diámetro, dentro de la cual se colocó en

su base una toalla sanitaria humedecida con agua destilada y fueron incubadas por 2 horas (Sun F. *et al.*2005) 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 15) para condicionamiento del medio y en su caso dispersión de señales en gradiente. La posición de las cámaras microcanal con los distintos tratamientos (tipos de ovocitos o sin ellos colocados en pozos A y B) fue alternada, en el interior de la incubadora. Durante su colocación en las cámaras de microcanal, los ovocitos fueron observados bajo microscopio de disección Olympus SZ61, colocándolos en 2 µl de medio HTFs.

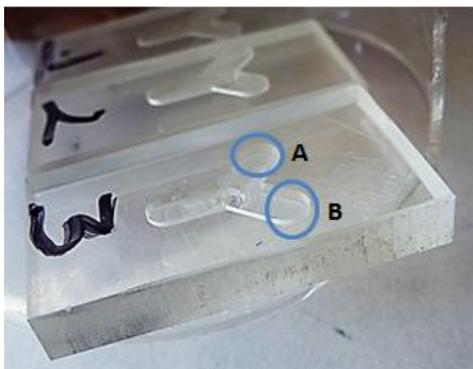


FIGURA 14 Se señala con círculo azul los pozos de entrada A y B donde se colocaron ovocitos viables, degenerados o sin ellos de manera alterna.



FIGURA 15 Cámaras de microcanal colocadas en el interior de cajas Petri.

Se efectuaron 8 repeticiones de cada tratamiento.

## **7.5. Obtención de espermatozoides epididimarios**

Cuando los OD y OV cumplieron una hora de incubación en las cámaras de microcanal, se sacrificó por dislocación cervical un macho hámster Sirio Dorado de 4 a 6 meses de edad, de fertilidad comprobada. Se disecó la región escrotal para exponer los testículos y epidídimos. Mediante una biopsia del epidídimo, se obtuvieron dos muestras pequeñas de tejido (aproximadamente un octavo del total de la masa de la cola del epidídimo) y fueron colocadas de forma independiente en dos tubos Eppendorf con 1 ml de HTFs e incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, para permitir el libre nado de los espermatozoides al exterior del tejido epididimario (Xie *et al.*, 2010 y Takase *et al.*, 1995).

## **7.6. Evaluación espermática**

A los 30 minutos de incubación de los tubos Eppendorf, se verificó la capacitación espermática a través del patrón de movimiento hiperactivo. Además, se evaluó la muestra espermática en uno de los tubos, considerando para ello la movilidad masal, la movilidad individual, la viabilidad y la concentración espermática. Para la movilidad masal se colocaron 5 µl de la muestra espermática sobre un portaobjetos limpio y atemperado y se observó de inmediato al microscopio de luz en aumento de 20X, percibiendo, en su caso, la formación de remolinos o la manifestación de corrientes y calificando de manera subjetiva con valores en múltiplos de 5, el porcentaje de movimiento observado. Así, el movimiento moderado se calificó con 20-40%, uno considerable 40-60% y, uno excelente 70-90% (Manual de la OMS). Para la movilidad individual se colocaron 5 µl de la muestra espermática sobre un portaobjetos atemperado y se colocó una gota de 5µl de medio HTFs con una separación de 2 a 4 mm a la gota de la muestra espermática. Con ayuda de una aguja calibre 29, se hizo un corrimiento desde la gota con espermatozoides hacia la del medio (dilución arbitraria) y se colocó bajo el microscopio óptico a 20X (Rossbach) para contar de manera diferenciada, los espermatozoides que se movían de los que no lo hacían. El porcentaje obtenido de esta observación, fue el resultado de la movilidad individual. Para la determinación de viabilidad se

colocaron 5  $\mu$ l de la muestra espermática a la orilla de un portaobjetos limpio y atemperado, así como 5  $\mu$ l de solución de Eosina (1%) Nigrosina (5%), se homogenizaron con ayuda de una aguja y con otro portaobjetos limpio se hizo un frotis, el cual fue fijado al calor de la flama del mechero cuidando no exceder la temperatura para lo cual se frotó con frecuencia en la piel de la mano. Finalmente en el microscopio de luz a 20X (Rossbach), se contaron 200 espermatozoides, diferenciando vivos (claros) de muertos (oscuro) y determinando su porcentaje. Para la determinación de la concentración espermática se utilizó una pipeta de Thoma para dilución de glóbulos rojos y se llenó hasta la marca de 0.1 con la muestra espermática del tubo Eppendorf, posteriormente se terminó de llenar la pipeta con agua destilada hasta la marca de 101, para obtener así una dilución 1:200. Se movió intensamente el agitador de la burbuja de la pipeta de Thoma durante 1 minuto, se desecharon las primeras 10 gotas de la pipeta soplando con una manguera y una boquilla y posteriormente se llenaron las cámaras del hematocitómetro o cámara de Neubauer. Bajo el microscopio de luz a aumento de 20X (Rossbach), se contaron 5 cuadros grandes de los 25 posibles en cada una de las cámaras, se promedió el valor obtenido y el resultado se multiplicó por 10, estableciendo así el valor en millones de células espermáticas por mililitro de muestra espermática contenida en el tubo Eppendorf (Zhaojing *et al.*, 2013).

### **7.7. Depósito de espermatozoides en cámara de microcanal**

Para llenar las cámaras de microcanal, solo se utilizaron aquellas muestras, procedentes del tubo Eppendorf con espermatozoides de movilidad mayor al 70% y concentración mínima de 150 millones de espermatozoides por ml. El otro tubo Eppendorf fue centrifugado a 552 g durante 3 minutos y se tomaron 45  $\mu$ l del sobrenadante para llenar las cámaras de microcanal. A las 2 horas de incubación de los ovocitos (condicionamiento del medio), se colocó en el pozo de entrada una muestra espermática de 2  $\mu$ l conteniendo 140,000 espermatozoides, como se observa en la Figura 16 (Xie *et al.*, 2010).

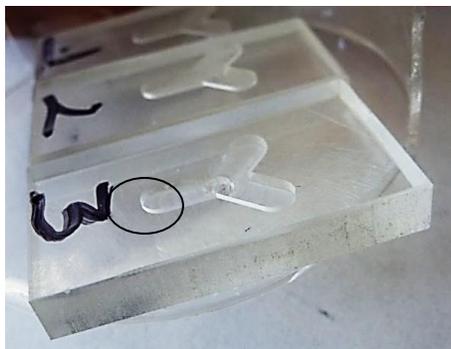


FIGURA 16 En la cámara de microcanal 3 se señala con círculo negro el pozo de entrada donde se colocaron los espermatozoides capacitados.

### **7.8. Conteo de espermatozoides en pozos de salida de la cámara de microcanal**

Una vez colocados los ovocitos (OD, OV, o sin ellos) en los pozos A y B y los espermatozoides capacitados en el pozo C, las cámaras de microcanal permanecieron durante 15 minutos (37°C y 5% CO<sub>2</sub>). en incubación, al cabo de los cuales se colocó la cámara bajo el microscopio estereoscópico Carl Zeiss Modelo Stemi-DV4. Se tomaron 2 µl de los pozos A y B con una pipeta de volumen variable y puntas independientes en un portaobjetos para determinar y cuantificar la presencia de los espermatozoides, observando bajo el microscopio óptico a 20X Rossbach Modelo 375. Estos conteos fueron realizados simultáneamente por dos personas.

### **7.9. Análisis estadístico**

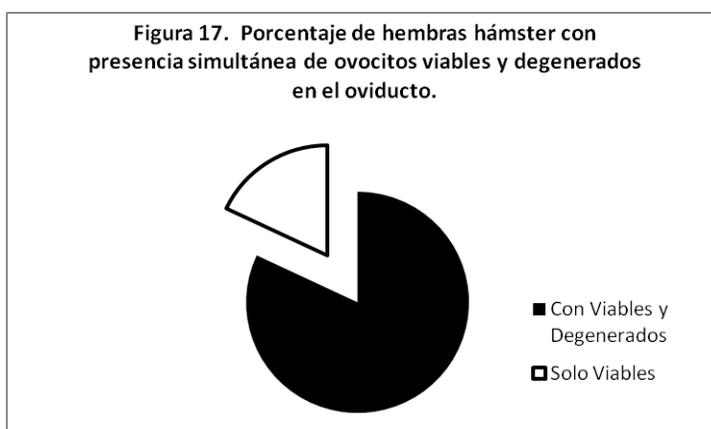
Los resultados del conteo de espermatozoides en cada pozo de salida (A o B), fueron comparados con la prueba paramétrica, t-Student, considerando diferencias significativas a  $P < 0.05$  utilizando el paquete NCSS de 2007.

## VIII. RESULTADOS

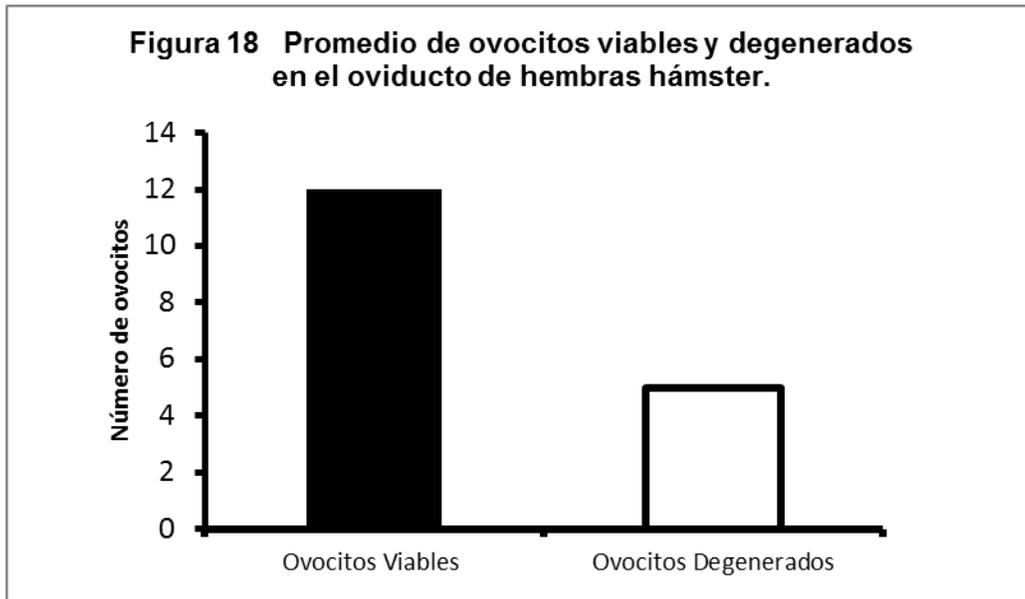
### 8.1. Obtención de ovocitos

La obtención de ovocitos de hembras hámster, se realizó de las 2 a las 4 pm del día de la secreción vaginal postovulatoria. Con ello se logró que los ovocitos estuvieran libres de células *cúmulus* para facilitar su identificación y manipulación, y para colocarlos en los pozos de la cámara de microcanal.

El 82% (n=23) de las hembras hámster, tuvieron simultáneamente ovocitos viables y degenerados en sus oviductos, en tanto que el restante 18% (n=5 hembras), solo presentó ovocitos viables (Figura 17). La perfusión del oviducto se realizó desde la fimbria hacia la unión útero tubaria sin distinguir el segmento oviductal en donde se encontraban almacenados los ovocitos viables y degenerados.



El número promedio de ovocitos viables por hembra fue de 12.5, con un rango de 1 a 18, en tanto que los ovocitos degenerados fueron en promedio 4.9 por hembra, con un rango de 1 a 20. La razón entre ovocitos fue de 2.6 ovocitos viables por cada ovocito degenerado (Figura 18).



## 8.2. Evaluación de las muestras espermáticas

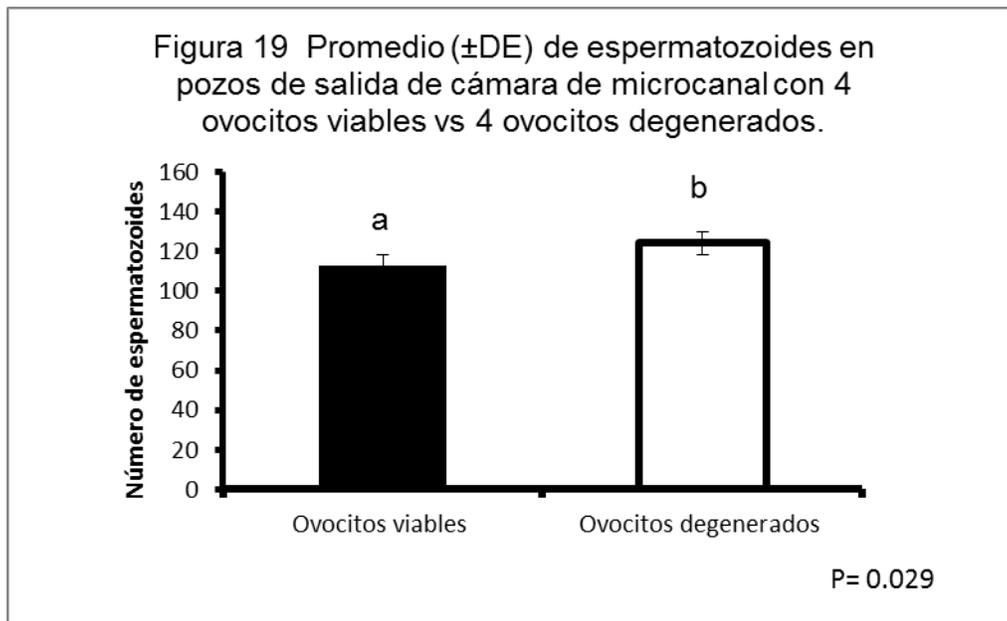
Las muestras de espermatozoides epididimarios provenientes de la biopsia de un octavo de la cola de epidídimo y capacitados *in vitro*, mostraron en su totalidad buenos parámetros, reportando una movilidad masal promedio ( $\pm$ DE) de 80% ( $\pm$ 10%), una movilidad individual de 86% ( $\pm$ 12%), viabilidad de 86% ( $\pm$  9%) y una concentración espermática de 31.8 millones de espermatozoides por ml ( $\pm$  14.1 millones), con un rango de 12.5 a 68.7 millones de espermatozoides por mililitro.

## 8.3 Espermatozoides que migraron a los pozos de salida

Experimento 1: Ovocitos Viables vs Ovocitos Degenerados

El promedio de espermatozoides presentes ( $\pm$ DE) con 4 ovocitos viables o con 4 ovocitos degenerados, fue de  $113\pm 30$  y  $124\pm 21$  ( $p < 0.05$ ) respectivamente, con un rango de 81 a 183 y 93 a 164, respectivamente.

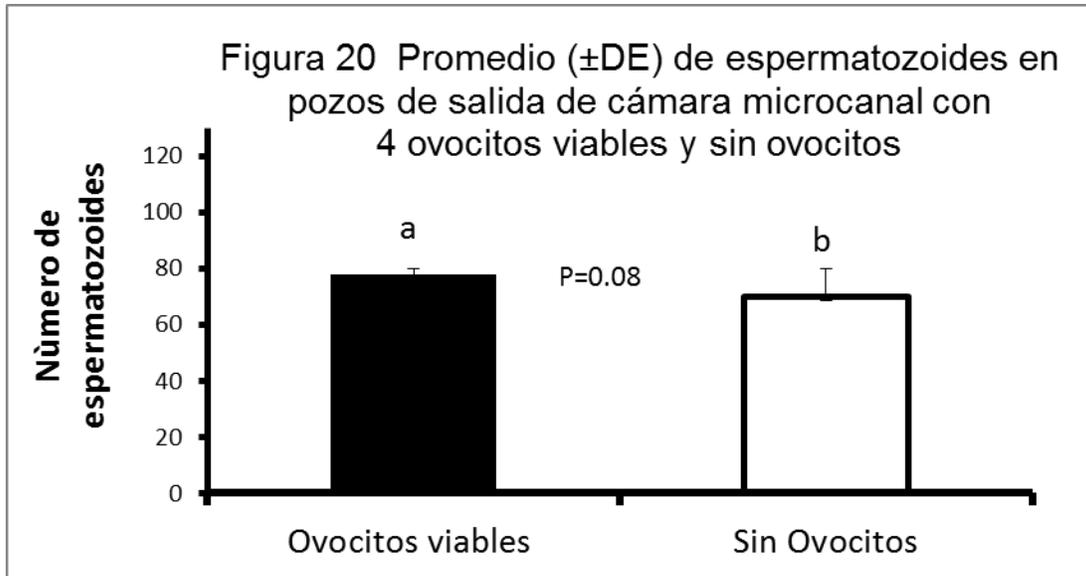
A pesar de la atracción de espermatozoides de los ovocitos viables y los degenerados, es importante mencionar que existió una mayor cantidad de espermatozoides (10% +) atraídos por los ovocitos degenerados (Figura 19).



Experimento 2: Ovocitos Viables vs Sin Ovocitos.

Cuando en uno de los pozos de salida no se colocaron ovocitos y en el otro se colocaron 4 ovocitos viables, se encontró que hubo un 11% ( $P>0.05$ ) más de espermatozoides promedio que migraron hacia el pozo con los ovocitos viables.

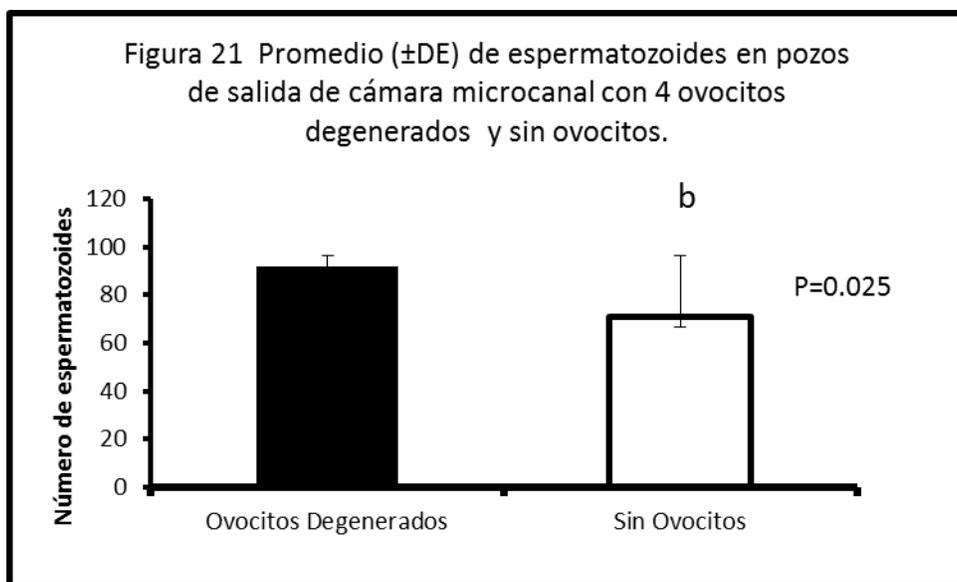
El promedio de espermatozoides ( $\pm$ DE) en el pozo con los ovocitos viables fue de  $78\pm 42$  con un rango de 21 a 183, en tanto que en el que no se colocaron ovocitos fue de  $70\pm 33$  con un rango de 17 a 144. A pesar de no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas ( $P>0.05$ , t-Student), también se encontró que se manifiesta una mayor migración de espermatozoides hacia donde se encontraban los ovocitos viables (11%) (Figura 20).



Experimento 3: Ovocitos Degenerados vs Sin Ovocitos.

Cuando en uno de los pozos de salida no se colocaron ovocitos y en el otro se colocaron 4 ovocitos degenerados, se encontró que hubo un 30% ( $P < 0.05$ ) más de espermatozoides promedio que migraron hacia el pozo con los ovocitos degenerados.

El promedio de espermatozoides ( $\pm$ DE) en el pozo con los ovocitos degenerados fue de  $92 \pm 31$  con un rango de 33 a 138, en tanto que en el que no se colocaron ovocitos fue de  $71 \pm 24$  con un rango de 45 a 114. La diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ , t-Student) manifiesta una mayor migración de espermatozoides hacia donde se encontraban los ovocitos degenerados (30%,  $P < 0.05$ )(Figura 21).



El resumen de los resultados de la migración de espermatozoides hacia los ovocitos viables, degenerados y sin ovocitos, se presenta la tabla 1

TABLA 1 Comparación del promedio ( $\pm$ DE), el rango y la diferencia de espermatozoides migrados en la cámara de microcanal según cada tratamiento.

#### Ovocitos Viables vs Ovocitos Degenerados

	PROMEDIO ( $\pm$ DE)	RANGO	Diferencia
Ovocitos Viables	113 $\pm$ 30	81-193	
Ovocitos Degenerados	124 $\pm$ 21	93-164	+ 10 % (P<0.05)

#### Ovocitos Viables vs Sin Ovocitos

Ovocitos Viables	78 $\pm$ 42	21-183	+ 11 % (P>0.05)
Sin Ovocitos	70 $\pm$ 33	17-144	

#### Ovocitos Degenerados vs Sin Ovocitos

Ovocitos Degenerados	92 $\pm$ 31	33-138	+ 30 % (P<0.05)
Sin Ovocitos	71 $\pm$ 24	45-114	

## IX. DISCUSIÓN

Lu *et al.* (2013) señalaron que en el proceso reproductivo en mamíferos, los espermatozoides presentarán capacitación, hiperactivación, quimiotaxis y posteriormente reacción acrosomal, lo que pone de manifiesto que el proceso de quimiotaxis es fisiológico. Los investigadores utilizaron como atrayente de espermatozoides células *cúmulus* obtenidas de ratonas jóvenes (8 semanas) hiperovuladas. Dichas células fueron colocadas en un sistema de microcanal y se incubaron durante 24 horas para condicionar el medio. Luego colocaron 25,000 espermatozoides capacitados durante 30 minutos en el pozo de entrada y se dejaron en el microcanal durante 15 minutos. Encontraron que solo el 10% de los espermatozoides migraron a alguno de los dos brazos de salida del microcanal. En el presente trabajo se colocaron 140,000 espermatozoides en el pozo de entrada de la cámara de microcanal y migraron el 0.2%, lo cual es menor a lo reportado. Una posible explicación sería que la diferencia se deba a la especie utilizada, a las condiciones de la cámara, así como a las variaciones individuales entre machos y muestras, esto último estudiado a detalle por Gómez en 2004, quien reporta que, algunas muestras seminales de toros tienen muy mala calidad para este tipo de estudios de quimiotaxis y que hay gran variación entre muestras de un mismo individuo.

A pesar de que en mamíferos no está completamente entendido el proceso de inducción y trascendencia fisiológica de la quimiotaxis, algunos estudios sugieren que podrían estar involucradas las células *cúmulus*, mismas que producen quimioatrayentes, los cuales pueden unirse a proteínas G acopladas a los receptores olfatorios que sirven como receptores quimio atractivos en la membrana espermática. La concentración de  $Ca^{2+}$  en el espermatozoide también contribuye al patrón de movilidad y durante la fecundación. Un aumento transitorio en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular ocurre cuando la actividad quimiotáctica se presenta en el espermatozoide. La isoforma de la Adenilato Ciclasa asociada a la membrana en el flagelo del espermatozoide, puede funcionar como quimiotáctica en respuesta al quimioatrayente. El mecanismo posible de la quimiotaxis en mamíferos involucra la unión de ligandos al receptor

olfatorio, la activación de proteínas G, la síntesis de AMPc y finalmente el aumento de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lu *et al.*, 2013).

Blengini *et al.* (2011), estudiando espermatozoides humanos y utilizando una pequeña cámara de quimiotaxis, evaluaron el patrón de movimiento espermático de retorno en presencia de progesterona (10 pM/ml). Solo fueron evaluados de 80 a 100 espermatozoides en un equipo computarizado para estudio del movimiento y velocidad espermática (VCL o Velocidad Curvilínea, VAP o Trayectoria Espacial Promedio y VSL, Velocidad en Línea Recta), encontrando un patrón de transición del movimiento lineal a hiperactivo, con una diferencia en espermatozoides tratados con progesterona y no tratados del 10.7%. Este experimento demostró que hay un cambio en la dirección de la trayectoria de los espermatozoides en respuesta a la presencia de progesterona que no llega a ser tan manifiesto como la que se ha estudiado en los organismos de fecundación externa. Además, estos autores describen 6 posibles patrones de movimiento espermático re-direccionado, en respuesta a la presencia de progesterona, pero solo uno de ellos puede considerarse como quimiotaxis, en este caso fue presentado solo por el 10% de los espermatozoides estudiados. En este trabajo de tesis solo un 0.2% de la población espermática respondió a la migración por las causas ya descritas.

El líquido folicular también ha sido estudiado como inductor de la quimiotaxis y se ha reportado que el de una especie puede atraer espermatozoides de otra especie, lo que sugiere que no se trata de un fenómeno especie-específico (Blengini *et al.*, 2011). Además se ha reportado que la pequeña cantidad de progesterona que producen las células que rodean al ovocito (*cúmulus*), podría ser una señal importante para la inducción de la atracción de espermatozoides.

Por otro lado, los dispositivos utilizados para el estudio de estos fenómenos de migración y atracción espermática, han sido muy variados a través del tiempo. La mayor parte de ellos ha procurado imitar la anatomía del tracto reproductor femenino de los mamíferos, es decir un conducto de entrada (vagina-útero) y dos conductos de salida (oviductos). Las señales para la atracción estudiadas han sido, de la misma manera muy variadas, por ejemplo el líquido folicular (Navarro, 1998 Gómez, 2004) así como la progesterona (Oren-Benaroya *et al.*, 2008;

Teves *et al.*, 2009; Chang y Suárez, 2010; Blengini *et al.*, 2011), las células *cúmulus* (Sun *et al.*, 2005; Oren-Benaroya *et al.*, 2008; Chang y Suárez, 2010) y los ovocitos viables (Sun *et al.*, 2005). En el presente trabajo se utilizaron ovocitos viables y degenerados, lo cual es el aporte relevante de esta investigación, pues no se encontró en la literatura experimentos de quimiotaxis que utilizaran ovocitos degenerados, ni algo relativo a su posible participación fisiológica.

Gómez (2004), utilizando líquido folicular de vaca para la atracción de espermatozoides homólogos, colocó en la entrada de su dispositivo  $0.6 \times 10^6$  espermatozoides en 10 $\mu$ l, recuperando a la salida (espermatozoides migrados) 1 de cada 100 espermatozoides. En tanto que en el presente estudio se recuperaron 2 de cada 1,000 espermatozoides colocados. Esta diferencia puede deberse a la especie, al dispositivo utilizado o a las moléculas de atracción. En el caso de Gómez (2004) el dispositivo de estudio consistió en un par de pequeños tubos (2ml) perforados en su parte media y comunicados a través de un tubo capilar plástico, el cual fue perforado al centro para servir de entrada de los espermatozoides. En el presente estudio el porcentaje de espermatozoides migrados fue variable. La diferencia mayor se encontró entre los ovocitos degenerados y donde no se colocaron ovocitos, 92 vs. 71 espermatozoides, respectivamente, es decir una diferencia de 21 que corresponde al 30% de los espermatozoides que migraron hacia donde no había ovocitos y a una diferencia entre grupos del 12% (92=56% y 71=44%). Gómez (2004), utilizando como atrayente líquido folicular y comparando el número de espermatozoides migrados sin el líquido folicular, encontró una migración espermática en toro de 80% y 20%, respectivamente, con una diferencia entre ellos del 60%. Los datos aquí obtenidos son inferiores a los reportados por Gómez en 2004, 12% vs. 60%. Por su parte, Oren-Benaroya *et al.* (2008) encontraron que los espermatozoides humanos que migraron hacia donde no había atrayente, fueron el 40% con respecto a los que migraron hacia donde si había atrayente (progesterona), y el resultado fue similar cuando se colocó a los espermatozoides primero en presencia de un anticuerpo antiprogesterona y luego se pusieron a migrar en presencia de progesterona. Los datos obtenidos en esta tesis son inferiores a los de Oren-Benaroya *et al.* (2008) con 12% y 40% respectivamente.

Por otro lado, Oren-Benaroya *et al.* (2008) hacen referencia a que, además de los procesos de quimiotaxis, quimiocinesis y atrapamiento, es importante el proceso de termotaxis, descrito como el movimiento inducido por la temperatura, considerando que en el istmo oviductal, el espermatozoide está almacenado e inactivo, pero acude pronto hacia el ámpula, donde existe una mayor temperatura por haber mayor cantidad de metabolismo especialmente en el momento cercano de la ovulación. Asimismo mencionan que las abundantes células *cúmulus* que rodean al ovocito después de la ovulación, pueden ser una fuente importante de quimioatrayentes. En su investigación, los autores reportan que obtuvieron la progesterona de las células *cúmulus* provenientes de ovocitos humanos superovulados y los espermatozoides lavados y capacitados fueron colocados en un dispositivo de doble pozo y unido en un porta objetos. La presencia de quimiotaxis fue definida de acuerdo a los ángulos seguidos por las trayectorias de los espermatozoides, de acuerdo a Gakamsky (2008). Destaca de este estudio que, la capacidad de producción de progesterona declina drásticamente en las células *cúmulus* en cultivo con 100% de 1 a 3 días, hacia un 50% del día 3 al 6 y a un 25% del día 6 al 9. Denotando que las células *cúmulus* tendrán un tiempo óptimo para la emisión de señales de atracción y posteriormente irán reduciéndola. En el caso de los ovocitos degenerados, en el presente trabajo se observó que éstos permanecen en el oviducto más allá de un ciclo estral y se encuentran desprovistos de las células *cúmulus*, pero cercanos al complejo ovocito células *cúmulus* recién ovulado.

Xie *et al.* (2010) consideraron para su estudio experimental en ratón, la utilización de una pequeña cámara de microcanal hecha con rayo láser sobre un porta objetos excavado y cubierto con cobre objetos, para poder videografiar el movimiento espermático por efecto de la quimiotaxis bajo el microscopio. Utilizaron como atrayente un macerado de células *cúmulus* incubado durante 24 horas, para condicionamiento del medio. Colocaron 25,000 espermatozoides de ratón, los cuales tuvieron un efecto mediado por el atrayente (quimiotaxis) del 10%. Aunque, de manera importante reportaron amplias variaciones entre tratamientos (hasta 5% de desviación estándar) y grabaron el patrón de movimiento espermático durante 10 minutos. La salida de espermatozoides al pozo sin atrayente fue del 90% con respecto a los que respondieron al atrayente. Cuando se colocó el atrayente en un solo pozo, hubo diferencias importantes de casi un 40% que, no fueron explicadas en dicho

trabajo. Aclaran que con la dilución espermática empleada ( $5 \times 10^6/\text{ml}$ ) así como con los 25,000 espermatozoides colocados en la cámara, se eliminó el fenómeno que se engancharan las cabezas de los espermatozoides y que viajaran en grupo, lo que es característico en roedores, señalando que esto favorece alcanzar la reacción acrosomal *in vivo*. En este trabajo de tesis, el fenómeno de enganche entre cabezas fue grande, de manera que pocos espermatozoides migraron y los que llegaron a los pozos de salida lo hicieron de manera aislada. Es posible que el aumentar el factor de dilución de la muestra de espermatozoides, resulte benéfico para el sistema de cámara de microcanal. En el presente estudio se utilizó una dilución inicial de  $70 \times 10^6/\text{ml}$  y se colocaron 140,000 espermatozoides en la cámara microcanal con 50  $\mu\text{l}$  de volumen total. Xie *et al.*, (2010) no especifica el volumen de la cámara empleada

Yanagimachi en 1970 (citado por Chang y Suárez, 2010), observó por vez primera, el proceso de hiperactivación en el oviducto de hámster. Dicha hiperactivación está caracterizada por batimiento flagelar de gran amplitud y asimétrico que lleva a un espermatozoide (en un porta objetos y con medio acuoso), a seguir una trayectoria helicoidal o circular. La quimiotaxis por su parte, está definida como una trayectoria de nado del espermatozoide hacia un gradiente químico, así, el espermatozoide puede utilizar la hiperactivación y quizá de manera intermitente, alcanzar la quimiotaxis. En mamíferos acuáticos es conocido el modelo de girar y correr (turn and run), que describe el movimiento del espermatozoide siguiendo un patrón de asas helicoidales. Este patrón no ha sido descrito en espermatozoides de mamíferos. La hiperactivación ayuda a que el espermatozoide se suelte de las células del oviducto a nivel del istmo, además le provee de mayor fuerza para nadar en un medio viscoso elástico que incluye las secreciones oviductales, como la matriz del *cúmulus*. Además, la hiperactivación es requerida para penetrar la zona pelúcida. Es posible que bajos niveles de progesterona se encuentren en el oviducto o en la masa del *cúmulus* periférica y que funcionen para la quimiotaxis, mientras que mayores niveles se pueden encontrar en la masa del *cúmulus* y que sirvan para inducir la reacción acrosomal. También hay evidencias que señalan la existencia de moléculas odorantes que sirven para la quimioatracción de espermatozoides de mamíferos, localizadas en la base del flagelo o en la pieza media de espermatozoides de perro y rata (Chang y Suárez, 2010). En humanos, un receptor específico para olores en el

testículo fue identificado como hOR17, el ligando para este receptor es el bourgeonal, el cual induce el nado del espermatozoide en un gradiente. En roedores la molécula ha sido identificada como lyral y lo más sorprendente es que, ambas moléculas están relacionadas con aromas florales.

Sun *et al.*,(2005) cuestionaron la participación del líquido folicular en el mecanismo de quimiotaxis en mamíferos, ya que la cantidad de líquido folicular que ingresa y permanece en el oviducto (de cerda) es acaso del 1%, además de que, si este mecanismo fuera esencial para el proceso de fecundación, debería permanecer el gradiente durante un tiempo prolongado y no solo durante el flujo del líquido folicular. Ante ello, estudiando el proceso de quimiotaxis en humanos, probaron la atracción de los espermatozoides y la medición de su patrón de movimiento utilizando como atrayentes células *cúmulus*, un macerado de éstas y ovocitos, encontrando que ambos tipos de señales, provenientes de las *cúmulus* o de los ovocitos, son capaces de modificar el patrón de movimiento espermático y atraerlos. En los pozos donde no se colocó el atrayente, se tuvo una atracción de cerca del 86% con respecto a los que sí tuvieron atrayentes. En tanto que con los atrayentes se logra duplicar las velocidades estudiadas, en comparación con los espermatozoides sin atrayentes. Concluyeron que, tanto las células *cúmulus* como los ovocitos, son fuentes de atracción para espermatozoides de mamíferos. Encontraron también que, la quimioatracción ejercida por el ovocito sobre el espermatozoide, es más potente que la de las células *cúmulus*, por lo que cada uno o ambos, liberan diferentes moléculas como si fuera un proceso en dos pasos, el de las células *cúmulus* y el de los ovocitos. Esto también apoya la idea de que, si un ovocito ha perdido las células *cúmulus*, entonces el ovocito puede guiar a los espermatozoides hacia él (Sun *et al.*, 2005). Esto concuerda con lo planteado en el presente trabajo, con respecto a la atracción que los ovocitos viables o degenerados pueden ejercer sobre los espermatozoides. El aporte principal de este trabajo de tesis consiste en que no se había estudiado el posible efecto de los ovocitos degenerados sobre este fenómeno de atracción espermática que, según aquí se observó, tiene aún más poder de atracción que los propios ovocitos viables (10%). Lo que sugiere que la atracción ejercida por los ovocitos degenerados sobre los espermatozoides de hámster, para dirigirlos hacia el ámpula oviductal, tenga influencia en la

eficiencia en la fecundación de ovocitos viables. Éste y otros aspectos relacionados con los ovocitos degenerados, deberán ser estudiados a mayor profundidad.

## **X. CONCLUSIONES**

- 1.- El sistema de microcanal es un dispositivo adecuado para estudiar el fenómeno de atracción espermática.
- 2.- Los espermatozoides de mamífero si bien son sensibles a la quimio atracción también presentan movimiento azaroso, demostrado por la gran migración en los pozos donde no se colocó atrayente.
- 3.- Los ovocitos degenerados son capaces de atraer espermatozoides, lo que hacen en una cantidad mayor a lo que ocurre con los ovocitos viables.
- 4.- Es importante estudiar cuales podrían ser las señales emitidas por los ovocitos degenerados para la atracción espermática y definir con mayor precisión su participación para la fecundación exitosa de los ovocitos viables.

## XI. REFERENCIAS

Ambríz G.D y Navarro M.C. (2013). Presencia simultánea de ovocitos en degeneración y fértiles en el oviducto de hembras hámster y su repercusión en la eficiencia reproductiva. X Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia. León, Guanajuato, Mayo 2013.

Anzaldúa S.R., M. Pérez., M.A. Cerbón. y I. Camacho. (2003), Actividad secretora del oviducto de mamíferos domésticos durante la fertilización y el desarrollo embrionario temprano. *Ciencia Veterinaria* 9, pp. 229-268.

Arenas E., Cambrón A., Ambríz D., Zúñiga P., Rodríguez A. y Rosado A., (2010), Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide, *Contactos* 78, pp. 5-11.

Barros, C., Crosby, J.A., Moreno, R. D. (1996). Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization. *Cell. Biol. Int.* 20(1), pp. 33-39.

Betancourt M., Bonilla E., Casas, E., Ducolomb. Y., (2003). Maduración de gametos y fertilización en mamíferos. En Jiménez L F., Merchant H. *Biología celular y molecular*. 1ra edición. Pearson educación de México. 681-683.

Bivin S.W., Olsen A. G. y Murray A. K. (1987) Morphophysiology. En Hoosier V. G. L. y Mc Pherson C. W. *Laboratory hamsters, American College of Laboratory Animal Medicine Series*, pp. 30-31.

Blengini, C., Teves, M., Uñates, D., Guidobaldi. H. Gatica., L. y Giojalas, L. (2011) Human sperm pattern of movement during chemotactic re-orientation towards a progesterone source. *Asian Journal of Andrology* 13, pp. 769-773.

Centro de Estudios Agropecuarios Serie Agropecuaria, (2001), *Crianza de Hámsters*, Gpo Edit. Iberoamericana SA de CV. Pp. 70.

Chang, H. y Suárez S., (2010), Rethinking the relationship between Hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. *Biology of Reproduction* 83:507-513.

Coy, F. A. García-Vázquez P.E. Visconti y M. Avilés. (2012). Roles of the oviduct in mammalian fertilization, reproduction review. *Reproduction* 144:649-660.

Croxatto H B y Ortíz M. E, (1975), Egg transportation in the fallopian tube, *Rev, Gynecol. Invest.* 6: 215-225.

Croxatto HB (2002). Physiology of gamete and embryo transport through the fallopian tube. *Reproduction Biomedical Online* 4:160-169.

David J. S. E., (1975) A Survey of eggs in the oviducts of mares. *J. Reprod. Fert., Suppl.*23: 513-517.

Darszon, A. (2008). Canales, iones y cómo el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo. In c. Instituto de Biotecnología de la UNAM 25 aniversario (Ed.), *Una ventana al quehacer científico México*, DF: UNAM., pp. 29-42.

Domínguez R. Álvaro E., (2010), Tesis Doctoral Universidad de Castilla- La mancha, Estudio del estrés oxidativo en espermatozoides epididimarios criopreservados de ciervo. Pp

Eisenbach M. (1999), Sperm chemotaxis. *Reviews of Reproduction* 4: 56-66.

Fissore R., Kurokawa M., Knott J., Zhang M. y Smyth J., (2002), Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing, *Reproduction* 124, 745-754.11.

Gómez A. Y. (2004), Respuesta quimiotáctica de los espermatozoides hacia el líquido folicular en Bovinos, Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.pp1- 72.

Hoosier V y Mc Pherson C., (1987), Laboratory Hamsters, edit., American College of Laboratory Animal Medicine, impreso en E.U.A.pp.31

Kowaltowski AJ, Souza-Pinto NC, CAstillo RF, Verfcési AE. (2009) Mitochondria and reactive oxygene species. Free Radical Biol Med: 47: 333-343.

Liang Y., Kikuchi K., Yuan Q. y Schatten H., (2009), Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility, Human Reproduction Update vol. 15, No. 5, pp. 573-585

Magalhaes H., 1970, Hamsters. En: Hafez E.S.E (Ed) Reproduction and Breeding Technics for Laboratory animals. De Lea and Fabiger, Filadelfia, E.U.A. Pp. 250-271

Navarro M C, Valencia J, Vázquez C, Cózar E y Villanueva C. (1998). Crude mare exerts chemotactic effects on stallion spermatozoa. Reprod. In Domestic Animals. 33:321-324.

Olivera M., Ruiz T., Tarazona A., y Giraldo C., (2006), El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización, Rev Col Cienc Pec Vol 19:4 pp. 426-436.

Oren-Benaroya, R., Orvieto, R., Gakamsky A., Pinchasov, M., y Eisenbach, M. (2008) The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. Humman Reproduction 23:10:2339-2345.

Parkening T. (1976) Retention of ova in oviducts of senescent mice and hamster, J. Exp. Zool. 196, pp 307-314.

Rasweiler J.(1979) Differential transport of embryos and degenerating ova by the oviducts of the long tongued bat, *Glossophaga soricina*, J. Reprod. Fert. 55, pp 329-334.

Simons K, Mukandan A Dewundara S, Van Remmen H, Dombkowski A, Cabelof DC., (2009) Transcriptional profiling of the age-related response to genotoxic stress points to differential DNA damage response with age. *Mech Age Develop.*, 130, pp 637-647.

Soderwall, A, H. Kent., L. Turbyfill y A. Britenbaker (1960) Variation in gestation length and litter size of the golden hamster *Mesocricetus auratus*. *J. Geront.* 15, pp.246-8.

Steffenhagen W, Pineda M. y Ginther O. (1972) Retention of unfertilized ova in uterine tubes of mares. *Am. J. Vet. Res* 33, pp2391-8.

Suárez, S. X. Dai, R. de Mott, I.K. Redfern y M. Mirando, 1992. Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct hyperactivated in vitro. *Journal of Andrology* 13, pp.75-80

Sun F., Bahat A., Gakamasky A., Girsh E., Katz N., Giojalas L., Tur-Kaspa I. y Eisenbach M., (2005), Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants, vol 20, No 3, pp.761-767.

Takahashi T., Igarashi H., Amita M., Hara S., Matsuo K. and Kurachi H., (2013), Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: Mini review, *J. Obstet. Gynaecol* Vol.39. No.10, pp.1431-1439.

Takase K., Ishikawa M. y Hoshiai H., (1995), Apoptosis in the degeneration process of unfertilized ova, *Tohoku J. Exp. Med.*, 171 (1), pp 69-76.

Teves M., Guidobaldi H., Uñates D., Sánchez R., Miska W., Publicover S. y Morales A., Giojalas L., (2009), Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone, *Plos One*, 4, pp 1-11.

Tortora J. G., Derrickson B., (2006), *Principios de anatomía y fisiología*, 11a Ed., Editorial Medica Panamericana, USA, pp 1077 – 1095.

Trejo C A, Navarro M C, Ambríz G D y Rosado A. (2005). Effect of maternal age and parity on preimplantation embryo development and transport in the Golden hamster (*Mesocricetus auratus*). Lab. Animals. pp 290-297

Trejo, A., Ambriz, D., Navarro, MC., Mercado, E y Rosado A. (2008) Presence and distribution of E-Cadherin in the 4-cell golden hamster embryo. Effect of maternal age and parity. Zygote 16 pp. 271-277

Van Hoosier, G, y Mc Pherson, C (1987) Laboratory hamsters, Elsevier.

Vantman B D y Vega B M. (2010). Fisiología Reproductiva y Cambios Evolutivos con la edad de la mujer. Revista Médica clínica CONDES 3, pp 348-362.

Wassarman M. P. y Albertini F. D. (1994). The Mammalian Ovum. En Knobil E. y Neill J. D. The physiology of reproduction, 2da edición. New York. pp 81-83.

Xie L, Ma R, Han C, Su K, Zhang Q, Qiu T, Wang L, Huang G, Quiao J, Wang J, y Cheng J. (2010), Integration of sperm motility and chemotaxis screening with a microchannel-based device. Clinical chemistry 56(8) pp 1270-1278.

Zhaojing Lu, Shaolin Wang, Zilong Sun, Ruiyan Niu, y Jundong Wang, (2013). In vivo influence of sodium fluoride on sperm chemotaxis in male mice. Reproductive Toxicology. 14, pp. 649-660.