



132  
24  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGIA

**"ESTUDIO COMPARATIVO DE LA MOVILIDAD,  
CAPACITACION-REACCION ACROSOMAL Y  
LA CAPACIDAD FERTILIZANTE DEL  
GAMETO MASCULINO EN  
VARONES FERTILES  
E INFERTILES".**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
PRESENTA  
RAFAEL MOLINA BLAS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

AGOSTO DE 1990

## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## I N D I C E

	Pág.
<b>I. Introducción.....</b>	<b>1</b>
I.1 Activación.....	1
I.2 Capacitación.....	4
I.3 Reacción acrosomal.....	7
I.4 Interacción de gametas.....	12
I.5 Infertilidad masculina.....	17
<b>II. Hipótesis.....</b>	<b>25</b>
<b>III. Objetivos.....</b>	<b>26</b>
<b>IV. Material y Métodos.....</b>	<b>27</b>
IV.1 Material biológico.....	27
IV.2 Donación de muestras.....	27
IV.3 Desarrollo experimental.....	28
IV.4 Análisis estadístico.....	39
IV.5 Reactivos.....	40
<b>V. Resultados.....</b>	<b>41</b>
V.1 Análisis de los parámetros de calidad del semen.....	41
V.2 Determinación objetiva de las caracterís- ticas de movilidad espermática.....	41
V.3 Determinación de la morfología espermáti- ca y presencia de células germinales inmaduras.....	42
V.4 Evaluación de la capacitación-reacción acrosomal <u>in vitro</u> .....	44

V.5	Valoración de la capacidad fertilizante del gameto masculino mediante el bioensayo con ovocitos de hamster libres de la <u>zona pellucida</u> .....	46
V.6	Correlación entre la capacidad fertilizante con los diferentes parámetros estructurales y funcionales del semen humano.....	47
VI.	Discusión.....	62
VII.	Conclusiones.....	74
VIII.	Bibliografía.....	77

La movilidad flagelar es generada por el deslizamiento de los microtúbulos dentro del axonema, inducido por la actividad de ATPasa asociada con los brazos de dineína, localizados en los dobletes externos de los microtúbulos. Un complejo sistema mecano-electroquímico es responsable de este deslizamiento y de su conversión en la propagación de la onda flagelar (Tash y Means, 1983).

En este proceso, el aporte de ATP para mantener la movilidad flagelar y el transporte iónico proviene del metabolismo de numerosos sustratos exógenos y endógenos por el espermatozoide. En el inicio de la activación y durante la capacitación, se ha observado un aumento en el consumo de oxígeno debido a la fosforilación oxidativa de sustancias tales como lactato, piruvato, ácidos grasos volátiles e intermediarios del ciclo del ácido cítrico, así como un incremento en la actividad glicolítica y un cambio en la utilización preferencial de glucosa, tanto por la vía de Embden-Meyerhoff como a través del ciclo de las pentosas (Hicks y col., 1972).

El calcio y el monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) han recibido considerable atención como posibles moduladores de este proceso (Tash y Means, 1983). Se ha demostrado que el AMPC en las células eucariontes induce fosforilación de proteínas, vía activación de una proteína cinasa (Rossen y col., 1975). Esta proteína cinasa dependiente de AMPC se ha identificado en la base y pieza media del flagelo del espermatozoide en estrecha relación con proteínas susceptibles de ser fosforiladas (tubulina y dineína), lo que ha permitido sugerir la participación de la fosforilación de proteínas en la regulación de la

propagación de la onda flagelar del espermatozoide (Tash y Means, 1983).

En el espermatozoide, la movilidad flagelar es un proceso dependiente de calcio; se ha demostrado que el calcio regula el metabolismo de AMPc y tiene efectos directos sobre la movilidad espermática, debido a que mientras el AMPc estimula la fosforilación de proteínas específicas, el incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular interfiere con este proceso (Garbers y Kopf, 1980). Por tal motivo, se ha sugerido que la regulación de la movilidad flagelar del espermatozoide mediada por AMPc y calcio involucra procesos de fosforilación y desfosforilación de proteínas del axonema (Tash y Means, 1983; Garbers y Kopf, 1980).

Por otra parte, se ha establecido que la calmodulina está involucrada en el metabolismo de los nucleótidos cíclicos y en la regulación intracelular de las concentraciones de calcio en la célula espermática (Garbers y Kopf, 1980), regulando la actividad ATPasa de la dineína o la actividad de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (Tash y Means, 1983); además existen evidencias que una deficiencia en las concentraciones de calmodulina en la célula espermática se encuentra asociada con un decremento en la movilidad flagelar (Reyes y col., 1987).

Estos eventos en el espermatozoide de mamífero están modulados por la composición iónica de los diferentes microambientes a través de los cuales esta célula es transportada (Yanagimachi y Usui, 1974; Reyes y col., 1987).

## I.2 Capacitación

En este evento, la membrana plasmática del espermatozoide de mamífero presenta cambios estructurales y bioquímicos, que incluyen la liberación y/o modificación de la distribución de moléculas estabilizantes incorporadas en el exterior o interior de la membrana durante la maduración del espermatozoide en el epidídimo y su exposición a las secreciones de las glándulas accesorias masculinas en la eyaculación (Tesarik, 1986).

Una de las primeras etapas en este evento es la liberación de proteínas estabilizantes provenientes del plasma seminal y epididimario de la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide (Oliphant y Brackett, 1973).

Posteriormente a las observaciones de Chang y Austin (1951) con respecto a que los espermatozoides de conejo y rata debían permanecer en el tracto genital femenino durante cierto tiempo para adquirir la capacidad de fertilizar al óvulo, se describió la presencia de un componente del plasma seminal que inhibe la capacitación, ocasionando que los espermatozoides capacitados sean incapaces de fertilizar (Chang, 1957).

Se han identificado varias glicoproteínas de diferente peso molecular con actividad descapacitante, en fluidos obtenidos en todos los niveles del tracto genital masculino; túbulos seminíferos, epidídimo y fluido seminal de la mayoría de las especies de mamíferos estudiados (Bedford, 1970; Davis, 1971; Reyes y col., 1975).

Los espermatozoides descapacitados pueden readquirir su habilidad fertilizante si se incuban nuevamente en condiciones de capacitación tanto in vivo como in vitro (Reyes y col., 1975). El factor descapacitante actúa en la superficie del espermatozoide bloqueando ciertos sitios o procesos en el desarrollo de la capacitación y reacción acrosomal, tales como receptores específicos (Rosado y col., 1975), grupos funcionales (Reyes y col., 1975), canales de transporte de iones y actividades enzimáticas (Yanagimachi y Usui, 1974).

Los sulfatos esteroides son compuestos específicos de la membrana plasmática del espermatozoide que se caracterizan por su capacidad de estabilizar la estructura membranal y han sido propuestos como factores descapacitantes que requieren ser eliminados de la superficie del espermatozoide durante el proceso de capacitación (Bleau y col., 1975). Por otra parte, se ha observado la existencia de una alta actividad de esteroide-sulfatasa en las células del cúmulus y en la trompa de Falopio durante la ovulación, sugiriendo que esta actividad enzimática participa de manera importante en la capacitación (Langlais y Roberts, 1985).

Con la aplicación de técnicas en microscopía electrónica y criofractura, así como la utilización de sistemas de capacitación in vitro, se ha observado que la membrana plasmática presenta una considerable heterogeneidad regional en su estructura, reflejada por el tamaño, rearrreglo y distribución de partículas intramembranales en relación con las diversas estructuras de la célula espermática (Koehler y Gaddum Rosse, 1975).

Estos cambios membranales intrínsecos se llevan a cabo por una liberación y/o modificación en la distribución de glicoproteínas de la membrana plasmática y como consecuencia un cambio en el rearrreglo de partículas intramembranales en la cabeza del espermatozoide humano, principalmente en la región acrosomal (Tesarik, 1985). El agrupamiento de partículas intramembranales indica una movilidad regional y/o diferencial facilitada de las proteínas integrales en la bicapa lipídica de la membrana plasmática, ocasionándose cambios en la permeabilidad y fluidez membranal (Reyes y col., 1980).

La estabilidad membranal depende también de la conformación espacial de las proteínas intrínsecas. El espectro infrarojo de membranas acrosomales aisladas de espermatozoides eyaculados humanos muestra una elevada proporción de proteínas constitutivas en una conformación más estable (conformación B antiparalela). La incubación de membranas acrosomales con AMPc y/o con líquido folicular humano modifica la conformación de las proteínas membranales a conformaciones menos estables, hélice alfa y/o enrollamiento al azar (Delgado y col., 1976; Rosado, 1988).

Se ha reconocido la importancia del colesterol y de los fosfolípidos como constituyentes estructurales de las membranas celulares. Tanto el colesterol, como los fosfolípidos pueden ser intercambiados libremente entre la membrana plasmática y su microambiente. Numerosos investigadores han señalado la importancia de la relación entre la fluidez de la bicapa lipídica con las funciones membranales enzimáticas y de transporte (Reyes y col., 1980; Ehrenwald y col., 1988)

La fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática

dependen parcialmente de la composición lipídica, fundamentalmente de la relación molar colesterol/fosfolípidos. Se ha demostrado que la incubación en medio capacitante disminuye la cantidad de colesterol presente en la estructura membranar del espermatozoide humano, particularmente en la cabeza, con lo que disminuye la relación molar colesterol/fosfolípidos, provocando una desestabilización de la estructura proteica de la membrana plasmática, lo que induce cambios en la permeabilidad a iones, en la fluidez y movilidad intramembranal de lípidos y proteínas, condiciones indispensables para la fusión de la membrana plasmática en la reacción acrosomal (Rosado y col., 1988).

### I.3 Reacción acrosomal

La reacción acrosomal es un evento modificado de la exocitosis que es esencial para la fertilización (Meizel, 1984) y que involucra la fusión progresiva de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa de la cabeza del espermatozoide, dando como resultado la secreción y/o liberación de las enzimas presentes en el acrosoma, la penetración de la envoltura glicoprotéica circundante al ovocito (zona pelucida) y la generación de un segmento ecuatorial fusogénico capaz de iniciar la fusión con el ovocito.

En general, es probable que la reacción acrosomal en los espermatozoides con capacidad fertilizante se inicie in vivo en la superficie o en el interior del cúmulus oophorus y se complete en la superficie de la zona pelucida (Bedford, 1983; Yanagimachi, 1984).

Investigaciones recientes con espermatozoides de

hamster (Cherr y col., 1986) y ratón (Bleil y Wassarman, 1983) capacitados in vitro, indican que la reacción acrosomal es inducida por un componente de la zona pelucida, que en el ratón ha sido identificado como una glicoproteína sulfatada o ZP3.

Los espermatozoides humanos también realizan reacción acrosomal cuando se unen a la superficie de la zona pelucida (Cross y col., 1988). Sin embargo, diferentes estudios en hamster y humano indican que existe una gran variedad de moléculas que estimulan o aceleran la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados (Meizel, 1984). Muchas de estas moléculas están presentes en el fluido del oviducto (Reyes y col., 1984), la matriz del cúmulus (Sliteri y col., 1988) y la zona pelucida (O'rand y Fisher, 1987), los tres principales sitios propuestos para la iniciación de este evento. Estas moléculas incluyen: albúmina sérica, enzimas hidrolíticas, glicosaminglicanos, aminas biogénicas, productos del metabolismo de prostaglandinas, esteroides, beta aminoácidos (taurina e hipotaurina) y componentes de la zona pelucida (Meizel, 1984).

El acrosoma de los espermatozoides de mamífero ha sido comparado con un lisosoma o con un gránulo secretor debido a su origen, estructura y expresión de su función celular. Estos organelos tienen en común la exocitosis, con características particulares en cada una de las estirpes celulares (Meizel, 1978).

Actualmente, existen evidencias experimentales de que este proceso de secreción está regulado tanto por nucleótidos cíclicos endógenos y exógenos, así como por hormonas esteroides, calcio y calmodulina, contribuyendo en

este evento el ensamble y desensamble de microtúbulos y microfilamentos (Reyes y Chavarría, 1985). El AMPc exógeno parece ejercer su efecto al unirse a receptores membranales en la región apical de la cabeza, los que están asociados con la activación de proteínas cinasas, fosforilando componentes de esta entidad, lo que a su vez se traduce en cambios en el transporte de iones y sustratos (Hyne y Garbers, 1979).

Se ha demostrado que las hormonas esteroides poseen receptores en la membrana celular del espermatozoide y que esta interacción induce cambios en las propiedades biofísicoquímicas y en las funciones membranales (Hernández-Pérez y col., 1979). Durante las últimas etapas de la capacitación, la interacción específica de progesterona y 17-beta-estradiol con las membranas acrosomales modula la relación GMPC/AMPC intraacrosomal necesaria para que se lleve a cabo la reacción acrosomal (Reyes y col., 1989). La actividad de adenilil ciclasa en el acrosoma podría estar modulada también a través del complejo calcio-calmodulina, como sucede en otras estirpes celulares (Means y col., 1982), presentando la calmodulina una función moduladora en este proceso, ya que está presente en la región acrosomal y se ha demostrado que regula la actividad de enzimas involucradas en este evento (Reyes y col., 1987). Por otra parte, tanto el complejo calcio-calmodulina como los nucleótidos cíclicos participan conjuntamente en la regulación de la polimerización de la tubulina y la actina en las células espermáticas (Reyes y Chavarría, 1985). Estas proteínas parecen regular diferentes funciones en esta entidad como la contracción (Meizel, 1978), el acercamiento de las membranas para su fusión (Yanagimachi, 1981), la fijación y transporte de las enzimas hidrolíticas contenidas

en el acrosoma (Meizel, 1974) o la movilidad de componentes membranales, como los receptores (Yanagimachi, 1981).

Se ha determinado que el acrosoma de espermatozoides de mamífero posee múltiples sistemas enzimáticos, tales como enzimas hidrolíticas (principalmente hialuronidasa y acrosina), fosfolipasa A2, ATPasas dependientes de magnesio, sodio, potasio y calcio. Estos sistemas enzimáticos parecen estar involucrados en la regulación de diversas expresiones de la función celular (Meizel, 1984).

La hialuronidasa se localiza en las porciones anteriores y periféricas del acrosoma de diferentes especies de mamíferos, y facilita el transporte del espermatozoide mediante la hidrólisis del material constituyente de la matriz del cúmulus oophorus y sustancias mucoprotéicas, como las presentes en el moco cervical (Cummins y Yanagimachi, 1986).

Además de la hialuronidasa, el acrosoma contiene varias proteasas; la mejor caracterizada es la acrosina, proteasa con actividad tripsínica que hidroliza el material acelular de la zona pelucida y permite el contacto del espermatozoide con la membrana vitelina (Garner y col., 1975). Se ha sugerido que la acrosina no es liberada durante el proceso de interacción espermatozoide-zona pelucida, sino que permanece unida a la membrana acrosomal interna (Brown y col., 1976). El mecanismo de acción in vivo se desconoce, pero se sugiere que esta enzima puede unirse a un receptor sensible a la tripsina en la zona pelucida, a través del cual el espermatozoide es guiado en la penetración de esta capa acelular (Meizel, 1978).

Por otra parte, por medio de inhibidores específicos se ha sugerido que la acrosina presente en el acrosoma, al activarse hidroliza a las proteínas de la membrana acrosomal externa facilitando su fusión con la membrana plasmática. El mecanismo por el cual la acrosina puede participar en estos eventos membranales, es por activación de una fosfolipasa y/o la hidrólisis de proteínas constitutivas de la membrana acrosomal externa y/o la membrana plasmática (Meizel, 1984).

Inhibidores específicos de la fosfolipasa A2, así como los productos de su actividad hidrolítica en los fosfolípidos membranales (lisofosfolípidos y ácidos grasos libres), inhiben también la reacción acrosomal en condiciones in vitro, por lo que, se ha sugerido que la fosfolipasa y los productos de su actividad están involucrados en los eventos de fusión membranal, desestabilizando la membrana plasmática. Sin embargo, la localización y el mecanismo de acción de estas moléculas no han sido definidos (Thakkar y col., 1984).

La enzima ATPasa dependiente de magnesio, ha sido localizada en las membranas acrosomales de diferentes especies de mamíferos; la inhibición de esta ATPasa (sin afectar las ATPasas mitocondriales), induce reacción acrosomal en espermatozoides de hamster en condiciones capacitantes (Meizel, 1984). Esta enzima está asociada a una bomba de protones, regulando de esta manera el pH intracrosomal por un aumento en la permeabilidad  $H^+$  y  $K^+$  o mediante un cambio en la permeabilidad a calcio (Irvine y Aitken, 1986).

Posteriormente a la acidificación inicial del ambiente intracelular durante la capacitación, la concentración

intracelular de calcio aumenta en el espermatozoide por la difusión de calcio extracelular hacia el interior de la célula. Este aumento en la concentración de calcio inhibe la actividad de la ATPasa dependiente de sodio y potasio, lo que aumenta la concentración intracelular de sodio y provoca la salida de iones hidrógeno por un intercambio fisiológico  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ; ésto resulta en un aumento del pH intraacrosomal, lo que provocará la iniciación de la secuencia de eventos que terminan en la producción de la reacción acrosomal (Reyes y col., sometido a publicación).

#### I.4 Interacción de gametas

La habilidad del espermatozoide humano para atravesar la zona pelucida depende de una secuencia compleja de interacciones asociada con: 1) la unión del espermatozoide a la capa rica en carbohidratos en la superficie externa de la zona; 2) la inducción de la reacción acrosomal y 3) la penetración física de la matriz de la zona. Estos eventos se encuentran dirigidos por macromoléculas específicas, tales como receptores superficiales o actividades enzimáticas (Tesarik, 1986).

La unión inicial del espermatozoide a la superficie de la zona pelucida involucra un alto grado de especificidad celular y de especie, ya que la zona pelucida contiene un receptor específico de especie que modula la unión del espermatozoide a la superficie de la zona (Bedford, 1983).

Diferentes estudios utilizando al ratón como modelo experimental, sugieren que en la superficie del espermatozoide hay al menos dos sitios de reconocimiento a la zona pelucida; un sitio con actividad de galactosiltransfera

sa y un sitio sensible al inhibidor de tripsina (Bleil y Wassarman, 1983). El concepto de una glicosiltransferasa en la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide que une residuos de carbohidratos localizados en la superficie externa de la zona pelucida, define a esta unión como una interacción de tipo enzima-sustrato (Macek y col., 1988). En este reconocimiento celular mediado por carbohidratos, los eventos de interacción espermatozoide-zona pelucida parecen depender de los cambios peroxidativos en la membrana plasmática asociados con la generación de especies oxidoreactivas, las cuales pueden ser estimuladas significativamente por el incremento intracelular de calcio. Esta peroxidación potencializa un incremento en la actividad de la fosfolipasa A2 y tiene como consecuencia una desestabilización membranar y la inducción de la reacción acrosomal (Aitken, 1988).

Una vez que el espermatozoide ha realizado la reacción acrosomal en la superficie de la zona pelucida, la próxima etapa en la interacción espermatozoide-ovocito involucra la penetración física de la zona por medio del movimiento mecánico generado por la propagación flagelar y la actividad enzimática de la acrosina. En roedores y primates subhumanos, la penetración de los espermatozoides está asociada con un cambio en las características del movimiento del espermatozoide, de un movimiento lineal progresivo a un movimiento no progresivo y errático, caracterizado por una propagación de la onda flagelar de amplitud alta y asimétrica. Este tipo de movilidad ha sido denominada hiperactivación (Yanagimachi, 1981). En poblaciones de espermatozoides de hamster capacitados, cerca del 60% de la población exhibe hiperactivación (White y Aitken, 1989). En contraste, en los espermatozoides humanos en condiciones

capacitantes, no parece existir ningún cambio significativo en las características del movimiento excepto en la velocidad promedio de las células (Aitken, 1982), pero es probable que este tipo de movimiento lo presente selectivamente una proporción pequeña de la población espermática (Robertson y col., 1988).

Se ha propuesto que la acrosina se encuentra unida a la membrana acrosomal interna (Meizel, 1984). Estudios de la interacción de gametas in vitro mediante microscopía electrónica, han demostrado que el espermatozoide de hamster realiza un canal a través de la zona, atravesando la zona pelucida oblicuamente o radialmente (Katz y col., 1986).

Posteriormente que la zona pelucida ha sido penetrada, los siguientes pasos en la fertilización involucran la fusión de un espermatozoide con reacción acrosomal con la membrana vitelina del ovocito y la conversión del núcleo espermático en el pronúcleo masculino dentro del citoplasma del ovocito (Sathananthan y col., 1986a). En la fertilización humana estos eventos finales son menos accesibles a una investigación directa debido a la selectividad de estos procesos, la baja disponibilidad de ovocitos humanos y por aspectos éticos en la investigación biomédica.

La fusión de las gametas se inicia por el reconocimiento entre la membrana plasmática de la región del segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide y la membrana vitelina (Bedford, 1979). Se ha sugerido que este reconocimiento involucra una interacción mediada por residuos de carbohidratos y altamente dependiente de los cambios de estabilidad membranal (Dravland y Mortimer,

1988). El calcio participa de manera importante en el proceso de fusión como activador de la fosfolipasa A2 y/o a través de la calmodulina, regulando la actividad del citoesqueleto del espermatozoide (Aitken, 1988).

Los eventos de fusión espermatozoide-ovocito se han estudiado con microscopía electrónica en sistemas de fertilización homóloga (Sathananthan, 1986b) o heteróloga (Talbot y Chacón, 1982) en condiciones in vitro. En los espermatozoides de mamífero existen diferencias de opinión acerca de la localización de la zona fusogénica de la cabeza del espermatozoide; se ha postulado que la membrana de la región postacrosomal, el segmento ecuatorial de la cabeza o ambas son capaces de fusionarse con la membrana vitelina del ovocito durante la fusión de gametas (Yanagimachi, 1981). La fusión ocurre extendiéndose desde el vestigio ecuatorial a la región postacrosomal de la cabeza del espermatozoide. Una vez que la fusión ha ocurrido, la región anterior de la cabeza del espermatozoide (limitada por la membrana acrosomal interna) es incorporada por extensiones de citoplasma cortical del ovocito en un proceso parecido a la fagocitosis (Talbot y Chacón, 1982). Simultáneamente, los gránulos corticales liberan su contenido en el citoplasma del ovocito (factores citoplasmáticos) e inducen cambios en la membrana nuclear del espermatozoide provocando una desestabilización y vesiculación de la membrana, eventos que preceden a la descondensación de la cromatina (Sathananthan, 1986b).

La habilidad de los ovocitos de mamífero para descondensar un núcleo espermático y transformarlo en pronúcleo depende en parte de su etapa de desarrollo (Sathananthan y Trounson, 1985). Durante el proceso de

descondensación las protaminas nucleares del espermatozoide son reemplazadas por las histonas (Rodman y col., 1981) y en condiciones in vitro está asociada a la acción de agentes reductores disulfuro o con agentes reductores en combinación con detergentes, proteasas y sales (Zirkin, 1985). Sin embargo, la reducción de uniones disulfuro nucleares no es suficiente para estimular la descondensación nuclear, lo que indica que la descondensación inducida por el rompimiento in vitro de uniones sulfhidrilo involucra una degradación enzimática de proteínas nucleares o bien mecanismos no enzimáticos dependientes aparentemente de cambios eléctricos de la membrana nuclear (Tesarik, 1986).

Se ha demostrado que la descondensación nuclear del espermatozoide in vitro en presencia de detergentes neutros o bajas concentraciones de sales se inicia en la región postacrosomal, como sucede durante la fertilización in vivo, a través de un proceso enzimático que involucra la degradación de proteínas nucleares en el espermatozoide.

Se ha sugerido que la actividad proteolítica que participa en la descondensación, es producida a partir de la cromatina in situ, en el acrosoma o la fuente de la actividad reductora de puentes disulfuro, depende de factores citoplasmáticos del ovocito (Zirkin, 1985).

### I.5 Infertilidad Masculina

La fertilidad masculina depende de la calidad del semen eyaculado, por lo que la evaluación de este potencial se ha basado tradicionalmente en el análisis convencional del semen, el cual proporciona información acerca de la apariencia física y volumen de la muestra, así como la concentración espermática, movilidad, morfología y otras características seminales. Se han establecido criterios estandarizados para definir las características de una muestra de semen normal (WHO, 1987). Sin embargo, los resultados de estos análisis tienen una baja correlación con la capacidad funcional de una muestra dada para fertilizar el ovocito humano in vivo o in vitro, excepto en individuos que presentan azoospermia o necrozoospermia (Aitken, 1985b).

La concentración espermática en el eyaculado fue el primer parámetro utilizado en la valoración clínica como indicador de la fertilidad masculina. Se ha reportado que aproximadamente el 40% de los pacientes infértiles presentan una concentración espermática menor de  $10-20 \times 10^6/\text{ml}$  (Zukerman y col., 1977). Sin embargo, en aproximadamente el 10% de hombres con fertilidad comprobada la concentración espermática se encuentra en rangos menores de  $10 \times 10^6/\text{ml}$ , (Davis, 1976); en contraste, concentraciones espermáticas mayores a  $100 \times 10^6/\text{ml}$  se presentan en cerca del 25% de la población de pacientes infértiles (Smith, 1977).

Por otra parte, se ha identificado a la oligozoospermia como un estado patológico en el cual el número de espermatozoides/ml de semen es menor a 20 millones (WHO, 1987). La etiología de esta entidad nosológica es diversa y en la mayoría de los casos no es posible establecer un

diagnóstico específico, por lo que se considera como idiopática (Comhaire y col., 1987).

Por otro lado, la movilidad espermática es una característica del semen que tiene una importancia crítica en la definición de la fertilidad, debido a que la propagación de la onda flagelar del espermatozoide es una expresión fundamental de la vitalidad de la célula. El espermatozoide utiliza su movimiento flagelar durante el proceso de transporte a través del tracto genital femenino (Mortimer y Templeton, 1982), particularmente a nivel del endocérvix (Aitken, 1982), hacia el sitio de la fertilización y en la penetración de las capas circundantes del ovocito (Bedford, 1983).

Se ha establecido que la astenozoospermia es un estado patológico cuya incidencia es aproximadamente del 12% en la población infértil (Comhaire y col., 1987). Esta entidad nosológica está caracterizada por la presencia de una movilidad menor al 40% en el eyaculado (WHO, 1987). La etiología de esta disfunción en la movilidad espermática se debe a defectos ultraestructurales del flagelo, alteraciones bioquímicas, factores inmunológicos e infecciosos (Steinberger, 1978).

Además del número de espermatozoides y de la proporción de células con movilidad unidireccional, las alteraciones en la morfología de los espermatozoides también se han relacionado con el potencial de fertilidad en el varón, debido a que estas alteraciones están asociadas con anomalías en la función reproductiva (Russell y Rogers, 1987). En el eyaculado de pacientes infértiles existe una proporción elevada de formas anormales, que a menudo van

asociadas a una gran cantidad de células germinales exfoliadas, células del tracto genital y detritus celulares.

Se ha reportado que cerca del 6% de la población infértil presenta teratozoospermia, un estado patológico caracterizado por la presencia de menos de 30-40% de espermatozoides con morfología normal en el eyaculado (Kruger, 1988). Además una baja proporción de células con morfología normal se encuentra asociada aproximadamente con el 50% de los diferentes estados etiológicos de infertilidad (Comhaire, 1987).

Por tal motivo, debido a la heterogeneidad morfológica y funcional que presenta el semen humano, aún es difícil definir y establecer los parámetros de normalidad del gameto masculino.

La evaluación del semen por los métodos clínicos tradicionales proporciona una descripción cualitativa y subjetiva del potencial de fertilidad masculina. Como una alternativa a la valoración de la capacidad funcional del gameto masculino para fertilizar al ovocito homólogo, recientemente se han introducido varios ensayos con el propósito de evaluar la función espermática de una manera más objetiva y cuantitativa (Blasco, 1984).

En 1976, Yanagimachi introdujo un bioensayo que ha sido ampliamente utilizado para valorar la funcionalidad del espermatozoide humano, estableciendo que el ovocito de hamster (Mesocricetus auratus) cuando se libera de la zona pelucida es capaz de incorporar espermatozoides heterólogos incluyendo el del humano. La utilidad de este bioensayo depende del hecho que sólo los espermatozoides con reacción

acrosomal pueden fijarse y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito durante la penetración, como consecuencia de una falta de especificidad de especie a nivel de la membrana plasmática del ovocito de hamster (Yanagimachi, 1976).

Esta prueba evalúa solamente ciertas funciones espermáticas como son: La habilidad del espermatozoide para realizar capacitación-reacción acrosomal, la fusión y la formación del pronúcleo masculino (y posiblemente su participación en la primera división celular).

Varios investigadores han aplicado el bioensayo del ovocito de hamster en el diagnóstico de infertilidad masculina (Yanagimachi, 1984); sin embargo, los protocolos experimentales asociados con la aplicación diagnóstica del bioensayo no están estandarizados a pesar del esfuerzo de varios investigadores (WHO, 1986). No obstante, los datos de diferentes laboratorios pueden ser comparados si se manejan los resultados en porcentajes de penetración. De estas investigaciones se establece: 1) que los espermatozoides de hombres con fertilidad comprobada penetran más del 10-15% de los ovocitos y 2) los espermatozoides de hombres clínicamente infértiles penetran con porcentajes significativamente más bajos del 10% (Yanagimachi, 1984). Es claro que aunque los espermatozoides de hombres fértiles son capaces de penetrar los ovocitos de hamster, su habilidad varía grandemente de un individuo a otro (Yanagimachi, 1984).

Por otra parte, esta prueba no puede evaluar otras funciones espermáticas importantes tales como: la penetración en el moco cervical, la sobrevivencia en el

ascenso en el tracto genital femenino y la penetración de las capas circundantes del ovocito, esenciales para la fertilización in vitro. Basados en ésto, varios investigadores han tratado de desarrollar métodos que pueden analizar las características del movimiento y el estatus metabólico de la célula espermática de manera más precisa.

Se han desarrollado diferentes técnicas para el análisis automatizado de la movilidad espermática, que van desde el uso de videocámaras hasta la aplicación de programas de computación que permiten evaluar imágenes directas obtenidas del microscopio (Knuth, 1987), lo cual además de complicado es costoso.

Un método preciso y menos complicado es el método fotográfico de exposición múltiple desarrollado por Makler (1978), el cual incluye el uso de un microscopio de contraste de fases convencional con una cámara fotográfica adaptada, en el que se coloca un estroboscopio con 6 o más ranuras entre la fuente de luz y el condensador. De esta manera las impresiones fotográficas registran la posición secuencial del espermatozoide durante su movimiento, la presencia de espermatozoides con diferentes tipos de movilidad, así como una clara distinción entre espermatozoides móviles (secuencia de imágenes) e inmóviles (sobre exposición luminosa). El tiempo de exposición para las impresiones fotográficas es de un segundo, de tal manera que es posible evaluar no sólo la distancia recorrida sino también la velocidad de los espermatozoides (u/s).

Para valorar la capacitación *in vitro* de la población espermática se ha utilizado la evaluación cuantitativa de la reacción acrosomal. En el espermatozoide humano el acrosoma

es una estructura difícil de visualizar directamente; sin embargo, existen técnicas de tinción específicas para este propósito por ejemplo, Talbot y Chacón (1981) introdujeron un método de triple tinción para la evaluación de la reacción acrosomal normal. La ventaja principal de esta técnica es que diferencia entre reacciones acrosomales fisiológicas y reacciones anormales asociadas con espermatozoides en degeneración o muertos.

Actualmente se ha introducido también el uso de anticuerpos monoclonales como marcadores de la capacitación y/o reacción acrosomal de los espermatozoides humanos, de tal manera que el empleo de esta metodología no sólo proporciona un método para detectar la reacción acrosomal, sino también para la cuantificación específica de los cambios en la superficie espermática (Wolf y col., 1985).

Otros bioensayos utilizados para la evaluación de la funcionalidad del gameto masculino incluyen la penetración espermática in vivo del moco cervical (prueba postcoital o Sims-Huhner); la prueba in vitro de la penetración en tubo capilar (con moco cervical bovino o humano de la mitad del ciclo menstrual), evaluando de esta manera la capacidad de los espermatozoides para atravesar el moco cervical (WHO, 1987). La unión del espermatozoide humano a la zona pelucida es un evento crítico en la interacción de gametas; diferentes bioensayos han sido empleados para la evaluación de la unión y la penetración de la zona pelucida, como son los sistemas de interacción de espermatozoides con ovocitos humanos colectados de cadáveres o de ovarios removidos quirúrgicamente por razones ginecológicas y recientemente el empleo de hemizonas pelucidas obtenidas de ovocitos no fertilizados en los programas de fertilización in vitro, que

nos permiten valorar cuantitativamente el potencial de penetración en la zona pelucida, teniendo un mejor control de la variabilidad entre los fragmentos de las zonas pelucidas utilizadas (Burkman y col., 1988).

Los aspectos antes señalados, indican que la investigación de los procesos relacionados con la propagación de la onda flagelar del espermatozoide, con la capacitación-reacción acrosomal, la capacidad funcional del gameto masculino para fertilizar al ovocito, así como el estudio de las alteraciones en la función espermática de individuos con problemas de infertilidad, permite caracterizar los diferentes mecanismos de control involucrados en la interacción espermatozoide-ovocito durante la fertilización y plantear perspectivas, no sólo para conocer la naturaleza precisa de la etiología que contribuye a la pérdida del potencial fertilizante del gameto masculino en los diferentes casos de infertilidad humana y adoptar la terapia adecuada, sino también para regular la fertilidad masculina a través de interferir específicamente en los mecanismos bioquímicos responsables de la función del espermatozoide en este proceso.

Por lo antes expresado, decidimos estudiar comparativamente la integridad estructural y funcional de los espermatozoides de individuos oligoastenoteratozoospermicos infértiles de etiología idiopática y la de los espermatozoides de individuos euspermicos fértiles, con la finalidad de establecer las diferencias en la movilidad, capacitación-reacción acrosomal y la capacidad fertilizante del gameto masculino, mediante la valoración de las características de la movilidad espermática utilizando la técnica fotográfica de exposición múltiple (Makler, 1978);

la evaluación de la capacidad de respuesta de los espermatozoides a la capacitación in vitro empleando la técnica de triple tinción para identificar la reacción acrosomal (Talbot y Chacón, 1981) y la valoración de la capacidad fertilizante de los espermatozoides humanos utilizando el bioensayo de interacción con ovocitos de hamster libres de la zona pelucida (Yanagimachi, 1976).

## II. HIPOTESIS

Con la premisa de que la fertilidad e infertilidad en el varón dependen de la integridad estructural y funcional del gameto masculino y de su capacidad para interactuar con el ovocito homólogo tanto in vivo como in vitro, se propone que la disminución en la capacidad fertilizante de los espermatozoides eyaculados de individuos oligoastenotera tozoospermicos infértiles de etiología idiopática, está asociada con alteraciones en la estructura y la función de estas células.

### III. OBJETIVOS

Determinar las características estructurales y funcionales de los espermatozoides de individuos euspermicos fértiles e individuos oligoastenoteratozoospermicos infértiles de etiología idiopática mediante:

- 1) La valoración de los parámetros convencionales en muestras de semen.
- 2) La determinación cuantitativa de las características de la movilidad espermática.
- 3) El análisis de la capacidad de respuesta de los espermatozoides a la inducción del proceso de capacitación-reacción acrosomal in vitro.
- 4) La valoración de la capacidad fertilizante del gameto masculino de los individuos de ambos grupos de estudio, mediante el análisis de la penetración de los espermatozoides en sistemas de interacción in vitro con ovocitos de hamster libres de la zona pelúcida.

#### IV. MATERIAL Y METODOS

##### IV.1 Material biológico:

El estudio se desarrolló en base a la valoración cuantitativa y funcional de muestras de semen de 21 individuos que asistieron a la consulta de Andrología en el Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 "Dr. Luis Castelazo Ayala", Instituto Mexicano del Seguro Social o a la consulta de Planificación Familiar del Hospital General de zona No. 8 y que fueron clasificados en base a su historia clínica, examen físico (incluyendo volumen testicular) y el análisis de 2 o más muestras de semen, en dos grupos:

Grupo A: 11 individuos sanos, euspermicos y fértiles.

Grupo B: 10 pacientes infértiles con un diagnóstico de oligoastenoteratozoospermia de etiología idiopática (WHO, 1987).

Los criterios utilizados en el diagnóstico de los pacientes oligoastenoteratozoospermicos fueron: la presencia de menos de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/ml de semen, menos del 50% de espermatozoides con movilidad progresiva y menos del 40% de espermatozoides con morfología normal en el eyaculado; un registro de infertilidad de por lo menos un año antes del inicio del estudio; sus compañeras no presentaban signos de endometriosis, patología tubal, sin historia de infección pélvica y tenían ciclos menstruales regulares y/u ovulación normal.

##### IV.2 Donación de muestras:

Ambos grupos de pacientes participaron voluntariamen-

te después de proporcionarles un detallado informe del estudio; cada individuo donó 4  $\pm$  1 muestras en un período de 4 meses, cada muestra fue obtenida por masturbación después de 3 días de abstinencia sexual y el eyaculado fue depositado dentro de recipientes de plástico, estériles, de boca ancha.

Las muestras se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente con la finalidad de que completaran su licuefacción y fueron analizadas en un intervalo no mayor de 2 horas después de su producción.

#### IV.3 Desarrollo experimental:

La primera fase en la valoración de cada una de las muestras biológicas involucró el análisis convencional de los parámetros de calidad del semen humano (espermatobioscopia), utilizando los criterios propuestos por la Organización Mundial de la Salud para el examen del semen humano, describiendo la apariencia física y volumen de la muestra, así como el número, morfología y movilidad espermática (OMS, 1987).

- Evaluación de la espermatobioscopia y movilidad objetiva.

##### a) Volumen:

El volumen total del eyaculado de cada una de las muestras de semen fue medido inmediatamente después de completarse la licuefacción, en tubos graduados de centrifuga.

b) Viabilidad:

Para la evaluación de la viabilidad se utilizó la técnica de exclusión de colorantes vitales.

Con una micropipeta se colocó una alícuota de 500 ul de la suspensión de semen en un tubo de vidrio (13 x 100), al cual se le adicionaron 500 ul de solución de azul de tripano al 2% en solución amortiguadora de Biggers, Whitten y Whittingham (1971) con albúmina y libre de calcio a un pH de 7.4 (BWW). Esta suspensión fue incubada durante 15 minutos a 37°C; al término de este período de incubación se transfirió una alícuota de 5 ul a un sistema porta-cubre-objetos y se evaluó el porcentaje de células viables en un microscopio de contraste de fases (Carl Zeiss)

c) Densidad espermática:

La concentración de espermatozoides por mililitro de eyaculado fue determinada mediante el uso de un hematocitómetro. Con una pipeta serológica se realizó una dilución 1:20 de la suspensión de semen, tomando una alícuota de 50 ul de semen y aforando con 950 ul de solución para contar (formol 1% en citrato de sodio 2.9%); la muestra diluida fue mezclada con un agitador de pipetas durante 135 segundos (45 seg x 3 veces) y una gota fue transferida a una cámara de Neubauer. La cámara de Neubauer se colocó en un sistema húmedo durante 5 minutos permitiendo la sedimentación de las células y se determinó la concentración de espermatozoides en un microscopio de contraste de fases con el objetivo 40 X.

d) Determinación objetiva de las características de movilidad espermática:

Las características del movimiento de los espermatozoides de cada una de las muestras biológicas, fueron determinadas inmediatamente después de ocurrida la licuefacción mediante la técnica fotográfica de exposición múltiple propuesta por Makler (1978).

Alícuotas de 5  $\mu$ l de semen sin diluir se colocaron en un sistema porta-cubreobjetos previamente equilibrado a una temperatura de 20 $^{\circ}$  C; este sistema se colocó en un microscopio de contraste de fases equipado con una cámara fotográfica (Carl Zeiss) y se observaron varios campos al azar.

Se obtuvieron 5 impresiones fotográficas en sucesión por cada muestra, o su equivalente para contar un mínimo de 400 células, utilizando una película blanco y negro Kodak Plus-X que se expuso durante un segundo a 6 pulsos de luz que partieron de un estroboscopio de 6 ranuras colocado entre la fuente de luz y el condensador del microscopio.

En las impresiones fotográficas se analizaron los diferentes parámetros de movilidad de cada una de las muestras biológicas: número y porcentaje de espermatozoides con o sin movilidad flagelar; longitud y patrón de desplazamiento de cada espermatozoide; la velocidad promedio de los espermatozoides, calculada a partir de la suma total de la distancia recorrida por la población espermática móvil entre el número de espermatozoides móviles:  $\bar{V} = T/N \times S/(P-1)$  donde  $\bar{V}$  = velocidad promedio en  $\mu$ /seg; T = distancia total de la población espermática móvil calculada en micras mediante el factor de amplifica-

ción; N = número de espermatozoides móviles; S = número de ranuras en el estroboscopio o frecuencia de pulsos de luz por segundo y P = número de imágenes observadas en cada trayectoria de los espermatozoides; distribución de velocidades e índice de movilidad calculado a partir de la distancia efectiva recorrida por toda la población móvil espermática ( $Micras=u$ ) dividida entre la velocidad espermática promedio expresada en u/s (Makler, 1978).

e) Determinación de la morfología espermática y de la presencia de células inmaduras en el eyaculado

Para el análisis de la morfología y presencia de células inmaduras se utilizó la tinción de Papanicolaou, que distingue claramente los componentes celulares basófilos y acidófilos.

De cada una de las muestras de semen de los grupos en estudio se tomó una alícuota de 10  $\mu$ l y se realizó un frotis en un portaobjeto; las preparaciones se dejaron secar al aire y se fijaron en una solución de alcohol etílico (95%) y éter etílico en partes iguales, durante 15 minutos por lo menos, tiñiéndose posteriormente de acuerdo con el procedimiento propuesto por la Organización Mundial de la Salud (1987).

Los frotis fueron colocados en una caja de Coplin y fueron teñidos según el siguiente esquema:

- 1) Etanol al 80% durante 10 segundos.
- 2) Etanol al 70% durante 10 segundos.
- 3) Etanol al 50% durante 10 segundos.
- 4) Agua destilada durante 10 segundos.

- 5) Hematoxilina de Harris durante 3 minutos.
- 6) Agua corriente durante 5 minutos.
- 7) Etanol-ácido durante 2 segundos.
- 8) Agua corriente durante 5 minutos.
- 9) Solución de Scott durante 4 minutos.
- 10) Agua destilada durante un segundo.
- 11) Etanol al 50%, 70%, 80%, 95% durante 10 segundos cada uno.
- 12) Anaranjado G-6 durante 2 minutos.
- 13) Etanol al 95% durante 10 segundos (dos veces).
- 14) Colorante EA-50 durante 5 minutos.
- 15) Etanol al 95% durante 5 segundos (3 veces).
- 16) Etanol al 99% durante 2 minutos.
- 17) Xilol (durante 3 minutos).

Una vez teñidos, los frotis fueron analizados en un microscopio de contraste de fases con el objetivo de 100 X; las siguientes categorías morfológicas fueron evaluadas según los criterios de la OMS (1987); espermatozoides normales, cabeza oval grande, cabeza oval pequeña, cabeza de alfiler, cabeza alargada, cabeza piriforme, cabeza duplicada, cabeza amorfa, cabeza redonda, presencia de gota citoplasmática en cabeza y cuello, defecto en la pieza media y defecto flagelar. Se evaluaron cuando menos 400 células por frotis.

En estas mismas preparaciones se analizó la presencia de células inmaduras: espermatogonías, espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios, espermatídes Sab, espermatídes Scd, espermatozoides maduros e inmaduros. Se evaluaron cuando menos 400 células por frotis.

### - Capacitación-Reacción acrosomal

La segunda fase de la valoración de las muestras de semen fue la capacitación, evaluada por la habilidad del espermatozoide para completar la reacción acrosomal, lo que refleja el estado metabólico y fisiológico de los espermatozoides. Una vez completada la licuefacción y valorada la espermatobioscopía, el material biológico se diluyó 1:3 (V/V) con solución amortiguadora BWW con albúmina al 3%; las muestras diluidas se centrifugaron dos veces a 1000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga clínica a temperatura ambiente, con el objeto de concentrar las células y eliminar el plasma seminal. El precipitado fue resuspendido con un mililitro de BWW con albúmina al 3.5% y se determinó la concentración espermática con una cámara de Neubauer, ajustándose por dilución, en caso necesario, a  $10^8$  espermatozoides/ml.

De esta suspensión de espermatozoides se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l ( $10 \times 10^6$  espermatozoides) que se colocaron en tubos de poliestireno (13 x 100). El volumen final de cada tubo se ajustó a un mililitro con BWW, previa adición de  $\text{CaCl}_2$ , 2.5 mM concentración final, y se incubó durante 22 horas a 37°C, bajo una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  en aire, con una inclinación de los tubos de aproximadamente 45°.

La reacción acrosomal inducida se analizó empleando la técnica histoquímica de triple tinción, propuesta por Talbot y Chacón (1981):

A cada tubo de los sistemas de capacitación se añadió 1:1 (V/V) solución de azul de tripano al 2% en BWW y se

incubó a una temperatura de 37° C durante 15 minutos.

Previa evaluación de la viabilidad al microscopio, la suspensión de espermatozoides se concentró centrifugando a 1000 rpm durante 10 segundos en una centrifuga clínica, a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. El precipitado de espermatozoides se lavó dos veces con 1 ml de solución BWB sin albúmina y sin calcio, centrifugando a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

El precipitado se resuspendió en 500 ul de una solución de glutaraldehído al 2% en amortiguador de cacodilatos 5 mM, pH 7.4 y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Esta solución se descartó por centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos y el precipitado se lavó dos veces con amortiguador de cacodilatos 5 mM, pH 7.4 en una relación 1:05 (V/V).

La suspensión de células fijadas fue resuspendida en agua destilada, se lavó dos veces por centrifugación y se dejó un volumen final de 50 ul, procediéndose a la realización de frotis por duplicado, los cuales se secaron al aire.

Los frotis secos fueron colocados en una caja de Coplin y fueron teñidos de la siguiente manera:

- 1) Solución de café de Bismarck al 0.8% durante 5 minutos a 40° C.
- 2) Agua bidestilada hasta quitar el exceso de colorante.
- 3) Solución de rosa de Bengala 0.8%, 40 minutos a 24° C.
- 4) Agua bidestilada hasta quitar el exceso de colorante.
- 5) Etanol al 70% durante 1 minuto.

- 6) Etanol al 80% durante 1 minuto.
- 7) Etanol al 90% durante 2 minutos.
- 8) Etanol al 95% durante 2 minutos.
- 9) Etanol al 99% durante 2 minutos.
- 10) Xilol durante 2 minutos.

Los frotis teñidos fueron montados con resina y posteriormente fueron evaluados 800 células por frotis de cada muestra biológica, con un microscopio de contraste de fases utilizando el objetivo de 100 X.

#### - Fertilización heteróloga

La última fase en la valoración de las muestras biológicas fue la evaluación de la capacidad fertilizante de los espermatozoides con el bioensayo de ovocitos de hamster libres de la zona pelucida, el cual analiza la habilidad de estas células para penetrar y descondensarse en el citoplasma de los ovocitos.

El bioensayo se desarrolla en cuatro etapas:

- a) Estimulación de ovulación, recolección y preparación de ovocitos de hamster.
  - b) Capacitación in vitro de los espermatozoides humanos.
  - c) Interacción de gametos.
  - d) Evaluación de la penetración a través del análisis microscópico de la presencia de cromatina sexual.
- a) Estimulación de ovulación, recolección y preparación de ovocitos.
- Se utilizaron hembras hamster (Mesocricetus auratus) prepúberes inmaduras, de 8 a 12 semanas de edad,

mantenidas bajo un fotoperíodo 12:12.

- A animales seleccionadas al azar se les indujo maduración folicular y superovulación mediante la inyección intraperitoneal de 30 UI/animal de Gonadotrofina de yegua preñada (PMSG, Sigma), seguida por la inyección de 30 UI/animal de Gonadotrofina coriónica humana (HCG, Sigma) 55-57 horas después de la primera dosis.
- Para la recolección de los ovocitos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical después de 15-17 horas de la administración de HCG.
- Los animales fueron fijados en una tabla de cirugía, y la pared abdominal de los mismos fue lavada con etanol al 95% y rasurada, realizándose laparotomía con la finalidad de exponer el aparato reproductor. Los oviductos fueron separados y colocados en una caja de Petri de plástico estéril con solución salina fisiológica, a una temperatura de 22° C, con la finalidad de eliminar la contaminación con grasa y sangre.
- Se transfirieron los oviductos a un vidrio de reloj que contenía solución BWB y aceite de silicón a temperatura de 37° C, bajo estrictas condiciones de esterilidad.
- Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se liberó de los oviductos la masa del cúmulus oophorus conteniendo a los ovocitos, mediante la punción en la región ampular con una aguja del número 27.
- Las masas del cúmulus se transfirieron a un sistema de incubación conteniendo 100 ul de BWB con albúmina al

3%, con una cubierta de aceite de silicón equilibrado a una temperatura de 37° C.

- Se adicionaron 10 ul de una solución de hialuronidasa al 1% y se incubó este sistema a 36° C durante 10 minutos, con el objeto de remover las células del cúmulus.
- Los ovocitos, una vez liberados de las células del cúmulus, se transfirieron secuencialmente a tres sistemas con 100 ul de solución BWB con albúmina al 3%, equilibrados a 37° C, con el objeto de lavar y eliminar la hialuronidasa utilizada.
- Los ovocitos dispersados se colocaron en un sistema de incubación conteniendo 100 ul de BWB sin albúmina, con cubierta de silicón. Este sistema se incubó en presencia de 10 ul de tripsina pancreática bovina al 1% durante 1 minuto, para remover la zona pelucida de los ovocitos.
- Una vez que los ovocitos se encontraron libres de la zona pelucida, se transfirieron a tres sistemas secuenciales con 100 ul de solución BWB, con el fin de lavar cuidadosamente estas células antes de colocarlas en los sistemas de incubación para su posterior inseminación.

b) Capacitación in vitro de espermatozoides humanos.

La capacitación in vitro de las células espermáticas se realizó como se describió anteriormente en la valoración de la capacitación-reacción acrosomal.

c) Interacción de Gametas

En cajas de Petri estériles se colocaron alícuotas de 100 ul de BWW, por separado, que se cubrieron con aceite de silicón; a cada sistema se adicionaron  $\pm$  30 ovocitos de hamster libres de la zona pelucida, obtenidos como se describió en la etapa A.

La inseminación fue iniciada por la adición a cada sistema de alícuotas de  $1 \times 10^6$  espermatozoides móviles capacitados y se incubó durante 3 horas a  $37^{\circ}$  C, bajo una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  en aire; este sistema de interacción fue realizado por duplicado para cada muestra, incubando simultáneamente por separado espermatozoides de individuos fértiles e infértiles.

La reacción de inseminación se finalizó con la remoción de los ovocitos de cada sistema, los cuales se lavaron transfiriéndolos a sistemas secuenciales de BWW, con el objeto de eliminar los espermatozoides adheridos débilmente a la superficie de la membrana plasmática del ovocito.

d) Evaluación de la penetración a través del análisis microscópico de la presencia de cromatina sexual

Al completar el lavado, los óvulos se concentraron y se transfirieron en un volumen de aproximadamente 10 ul a un portaobjetos, el cual se cubrió con un cubreobjetos en el que previamente se colocó en cada esquina una pequeña cantidad de una mezcla de vaselina: parafina (20:1).

El cubreobjetos se colocó sobre el centro de la

alícuota que contenía los óvulos y se oprimió sobre los puntos de soporte de vaselina: parafina hasta que los óvulos se comprimieron lo suficiente para poder observar las cabezas de los espermatozoides que penetraron, inmediatamente después se añadió una gota de glutaraldehído al 2% en el extremo del cubreobjetos y la preparación se transfirió a una caja de Coplan que contenía formalina al 10%, durante 10 minutos. Las preparaciones se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en una caja de Coplan que contenía etanol al 95% durante 5 minutos. Posteriormente éstas fueron teñidas con una solución de Lacmoid 0.25% en ácido acético al 45%.

Las preparaciones se observaron en un microscopio de contraste de fases y el porcentaje de penetración fue determinado con el objetivo de 100 X.

Los óvulos se consideraron penetrados cuando se observaron las cabezas de los espermatozoides hinchadas, independientemente de la presencia de los flagelos correspondientes dentro del ovoplasma o bien la presencia de pronúcleos.

Los resultados se reportaron como porcentajes de penetración e índices de penetración y se corroboró con el análisis estadístico de Poisson (Aitken, 1984).

#### IV.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados experimentales del grupo fértil e infértil fueron analizados por las pruebas paramétricas t de Student y prueba de ajuste

de  $x^2$ , así como las pruebas no paramétricas de Mann Whitney y el coeficiente de correlación de intervalos de Spearman.

#### IV.5 Reactivos

Los reactivos que se utilizaron en este estudio fueron grado químicamente puro y se obtuvieron de las siguientes casas comerciales: Sigma Chemical Co., St. Louis; Merck, Darmstadt.

## V. RESULTADOS

### V.1 Análisis de los parámetros de calidad del semen

Los resultados obtenidos del análisis del semen permitieron determinar que entre el grupo de individuos euspermicos fértiles y oligoastenoteratozoospermicos infértiles de etiología idiopática, existen diferencias significativas en la mayoría de los parámetros analizados ( $P < 0.0001$ ), con excepción de la licuefacción y número de leucocitos por campo de observación. Los datos de los diferentes parámetros andrológicos evaluados se muestran en el cuadro 1 y representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de cada grupo de estudio.

### V.2 Determinación objetiva de las características de movilidad espermática

El análisis de la movilidad espermática evaluada mediante la técnica fotográfica de exposición múltiple (Makler, 1978) en individuos euspermicos y oligoastenoteratozoospermicos, demostró en el grupo de pacientes infértiles una disminución significativa en la proporción de espermatozoides móviles ( $P < 0.0001$ ), en la velocidad promedio ( $P < 0.0001$ ) y en el índice de movilidad ( $P < 0.0001$ ), al comparar los resultados observados con el grupo de individuos euspermicos fértiles (Cuadro II), de tal manera que no sólo la población de espermatozoides móviles es significativamente menor en los individuos oligoastenoteratozoospermicos, sino que existen también alteraciones significativas en las características de la movilidad, expresadas como velocidad promedio e índice de movilidad.

La frecuencia y distribución de las velocidades de los espermatozoides del grupo de oligoastenoteratozoospermicos y de euspermicos fértiles se compararon en la figura 1. En ambos grupos los espermatozoides móviles se desplazaron con velocidades que se encuentran en el intervalo de 0-80 micras/segundo. El análisis estadístico demostró que la distribución de estas dos poblaciones fue diferente ( $P < 0.0001$ ). En el intervalo de 10-30 micras/segundo existe una proporción significativamente mayor de espermatozoides de individuos infértiles ( $P < 0.005$ ), en tanto que en el intervalo de 30-60 micras/segundo la mayor población de espermatozoides con estas velocidades corresponde a individuos euspermicos ( $P < 0.001$ ).

La evaluación objetiva de la movilidad espermática, nos permitió determinar además los patrones de movilidad presentes en los espermatozoides de los individuos de ambos grupos de estudio.

En la discreta proporción de espermatozoides móviles presente en los individuos oligoastenoteratozoospermicos no se observaron diferencias significativas en la proporción de los diferentes patrones de movilidad al compararlos con los patrones de movilidad determinados en los espermatozoides de individuos euspermicos (Cuadro III).

### V.3 Determinación de la morfología espermática y presencia de células germinales inmaduras

Se analizaron comparativamente los espermatozoides de individuos euspermicos fértiles y oligoastenoteratozoospermicos infértiles mediante la tinción de Papanicolaou (WHO, 1987), con la finalidad de determinar las principales anomalías morfológicas presentes en estas células.

La frecuencia y distribución de la proporción de espermatozoides con morfología normal en ambos grupos se observa en la figura 2. El análisis estadístico demostró que la distribución de estas dos poblaciones es diferente ( $P < 0.005$ ). La distribución del porcentaje de incidencia de espermatozoides normales en el eyaculado de individuos infértiles se encuentra entre los intervalos 1-40%; el intervalor de mayor incidencia en estos individuos es de 10-20% de normalidad. En contraste, la distribución de los porcentajes de incidencia de los espermatozoides normales en el eyaculado de individuos fértiles, se ubica entre los intervalos de 10-60%, teniendo su más amplia distribución en el intervalo de 20-40%. Se puede observar también que no existe una diferencia significativa en el intervalo de 20-30% de normalidad; en este intervalo se encuentra aproximadamente el 30% de la población de espermatozoides normales en ambos grupos de estudio.

De acuerdo con nuestros datos, en el grupo de individuos euspérmicos fértiles la proporción de espermatozoides con morfología normal es significativamente mayor ( $P < 0.0001$ ), comparado con el grupo de pacientes infértiles. La incidencia de las principales anomalías morfológicas en ambos grupos de estudio se presenta en el cuadro IV. En el grupo de pacientes oligoastenoteratozoospermicos se encontró una proporción significativamente mayor de espermatozoides con cabeza amorfa ( $P < 0.005$ ), cabeza de alfiler ( $P < 0.01$ ) y defecto flagelar ( $P < 0.002$ ) en comparación con lo observado en el grupo de individuos euspérmicos fértiles. En ambos grupos de estudio se puede observar que la principal incidencia de anomalías corresponde a defectos en la cabeza del espermatozoide (44% en el grupo fértil y 48% en el grupo infértil, del total de

anormalidades), seguido de defectos en el flagelo, presencia de gota citoplasmática y en menor proporción defectos en pieza media.

Por otra parte, se determinó que en el semen de los pacientes infértiles existe un decremento significativo en la proporción de espermatozoides morfológicamente maduros ( $P < 0.0001$ ) y por lo tanto un incremento en la proporción de células germinales inmaduras ( $P < 0.0001$ ) con respecto al grupo de individuos euspermicos (Cuadros V y VI); ninguna diferencia significativa se observó al comparar la concentración de las diferentes categorías de células germinales en ambos grupos de estudio (Cuadro V).

#### V.4 Evaluación de la capacitación-reacción acrosomal in vitro

La reacción acrosomal fue evaluada por la técnica de triple tinción: con este procedimiento la viabilidad de los espermatozoides fue diferenciada en primer lugar con azul de tripano, el cual tiñó a los espermatozoides muertos, en tanto que las células vivas excluyeron a este colorante; las células fueron fijadas y posteriormente teñidas con café de Bismarck y rosa de Bengala; el café de Bismarck tiñó la región postacrosomal de café claro, lo cual permitió obtener un mejor contraste en esta región al impedir la tinción inespecífica de la misma con el rosa de Bengala, el cual tiñe de color rosa a la región acrosomal de espermatozoides con acrosoma intacto (Talbot y Chacón, 1981).

Mediante esta técnica se observaron 4 patrones de tinción: A) región postacrosomal azul con acrosoma rosa (espermatozoides muertos con acrosoma intacto); B) región

postacrosomal azul con región acrosomal sin tinción (espermatozoides muertos con ausencia de acrosoma indicativo de reacción acrosomal degenerativa); C) región postacrosomal con tinción café claro y acrosoma rosa (espermatozoides vivos sin reacción acrosomal); D) región postacrosomal de color café con región acrosomal sin tinción (espermatozoides vivos con reacción acrosomal) (Figura 3).

Esta tinción de los espermatozoides permitió determinar la existencia de un decremento significativo de la viabilidad de las células en los pacientes oligoastenoteratozoospermicos ( $P < 0.01$ ), en comparación con el porcentaje de viabilidad espermática del grupo de individuos euspermicos fértiles (Cuadro VII), tanto antes como después de la inducción del proceso de capacitación-reacción acrosomal in vitro.

Por otra parte, al comparar la evaluación del porcentaje de incidencia de reacción acrosomal en el grupo de individuos euspermicos con el grupo de pacientes infértiles después de la inducción del proceso de capacitación in vitro (Cuadro VIII), se demostró que existe un incremento significativamente mayor en el porcentaje de reacción acrosomal en los individuos euspermicos ( $P < 0.0001$ ) que el determinado en pacientes oligoastenoteratozoospermicos. Sin embargo, los datos que representan el porcentaje de incidencia de reacción acrosomal en individuos euspermicos fértiles, indican que solo una pequeña proporción de los espermatozoides eyaculados (aproximadamente el 10%) completan la reacción acrosomal después de su incubación en condiciones de capacitación in vitro.

V.5 Valoración de la capacidad fertilizante del gameto masculino mediante el bioensayo con ovocitos de hamster libres de la zona pelucida

La evaluación de las propiedades funcionales de los espermatozoides capacitados in vitro mediante el bioensayo con ovocitos de hamster libres de la zona pelucida en ambos grupos de estudio, indica que existe una disminución significativa en el índice de penetración de los espermatozoides de individuos infértiles ( $P < 0.001$ ) en comparación con el grupo fértil. El promedio de espermatozoides que penetraron y descondensaron su cromatina/ovocito en los individuos euspermicos fue de  $1.53 \pm 0.64$ , en contraste con el índice de penetración en individuos infértiles que fue de  $0.11 \pm 0.1$  (Cuadro IX).

Los resultados indican que existen también diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) entre ambos grupos de estudio en el porcentaje de penetración (Porcentaje de ovocitos penetrados por uno o más espermatozoides). El porcentaje promedio de penetración en individuos euspermicos fue de  $73.88 \pm 13.41$ , con un intervalo de penetración 45-90%; en contraste, el porcentaje de penetración en individuos infértiles fue de  $10.49 \pm 8.30$  con un intervalo de penetración de 0-26.6% (Cuadro IX), utilizando una concentración constante de espermatozoides inseminados ( $1 \times 10^6$  células/ml).

A partir de estos resultados se establece que los espermatozoides de los individuos del grupo de pacientes infértiles penetraron menos del 15% de los ovocitos con los que fueron inseminados (30 ovocitos/muestra), a diferencia de los individuos euspermicos fértiles que presentaron

porcentajes de penetración mayores al 20%. (figura 4)

El criterio de control de calidad adoptado en este estudio para determinar el grado de confiabilidad y reproducibilidad fue el propuesto por Aitken (1984), quien determinó que la frecuencia y distribución del porcentaje de penetración de espermatozoides fértiles e infértiles sigue una distribución de tipo Poisson, calculada a partir del índice de penetración de estas células.

El análisis estadístico no demostró alguna diferencia significativa entre la distribución del porcentaje de penetración experimental y la calculada en base al modelo de Poisson, señalando que los ovocitos utilizados en cada experimento presentaron las mismas condiciones de penetración.

#### V.6 Correlación entre la capacidad fertilizante con los diferentes parámetros estructurales y funcionales del semen humano

Se calcularon los coeficientes de correlación entre los datos obtenidos de la capacidad fertilizante de los espermatozoides de individuos oligastenoteratozoospermicos e individuos euspermicos fértiles con los diferentes parámetros estructurales y funcionales examinados en este estudio. Los coeficientes de correlación de los principales parámetros estudiados se presentan en el Cuadro X.

En el grupo de individuos fértiles ninguna correlación significativa fue observada con algún parámetro del análisis convencional del semen, con las características de movilidad espermática o con las diferentes categorías

morfológicas o de células germinales inmaduras, a diferencia de los resultados del grupo de pacientes infértiles que exhibieron una correlación positiva  $r = 0.986$  ( $P < 0.005$ ) con la velocidad promedio de los espermatozoides y una correlación negativa con el porcentaje de anomalías presentes en el eyaculado de estos individuos  $r = -0.942$  ( $P < 0.005$ ).

. El análisis entre las principales categorías de formas anormales y células inmaduras no presentó alguna correlación significativa con la capacidad fertilizante de los espermatozoides del grupo infértil. Por otro lado, el grupo de individuos fértiles y pacientes infértiles presentaron una correlación positiva  $r = 0.834$  ( $P < 0.005$ ) y  $r = 0.986$  ( $P < 0.005$ ) respectivamente entre la capacidad fertilizante del gameto masculino y la reacción acrosomal inducida por la capacitación in vitro.

CUADRO I. ANALISIS CONVENCIONAL DEL SEMEN HUMANO.

PARAMETRO SEMINAL	GRUPO EUSPERMICO FERTIL (N = 11)				GRUPO OLIGOASTENOTERATO- ZOOSPERMICO (N = 10)			
	PROMEDIO ±	D.S.	RANGO		PROMEDIO ±	D.S.	RANGO	
			MIN. -	MAX.			MIN. -	MAX.
- VOLUMEN	1.97	0.8	0.90	- 4.00	3.0 <sup>W</sup>	0.9	1.4	- 4.6
- LICUEFACCION	COMPLETA		-	-	COMPLETA		-	-
- MOVILIDAD PROGRESIVA <sup>A</sup>	2 - 3		-	-	0-1		-	-
- MOVILIDAD ESPERMATICA (%)	60.5	10.0	40.0	- 84.5	30.8 <sup>W</sup>	24.7	0.0	- 70.0
- DENSIDAD ESPERMATICA (Espermatozoides x 10 <sup>6</sup> /ml.)	159.2	74.2	33.7	- 316.0	24.7 <sup>W</sup>	28.3	0.01	- 97.5
- CONCENTRACION ESPERMATICA TOTAL / EYACULADO	305.1	175.8	68.0	- 861.3	73.35 <sup>W</sup>	79.2	0.02	- 284.8
- MORFOLOGIA NORMAL (%)	52.1	33.5	25.5	75.5	19.5 <sup>W</sup>	15.7	0.0	- 15.8
- NUMERO DE LEUCOCITOS / CAMPO	1.71	2.5	0.0	10.1	1.67	1.9	0.0	- 5.8

D.S. DESVIACION ESTANDAR      MIN. VALOR MINIMO.      MAX. VALOR MAXIMO.

<sup>W</sup> P < 0.0001 COMPARANDO CON EL GRUPO EUSPERMICO, UTILIZANDO LA PRUEBA DE MANN-WHITNEY

<sup>A</sup> ESCALA DE MOVILIDAD PROGRESIVA: 0-NULA ; 1-ESCALA ; 2-BUENA ; 3-EXCELENTE.  
LOS DATOS REPRESENTAN EL PROMEDIO ± DESVIACION ESTANDAR DE 41 Y 51 ESPERMATOBIOSCOPIAS REALIZADAS AL GRUPO DE INDIVIDUOS FERTILES E INFERTILES RESPECTIVAMENTE.

CUADRO II: DETERMINACION OBJETIVA DE LAS CARACTERISTICAS DE LA MOVILIDAD ESPERMATICA.

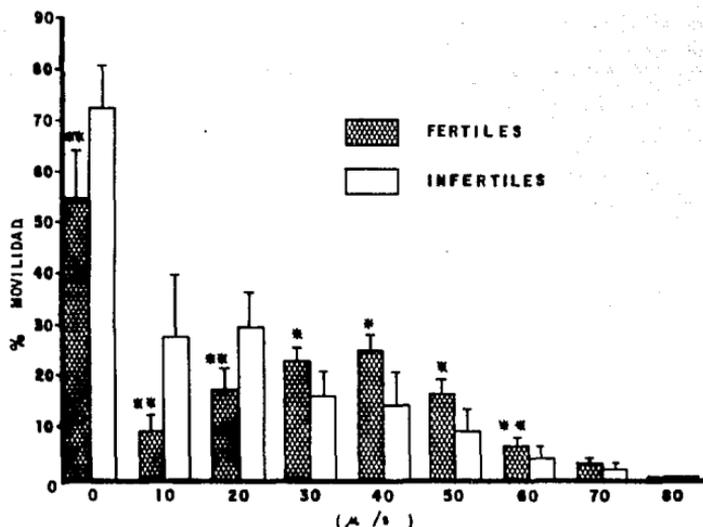
PARAMETRO	GRUPO EUSPERMICO FERTIL (N=11)	GRUPO OLIGOASTENOTE- RATOZOOSPERMICO INFERTIL (N=10)
MOVILIDAD (%)	44.67 ± 9.41	28.18 ± 10.93*
VELOCIDAD PROMEDIO ( μ / Seg.)	38.14 ± 18.1	19.08 ± 15.0*
INDICE DE MOVILIDAD	12.93 ± 8.4	5.21 ± 5.36*

LOS VALORES REPRESENTAN EL PROMEDIO ± DESVIACION ESTANDAR DE LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE LAS CARACTERISTICAS DE LA MOVILIDAD ESPERMATICA EVALUADA MEDIANTE EL METODO FOTOGRAFICO DE EXPOSICION MULTIPLE.

LA DIFERENCIA ESTADISTICA DE LOS DATOS SE OBTUVO MEDIANTE LA PRUEBA DE MANN-WHITNEY.

\* P < 0.0001 COMPARADO CON LOS DATOS DEL GRUPO DE INDIVIDUOS EUSPERMICOS

FIGURA 1  
VELOCIDAD ESPERMÁTICA



LA FIGURA REPRESENTA LA FRECUENCIA Y DISTRIBUCION DE VELOCIDADES ( $\mu/s$ ) DE ESPERMATOZOIDES DE INDIVIDUOS EUSPERMICOS (N=11) Y OLIGOASTENOTERATOZOSPERMICOS (N=10), MEDIANTE LA TECNICA FOTOGRAFICA DE EXPOSICION MULTIPLE, LOS VALORES EXPRESADOS EN LA GRAFICA REPRESENTAN EL PROMEDIO DE LAS DETERMINACIONES REALIZADAS EN CADA GRUPO DE INDIVIDUOS (4±1 DETERMINACIONES/INDIVIDUO). SE ANALIZARON LOS RESULTADOS MEDIANTE LA PRUEBA DE MANN-WHITNEY.

■ P < 0.001

■\* P < 0.005

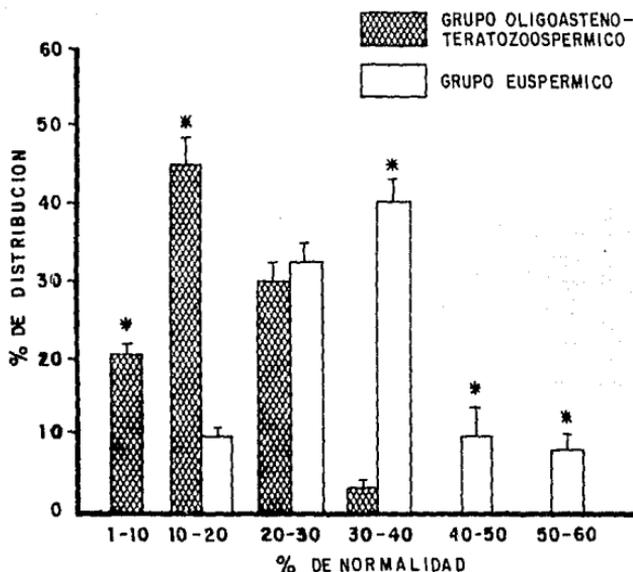
CUADRO III: DETERMINACION OBJETIVA DE LOS PATRONES DE MOVILIDAD ESPERMATICA.

PATRON DE MOVILIDAD (%)	GRUPO EUSPERMICO FERTIL (N=11)	GRUPO OLIGOASTENOTE-RATOZOOSPERMICO INFERTIL (N=10)
UNIDIRECCIONAL	44.00 ± 2.4	49.81 ± 9.0 <sup>N.S.</sup>
ERRATICA	33.60 ± 3.9	27.38 ± 6.1 <sup>N.S.</sup>
CIRCULAR	20.68 ± 2.8	22.86 ± 5.2 <sup>N.S.</sup>

CADA VALOR REPRESENTA EL PROMEDIO ± DESVIACION ESTANDAR DEL ANALISIS CUANTITATIVO DE LOS PATRONES DE MOVILIDAD QUE SE DETERMINARON POR EL METODO FOTOGRAFICO DE EXPOSICION MULTIPLE. CADA VALOR SE OBTUVO DE 4 ± 1 DETERMINACIONES/INDIVIDUO. EL ANALISIS ESTADISTICO SE REALIZO UTILIZANDO LA PRUEBA DE t STUDENT.

N. S. NO SIGNIFICATIVO

FIGURA 2  
 FRECUENCIA Y DISTRIBUCION DE LA PROPORCION  
 DE ESPERMATOZOIDES CON MORFOLOGIA NORMAL



LA GRAFICA REPRESENTA LA FRECUENCIA Y DISTRIBUCION DE LA PROPORCION DE ESPERMATOZOIDES CON MORFOLOGIA NORMAL EN MUESTRAS DE SEMEN DE INDIVIDUOS EUSPERMICOS (N=11) Y OLIGOASTENOTERATOZOOSPERMICOS (N=10), EN LA ABCSCISA SE REPRESENTA EL PROMEDIO DEL PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE FORMAS NORMALES.

EL ANALISIS ESTADISTICO SE REALIZO MEDIANTE LA PRUEBA  $t$  STUDENT.

\*  $P < 0.005$

CUADRO IV: ANALISIS MORFOLOGICO DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO

CATEGORIA MORFOLOGICA	GRUPO EUSPERMICO (%)	GRUPO OLIGOASTENOTE-RATOZOOSPERMICO (%)
ESPERMATOZOIDE NORMAL	31.22 ± 9.3	15.60 ± 7.0 <sup>d</sup>
<b>DEFECTO EN CABEZA</b>		
CABEZA OVAL GRANDE	5.02 ± 2.4	6.08 ± 2.5
CABEZA OVAL PEQUEÑA	5.28 ± 3.4	4.40 ± 3.3
CABEZA DE ALFILER	3.05 ± 1.8	5.54 ± 4.0 <sup>d</sup>
CABEZA ALARGADA	6.03 ± 4.6	7.61 ± 6.9
CABEZA PIRIFORME	4.83 ± 4.3	3.47 ± 2.7
CABEZA DUAL	0.92 ± 1.5	1.59 ± 1.3
CABEZA AMORFA	9.10 ± 5.6	13.31 ± 6.2 <sup>c</sup>
CABEZA REDONDA	9.45 ± 5.0	5.82 ± 7.3 <sup>d</sup>
<b>PRESENCIA DE GOTA CITOPASMATICA</b>		
CABEZA	0.87 ± 1.1	1.00 ± 0.9
CUELLO	9.71 ± 4.44	12.34 ± 7.4
DEFECTO EN PIEZA MEDIA	2.96 ± 1.84	3.51 ± 2.3
DEFECTO FLAGELAR	11.42 ± 7.6	19.57 ± 11.3 <sup>b</sup>

CADA VALOR REPRESENTA EL PROMEDIO ± DESVIACION ESTANDAR DEL PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE ANORMALIDADES PRESENTES EN LOS ESPERMATOZOIDES DE AMBOS GRUPOS. ANALIZANDOSE COMPARATIVAMENTE MEDIANTE LA TINCION DE PAPANICOLAOU.

LAS DIFERENCIAS SE ANALIZARON MEDIANTE LA PRUEBA DE MANN-WHITNEY.

a: P < 0.0001

b: <P 0.002

c: P < 0.005

d: P < 0.01

CUADRO V: DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE CELULAS GERMINALES INMADURAS EN EL SEMEN HUMANO.

CATEGORIA (CELULAS x 10 <sup>6</sup> /ml)	GRUPO EUSPERMICO FERTIL (N=11)	GRUPO OLIGOASTENOTE- RATOZOOSPERMICO INFERTIL (N=10)
ESPERMATOGONIAS	0.319 ± 0.76	0.142 ± 0.17 <sup>N.S.</sup>
ESPERMATOCITOS PRIMARIOS	1.023 ± 1.42	0.321 ± 0.94 <sup>N.S.</sup>
ESPERMATOCITOS SECUNDARIOS	1.045 1.30	0.885 0.71 <sup>N.S.</sup>
ESPERMATIDES		
Sab	2.174 ± 2.62	2.292 ± 1.96 <sup>N.S.</sup>
Scd	1.725 ± 1.695	1.454 ± 1.57 <sup>N.S.</sup>
ESPERMATOZOIDES INMADUROS	0.788 ± 2.901	0.960 ± 2.11 <sup>N.S.</sup>
ESPERMATOZOIDES MADUROS	158.640 ± 111.67	29.790 ± 25.66 <sup>N</sup>

LOS VALORES REPRESENTAN EL PROMEDIO ± LA DESVIACION ESTANDAR DE LA CONCENTRACION DE CELULAS GERMINALES INMADURAS EN EL SEMEN DE DONADORES FERTILES Y PACIENTES INFERTILES MEDIANTE LA TECNICA DE TINCION DE PAPANICOLAOU. EL ANALISIS ESTADISTICO SE REALIZO MEDIANTE LA PRUEBA DE MANN-WHITNEY.

N P<0.0001 COMPARADO CON EL GRUPO EUSPERMICO FERTIL.

N.S. NO SIGNIFICATIVO

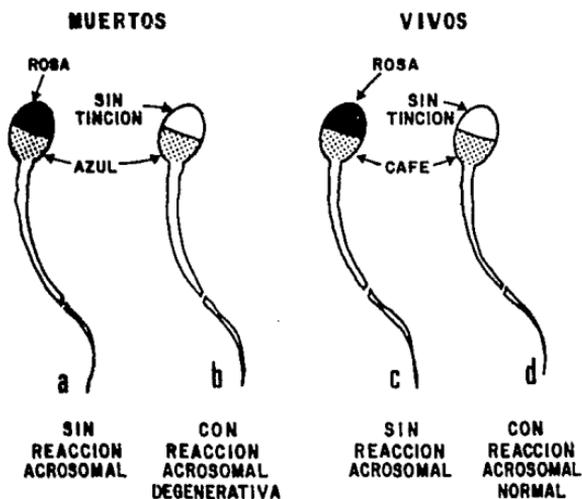
CUADRO VI: PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE CELULAS GERMINALES INMADURAS EN EL SEMEN HUMANO.

CATEGORIA (%)	GRUPO EUSPERMICO FERTIL (N=11)	GRUPO OLIGOASTENOTERATOZOOSPERMICO INFERTIL (N=10)
ESPERMATOZOIDES MADUROS	95.05 ± 66.88	77.03 ± 66.36 <sup>W</sup>
CELULAS GERMINALES INMADURAS	4.94 ± 3.7	22.96 ± 16.2 <sup>K</sup>

LOS VALORES REPRESENTAN EL PROMEDIO ± DESVIACION ESTANDAR DEL PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE ESPERMATOZOIDES MADUROS Y CELULAS GERMINALES INMADURAS PRESENTES EN EL SEMEN DE LOS INDIVIDUOS DE AMBOS GRUPOS DE ESTUDIO. LAS DIFERENCIAS ESTADISTICAS SE ANALIZARON CON LA PRUEBA DE MANN-WHITNEY.

\* P<0.0001 COMPARADO CON EL GRUPO EUSPERMICO.

Figura 3  
**ESPERMATOZOIDES**



REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LOS CUATRO PATRONES DE TINCION OBTENIDOS MEDIANTE LA TECNICA HISTOQUIMICA DE TRIPLE TINCION PARA ESPERMATOZOIDES HUMANOS: (a) ESPERMATOZOIDES MUERTOS CON ACROSOMA INTACTO (b) ESPERMATOZOIDES MUERTOS SIN ACROSOMA (REACCION ACROSOMAL DEGENERATIVA); (c) ESPERMATOZOIDES VIVOS CON ACROSOMA INTACTO Y (d) ESPERMATOZOIDES VIVOS SIN ACROSOMA (REACCION ACROSOMAL NORMAL).

CUADRO VII : PORCENTAJE DE VIABILIDAD ESPERMATICA

	GRUPO EUSPERMICO ( N=11 )	GRUPO OLIGOASTENOTE - RATOZOOSPERMICO (N=10)
VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES NO CAPACITADOS (Tiempo = 0 )	99.50 ± 88.7	62.05 ± 33.37*
VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS (Tiempo = 22 horas)	51.86 ± 6.4	31.67 ± 14.8*

LOS DATOS REPRESENTAN EL PROMEDIO ± LA DESVIACION ESTANDAR DEL PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES DE PACIENTES FERTILES E INFERTILES, ANTES Y DESPUES DE LA INCUBACION EN MEDIO CAPACITANTE. EL ANALISIS ESTADISTICO SE REALIZO MEDIANTE LA PRUEBA DE t DE STUDENT.

\* P < 0.01 AL COMPARARLO CON EL GRUPO EUSPERMICO.

CUADRO VIII : PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE REACCION  
ACROSOMAL DESPUES DE LA INDUCCION  
DEL PROCESO DE CAPACITACION IN VITRO

---

INCIDENCIA DE REACCION ACROSOMAL  
(%)

---

GRUPO EUSPERMICO  
FERTIL (N=11)

9.45 ± 2.02

GRUPO OLIGOASTENOTERATOZOOSPERMICO  
INFERTIL (N=10)

4.37 ± 2.53\*

---

CADA VALOR REPRESENTA EL PROMEDIO ± DESVIACION ESTANDAR  
DE 4 ± 1 DETERMINACIONES/INDIVIDUO MEDIANTE LA TECNICA MISTO-  
QUIMICA DE TRIPLE TINCION.

\* P<0.0001 CUANDO SE COMPARA CON EUSPERMICOS FERTILES ME-  
DIANTE EL ANALISIS ESTADISTICO DE MANN-WHITNEY.

CUADRO IX: EVALUACION DE LA CAPACIDAD FERTILIZANTE DEL GAMETO MASCULINO

	GRUPO EUSPERMICO		GRUPO OLIGOASTENOTERA- TOZOOSPERMICO	
	FERTIL	RANGO	INFERTIL	RANGO
	PROMEDIO $\pm$ D.S.	MIN.-MAX.	PROMEDIO $\pm$ D.S.	MIN.-MAX.
INDICE DE PENETRACION	1.53 $\pm$ 0.64	0.6-2.6	* 0.11 $\pm$ 0.1	0-0.33
PORCENTAJE DE PENETRACION	73.88 $\pm$ 13.41	45-90	* 10.42 $\pm$ 7.7	0-26.6
PORCENTAJE DE PENETRACION CALCULADA POR EL MODELO DE POISSON	74.49 $\pm$ 14.6	45-93	* 10.49 $\pm$ 8.30	0-28.1

D.S. DESVIACION ESTANDAR ; MIN. VALOR MINIMO ; MAX. VALOR MAXIMO.

LOS DATOS REPRESENTAN LAS CONDICIONES Y EL PROMEDIO DEL PORCENTAJE DE — PENETRACION DE LOS ESPERMATOSOIDES CAPACITADOS IN VITRO (t: 22 HORAS) INSEMINADOS CON OVOCITOS DE HAMSTER LIBRES DE LA ZONA PELLUCIDA. EL ANALISIS ESTADISTICO SE REALIZO MEDIANTE LAS PRUEBAS DE T DE STUDENT Y LA PRUEBA DE  $\chi^2$

\*  $P > 0.001$  COMPARADO CON EL GRUPO EUSPERMICO.

Figura 4 a

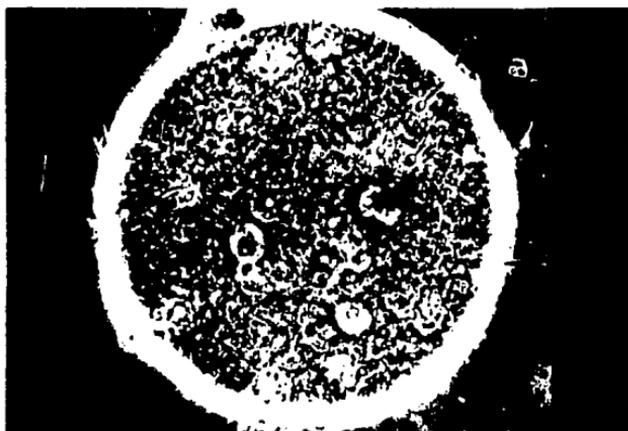


Figura 4 b

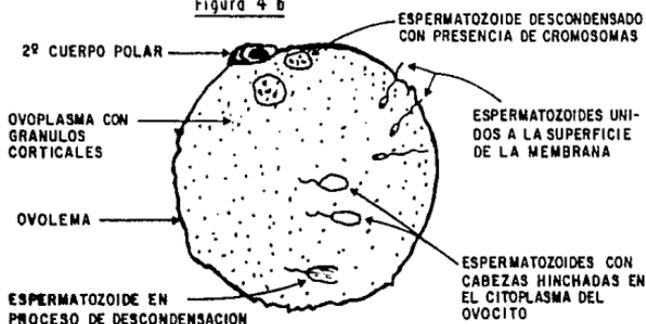


FIGURA 4 a; FOTOMICROGRAFIA EN CONTRASTE DE FASES DE UN OVOCITO DE HAMSTER LIBRE DE LA ZONA PELLUCIDA PENETRADO POR ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

FIGURA 4 b; REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA INTERACCION DE ESPERMATOZOIDES - OVOCITO DE HAMSTER LIBRE DE LA ZONA PELLUCIDA.

CUADRO X. CORRELACIONES ENTRE LA CAPACIDAD FERTILIZANTE CON LOS DIFERENTES PARAMETROS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DEL SEMEN HUMANO

PARAMETRO	GRUPO ESPERMICO FERTIL (N=11)		GRUPO OLIGOSPERMATOZOOSPERMICO INFERTIL (N=10)	
	COEFICIENTE DE CORRELACION	NIVEL DE SIGNIFICANCIA	COEFICIENTE DE CORRELACION	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
DENSIDAD ESPERMATICA (CELULAS $\times 10^6$ /ml)	0.189	N.S.	0.274	N.S.
CONCENTRACION TOTAL (CELULAS $\times 10^6$ /EYACULADO)	0.642	N.S.	0.642	N.S.
PORCENTAJE DE MOVILIDAD	0.490	N.S.	0.329	N.S.
VELOCIDAD PROMEDIO ( $\mu$ /s)	0.563	N.S.	0.966	P<0.005
INDICE DE MOVILIDAD	0.678	N.S.	0.815	N.S.
PORCENTAJE DE ANORMALIDADES	0.016	N.S.	-0.942	P<0.005
PORCENTAJES DE CELULAS GERMINALES	0.404	N.S.	-0.657	N.S.
CONCENTRACION DE ESPERMATOZOIDES MADUROS $\times 10^6$ /ml	-0.568	N.S.	0.7286	N.S.
PORCENTAJE DE REACCION ACROSOMAL	0.834	P<0.005	0.986	P<0.005

N. S. NO SIGNIFICATIVO

LOS DATOS REPRESENTAN LOS COEFICIENTES DE CORRELACION Y NIVELES DE SIGNIFICANCIA ENTRE LA CAPACIDAD FUNCIONAL DEL GAMETO MASCULINO PARA FERTILIZAR AL OVOCITO DE HAMSTER LIBRE DE LA ZONA PELLUCIDA, CON LOS DIFERENTES PARAMETROS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DEL SEMEN HUMANO. EL ANALISIS ESTADISTICO PARA EL CALCULO DE LOS COEFICIENTES DE CORRELACION FUE MEDIANTE LOS INTERVALOS DE SPEARMAN

## VI. DISCUSION

Se ha señalado que los espermatozoides estructural y funcionalmente íntegros son capaces de transportarse desde el fondo del saco vaginal hasta la región ampular de la trompa de Falopio, con la finalidad de fertilizar al ovocito homólogo (Aitken, 1982). Esta premisa ha permitido enfatizar la necesidad de establecer los parámetros de normalidad en el espermatozoide con el objeto de relacionar cuantitativamente las diferentes expresiones de funcionalidad del gameto masculino con su capacidad fertilizante.

En este estudio se examinó un grupo de pacientes infértiles con características de oligoastenoteratozoospermia y sus resultados fueron comparados con los determinados en un grupo de individuos euspérmicos fértiles, con la finalidad de establecer las principales alteraciones funcionales en los espermatozoides de este grupo de pacientes infértiles.

El primer indicio de la existencia de una alteración en el semen de individuos oligoastenoteratozoospérmicos infértiles, fue observado en la valoración de los parámetros convencionales del semen, señalando que existe un decremento en la densidad, concentración total, movilidad y morfología espermática normal, en relación con los parámetros analizados en los individuos euspérmicos fértiles (Cuadro I), lo que sugiere una alteración en el proceso de espermatogénesis (Dickerman y col., 1988).

Diferentes investigaciones han demostrado que no existe una relación directa entre las características

físicas del semen, obtenidas mediante la espermatobioscopía, con la fertilidad masculina y principalmente en el intervalo de densidad espermática entre  $5$  y  $60 \times 10^6$  células/ml (Smith y col., 1977; David, 1979; Chan, 1985; Dickerman, 1988). Por tal motivo, el análisis basado principalmente en la evaluación microscópica del semen ha sido utilizado exclusivamente en el diagnóstico y caracterización del tipo de infertilidad masculina y en la identificación de lesiones severas en la función reproductiva (WHO, 1987).

La movilidad espermática es considerada como uno de los parámetros importantes en la evaluación del semen humano debido a que participa de manera fundamental tanto en el transporte de los espermatozoides hacia el sitio de la fertilización, como durante este proceso (Bedford, 1983; Blasco, 1984).

En este estudio, al evaluar cuantitativamente la movilidad espermática en individuos euspermicos y oligoastoteratozoospermicos, se observó que la proporción de espermatozoides móviles fue de 45 y 28% respectivamente (Cuadro II). Estos valores determinados mediante la técnica fotográfica de exposición múltiple son menores que los determinados subjetivamente mediante la espermatobioscopía en estos mismos individuos, lo cual coincide con los estudios reportados por diversos grupos de investigadores que han utilizado esta técnica fotográfica para el análisis de la movilidad espermática en individuos fértiles e infértiles (Makler, 1978; Aitken, 1982, 1985) y permite señalar que la evaluación subjetiva de la movilidad tiende a sobreestimar la proporción de espermatozoides móviles en una muestra de semen.

El análisis objetivo de la movilidad espermática permitió determinar que en el grupo de individuos oligoastenoteratozoospermicos existe una disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles, en la velocidad promedio y consecuentemente en el índice de movilidad (Cuadro III). El grupo de Aitken realizó un detallado estudio de la movilidad espermática mediante la técnica fotográfica de exposición múltiple en pacientes con infertilidad inexplicable (1982b) y pacientes oligozoospermicos (1985b) reportando que en ambos grupos de pacientes infértiles existe una disminución en las características de movilidad en los espermatozoides de estos individuos.

Estos aspectos permiten señalar que probablemente las alteraciones en las características de la movilidad observadas en los espermatozoides de los individuos oligoastenoteratozoospermicos estén implicadas en su infertilidad. Estos factores reflejan una alteración idiopática del proceso de espermatogénesis que podrían estar asociados con una deficiencia en las modificaciones bioquímicas que ocurren en el espermatozoide durante la maduración epididimaria o la existencia de una inadecuada relación funcional entre el gameto masculino con la composición bioquímica del plasma seminal y/o los diferentes microambientes del tracto genital femenino (Reyes y col., 1984, 1987; Katz y col., 1989; Lindemann y Kanous, 1989).

Por otra parte, el análisis de los diferentes patrones de movilidad en ambos grupos de estudio, no presentó alguna diferencia significativa entre ambas poblaciones de espermatozoides móviles. Sin embargo, debido a que la población de espermatozoides móviles del grupo de individuos infértiles estudiados presentó una velocidad promedio

discreta (18 u/s), la exposición fotográfica de un segundo produjo principalmente trazos rectos muy pequeños, por lo que el análisis de los mismos no permitió definir adecuadamente el patrón de movilidad correspondiente. Estos aspectos permiten sugerir que para estudios posteriores mediante esta técnica fotográfica en entidades caracterizadas por un decremento en la movilidad de los espermatozoides, es conveniente aumentar el tiempo de exposición fotográfica.

La valoración de la morfología y presencia de células germinales en el semen mediante la tinción de Papanicolaou con un estricto criterio de clasificación, permite señalar que los individuos oligoastenoteratozoospermicos presentan una disminución en la proporción de células con morfología normal, al compararlos con el grupo de individuos fértiles (16 y 31%, respectivamente), así como un incremento en la concentración de células germinales en el semen (23%) en relación con los individuos fértiles (5%). Estas observaciones apoyan los resultados de Aitken (1982b) y Rogers (1983), quienes reportaron que en el semen de pacientes con infertilidad inexplicable y en el de pacientes con parámetros convencionales del semen anormales, existen altos porcentajes de formas espermáticas anormales al compararlos con el semen de donadores fértiles. Además se ha observado un decremento en la movilidad, viabilidad y presencia de espermatozoides con morfología normal cuando existe un aumento en la concentración de células germinales inmaduras (Dickerman y col., 1988).

Shalgai y col. (1985) reportaron que las principales anomalías presentes en los espermatozoides de individuos espermicos fértiles y teratozoospermicos correspondían a

cabeza amorfa, sin acrosoma, piriforme y alargada. En nuestro estudio se determinó también que la incidencia principal de anomalías morfológicas correspondían a las diferentes categorías de anomalías en la cabeza de los espermatozoides (Cuadro IV). Sin embargo, en el grupo de pacientes infértiles se observó un incremento significativo en el porcentaje de incidencia de espermatozoides con cabeza amorfa y pequeña (en la primera categoría se incluyó a los espermatozoides con acrosoma ausente), lo que permite señalar que en los individuos oligoastenoteratozoospermicos parece existir una alteración en la secuencia de los eventos citológicos involucrados en la formación de espermatozoides maduros a partir de las células precursoras (espermiogénesis).

La capacitación y reacción acrosomal son considerados prerequisites indispensables para una fertilización normal en los mamíferos (Tesarik, 1986); la reacción acrosomal involucra la fusión y subsecuente vesiculación de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa del espermatozoide y ocurre después de la capacitación in vivo (Bedford, 1983) o en condiciones in vitro (Chang, 1984). Esta secuencia de eventos permite la liberación de las enzimas presentes en el acrosoma y la interacción posterior de la membrana acrosomal interna con la membrana plasmática del ovocito.

En los espermatozoides de los grupos de individuos oligoastenoteratozoospermicos e individuos euspermicos fértiles, se evaluó la reacción acrosomal inducida por la capacitación in vitro de estas células, mediante la incubación durante 22 horas en medio BWB con 2.5 mM de calcio. Con el objeto de valorar si la reacción acrosomal

representó un cambio patológico o fisiológico en los espermatozoides de los individuos de ambos grupos de estudio, se determinó la viabilidad tanto en condiciones basales como al final de la incubación en medio capacitante, observándose un decremento significativo en este parámetro en los espermatozoides de los individuos oligoastenoteratozoospermicos. Además, el porcentaje de incidencia de reacción acrosomal en los individuos infértiles fue significativamente menor que el observado en los individuos euspermicos; todo esto permite sugerir que existe una alteración fisiológica en las expresiones finales del proceso de capacitación-reacción acrosomal en estas células espermáticas.

Por otra parte, se ha demostrado que la liberación de colesterol en la membrana plasmática está asociada a un incremento en la fluidez y permeabilidad iónica, principalmente para el calcio, provocando un aumento en la concentración del calcio intracelular requerido para la inducción de la reacción acrosomal (Ehrenwald y col., 1988). Sin embargo, se ha reportado que los espermatozoides de los individuos oligoastenozoospermicos presentan una concentración de fosfolípidos similar a la de los individuos normales, pero una concentración significativamente más alta de colesterol, dando una relación colesterol/fosfolípidos mayor, lo cual da una gran estabilidad a la estructura membranal (Rosado, 1988). Estos aspectos posiblemente interfieren en el proceso normal de la capacitación-reacción acrosomal y contribuyen en la infertilidad de estos pacientes.

Ahora bien, los resultados obtenidos en relación a la reacción acrosomal inducida por la capacitación in vitro en

los espermatozoides de individuos euspermicos, apoyan las observaciones reportadas por diferentes grupos de investigación de que solamente del 10 al 20% de los espermatozoides presentes en el eyaculado realizan reacción acrosomal (Talbot, 1982; Yang, 1988).

La capacidad fertilizante de los espermatozoides de los individuos de ambos grupos de estudio fue valorada mediante el bioensayo propuesto por Yanagimachi (1976), determinando la habilidad de los espermatozoides humanos para penetrar y descondensarse en los ovocitos de hamster libres de la zona pelucida. Se ha demostrado que este bioensayo puede diferenciar entre donadores fértiles y pacientes infértiles (Rogers y col., 1979; Aitken, 1982). En los últimos años se han realizado diferentes investigaciones para describir el uso clínico de este bioensayo en la evaluación de la infertilidad masculina (Yanagimachi, 1984), estableciéndose que los espermatozoides de individuos fértiles se caracterizan por tener una capacidad de penetración en los ovocitos de hamster libres de la zona pelucida más alta (>15%) que el porcentaje de penetración de los espermatozoides de pacientes infértiles (<10-15%).

El análisis de los resultados de la valoración de la capacidad fertilizante mediante el bioensayo con ovocitos de hamster, indica que los pacientes oligoastenoteratozoospermicos presentan índices bajos de polispermia y porcentajes de penetración menores al 15% (Cuadro IX). Estos resultados concuerdan con los registrados por el grupo de Rogers (1979) quien reportó porcentajes de penetración menores al 14% en individuos oligozoospermicos y teratozoospermicos, así como con los valores determinados por Aitken (1982b) en individuos con infertilidad inexplicable, con porcentajes de penetración menores al 10%.

Nuestros resultados de penetración de los ovocitos de hamster fueron validados por el modelo de distribución de Poisson (Aitken y Elton, 1984), que describe de una manera cuantitativa la interacción espermatozoide-ovocito durante la fertilización heteróloga in vitro. La frecuencia y distribución de las penetraciones por ovocito, así como la proporción de ovocitos penetrados y el grado de polispermia en nuestro estudio, presentaron una distribución de tipo Poisson.

Se han realizado diferentes estudios con el objeto de correlacionar los resultados obtenidos en la prueba de penetración de ovocitos de hamster, con la fertilización in vitro de gametos humanos (Yanagimachi, 1984; Kruger, 1988) y con la habilidad para predecir la probabilidad de éxito de embarazo en parejas con problemas de infertilidad masculina (Shy y col., 1988). Estos estudios indican que la evaluación de la capacidad fertilizante por la prueba de penetración de ovocitos de hamster libres de la zona pelucida tiene un alto valor predictivo para definir la fertilidad e infertilidad masculina y la interacción espermatozoide-ovocito humano en la fertilización in vitro. Por lo tanto, las diferencias observadas en la capacidad funcional entre los espermatozoides de individuos fértiles e infértiles, permiten definir que el grupo de individuos oligoastenoteratozoospermicos infértiles presenta defectos específicos en la inducción de proceso de capacitación-reacción acrosomal como se mencionó anteriormente, o bien en la fusión con la membrana plasmática del ovocito de hamster, responsable de la capacidad fertilizante del gameto masculino en estos individuos.

Por otra parte, se determinó si la disminución en la

capacidad fertilizante de los espermatozoides de individuos oligoastenoteratozoospermicos, se encuentra asociada con alguna alteración estructural y/o funcional en estas células. Las diferencias observadas entre los espermatozoides de individuos euspermicos en relación a la penetración de los ovocitos de hamster libres de la zona pelucida no se encontraron relacionadas con ningún parámetro convencional del análisis del semen. Estos resultados apoyan las observaciones de diferentes investigadores que reportaron que no existe correlación entre la capacidad fertilizante y los diferentes parámetros evaluados por espermatobioscopía (Zaugner-Guelman, 1981; Aitken, 1985; Chang, 1985).

En este estudio, la capacidad fertilizante de los espermatozoides del grupo de individuos fértiles tampoco presentó ninguna correlación con las diferentes características de movilidad determinadas mediante la técnica fotográfica; en contraste, este parámetro en los espermatozoides de los individuos infértiles presentó una correlación positiva con la velocidad promedio.

Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos por el grupo de Aitken (1982a), quienes determinaron en un detallado estudio de las características de movilidad evaluadas por la técnica fotográfica de exposición múltiple, que ninguna de ellas correlacionó con la capacidad fertilizante de los espermatozoides de individuos euspermicos, evaluada ésta mediante el bioensayo con ovocitos de hamster, excepto con una discreta población de espermatozoides que presentó una velocidad de 25  $\mu\text{m}$  y con una amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza menor de 10  $\mu\text{m}$ . Estos mismos investigadores al valorar la movilidad

de los espermatozoides de individuos con infertilidad inexplicable (Aitken y col., 1985a), reportaron que existe correlación entre las diferentes características de movilidad con la capacidad fertilizante de los espermatozoides de estos individuos. Sin embargo, aunque la presencia de alteraciones en la capacidad fertilizante de los espermatozoides de estos individuos fue correlacionada con ciertas características de la movilidad espermática, ninguna de estas asociaciones tiene un valor predictivo, debido a que ambas pruebas evalúan diferentes funciones fisiológicas de los espermatozoides en el proceso de la fertilización. Se sabe que el moco cervical representa una de las barreras biológicas que regulan el paso de los espermatozoides hacia el sitio de fertilización, de tal manera que la calidad de la movilidad espermática es un factor fundamental para determinar la habilidad del espermatozoide humano para transportarse hasta la región ampular, así como en la penetración de la zona pelucida (Urry, 1983). Por tal motivo, la combinación de la valoración de la movilidad y la capacidad fertilizante de los espermatozoides da una predicción más precisa de la fertilidad para estos grupos de pacientes. (Aitken, 1985b).

En este estudio se determinó que la capacidad fertilizante de los espermatozoides de individuos oligoasteno-teratozoospermicos presenta una correlación negativa con el porcentaje de anomalías morfológicas de los espermatozoides que principalmente corresponde a defectos en la cabeza. Observaciones semejantes fueron reportadas por el grupo de Shalgai (1985) en pacientes que presentaron teratozoospermia. Por otra parte, el porcentaje de espermatozoides con morfología normal presentó una baja correlación con la capacidad fertilizante en los individuos oligoasteno-

teratozoospermicos, en contraste, ninguna correlación con la morfología de los espermatozoides fue observada en el grupo de individuos euspermicos. Estos resultados apoyan las observaciones de los grupos de Aitken (1982); Shalgai (1985) y Rogers (1983), quienes reportaron que no existe alguna correlación de la morfología con la capacidad fertilizante de los espermatozoides de los individuos con fertilidad comprobada.

Por otra parte, el análisis de la morfología con un criterio estricto en nuestro grupo de individuos euspermicos fértiles, indica que menos del 40% de los espermatozoides de este grupo son morfológicamente normales. Además los resultados obtenidos en el grupo de pacientes infértiles nos permiten establecer que menos del 15% de espermatozoides con morfología normal presentes en el semen, se encuentran asociados con un decremento en la capacidad fertilizante de estas células para penetrar los ovocitos de hamster con valores menores al 10% de penetración.

Estas observaciones concuerdan con los resultados reportados por Krugger y col., (1986, 1988) quienes establecieron que pacientes con porcentajes menores del 14% de espermatozoides con morfología normal en el eyaculado, tienen alteraciones críticas en la tasa de fertilización in vitro, a diferencia de los pacientes con porcentajes de morfología normal mayores al 14%, quienes presentan un incremento en la probabilidad de éxito en este procedimiento.

La valoración de la inducción de la reacción acrosomal en los espermatozoides después de 22 horas de incubación en medio capacitante, permite señalar que en ambos grupos estu-

diados existe una correlación positiva de este parámetro con el porcentaje de penetración de las células espermáticas en los ovocitos de hamster. Estos resultados apoyan los reportes que indican que sólo los espermatozoides que han completado la reacción acrosomal son capaces de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Yanagimachi, 1984; Talbot y Chacón, 1982). Sin embargo, la presencia de espermatozoides con reacción acrosomal no es el único factor funcional en la interacción espermatozoide-ovocito, ya que muestras que presentan porcentajes de incidencia de reacción acrosomal semejantes, presentan variaciones en los porcentajes de penetración de estas mismas células (Yang, 1984).

Estos aspectos nos permiten sugerir el estudio de los diferentes mecanismos bioquímicos de control involucrados en la interacción espermatozoide-ovocito durante la fertilización, así como las alteraciones fisiológicas expresadas en la morfología, movilidad, la capacitación-reacción acrosomal y los eventos que determinan la penetración y la formación del pronúcleo masculino para su posterior singamia con el ovocito en individuos infértiles, para el mejor diagnóstico y por lo tanto el uso de la terapia adecuada para el reestablecimiento de la habilidad fertilizante de los espermatozoides de estos individuos.

## VII. CONCLUSIONES

El análisis realizado en este estudio nos permitió determinar que existe un decremento de la capacidad funcional en los espermatozoides de individuos oligoastenoteratozoospermicos para fertilizar el ovocito homólogo o heterólogo.

La evaluación de los parámetros convencionales del semen mediante la espermatobioscopia, nos indica que existe un decremento en la densidad, concentración total, movilidad y morfología espermática en el semen de individuos infértiles, expresando una alteración en el proceso de espermatogénesis.

La determinación cuantitativa de la movilidad espermática indica que en los espermatozoides de los individuos oligoastenoteratozoospermicos se presentaron alteraciones significativas en las características de movilidad que podrían estar implicadas en la infertilidad de los pacientes estudiados. Estas alteraciones en la movilidad permiten señalar una posible disfunción en el metabolismo y/o en el intercambio iónico necesario para el mantenimiento y activación de la movilidad.

En la valoración de la morfología y presencia de células germinales, se determinó que en el semen de individuos infértiles existe un incremento en el porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas (principalmente en la cabeza), así como en la concentración de células germinales inmaduras. Las alteraciones en estos parámetros evaluados permiten establecer la existencia de una

interferencia en la secuencia de los eventos citológicos involucrados en la formación de espermatozoides estructuralmente maduros (espermatogénesis y espermiogénesis) de los individuos oligastenoteratozoospermicos infértiles.

Por otra parte, se observó que los individuos euspermicos presentan bajos porcentajes de incidencia de espermatozoides con morfología normal como consecuencia de la existencia de una heterogeneidad morfológica en el semen humano.

La proporción de espermatozoides susceptibles a la inducción de la reacción acrosomal en sistemas de capacitación in vitro es discreta en los individuos euspermicos. El análisis del estado fisiológico de los espermatozoides de los individuos oligastenoteratozoospermicos en el proceso de capacitación-reacción acrosomal nos permite señalar una posible disfunción fisiológica subcelular y/o molecular que son expresados en el decremento de la viabilidad y porcentaje de incidencia de reacción acrosomal en los espermatozoides de estos individuos.

La valoración de la capacidad fertilizante de los espermatozoides de los individuos oligastenoteratozoospermicos, permite señalar que existe un decremento en la capacidad de penetración de estas células en los ovocitos de hamster libres de la zona pellucida.

Finalmente, debido a los resultados obtenidos en este estudio, se considera que es indispensable que en el análisis del semen se incluya la determinación cuantitativa de la movilidad, la reacción acrosomal del gameto masculino

inducida in vitro, así como la valoración de la capacidad fertilizante de estas células mediante sistemas de interacción in vitro con ovocitos heterólogos, con la finalidad de establecer tanto el diagnóstico, como el pronóstico más preciso para el varón infértil.

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

1. Aitken, R.J.; Best, F.S., Richardson, D.W.; Djahanbakch O; Lees, M.M. (1982a): The correlates of fertilizing capacity in normal fertile men. *Fertil. Steril.*, 38:68-76.
2. Aitken, R.J.; Best, F.S.; Richardson, D.W.; Djahanbakhch, O.; Mortimer, D.; Templeton, A.A.; Lees, M.M. (1982b): An analysis of sperm function in cases of unexplained infertility: Conventional criteria, movement characteristics, and fertilizing capacity. *Fertil. Steril.*, 38:212-221.
3. Aitken, R.J. and Elton, R.: Significance of Poisson distribution theory in analyzing the interaction between human spermatozoa and zona-free hamster oocytes. (1984): *Journal of Reproduction and Fertility*, 72:311-321.
4. Aitken, R.J.; Sutton, M.; Warner, P.; Richardson, D.W. (1985): Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. *J. Reprod Fert.*, 73:441-449.
5. Aitken, R.J. (1985B): Diagnostic value of the zona-free hamster oocyte penetration test and sperm movement characteristics in oligozoospermia. *International Journal of andrology*, 8:346-356.

6. Aitken, R.J. and Elton, R.A. (1986): Application of Poisson distribution theory to the zona-free hamster oocyte penetration test to assess sperm function of men with asthenozoospermia. *Journal of Reproduction and Fertility*, 77:67-74.
7. Aitken, R.J. (1988): Sperm-egg interaction. En A. Negro-Vilar, A. Isidori, J. Paulson, R. Abdelmassih and M.P.P. de Castro, Editors. *Andrology and Human Reproduction* New York, Raven Press, 1988: 51-62.
8. Austin, C.R. (1951): Observations on the penetration of sperm into the mammalian egg. *Austral. J. Sci-Res.*, 46:581-592.
9. Bedford, J.M. (1970): Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod., Suppl.* 2:128-158.
10. Bedford, J.M.; Moore, H.D.M.; Franklin, L.E. (1979): Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoa in eutherian mammals. *Experimental Cell Research*, 119:119-126.
11. Bedford, J.M. (1983): Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biology of Reproduction*, 28:108-120.
12. Biggers, J.D.; Whitten, W.K.; Whittingham, D.G. (1971): The culture of mouse embryos "in vitro". In: *Methods in Mamalian Embriology*, Daniel, J.C. (Ed.) Freeman and Co.; San Francisco, pp. 86-116.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

79.

13. Blasco, L. (1984): Clinical tests of sperm ability. *Fertility and Sterility*, 41:177-191.
14. Bleau, G.; Vandenheuevel, W.J.A.; Andersen, O.F.; Gwatkin, R.B.L. (1975): Demosteryl sulphate of hamster spermatozoa, a potent inhibitor of capacitation in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 43:175-179.
15. Bleil, J.D.; Wassarman, P.M. (1983): Sperm-egg interactions in the mouse sequence of events and induction of acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Developmental Biology*, 95:317-324.
16. Brown, C.R.; Andai, Z., Hartree, E.F. (1976): Studies on ram acrosin: Isolation from spermatozoa, activation by cations and organic solvents and influence of cations on it's reaction with inhibitors. *Biochem. J.*, 149:133-146.
17. Burkman, L.J.; Coddington, C.C.; Franken, D.F.; Kruger, T.F.; Rosenwaks, Z.; Hodgen, G.D. (1988): The hemizona assay (HZA): Development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertility and Sterility*, 49:688-697.
18. Chang, M.C. (1951): The fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the zallopian tubes. *Nature*, 168:697-698.
19. Chang, M.C. (1957): A detrimental effect of the seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature*, 179:258-259.

20. Chang, M.C. (1984): The meaning of sperm capacitation. *Journal of Andrology*, 5:45-50.
21. Chan, S.Y.W.; Fox, E.J.; Chan, M.M.; Tsoi, W.; Wang, C. Tang, L.C.; Tang, G.W.; Ho, P. (1985): The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routine semen analysis, and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay. *Fertility and Sterility*, 44:668-672.
22. Cherr, G.N.; Lamber, H.; Meizel, S.; Katz, D.F. (1986): In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: Completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zonae pellucidae. *Dev. Biol.*, 114:119-131.
23. Cohen, J.; Weber, R.F.A., Vander Vituer, J.C.M.; Zeil, Maker, G.H. (1982): In vitro fertilizing capacity of human spermatozoa with the use of zona-free hamster ova: Interassay variation and prognostic value. *Fertility and Sterility*, 37:565-572.
24. Comhaire, F.H.; de Kretser, D.; Farley, T.M.M.; Rowe, P.J. (eds). Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. World Health organization. *Int. J. Andrology*, 1987.
25. Cross, N.L.; Morales, P.; Overstreet, J.W., Hanson, P. W. (1988): Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida. *Biology of Reproduction*, 38:235-244.

26. Cummins, J.M.; Yanagimachi, R. (1986): Development of ability to penetrate the cumulus oophorus by hamster spermatozoa capacitated in vitro, in relation to the timing of the acrosome reaction. Gamete Research, 15:187-212.
27. David, G.; Jonannet, P.; Martin-Boyce, A.; Spira, A.; Schwartz, D. (1979): Sperm counts in fertile and infertile men. Fertility and Sterility, 31:453-455.
28. Davis, B.K. (1971): Macromolecular inhibitor of fertilization in rabbit seminal plasma. Proc. Natl. Acad. Sci., 68:951-955.
29. Delgado, N.M.; Huacuja, L.; Pancardo, R.M.; Merchant, H.; Rosado, A. (1976): Changes in the protein conformation of human spermatozoal membranes after treatment with cyclic adenosine 3'5'-monophosphate and human follicular fluid. Fertil. Steril., 27:413.
30. Dickerman, Z.; Sagi, M.; Segenreich, E.; Levinsky, H.; Singer, R. (1988): The evaluation of routine andrological parameters in human semen. Andrologia, 20: 492-501.
31. Dravland, J.E. and Mortimer, D. (1988): Role for fucose -sulfate rich carbohydrates in the penetration of zona pellucida-free hamster eggs by hamster spermatozoa. Gamete Research, 21:353-358.
32. Ehrenwald, E.; Parks, J.E.; Foote, R.H. (1988): Cholesterol efflux from bovine sperm. I. Induction of

the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. Gamete Research, 20:145-157.

33. Garbers, D.L.; Kopf, G.S. (1980); The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides. Adv Cyclic Nucleotide. Res., 13:251-255.
34. Garner, D.L.; Easton, M.P.; Mounson, M.E.; Doane, M.A. (1975): Immunofluorescent localization of bovine acrosin. J. Exp. Zool., 191:127-131.
35. Hicks, J.J.; Martinez-Manuatou, J.; Pedeon, N.; Rosado, A. (1972): Metabolic changes in human spermatozoa related to capacitation. Fertility and Sterility, 23:172-179.
36. Hernández-Perez, O.; Ballesteros, L.M.; Rosado, A. (1979): Binding of 17-B-Estradiol to the outer surface and nucleus of human spermatozoa. Arch. Androl., 3:23-28.
37. Hyne, R.V.; Garbers, D.L. (1979): Calcium-dependent increase in adenosine 3'5'-monophosphate and induction of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5699-5703.
38. Irvine, D.S.; Aitken, R.J. (1986): Measurements of intracellular calcium in human spermatozoa. Gamete Research, 15:57-71.
39. Katz, D.F.; Cherr, G.N.; Lambert, H. (1986): The evolution of hamster sperm motility during capacitation and a interaction with the ovum vestments in vitro. Gamete Research, 14:333-346.

40. Katz, D.F.; Drobnis, E.Z.; Overstreet, J.W. (1989): Factor regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. Gamete Research, 22:443-469.
41. Knuth, U.A.; Yeung, C., Nieschlag, E. (1987): Computerized semen analysis: objective measurement of semen characteristics is biased by subjective parameter setting. Fertility and Sterility, 48:118-124.
42. Koehler, J.K.; Gaddum-Rosee, P. (1975): Media induced alterations of the membrane associated particles of the guinea pig sperm tail. J. Ultrastruct. Res., 51:106-118.
43. Kruger, T.F.; Menkueld, R.; Stander, F.S.H.; Lombard, C.J.; Vander Merwe, J.P.; Van Zyl, J.A.; Smith, K. (1986): Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertility and Sterility, 46:1118-1123.
44. Kruger, T.F., Acosta, A.A.; Simmons, K.F.; Swanson, R. J.; Matla, J.F.; Oehninger, S. (1988): Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. Fertility and Sterility, 49:112-117.
45. Langlais, J.; Roberts, K.D. (1985): A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. Gamete Research, 12: 188-224.
46. Lindemann, C.B. and Kanous, K.S. (1989): Regulation of mammalian sperm motility. Archives of Andrology, 23:1-22.

47. Makler, A. (1978): A new multiple exposure photography method for objective human spermatozoal motility determination. *Fertility and Sterility*, 30:192-199.
48. Makler, A. (1978b): A new chamber for rapid sperm count and motility estimation. *Fertility and Sterility*, 30:313-318.
49. Means, A.R.; Tash, J.S.; Chafouleag, J.G. (1982): Physiological implications of the presence distribution and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. *Physiol. Rev.*, 62:1-25.
50. Meizel, S. (1978): The mammalian sperm acrosome reaction, a biochemical approach. In: *Development in mammals*. M. H. Johnson. Ed. North Holland Press: Elsevier Vol. 3:1-64.
51. Meizel, S. (1984): The importance of hidrolitic enzymes to an excitotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. *Biol. Rev.*, 59:125-157.
52. Mortimer, D.; Templeton, A.A. (1982): Sperm transport in the human female reproductive tract in relation to semen analysis characteristics and time of ovulation. *J. Reprod. Fert.*, 64:401-408.
53. Oliphant, G.; Brackett, B.G. (1973): Immunological assessment of surface changes of rabbit sperm under going capacitation. *Biol. Reprod.*, 9:404-414.
54. O'rand, M.G. and Fisher, S.J. (1987): Localization of

zona pellucida binding sites on rabbit spermatozoa and induction of the acrosome reaction by solubilized zonae. *Developmental Biology*, 119:551-559.

55. Reyes, A., Oliphant, G.; Brackett, B.G. (1975): Partial purification and identification of a reversible decapacitation factor from rabbit seminal plasma. *Fertil. Steril.* 26:148-157.
56. Reyes, A.; Goicochea, B.; Rosado, A. (1978): Calcium ion requirement for rabbit spermatozoal capacitation and enhancement of fertilizing ability by ionophore A23187 and cyclic adenosine 3'5'-monophosphate. *Fertil. Steril.*, 29:451-455.
57. Reyes, A.; Chavarría, M.E.; Rosado, A. (1980): Interference with spermatozoa capacitation. In: *Clinics in Andrology*. Vol. 5. Regulation of male fertility. Cunningham G.R., Schill, W.B., Hafez, E.S.E (eds). Martinus Nijhoff. Pub. B.V., The Hague. pp. 135-144.
58. Reyes, A.; Martínez, M.; Luna, M.; Chavarría, M.E.; Merino, G. (1984): Quantitative evaluation of the human spermatozoa motility and acrosome reaction in infertile oligozoospermic and fertile euspermic men. *Archives of andrology*, 12:187-194.
59. Reyes, A.; Chavarría, M.E. (1985): Interference with acrosome reaction of spermatozoa by tubulin and actin-like protein inhibitors in guinea pig. *Contracept. Deliv. Syst.*, Monograph II:256.

60. Reyes, A.; Martínez, R.; Luna, M.; Chavarría, M.E. (1987): Concentrations of calmodulin in sperm in relation to their motility in fertile euspermic and infertile asthenozoospermic men. *International Journal of Andrology*, 10:507-515.
61. Reyes, A.; Delgado, N.; Rosado, A. (1990): Algunos conceptos nuevos sobre el mecanismo terminal de la fertilización en los mamíferos. Artículo en revisión.
62. Reyes, R.; Carranco, A.; Hernández, O.; Rosado, A.; Merchant, H.; Delgado, N.M. (1984): Glycosaminoglycan sulfate as acrosome reaction-inducing factor of follicular fluid. *Arch. Androl.* 12:203-209.
63. Robertson, L.; Wolf, D.P.; Tash, J.S. (1988): Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: Identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biology of Reproduction*, 39:797-805.
64. Rodman, T.C.; Pruslin, F.H.; Hofman, H.P.; Allfrey, V.G. (1981): Turnover of basic chromosomal proteins in fertilized eggs: A cytoimmunochemical study of events in vivo. *J. Cell. Biol.*, 90:351-361.
65. Rogers, A.W.; Koehler, J.K.; Smith, W.D.; Karp, L.E. (1984): Entry of inmotile spermatozoa into zona-free hamster ova. *Gamete Research*, 10:319-325.
66. Rosado, A.; Huacuja, L.; Delgado, N.M.; Hicks, J.J.; Pancardo, R.M. (1975): Cyclic AMP receptors in the human spermatozoa membrane. *Life Science*, 17:1707-1710.

67. Rosado, A. (1988): Aspectos nuevos de viejas ideas sobre la capacitación y reacción acrosomal. Archivos de Investigación Médica, 19:253-264.
68. Russell, L.D.; Rogers, B.J. (1987): Improvement in the quality and fertilization potential of a human sperm population using the rise technique. Journal of Andrology, 8:25-33.
69. Sathananthan, A.H.; Trounson, A.O. (1985): The human pronuclear ovum: Fine structure of monospermic and polyspermic fertilization in vitro. Gamete Research, 12:385-398.
70. Sathananthan, A.H.; Edirisinghe, S.C.; Ratnam, S.S.; Wong, P.C. (1986a): Human sperm-egg interaction in vitro. Gamete Research, 15:317-326.
71. Sathananthan, A.H.; Chen, C. (1986b): Sperm-oocyte membrane fusion in the human during monospermic fertilization. Gamete Research, 15:177-186.
72. Shaigai, R.; Dor, J.; Rudak, E.; Lusky, A.; Goldman, B.; Mashiachi, S.; Nebel, L. (1985): Penetration of sperm from teratozoospermic men into zona-free hamster eggs. International Journal of Andrology, 8:285-294.
73. Shy, K.K.; Stenchever, M.A.; Muller, C.H. (1988): Sperm penetration assay and subsequent pregnancy: A prospective study of 74 infertile men. Obstetrics and Gynecology, 71:685-690.

74. Siitery, J.E.; Dandekar, P.; Meizel, S. (1988): Human sperm acrosome reaction-initiating activity associated with the human cumulus oophorus and mural granulosa cells. *The Journal of Experimental Zoology*, 246:71-80.
75. Smith, K.D.; Rodríguez-Rigau, L.J.; Steinberger, E. (1977): Relation between indices of semen analysis and pregnancy rate in infertile couples. *Fertility and Sterility*, 28:1314-1319.
76. Steinberger, E. (1978): The etiology and pathophysiology of testicular dysfunction in man. *Fertility and Sterility*, 29:491-492.
77. Talbot, P.; Chacón, R.S. (1981): A triple stain technique for evaluating normal acrosomal reactions of human sperm. *J. Exp. Zool.*, 215:201-209.
78. Talbot, P. Chacón, R.S. (1982): Ultrastructural observations on binding and membrane fusion between human sperm and zona pellucida free hamster oocytes. *Fertility and Sterility*, 37:240-248.
79. Tash, J.S.; Means, A.R. (1983): Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. *Biol. Reprod.*, 26:745-755.
80. Tesarik, J. (1985): Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 74:383-388.

81. Tesarik, J. (1986): From the cellular to the molecular dimension: The actual challenge for human Fertilization Research. *Gamete Research*, 13:47-89.
82. Thakkar, J.K.; East, J.; Franson, R.C. (1984): Modulation of phospholipase A<sub>2</sub> activity associated with human sperm membranes by divalent cations and calcium antagonists. *Biology of Reproduction*, 30:679-686.
83. Urry, L.R.; Carrell, D.T.; Hull, D.B.; Middleton, R.G.; Wittbank, M.C. (1983): Penetration of zona free hamster ova and bovine cervical mucus by fresh and frozen human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 39:690-694.
84. White, D.R. and Aitken, J. (1989): Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Research*, 2:163-177.
85. World Health Organization. The zona-free hamster oocyte penetration test and the diagnosis of male fertility. Aitken, R.H. (ed). *International Journal of Andrology*, Suppl. 6:1-199. (1986).
86. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge, 1987.
87. Wolf, D.P.; Boldt, J.; Bird, W.; Bechtol, K.B. (1985): Acrosomal status evaluation in human ejaculated sperm with monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.*, 32:1157-1162.

88. Yanagimachi, R. and Usui, N. (1974): Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Experimental Cell Zoology*, 89:161-174.
89. Yanagimachi, R.; Yanagimachi, H.; Rogers, B.J. (1976): The use of zona free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 15:471-476.
90. Yanagimachi, R. (1981): Mechanisms of fertilization in mammals. In: Mastroianni L. Jr. y Biggers, J.D., eds. *Fertilization and Embryonic Development in vitro*. New York, Plenum Press, 1981, pág. 81.
91. Yanagimachi, R. (1984): Zona-free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Research*, 10:187-232.
92. Yang, Y.S.; Rojas, F.J.; Stone, S.C. (1988): Acrosome reaction of human spermatozoa in zona free hamster egg penetration test. *Fertil. Steril.*, 50:954-959.
93. Zaugner-Guelman, B.; Blasco, L.; Wolf, D.P. (1981): Zona-free hamster eggs and human sperm penetration capacity: A comparative study of proven fertile donors and infertility patients. *Fertility and Sterility*, 36:771-777.
94. Zirkin, B.R.; Soucek, D.A.; Chang, T.S.K.; Perreault, S.D. (1985): In vitro and in vivo studies of mammalian sperm nuclear decondensation. *Gamete Research*, 11:349-365.

95. Zukerman, J.; Rodriguez-Rigau, L.J.; Smith, K.D.; Steinberger, E. (1977): Frequency distribution of sperm counts in fertile and infertile males. *Fertility and Sterility*, 28:1310-1313.