

00346 15

2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
División de Estudios de Posgrado

**"Descondensación de la Cromatina,  
Formación de Pronúcleos y Obtención  
de Cromosomas en Espermatozoides  
Humanos"**

**T E S I S**  
Que para obtener el grado Académico de  
**MAESTRA EN CIENCIAS**  
**(BIOLOGIA CELULAR)**  
p r e s e n t a  
**ANA CLAUDIA VELAZQUEZ WONG**



**Director de Tesis:**  
**DR. FABIO SALAMANCA GOMEZ**

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

La presente tesis se realizó en el laboratorio de Fisiología de la Reproducción del Instituto Nacional de Perinatología y en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría del C.M.N. Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. Fabio Salamanca Gómez.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A los Doctores Fabio Salamanca, Luis Felipe Jiménez, Rosario Rodríguez, Patricia Ramos, Diego Arenas, Virginia Palma, Sandra Gómez y Luz Elena Hernández, por sus invaluables sugerencias, que han enriquecido este trabajo de tesis.**

**Mi más sincero agradecimiento al Dr. Carlos Villanueva, Jefe del laboratorio de Fisiología de la Reproducción, del Instituto Nacional de Perinatología, por las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis, así como al personal de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del IMSS.**

**A mis padres y hermanos, por su apoyo incondicional, mi admiración, cariño y respeto.**

**A mi esposo Próspero, por su gran apoyo y comprensión, todo mi amor.**

**A mi hijito José David, que me motiva a superarme más cada día, esperando que a la vez esto sea un estímulo en su vida.**

**A mis maestros, por sus grandes enseñanzas.**

**A mis amigos, presentes y ausentes, por sus valiosos e importantes consejos.**

## **CONTENIDO**

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>2</b>
<b>Antecedentes.....</b>	<b>14</b>
<b>Fertilización.....</b>	<b>18</b>
<b>Historia y ética.....</b>	<b>20</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>Espermatobioscopia directa.....</b>	<b>24</b>
<b>Preparación del Medio BWW.....</b>	<b>28</b>
<b>Capacitación de los espermatozoides.....</b>	<b>28</b>
<b>Recuperación y manejo de ovocitos.....</b>	<b>29</b>
<b>Interacción de Gametos.....</b>	<b>30</b>
<b>Verificación de la fertilización.....</b>	<b>31</b>
<b>Cultivo de ovocitos fertilizados.....</b>	<b>32</b>
<b>Fijación y preparación de laminillas.....</b>	<b>32</b>
<b>Monitoreo y análisis microscópico.....</b>	<b>33</b>
<b>Tinción fluorescente y fotografía.....</b>	<b>33</b>

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
<b>Análisis de las muestras de semen.....</b>	<b>34</b>
<b>Resultados de la capacitación.....</b>	<b>38</b>
<b>Resultados de la fertilización heteróloga.....</b>	<b>40</b>
<b>Interacción de gametos.....</b>	<b>43</b>
<b>Descondensación de la cromatina.....</b>	<b>44</b>
<b>Gránulos corticales.....</b>	<b>49</b>
<b>Desarrollo de pronúcleos.....</b>	<b>50</b>
<b>Observación de complementos cromosómicos.....</b>	<b>50</b>
<b>DISCUSION.....</b>	<b>55</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>68</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>69</b>

## **RESUMEN**

Mediante la técnica de fertilización heteróloga de ovocitos de criceto o "hamster" dorado Mesocricetus auratus, libres de zona pelúcida, con espermatozoides humanos, se determinó el tiempo en que inicia la activación de la descondensación de la cromatina en el núcleo de los espermatozoides, la formación de pronúcleos, así como también se logró la obtención y observación de complementos cromosómicos.

Se evaluaron las características de las muestras de semen, se realizó la capacitación de los espermatozoides, las hembras de criceto fueron estimuladas para lograr la superovulación y recuperación de los ovocitos, se llevó a cabo la fertilización heteróloga y una vez que se dió la fusión de gametos, los núcleos de los espermatozoides fueron capaces de descondensarse, lo que se verificó al observar cabezas turgentes de los espermatozoides y/o la presencia de pronúcleos en el citoplasma del ovocito. Finalmente se pudieron observar algunos complementos cromosómicos aunque no con una buena morfología.

La aplicación de esta metodología hará posible en un futuro, el análisis directo de los cromosomas del espermatozoide humano para conocer la frecuencia y el tipo de alteraciones cromosómicas tanto en varones sanos como en expuestos a la acción de agentes mutagénicos, de esta manera será posible determinar la contribución paterna de aberraciones cromosómicas en productos abortados o descendencia con múltiples malformaciones, con lo que se podrá valorar el daño reproductor en el hombre y proporcionar el adecuado asesoramiento genético.

## INTRODUCCION

La frecuencia y tipo de anomalías cromosómicas en gametos humanos ha sido un tema de continuo interés e investigación. Sin embargo, hasta hace relativamente poco tiempo, no había sido posible analizar directamente la constitución cromosómica en los gametos humanos, debido a que los ovocitos son de difícil obtención y en los espermatozoides los cromosomas son visibles solamente después de la fertilización (Martin y Taylor, 1982; Martin et al. 1982).

Un importante hallazgo que hizo posible la obtención de cromosomas de espermatozoides humanos, fue el descubrimiento de dos propiedades notables de los ovocitos de criceto dorado M. auratus: la primera es que una vez eliminada la zona pelúcida, permiten la entrada de espermatozoides no sólo de roedores, sino de una amplia variedad de especies como murciélago, delfín, caballo y hombre. Después de fusionarse, estos espermatozoides son capaces de descondensarse dentro del citoplasma del ovocito. En segundo lugar y de gran importancia, es que los ovocitos de criceto permiten la descondensación de la cromatina del espermatozoide humano para obtener cromosomas mitóticos de la primera segmentación (Brandriff y Gordon, 1989; Yanagimachi, 1984). De esta forma los cromosomas pueden ser procesados de forma tal, que se les pueda realizar un cariotipo por técnicas citogenéticas convencionales (Benet et al. 1986). Esto implica que los eventos complejos que siguen a la incorporación del espermatozoide, que involucran la descondensación de la cromatina y la reconstitución de un estado transcripcional activo, son correctamente ejecutados en estas cruces híbridas.

Tomando ventaja de estos atributos, es importante estandarizar la metodología adecuada, para investigar posteriormente, la constitución cromosómica de espermatozoides humanos.

La frecuencia de anomalías cromosómicas en gametos humanos ha sido establecida por estudios en concepciones que sobreviven para producir un embarazo clínicamente reconocido.

Se ha calculado que aproximadamente el 0.5 % de los nacidos vivos presentan una constitución cromosómica anormal (Martin et al. 1982), pero esta cifra está representando sólo una pequeña proporción de las concepciones cromosómicamente anormales, ya que la frecuencia es mucho mayor en abortos espontáneos (Martin et al. 1982; Martin et al. 1987; Rudak et al. 1978).

Rosenbush y Sterzik (1991), han especulado que posiblemente hasta un 70% de todas las concepciones mueren para finales del primer trimestre de la gestación y los factores genéticos representan una de las principales razones para que exista esta alta frecuencia de falla reproductora humana.

Aproximadamente el 50% de los abortos espontáneos del primer trimestre de la gestación presenta una constitución cromosómica anormal (Boué y Boué, 1973; Boué et al. 1975; Hassold et al. 1980) principalmente aneuploidías, y la frecuencia decrece con la edad gestacional. Mikamo (1970) ha encontrado que el 75% de los embriones abortados antes de las 5 semanas de gestación tienen anomalías cromosómicas, en el grupo de 5 a 8 semanas la frecuencia es del 50% y en el grupo de 9 a 12 semanas es del 5%.

Utilizando esta información se ha estimado que el 50% de todas las concepciones tienen una anomalía cromosómica, los mismos autores han indicado que entre el 7% y 10% de las concepciones reconocidas son anormales cromosómicamente (Boué y Boué, 1973; Boué et al. 1975).

Un estudio realizado por P. Jacobs en 1971, con un planteamiento más conservador, calcula que un mínimo de 7% de las concepciones reconocidas son cromosómicamente anormales. Esta cifra no incluye a las pérdidas tempranas de embarazos no reconocidos que pueden tener una alta frecuencia de anomalías. Este amplio rango entre 7% y 50% marca la incertidumbre que existe en los datos. Jacobs (1971) también ha sugerido que

aproximadamente el 1% o 2% de las concepciones reconocidas, (o el 14% y 28% de las concepciones anormales), son causadas por un espermatozoide anormal cromosómicamente.

Los estudios realizados en embriones abortados espontáneamente indican que las anomalías cromosómicas son en su mayoría numéricas, más que estructurales; siendo como ya se mencionó anteriormente, las aneuploidías la causa más común de pérdida embrionaria en embarazos clínicamente reconocidos, con trisomías autosómicas en primer lugar (50 a 60%), seguidas de monosomías del X (15 a 25%) y por último poliploidías (20 a 25%). La mayor parte de las monosomías y trisomías surgen como resultado de la no disyunción durante las divisiones meióticas en el ovocito o en el espermatozoide (Rosenbush y Sterzik, 1991).

Es bien conocida la contribución del gameto femenino para dar lugar a alteraciones cromosómicas en fetos y recién nacidos, pues los ovocitos están sujetos a eventos de no disyunción y son la principal causa de aneuploidía en humanos. Los estudios cromosómicos en ovocitos que fallan en la fertilización in vitro han demostrado que aproximadamente 21.3% presenta aneuploidías y 0.25% anomalías estructurales (Ma et al. 1989). Los estudios citogenéticos en espermatozoides han revelado que éstos son un tipo celular que tiende a sufrir aberraciones estructurales de novo (Estop et al. 1991).

En varios estudios se ha calculado que aproximadamente el 7.5% de las células espermáticas son estructuralmente anormales en sus cromosomas (Brandriff et al. 1984; Kamiguchi y Mikamo, 1986; Martin y Taylor, 1982; Martin y Rademaker, 1987; Templado et al. 1988). También se ha sugerido que los rearrreglos estructurales de novo son una consecuencia directa de una alta frecuencia de lesiones estructurales durante la espermatogénesis (Estop et al. 1991).

La aneuploidía es uno de los daños genéticos más significativos en el hombre. Debido a que los embriones aneuploides se pierden en estados tempranos del embarazo, es

importante conocer la incidencia en gametos para que los productos aneuploides previos a la implantación no pasen desapercibidos (Guttenbach y Schmid, 1990).

Por otro lado, los trabajos sobre aneuploidias en gametos humanos están basados principalmente en estudios de espermatozoides ya que los ovocitos son difíciles de obtener en cantidad suficiente. Sin embargo algunos estudios han permitido conocer información sobre anomalías cromosómicas en ovocitos humanos (Rudak et al. 1984; Tarin et al. 1991).

Los análisis citogenéticos en espermatozoides humanos son importantes debido a que proporcionan datos directos sobre el daño cromosómico que se presenta en hombres sanos y también porque contribuyen a entender el significado de este daño (Estop et al. 1991).

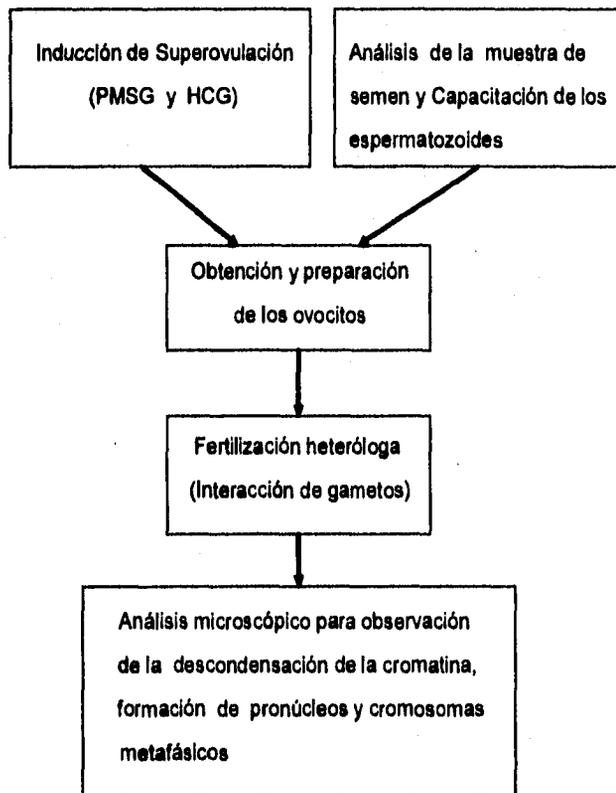
Existen algunos estudios sobre anomalías cromosómicas estructurales inducidas químicamente o por radiación en espermatozoides de hombres tratados con radio y/o quimioterapia, lo cual puede contribuir a un mejor entendimiento del origen celular de dichas anomalías, y por lo tanto también a la capacidad de discernir entre anomalías producidas durante, o después de la entrada del espermatozoide en el ovocito y aquellas inducidas en el proceso de la espermatogénesis (Genesca et al. 1990a y b).

Los ovocitos humanos serían indispensables para analizar cromosomas de gametos humanos de ambos sexos. Desafortunadamente, es extremadamente difícil obtener la cantidad de ovocitos necesaria para el propósito de hacer cariotipos de gametos humanos; esto hace que este tipo de estudios no sean factibles, pero los avances en biología del desarrollo y de la reproducción han desarrollado metodologías como la que se empleó en este protocolo para prever esos inconvenientes (Rudak et al. 1978; Yanagimachi et al. 1976).

Cuando los ovocitos de criceto dorado son liberados de la zona pelúcida y los espermatozoides son adecuadamente capacitados, esta fertilización *in vitro* interespecífica puede proceder a la descondensación de la cromatina del núcleo espermático, desarrollo de pronúcleos, división de primera segmentación a través del curso normal de la aparición de

pronúcleos, replicación de ADN, recondensación cromosómica, cariogamia, y formación del huso de la primera segmentación (Yanagimachi, 1984).

Rudak et al. (1978) realizaron el primer análisis directo de la constitución cromosómica de los espermatozoides humanos utilizando la técnica de fertilización heteróloga de ovocitos de criceto dorado M. auratus con espermatozoides humanos desarrollada por Yanagimachi et al. (1976), quienes comenzaron a utilizarla como una prueba de diagnóstico para la fertilidad masculina (Fig.1). Estos investigadores intentaron conocer la verdadera contribución de los gametos masculinos en la formación de individuos con anomalías cromosómicas y los factores que influyen en la producción y supervivencia de espermatozoides cromosómicamente anormales (Rudak et al. 1978).



**Fig. 1 Metodología para realizar la prueba de penetración espermática de ovocitos de criceto dorado.**

También se han llevado a cabo estos experimentos para valorar la incidencia espontánea de aberraciones cromosómicas en espermatozoides humanos (Brandriff et al. 1984; Brandriff et al. 1985a y b; Brandriff et al. 1988a y b; Martin et al. 1982; Martin et al. 1983a; Martin et al. 1983b; Martin et al. 1987), para analizar la constitución cromosómica de espermatozoides de varones heterocigotos para una translocación (Brandriff et al. 1986; Estop et al. 1995, Martin, 1988a; Martin, 1988b; Martin et al. 1990; Martin, 1992; Martin y Spriggs, 1995; Pellestor et al. 1989; Syme y Martin, 1992) y para inversiones pericéntricas (Martin, 1986). Posteriormente otros autores han perfeccionado esta metodología con óptimos resultados, logrando analizar una mayor cantidad de complementos cromosómicos en espermatozoides, obteniendo información sobre el tipo y la frecuencia de anomalías cromosómicas (Benet et al. 1986, Brandriff et al. 1984; Brandriff et al. 1985b; Chauduri y Yanagimachi, 1984; Martin y Taylor, 1982; Martin et al. 1982; Martin, 1983; Martin y Taylor, 1983; Martin et al. 1983a, Martin, 1988c; Martin et al. 1990a). En los últimos años, estos avances han permitido determinar la frecuencia de alteraciones cromosómicas en gametos humanos y obtener información para estudiar los mecanismos que llevan a la producción de anomalías cromosómicas y los factores que modifican su frecuencia.

La clave para el éxito de esta técnica es la fusión de las membranas plasmáticas de los gametos; es decir, el mecanismo por el cual el espermatozoide humano entra al citoplasma del ovocito de criceto dorado.

La fusión depende a la vez de la habilidad del espermatozoide para ser capacitado in vitro (Brandriff et al. 1985a y b). La capacitación que puede ser inducida bajo ciertas condiciones experimentales in vitro, consiste en una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos en el espermatozoide de mamífero al prepararse para la fertilización del ovocito y que en condiciones naturales ocurren en el tracto genital femenino (Yanagimachi, 1981; Yanagimachi, 1984). Los primeros cambios ocurren a nivel de la membrana plasmática, incluyendo la eliminación o alteración de sustancias incorporadas sobre o dentro de la membrana durante la maduración del espermatozoide en el epidídimo y bajo la exposición

de la secreción de las glándulas accesorias masculinas en la eyaculación, pero el cambio más aparente es el resultado de la reacción acrosómica, observándose mayor actividad en el espermatozoide (Yanagimachi, 1984).

Para una interacción exitosa con el gameto femenino, el espermatozoide humano requiere separarse del plasma seminal (Kline, 1991). Un signo indicador de que ha ocurrido la capacitación es el aumento en la movilidad del espermatozoide, donde el flagelo se mueve vigorosamente en forma de látigo (hiperactivación) (Yanagimachi et al. 1976; Yanagimachi, 1981).

Como una consecuencia de la activación del ovocito de mamífero por el espermatozoide fertilizante, la meiosis se reanuda, seguida de la extrusión del segundo cuerpo polar, extrusión de gránulos corticales y la formación del pronúcleo femenino. Una vez incorporado en el citoplasma del ovocito, el núcleo del espermatozoide se descondensa y finalmente forma el pronúcleo masculino (Longo y Kunkle, 1978; Yanagimachi, 1984). Los factores involucrados en promover la descondensación nuclear del espermatozoide y la aparición del pronúcleo no se conocen completamente. Sin embargo, la reducción de los grupos disulfuro en el núcleo del espermatozoide por el ovocito es requisito para que se den estos procesos (Kvist, 1980). Se ha determinado que el curso de estos eventos tempranos puede alterarse al modificar el contenido de enlaces disulfuro del núcleo del espermatozoide fertilizante; se ha comprobado que tanto la descondensación como la formación del pronúcleo masculino ocurren más rápido si el núcleo fertilizante contiene pocos o ningún enlace disulfuro (Naish et al. 1987). En algunos estudios sobre el tiempo de cambios químicos y morfológicos que el núcleo masculino lleva a cabo, se ha demostrado que los núcleos espermáticos sintetizan ADN después de que se transforman en pronúcleos (Brandriff y Gordon, 1989). Se conoce poco sobre el tiempo exacto de fertilización o la relación entre la edad y el estado morfológico de pronúcleos y su habilidad para incorporar precursores de ADN. Los núcleos inducidos para descondensarse in vitro mediante

tratamiento con agentes reductores de enlaces disulfuro, pueden ser capaces de servir como moldes de ADN cuando se les proporcionan precursores y polimerasas (Naish et al. 1987).

Con ayuda de la microscopía electrónica se pueden detectar componentes de la cola del espermatozoide en el citoplasma del ovocito. La desaparición o una abrupta reducción en el número de gránulos corticales de la corteza del ovocito es otra buena indicación de la penetración espermática (Maleszewski et al. 1995). En el ovocito de *M. auratus*, los gránulos corticales son lo suficientemente grandes para observarse con un objetivo de 100X.

Por otra parte, si no se observaran los núcleos turgentes del espermatozoide, sería muy difícil evaluar si los ovocitos han sido penetrados por espermatozoides (Yanagimachi, 1984).

Tesank y Kopecny (1989) describen detalladamente las actividades biológicas del desarrollo de pronúcleos humanos masculinos y Zalensky et al. (1993) han reportado otros hallazgos interesantes sobre la organización de la ultraestructura en los núcleos descondensados de espermatozoides humanos maduros.

Singer et al. (1985) han sugerido que la infertilidad humana puede resultar de anomalías durante las diferentes etapas en el proceso de gametogénesis, transporte de gametos, fertilización o desarrollo embrionario.

Otros estudios han sugerido que la naturaleza artificial de esta cruce heteróloga criceto-humano puede ser uno de los factores contribuyentes para la frecuencia y tipo de aberraciones estructurales, observándose especialmente rompimientos y fragmentos (Brandriff et al. 1988a y b).

Martin y Rademaker (1990) realizaron un trabajo sobre aneuploidía en espermatozoides humanos y encontraron que la hipohaploidía es más frecuente que la hiperhaploidía, especialmente en los cromosomas sexuales y en el cromosoma 9. La aneuploidía para los cromosomas sexuales es causada por error meiótico paterno más comúnmente que la aneuploidía para los autosomas. La aneuploidía se observa solamente en ciertos cromosomas en los recién nacidos. Las trisomías 13, 18 y 21 y la aneuploidía para

los cromosomas sexuales se observa regularmente, mientras que la aneuploidía en los otros cromosomas ocurre raramente. Esta aneuploidía selectiva puede ocurrir debido a que estos cromosomas son particularmente susceptibles a la no disyunción o porque la aneuploidía para otros cromosomas no es compatible con la vida (Martin y Rademaker, 1990, Hassold et al. 1995). Los grupos que sufren más frecuentemente la no disyunción son los D y G.

La trisomía 16 constituye la tercera parte (33%) de todas las trisomías en abortos espontáneos del primer trimestre de la gestación, por lo que es evidente que este cromosoma tiene una alta incidencia de no disyunción (Martin y Rademaker, 1990). La frecuencia de aneuploidía varía en los diferentes estados del desarrollo embriológico. La trisomía 1 nunca se ha encontrado en abortos espontáneos, pero recientemente se vió en el caso de un embrión de ocho células, lo que demuestra la viabilidad de esta trisomía en estados muy tempranos del desarrollo (Wall et al. 1987).

Es de interés determinar la incidencia de no disyunción para distintos cromosomas, ya que esta información dará importantes respuestas sobre este mecanismo en la formación y supervivencia de embriones cromosómicamente anormales. Si todos los cromosomas tienen la misma tasa de no disyunción, entonces el mecanismo que la origina podría ser el mismo para todos los cromosomas. Si existen cromosomas con una alta frecuencia de no disyunción, entonces sería conveniente considerar las características específicas de los cromosomas, tales como el tamaño pequeño o la presencia de heterocromatina o regiones del organizador nucleolar (NORs), para dilucidar algunos factores que influyen en la tasa de no disyunción. Se ha sugerido que todos los autosomas tienen la misma frecuencia de no disyunción en el varón, y que los cromosomas sexuales tienen una alta frecuencia de aneuploidía (Martin y Rademaker, 1990).

El cultivo de linfocitos ha identificado a portadores de translocaciones balanceadas como un grupo con alto riesgo de aborto habitual (Rosenbush y Sterzik, 1991). Sin embargo, algunos estudios en embriones abortados han indicado que las anomalías cromosómicas son en su mayoría numéricas, más que estructurales (Hassold et al. 1980).

Es importante señalar que el análisis de células somáticas no implica que no se presenten errores de novo durante la maduración de las células germinales. Por ejemplo las divisiones celulares continuas de la espermatogénesis y la exposición a clastógenos, son condiciones que podrían aumentar gradualmente la frecuencia de rompimientos cromosómicos en relación con la edad avanzada de los varones (Martin y Rademaker, 1987).

En el trabajo pionero descrito por Rudak et al. (1978) se encontró un 5% de aneuploidias en 60 espermatozoides de un varón sano. Por otro lado, Martin et al. (1982) encontraron 9.2% de anomalías cromosómicas, predominando las aneuploidias y los rompimientos cromosómicos.

Otro trabajo realizado por Martin (1984) mostró un 8.5% de anomalías cromosómicas, estando el 5.2% representado por alteraciones de tipo numérico. Se hallaron aneuploidias, rompimientos cromosómicos, fragmentos cromosómicos, deleciones y translocaciones recíprocas. Este estudio reporta una mayor frecuencia de anomalías cromosómicas en los gametos humanos que en los ovocitos de criceto, lo que quizá esté relacionado con los factores ambientales o genéticos.

Como se puede observar, la mayoría de los trabajos muestran una frecuencia de anomalías cromosómicas que varía desde 5% (Brandriff et al. 1985a) hasta 10.4% (Martin et al. 1987; Martin, 1990).

Un trabajo realizado por Benet et al. (1992) indica que la selección de espermatozoides móviles no implica selección cromosómica, pues se demostró que la frecuencia promedio de anomalías cromosómicas 10.9% y la proporción sexual (50.4% X y 49.6% Y) obtenidos en espermatozoides con alta movilidad no son significativamente diferentes de aquellos observados en espermatozoides no seleccionados: Brandriff et al. (1985a) 9.3% y 50.1% X y 49.9% Y y Martin et al. (1987) 10.3%, 53% X y 47%.

También se han reportado algunos trabajos donde se analizan complementos cromosómicos de varones sometidos a determinados tratamientos, que demuestran la

presencia de aberraciones cromosómicas. Por ejemplo, se han realizado estudios en pacientes con cáncer bajo tratamiento de quimio y/o de radioterapia, cuyos resultados demostraron una alta frecuencia de complementos aberrantes, en su mayoría de tipo estructural. Sin embargo, el bajo número de muestras no responde en forma definitiva si los mutágenos químicos pueden aumentar la frecuencia (Jenderny y Röhrborn, 1987; Martin et al. 1986). Pero en un trabajo de Genesca et al. (1992) se indica que el daño de los espermatozoides humanos producido por los efectos de la cafeína, ocasiona un aumento en las aberraciones cromosómicas y cromatídicas, pero que a su vez puede ser reparado en el citoplasma del ovocito de criceto mediante mecanismos de pre y post-replicación.

## ANTECEDENTES

Las técnicas de bandas cromosómicas han permitido la descripción de numerosos cuadros clínicos ocasionados por alteraciones numéricas y estructurales en los cromosomas autosómicos, así como en los gonosomas. Por la alta frecuencia y por las importantes repercusiones familiares y sociales que representan, es de gran importancia conocer su etiología. Algunos de los factores más relevantes para que se presenten anomalías cromosómicas son la edad materna, la edad paterna, la fertilización retardada, polimorfismos moleculares, autoinmunidad, disminución o bloqueo de los genes para ARNr, virus, variación estacional y acción de agentes mutagénicos, entre otros (Salamanca, 1990). Para analizar los cromosomas en el hombre se realiza un cariotipo, cuya metodología fue descrita por Moorhead (1960) y que consiste en extraer sangre periférica para hacer un cultivo de linfocitos, estimulándolos mediante el empleo de fitohemaglutinina. Más adelante se desarrollaron las técnicas de bandas cromosómicas, que permiten identificar a cada uno de los cromosomas individualmente por sus características morfológicas y estructurales (Dutrillaux y Lejeune, 1971; Caspersson et al. 1970).

Con la metodología desarrollada por Rudak et al. (1978) es posible analizar las características funcionales del semen, los tiempos de descondensación de la cromatina y formación de pronúcleos en el espermatozoide humano y la constitución cromosómica de los gametos humanos; también se puede aplicar al estudio sobre mecanismos causantes de anomalías cromosómicas, a investigaciones sobre el efecto de diversos agentes que pudieran ser mutagénicos y a la estimación de la frecuencia y tipo de anomalías cromosómicas en el espermatozoide humano (Martin et al. 1983a y b).

La cromatina del espermatozoide maduro de mamífero se encuentra empaquetada en una partícula paracristalina, genéticamente inactiva de organización única estructural y molecular. Esta partícula se caracteriza por la presencia de proteínas básicas específicas del espermatozoide, las protaminas, que reemplazan a las histonas somáticas (Brandriff et al. 1991; Kvist, 1980). Después de la entrada al citoplasma del ovocito y siguiendo a la fusión de gametos, el núcleo espermático se descondensa en un pronúcleo haploide, que

permanece separado del pronúcleo haploide derivado de la hembra y posteriormente lleva a cabo una serie de cambios bioquímicos y estructurales como parte de su reactivación genética en la preparación para la formación del genoma embrionario diploide (Kvist, 1980). Durante la profase de la primera división mitótica, el genoma paterno es reempaquetado en cromosomas mitóticos condensados y se une con el complemento cromosómico materno en la primera placa metafásica (Yanagimachi, 1984). Fig. 2.

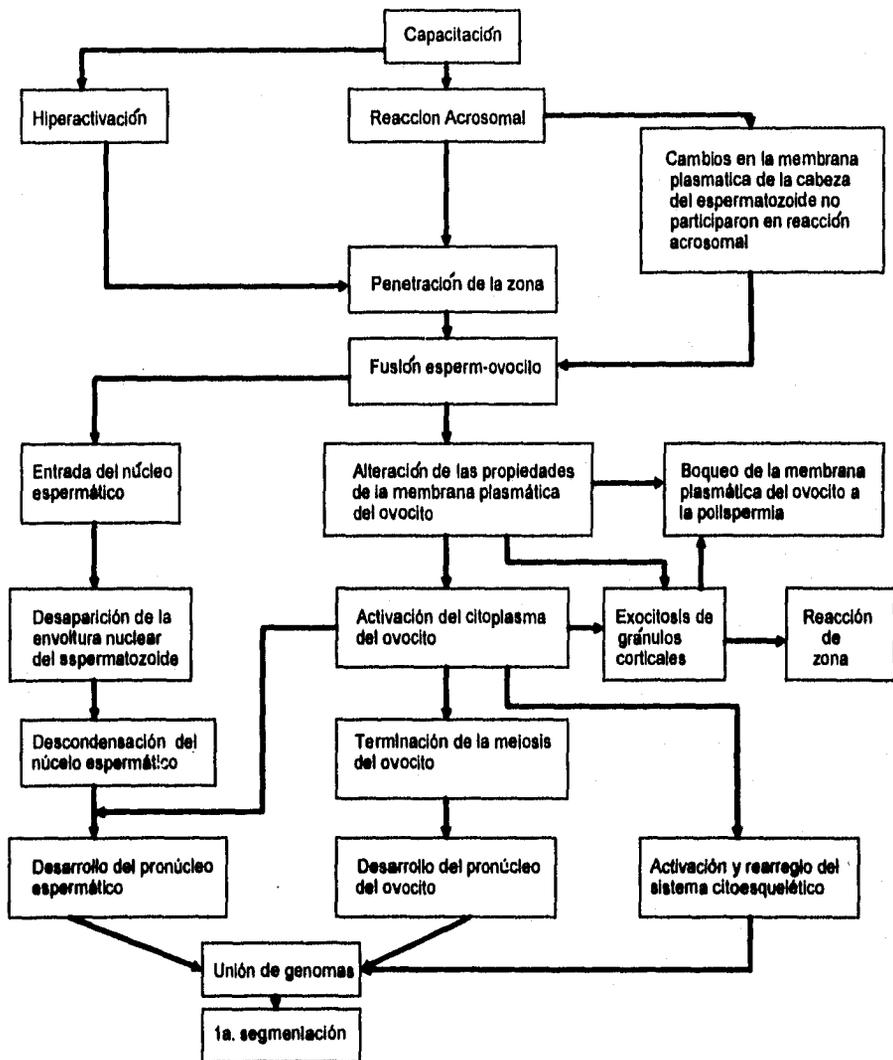


Fig. 2. Principales procesos y mecanismos de la fertilización normal en mamíferos y su posible relación.

Durante la transformación de espermatida a espermatozoide (espermatogénesis) se desarrollan el acrosoma, la hélice mitocondrial, el cuello, la cola y la cromatina nuclear se condensa. El estado final de la condensación de la cromatina es debido aparentemente, al reemplazo de las histonas de tipo somático por una histona básica específica del espermatozoide a la cual el ADN de la espermatida se une firmemente. La razón de este intercambio de histonas parece deberse a que las histonas básicas neutralizan efectivamente las fuerzas repulsivas electrostáticas en la molécula de ADN, y favorecen la condensación del material genético. Además de tener un alto contenido de arginina básica, las histonas del espermatozoide (en los mamíferos placentarios) son extremadamente ricas en grupos tioles, conteniendo cisteína. Entre los cambios morfológicos y estructurales que se presentan en el espermatozoide durante el proceso de maduración epididimaria están: la pérdida de la gota citoplásmica y una estabilización de la cromatina nuclear condensada por la formación de puentes disulfuro (S-S) entre los tioles (SH-) que contienen residuos de cisteína de las protaminas del espermatozoide (Kvist, 1980).

Durante la fertilización, conforme el núcleo comienza a penetrar el ovoplasma maduro, existe una rápida desintegración de la membrana nuclear simultánea con la descondensación de la cromatina nuclear fibrilar. Para que ocurra la fertilización es esencial la apropiada descondensación de la cromatina y la subsecuente formación de pronúcleos (Kamiguchi y Mikamo, 1986).

## FERTILIZACION

Tan pronto como la cabeza del espermatozoide es incorporada en el citoplasma del ovocito, su envoltura nuclear se desintegra y comienza la descondensación de la cromatina, lo que se verifica al observar la presencia de cabezas turgentes de los espermatozoides en el citoplasma de los ovocitos. La adecuada descondensación de la cromatina nuclear y la subsecuente formación de pronúcleos que ocurren en este estado, son esenciales para la fertilización (Brandriff et al. 1988a y b; Brandriff y Gordon, 1989). Durante la descondensación fisiológica de la cromatina, las fibras cromosómicas se empiezan a desenvolver lo cual hace posible la duplicación del ADN y el posterior arreglo de las fibras en cromosomas metafásicos en la placa ecuatorial del primer huso mitótico (Kvist, 1980; Longo y Kunkle, 1978; Longo y Yanagimachi, 1993). La cromatina nuclear condensada en los espermatozoides de los euterios, está estabilizada por enlaces S-S entre las unidades de protaminas. Para que se dé la descondensación de la cromatina y la subsecuente separación de los cromosomas, se requiere el rompimiento de los puentes S-S. Se ha postulado que el ovocito proporciona factores específicos (grupos tioles libres) que inducen la descondensación de la cromatina mediante un rompimiento reductor de los puentes disulfuro S-S de la cromatina nuclear cuando el espermatozoide ha perdido su membrana nuclear y se encuentra en el citoplasma del ovocito (Kvist, 1980; Yanagimachi et al. 1976). Sin embargo, no siempre ocurre una apropiada descondensación de la cromatina ni la formación de pronúcleos. Por lo tanto, en los ovocitos penetrados por más de un espermatozoide (polispermia) algunos pueden llevar a cabo la descondensación de la cromatina mientras que otros permanecen esencialmente intactos (Kvist, 1980).

En este proceso, se da una serie de eventos complejos que siguen a la incorporación del espermatozoide, incluyendo la descondensación de la cromatina y la reconstitución de un estado transcripcional activo. Por lo tanto en la cruce heteróloga entre ovocitos de criceto dorado y espermatozoides humanos, el citoplasma del ovocito y la cromatina del

espermatozoide deben estar programados de tal modo que puedan interactuar en una secuencia ordenada.

Los estudios realizados por Brandriff et al. han permitido determinar en qué estado del desarrollo pronuclear ocurre la síntesis de ADN, basándose en el tamaño del pronúcleo masculino, así como en el estado de descondensación (Brandriff et al. 1988a y b). Sin embargo, no se conocen los mecanismos implicados en este proceso (Brandriff y Gordon, 1989).

## HISTORIA Y ETICA

En 1976 Yanagimachi et al. reportaron que el espermatozoide humano penetra ovocitos de M. auratus libres de zona pelúcida después de haber llevado a cabo la capacitación y la reacción acrosómica, que son dos pasos importantes en la fertilización de los ovocitos en los mamíferos. Por lo tanto los ovocitos de criceto dorado se pueden usar como sustitutos de ovocitos humanos para valorar la capacidad fertilizante del espermatozoide humano. En esta fertilización heteróloga se desarrollan los pronúcleos y posteriormente aparecen los cromosomas del ovocito y del espermatozoide; el ovocito puede alcanzar el estado de dos células (Yanagimachi y Chang, 1964; Yanagimachi et al. 1976), pero nunca se desarrolla in vitro más allá de este estado. Aún cuando los ovocitos llegaran a un desarrollo posterior, el híbrido no llegaría a término debido a las enormes diferencias entre el genoma del roedor y el genoma humano. La utilización de ovocitos de animales para investigación básica y diagnóstico clínico, como en el caso de este protocolo, resulta justificada, ya que pretende evaluar la función y aspectos genéticos del espermatozoide humano para beneficio del hombre (Yanagimachi et al. 1976).

A este bioensayo que inicialmente se desarrolló para conocer la capacidad fertilizante del espermatozoide humano usando ovocitos de criceto libres de zona pelúcida, se le ha referido de diversas maneras: 1) ensayo de penetración del ovocito de hamster o criceto, 2) prueba o ensayo de ovocitos de criceto libres de zona pelúcida, 3) ensayo de penetración de ovocito, 4) ensayo o prueba de penetración del espermatozoide, o 5) prueba de Hamster (humano-hamster) (Yanagimachi, 1984).

Para realizar esta técnica es indispensable la eliminación de la zona pelúcida del ovocito de criceto aplicando una digestión enzimática, para evitar que haya especificidad a la reproducción (Yanagimachi et al. 1976). Asimismo es necesaria la capacitación in vitro de los espermatozoides humanos, proceso que en condiciones naturales es inducido por las secreciones del tracto genital femenino y que incluye alteración en la composición lipídica y de glicoproteínas de la membrana plasmática del espermatozoide, provocando así un aumento en la actividad metabólica y movilidad del mismo (Reyes et al. 1980).

### JUSTIFICACION

Actualmente no existe en nuestro medio la metodología adecuada para el estudio de la descondensación de la cromatina, formación de pronúcleos y obtención y observación de cromosomas en el espermatozoide humano. El desarrollo y estandarización de la prueba de penetración espermática con ovocitos de criceto dorado permitirá posteriormente, investigar la frecuencia y el tipo de alteraciones cromosómicas en los espermatozoides humanos. El análisis directo de los cromosomas en los gametos masculinos humanos facilitará en gran medida determinar la contribución paterna en las anomalías cromosómicas de sus descendientes, así como también permitirá valorar el daño reproductor en varones expuestos a la acción de agentes genotóxicos ambientales. Con estos datos se podrán establecer valores de referencia en nuestra población para conocer el efecto cromosómico a nivel de gametos de distintos agentes o sustancias que puedan ser mutagénicos.

También podrán investigarse los factores relacionados con el impacto de la no disyunción y con la segregación de translocaciones balanceadas en el hombre.

### **OBJETIVO GENERAL**

Aplicar la prueba de penetración de espermatozoides humanos en ovocitos de criceto dorado Mesocricetus auratus para la obtención y observación de cromosomas metafásicos.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Analizar las características estructurales y funcionales de cada una de las 50 muestras de semen humano mediante una espermatobioscopia directa
2. Realizar la capacitación in vitro de los espermatozoides humanos.
3. Efectuar la fertilización heteróloga con ovocitos de criceto dorado M. auratus y espermatozoides humanos.
4. Determinar el tiempo en que se lleva a cabo la descondensación de los núcleos espermáticos, así como la formación de pronúcleos.
5. Cuantificar el número de pronúcleos espermáticos y el grado de descondensación de la cromatina.
6. Obtener cromosomas metafásicos a partir de los ovocitos fertilizados.
7. Determinar si existen anomalías cromosómicas en los gametos humanos mediante el análisis microscópico de complementos cromosómicos.

## **MATERIAL Y METODOS**

1. Se seleccionaron para el estudio hombres donadores voluntarios en edad reproductora sin historia alguna de radio o quimioterapia, a quienes se les realizó una espermato-bioscopia espermato-bioscopia directa (EBD).
2. A los individuos se les proporcionó un cuestionario que debieron contestar para conocer su sitio de trabajo, vivienda, antecedentes de enfermedades genéticas, hábitos alimenticios, antecedentes de tabaquismo, alcoholismo, adicción a alguna sustancia o fármaco, etc.
3. Se averiguó también si habían engendrado o no un embarazo (fertilidad comprobada y no comprobada) y las características clínicas de la descendencia.

Cada uno de los donadores voluntarios participantes proporcionó una muestra de semen y se le realizó una EBD para valorar los parámetros y compararlos con los criterios establecidos por el Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano (1987).

Se obtuvo la muestra después de tres días de abstinencia sexual en una habitación cercana al laboratorio con la privacidad necesaria. Si esto no era posible, se hacía llegar la muestra dentro de la primera hora después de su obtención. Las muestras de semen se obtuvieron por masturbación en un recipiente limpio y estéril, de boca ancha, de vidrio o plástico, mantenido a una temperatura de 20°C a 37°C y se procesó tan pronto como ocurrió la licuefacción.

### ESPERMATOBIOSCOPIA DIRECTA (EBD)

Se observó la apariencia de la muestra (color, homogeneidad y licuefacción) 30 minutos después de su obtención. Se determinó el volumen de la muestra en mililitros y se analizaron la consistencia y la viscosidad. Se midió el pH. Se realizó la valoración microscópica de la muestra, que consistió en determinar en una pequeña proporción de la misma el porcentaje de la movilidad, si era o no progresiva, la viabilidad, la concentración espermática, la cuenta total, morfología y presencia de células germinales, epiteliales y/o leucocitos. En seguida se describe la forma en que se analizaron cada uno de los parámetros andrológicos evaluados:

**MOVILIDAD:** Se colocó una gota de semen sobre un portaobjetos y se estimó el porcentaje de espermatozoides móviles y la eficiencia con la cual éstos se movían. La movilidad puede ser "excelente o buena" si los espermatozoides se mueven rápida y linealmente, "escasa o moderada" si el desplazamiento es lineal lento o no lineal, y "no progresiva" si no existe movimiento. Se analizaron cuando menos 100 células.

**VIABILIDAD:** Se determinó utilizando la técnica de tinción supravital con el colorante azul de tripano. Se contaron 100 espermatozoides, diferenciando las células vivas (sin teñir) de las muertas (teñidas), se utilizó el azul de tripano al 2% (0.02 g de azul de tripano/ml de BWW).

**CONCENTRACION ESPERMATICA:** Se agregaron 0.02 ml de la muestra de semen licuado a 0.38 ml del diluyente para el conteo de los espermatozoides (5 g de  $\text{NaHCO}_3$  y 1 ml de formamida al 35% en 100 ml de  $\text{NaCl}$  0.9%); es decir, la dilución de la muestra fué de 1:20. La cuenta se realizó con ayuda de un hemocitómetro o cámara de Neubauer (Brigh Line, American Optical) colocando una gota de la muestra directamente o con pipeta para células blancas, y se contaron 5 de los 25 cuadrantes en la rejilla del hemocitómetro. La cantidad de espermatozoides contados de esta manera es igual al número de millones de

espermatozoides por mililitro de la muestra de semen original. Se reportó como número de células/ml (concentración espermática) y como número de células/eyaculado (cuenta total).

**CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS ESPERMATOZOIDES:** Se analizaron mediante preparaciones fijas de la muestra de semen, las cuales se tiñeron utilizando el método de Papanicolaou modificado para espermatozoides.

**PRESENCIA DE CELULAS GERMINALES, EPITELIALES Y/O LEUCOCITOS:** Se evaluó también en semen fresco, al igual que la movilidad; en el caso de los leucocitos se contaron observando con objetivo 40X, el promedio del número de leucocitos/campo. El conteo de las células germinales y epiteliales se hizo en preparaciones teñidas con la técnica de Papanicolaou. Se contaron cuando menos de 400 a 500 células para diferenciar cada tipo celular.

Una vez realizada la espermatozoscopia en la muestra de semen, se captaron los espermatozoides para proceder con la fertilización in vitro de los ovocitos de criceto dorado **M. auratus**.

## PREPARACION DEL MEDIO BWW

El medio utilizado para la preparación de las muestras de semen, lavado y capacitación de los espermatozoides, y preparación de los ovocitos fue una solución Krebs-Ringer modificada por Biggers, Whitten y Whittingham (Biggers et al. 1971) para experimentos frescos. Para la elaboración del medio BWW completo se requirió previamente de una solución madre de sales 10X y de otra 1X. Para preparar la primera se disolvieron los siguientes componentes en un volumen total de un litro de agua destilada:

NaCl	55.40 g
KCl	3.56 g
CaCl <sub>2</sub>	1.89 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.62 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.94 g

Esta solución se puede almacenar a 4°C por un periodo de tiempo indefinido.

La solución madre 1X se preparó combinando los siguientes componentes y agregando agua destilada a un volumen total de un litro (se puede mantener a 4°C por un periodo de dos semanas):

solución madre de sales 10X	100 ml
Solución de piruvato de sodio (0.28 g de piruvato en 10 ml agua)	1.0 ml
D-Glucosa	1.0 g
Solución madre de antibióticos (penicilina G, 10 UI/ml y sulfato de estreptomicina, 50 mg/ml)	1.0 ml
Rojo fendi (0.5%) (0.5 g en 100 ml)	0.5 ml
Hepes libre de ácido (2M) Sigma	9.5 ml
Hepes (2M en 3M NaOH)	10.5 ml

La solución de trabajo BWW completa se preparaba diariamente adicionando 0.2016 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 0.37 ml de ácido láctico (DL-V, Sigma) y 0.5 g de albúmina sérica humana (Sigma) a 100 ml de la solución madre BWW 1X. Esta mezcla se filtraba a través de una membrana de acetato de celulosa (de poro  $0.22 \mu$ ) esterilizada, y el pH se ajustó a 7.4 o 7.5 con un pequeño volumen de (aprox. 0.1 ml) de ácido o hepes básico.

El medio utilizado para el cultivo de los ovocitos fué Ham F-10 (Flow Laboratories) elaborado diariamente suplementado con 15% de suero fetal bovino (Flow Laboratories) inactivado al calor  $56^\circ\text{C}$  durante una hora), 100 UI de penicilina G/ml y 50  $\mu\text{g}$  de sulfato de estreptomicina/ml. El pH de la solución se ajustó a 7.2 con HCl 1N.

## CAPACITACION DE LOS ESPERMATOZOIDES

Para realizar la capacitación de los espermatozoides, la muestra fue procesada de la siguiente forma: una vez que ocurrió la licuefacción, la muestra de semen fue diluida a 10 ml con BWV en un tubo cónico de centrifuga de 15 ml y se centrifugó a 600 g durante 6 minutos. El sobrenadante era decantado y el botón se resuspendía en 10 ml de BWV. Éste se centrifugaba dos o más veces para remover fluidos seminales y sedimentos que pudieran inhibir la capacitación; y por lo tanto la penetración al ovocito. El botón final se resuspendió en un volumen final de 1 ml y se midió nuevamente la cuenta espermática. La concentración de espermatozoides se ajustó a  $10 \times 10^6$  esperm/ml. Empleando una pipeta Eppendorf, se colocaron gotas de 100  $\mu$ l en cada uno de los cuatro pozos de cultivo de tejidos (Falcon, 60 X 15 mm) y se cubrieron con aceite de parafina (Fisher, O-121). Finalmente estas preparaciones se incubaron a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad durante 4 a 6 horas para efectuar la capacitación antes de la coincubación con los ovocitos.

### Evaluación de la capacitación

Una vez transcurrido el tiempo de capacitación, se realizaba un frotis en fresco de la muestra de espermatozoides para evaluar el porcentaje de la movilidad y el tipo de movimiento que tenían las células. También se valoró nuevamente la viabilidad con azul de tripano.

## RECUPERACION Y MANEJO DE OVOCITOS (SUPEROVULACION)

Se utilizaron hembras de criceto dorado M. auratus de 6 a 8 semanas de edad (4 para cada experimento, 100-250 ovocitos); se mantuvieron 4 en cada jaula a 23°C con un fotoperíodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los cricetos se consiguieron una semana antes del experimento para ajustarlos a dichas condiciones y cuando se utilizaron tenían entre 2 y 6 meses de edad.

Dos mañanas previas al día del experimento se indujo la superovulación de los cricetos con una inyección intraperitoneal de 25 a 30 UI de PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin, Sigma G-4877) para inducir la maduración folicular, seguida a las 17 horas de otra inyección intraperitoneal de 25 a 30 UI de HCG (Human Chorionic Gonadotrophin, Serono) para provocar la ruptura de los folículos (ovulación). La masa del cumulus que contenía a los ovocitos se encontraba en el oviducto 15 a 17 horas después de la inyección de HCG; cada hembra proporcionó de 40 a 60 ovocitos. Las hembras se sacrificaron por dislocación cervical. Se disecaron el útero con los oviductos y los ovarios. Se separó la porción distal del útero junto con el oviducto y el ovario de cada lado y se colocaron en una caja de Petri con 3 ml de medio.

## INTERACCION DE GAMETOS (FERTILIZACION HETEROLOGA)

Aproximadamente una hora antes de la disección, se llenaron cuatro vidrios de reloj con 3 ml de BWW cada uno; otros dos se llenaron con 1.5 ml de BWW y 2 más se llenaron con 3 ml de F-10. Asimismo se preparó un tubo con hialuronidasa (Tipo I-S, Sigma) 1.5 ml de una solución 2 mg/ml en BWW, y otro tubo con tripsina (Tipo XII, Sigma) 3 ml de 1 mg/ml en BWW. La solución de colcemida (Gibco, 10 µg/ml) se agregó al medio F-10 en una concentración de 4 µg/ml. Utilizando una pipeta Eppendorf se colocaron gotas de 50 µl de F-10 en los pozos de cultivo de tejidos (Falcon, 60 X 15 mm) y se cubrieron con aceite de parafina. Todas las preparaciones se mantuvieron a 37°C hasta el momento de usarlas.

A la hora del experimento, aproximadamente 17 horas después de la inyección de la HCG, las cuatro hembras de criceto se anestesiaron con éter y se sacrificaron mediante dislocación cervical. Los oviductos de cada grupo fueron removidos a uno de los vidrios de reloj preparados con 3 ml de BWW. Para que el tiempo desde la disección hasta la coincubación de espermatozoides con ovocitos fuera entre 30 y 45 minutos, se disecaban rutinariamente 4 hembras de criceto. Los siguientes procedimientos se llevaron a cabo con la ayuda de un microscopio de disección equipado con un filtro de luz roja. Se utilizaron luces de baja luminosidad para manipular los ovocitos, ya que las longitudes de onda corta de los bulbos fluorescentes pueden impedir que la meiosis llegue a término o que los pronúcleos se formen (Rogers et al. 1979; Yanagimachi, 1981). Los oviductos fueron transferidos a otro vidrio de reloj preparado con 3 ml de BWW para lavar el exceso de sangre y después se colocaron en vidrios de reloj con 1.5 ml de BWW, donde el oviducto fue puncionado para recuperar la masa del cumulus. A ésta se le agregó la solución de hialuronidasa preparada en el tubo (concentración final 1 mg/ml), con lo cual se produjo la dispersión de células del cumulus en unos cuantos minutos, liberando así a los ovocitos. Utilizando una micropipeta con punta muy delgada, unida a un tubo de látex y una boquilla para succionar, los ovocitos eran inmediatamente lavados tres veces en una placa de 9 pozos precalentada a 37°C para

remover las células del cumulus. Posteriormente los ovocitos fueron transferidos a otro pozo en la misma placa que contenía la solución de tripsina preparada, la cual disolvió la zona pelúcida. Los ovocitos se lavaron otras tres veces después de que el primer cuerpo polar se había separado, lo que indicaba que la zona pelúcida había sido completamente disuelta por la tripsina. Si los ovocitos son removidos de la tripsina antes de que el cuerpo polar quede libre, se puede impedir la fertilización. Después, los ovocitos se colocaron en las gotas con los espermatozoides capacitados y se coincubaron a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad durante un periodo de 6 horas.

#### VERIFICACION DE LA FERTILIZACION

Para determinar el tiempo más apropiado para transferir los ovocitos con los espermatozoides al medio F10, se realizaron observaciones de la fertilización. El tiempo de observaciones depende de los parámetros de los espermatozoides: un vigoroso movimiento en una muestra con 50% de motilidad, se verifica para ver si hubo fertilización desde los 15 minutos de coincubación; mientras que una muestra inactiva o con muy baja motilidad no lo requiere hasta después de una hora o más de coincubación.

Las laminillas utilizadas para la verificación de la fertilización se prepararon con cuatro pequeñas gotitas de vaselina fría (4°C), que se colocaron sobre la laminilla de manera que las cuatro esquinas de un cubreobjetos de 22 mm descansaran sobre ellas.

Los ovocitos se lavaron en grupos de 5 a 10 sobre un vidrio de reloj preparado con F10 y luego se transfirieron en una gota de medio (aprox. 5 a 8 mm de diámetro) al centro del portaobjetos preparado. El cubreobjetos se colocó sobre las gotitas de vaselina y los ovocitos fueron comprimidos presionando ligeramente hasta que pudieron ser observados claramente con el microscopio de contraste de fases a un aumento de 100X. Las cabezas hinchadas de los espermatozoides, que indican la fertilización, aparecen como una área redonda clara con una cola, la cual es mucho más grande que en los espermatozoides que

aún no han penetrado el ovocito. Los espermatozoides adheridos parecen tener la mitad de la cabeza, que se encuentra distal a la cola dispada en el citoplasma del ovocito. Los espermatozoides que se veían completos aparecían frecuentemente nadando y estaban en muy estrecha proximidad con el ovocito y no se encontraban unidos.

#### CULTIVO DE OVOCITOS FERTILIZADOS

El medio utilizado para el cultivo de los ovocitos fertilizados fue el Ham F-10 (Flow Laboratories) inactivado con calor (56°C durante una hora), 100 UI de penicilina G/ml y 50 µg de sulfato de estreptomina/ml. El pH de la solución se ajustó a 7.2 con HCl 1N.

Cuando se determinó que sí existían cabezas turgentes (que indican fertilización) en el 50% de los ovocitos o cuando existían 2 ó 3 espermatozoides unidos por ovocito, o después de un máximo de 6 h de coincubación, los ovocitos se lavaron en vidrios de reloj preparados con F10 y se pasaron a gotas de F10, distribuyéndolos regularmente a través de las gotas. Luego los ovocitos se incubaron a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad por 7 h, durante este tiempo se agregaron 50 µl de colcemida (4 µg/ml) a cada gota de F10 y los ovocitos se incubaron toda la noche (15 h) en la solución de colcemida.

#### FIJACION Y PREPARACION DE LAMINILLAS

Después de 14 horas de cultivo, los ovocitos se colocaron en solución salina isotónica de citrato de sodio al 0.1% con 3 mg/ml de albúmina sérica bovina durante 2.5 minutos, luego se colocaron en una laminilla (5 ovocitos/laminilla) y se agregaron de 4 a 6 gotas de solución fijadora Carnoy (metanol:ácido acético 3:1) a una distancia de 4 a 6 cm; las gotas se pusieron una a la vez mientras el ovocito era comprimido y antes de que se secase

completamente. Las preparaciones se secaban agitándolas suavemente (Tarkowski, 1966). Las laminillas se colocaron en una placa caliente para aumentar la dispersión cromosómica.

**MONITOREO. ANALISIS MICROSCOPICO DE METAFASES Y CROMOSOMAS**

Después de la fijación, las laminillas se examinaron utilizando un microscopio de contraste de fases Carl Zeiss para localizar la dispersión de los cromosomas, los cuales se señalaban en las laminillas con círculos con un lápiz con punta de diamante. Este señalamiento reduce el tiempo en que los cromosomas son expuestos a luz ultravioleta la cual tiende a desvanecer y decolorar a los cromosomas cuando son fotografiados con el microscopio fluorescente.

#### **TINCION FLUORESCENTE Y FOTOGRAFIA**

Después de dos semanas, las preparaciones se tiñeron con dihidrocloruro de quinacrina al 0.5% (pH 4.4 a 4.5), seguido de tres enjuagues con agua destilada (pH 4.4 a 4.5) durante un total de 10 minutos. Las laminillas se montaron en agua destilada (pH 4.4 - 4.5) y luego de ser examinadas se fotografiaron con una cámara Kodak Tech Pan acoplada a un microscopio fluorescente Zeiss equipado con una lámpara de mercurio DC.

Cuando no se observaban los cromosomas después de la tinción con quinacrina, otra parte de los ovocitos fertilizados se tiñeron con DAPI (4, 6-diamidino, 2-fenilindol) a 0.1 µg/µl y se montaron con medio de fluorescencia (Polysciences). Las muestras se observaron con un microscopio de epifluorescencia equipado con el filtro para este fluorocromo (C.Zeiss).

## **RESULTADOS**

### **ANALISIS DE LAS MUESTRAS DE SEMEN (ESPERMATOBIOSCOPIA)**

Se analizaron 50 muestras de semen de 13 varones sanos en edad reproductora (edad promedio 29 años), 9 con fertilidad comprobada y 4 con fertilidad no comprobada. Los donadores eran hombres sin historia alguna de radio o quimioterapia residentes en el Distrito Federal. Los datos de los diferentes parámetros andrológicos evaluados (volumen, apariencia física de la muestra, morfología, movilidad y concentración) se compararon con los criterios establecidos como normales por el Manual de la OMS para el examen del semen humano que se muestran en la tabla 1. Como puede observarse en la tabla 2, todos los donadores que participaron en el estudio, presentaron perfiles normales del semen; esto implica que entre los varones con fertilidad comprobada y no comprobada no existen diferencias significativas. Los resultados obtenidos de las muestras de semen estudiadas se muestran en la tabla 3 y representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar. La licuefacción se presentó en todos los casos entre 25 y 40 minutos después de obtenida la muestra. El volumen fue en promedio de 2.3 ml, la movilidad espermática de 72%, la viabilidad de 89%, la concentración de  $121 \times 10^6$ , la cuenta total fue de 253 millones de espermatozoides/ayacuación y la morfología normal fue de 65%.

**TABLA 1**

VALORES NORMALES DE LAS VARIABLES DEL SEMEN MANUAL DE LA OMS 1987	
<b>VOLUMEN</b>	<b>2 ml o más</b>
<b>MOVILIDAD</b>	<b>50% o más</b>
<b>CONCENTRACION ESPERMATICA</b>	<b>50% vivos</b>
<b>CUENTA TOTAL</b>	<b>20 mill / ml</b>
<b>MORFOLOGIA NORMAL</b>	<b>40 mill / eyaculación</b>
<b>LEUCOCITOS</b>	<b>0 - 1 / campo</b>

**TABLA 2**

RESULTADOS PROMEDIO DEL ANALISIS DEL SEMEN DE 13 VARONES Y FERTILIDAD COMPROBADA O NO COMPROBADA						
PACIENTE	VOLUMEN (ml)	MOVILIDAD (%)	VIABILIDAD (%)	CONCENTRACION (mill/ml)	CUENTA (mill/eyac)	FERTILIDAD
1	1.7	69	82	103	173	FC
2	2.4	70	89	73	192	FC
3	2.5	68	89	101	244	FC
4	2.4	72	86	120	274	FC
5	2.8	68	92	140	355	FC
6	2.0	70	92	138	274	FC
7	2.2	75	93	124	203	FC
8	2.5	62	91	77	178	FC
9	2.4	72	91	194	358	FC
10	2.4	76	92	119	210	FNC
11	2.0	78	90	114	230	FNC
12	3.2	74	89	88	273	FNC
13	1.6	77	85	194	278	FNC

FC = Fertilidad comprobada

FNC = Fertilidad No Comprobada

**TABLA 3**

RESULTADOS DEL ANALISIS DEL SEMEN DE 13 VARONES		
<b>PARAMETROS</b>	<b>PROMEDIO ± SD</b>	<b>RANGO</b>
VOLUMEN	2.3 ± 0.76	0.9 - 4.0
LICUEFACCION	completa	completa
MOVILIDAD (%)	72 ± 8.28	53 - 86
MOVILIDAD PROGRESIVA	buena	buena a excelente
VIABILIDAD (%)	89 ± 5.38	78 - 98
CONCENTRACION ESPERMATICA ( mill / ml )	121 ± 59.82	40 - 333
CUENTA TOTAL (mill / eyaculación)	253 ± 89.29	36 - 408
MORFOLOGIA NORMAL (%)	65 ± 6.3	47 - 72
LEUCOCITOS / campo	1 - 3	0 - 3

## RESULTADOS DE LA CAPACITACION

Después de realizar la capacitación de los espermatozoides, se analizaron nuevamente los parámetros de las muestras de semen, especialmente aquellos que son de vital importancia para realizar la fertilización, como son el porcentaje y tipo de movilidad, la viabilidad y la concentración (Hail, 1981).

En relación a la viabilidad se observó disminución en el porcentaje de células después de la capacitación (64%); en cuanto a la movilidad también se observó una baja en el número de células móviles (42%), sin embargo, éstas se volvieron más rápidas en su movimiento, es decir se notó una hiperactivación en los movimientos de los espermatozoides (movilidad de progresiva a excelente). La concentración espermática igualmente se vió disminuída, pues antes de la capacitación se tenía una concentración de  $121 \times 10^6$  y después descendió a  $78 \times 10^6$ . En la tabla 4 se muestran los resultados de los valores promedio de los parámetros analizados después de la capacitación.

**TABLA 4**

**RESULTADOS DE LOS PARAMETROS DEL SEMEN ANALIZADOS  
DESPUES DE LA CAPACITACION**

<b>MOVILIDAD</b>	<b>42 %</b>
<b>TIPO DE MOVILIDAD</b>	<b>Progresiva a Excelente</b>
<b>VIABILIDAD</b>	<b>64 %</b>
<b>CONCENTRACION ESPERMATICA</b>	<b>78 mill / ml</b>

---

## RESULTADOS DE LA FERTILIZACION HETEROLOGA

### OBTENCION DE OVOCITOS

La estimulación hormonal de las hembras de criceto dorado para la obtención de ovocitos fue satisfactoria, pues se lograron en promedio 65 ovocitos por cada hembra con 30 UI de PMSG y 30 UI de HCG. El rango de ovocitos/hembra varió de 25 a 96. Para cada muestra de semen se emplearon 4 hembras de criceto; es decir aproximadamente 250 ovocitos por experimento.

Es importante señalar que de los ovocitos recuperados solamente se incubaron en promedio 70 ovocitos por cada muestra de espermatozoides, ya que después de la serie de lavados éstos no se recuperaron en su totalidad.

En la figura 3 se evidencian algunos ovocitos de criceto dorado con zona pelúcida a) ovocito de criceto dorado en contraste de fases a 10X ; b) ovocito a 40X y c) ovocito a 100X. En la figura 4 se observa un ovocito libre de zona pelúcida (100X).

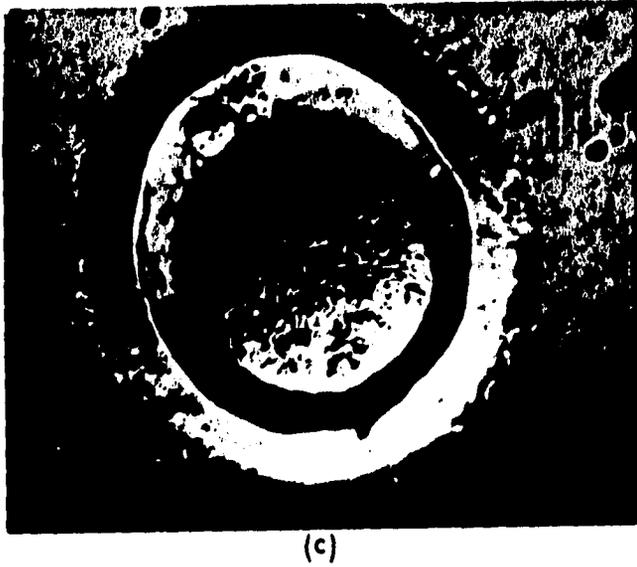
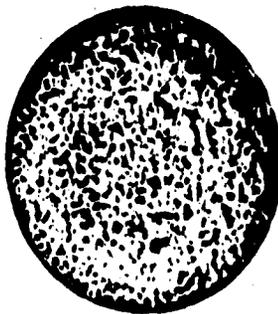


Figura 3. Ovocitos de criceto dorado no fertilizados, con presencia de zona pelúcida. En a) se observa un ovocito con un aumento de 10X, en b) 40X y en c) 100X.



**Figura 4. Ovocito de criceto dorado no fertilizado, libre de zona pelúcida, (100x).**

### INTERACCION DE GAMETOS

Durante la coincubación de los gametos se fueron monitoreando los ovocitos para observar la presencia de cabezas turgentes en su citoplasma. Durante las 6 horas que duró la coincubación se realizaron observaciones de las preparaciones desde los 15 minutos y después cada 30 minutos, esto con la finalidad de conocer el tiempo preciso en que comienza la descondensación de la cromatina y la formación de pronúcleos y así lograr la obtención y observación de complementos cromosómicos.

En la figura 5 se observa un ovocito de criceto dorado y un espermatozoide humano durante la coincubación.

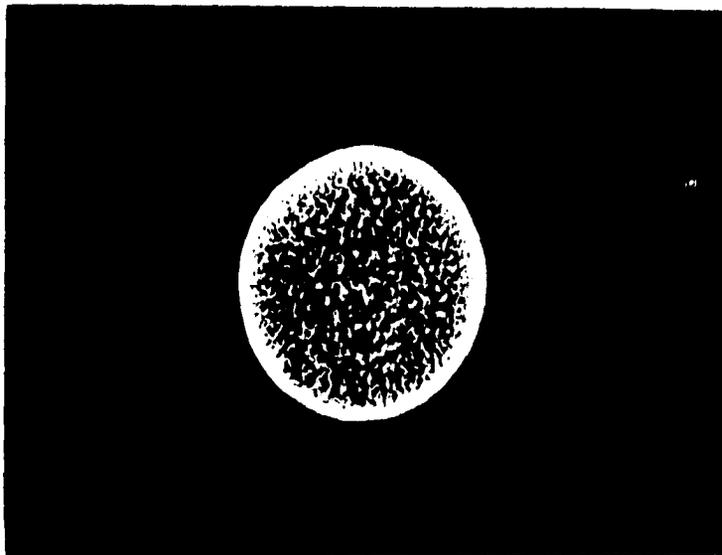


Figura 5. Ovocito de criceto dorado sin zona pelúcida durante la coincubación, cerca del mismo se observa un espermatozoide humano ( 100X ).

### DESCONDENSACION DE LA CROMATINA

Después de la fusión de gametos comenzó la descondensación de la cromatina en el citoplasma del ovocito, lo que se verificó al observar la presencia de cabezas turgentes de los espermatozoides o de pronúcleos espermáticos.

En la figura 6 se muestran dos ovocitos, en uno de ellos se estaba iniciando la extrusión del segundo cuerpo polar y en el otro ya se observa más prominente; en la figura 7 se muestra con más detalle un ovocito con extrusión del segundo cuerpo polar.

La evaluación de las propiedades funcionales de los espermatozoides capacitados in vitro mediante este bioensayo, indicó que en promedio penetraron a más del 30% de los ovocitos obtenidos.

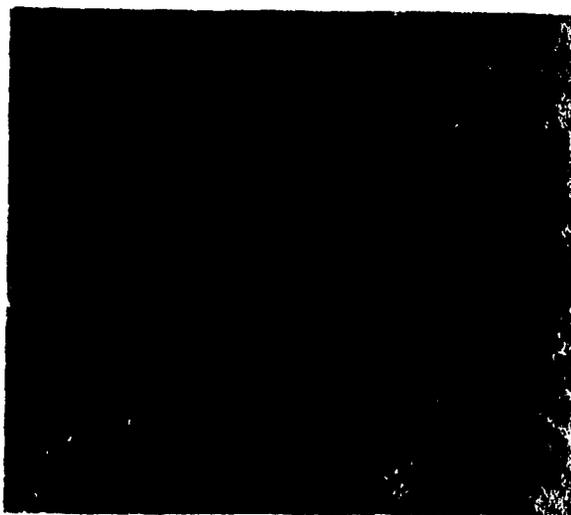
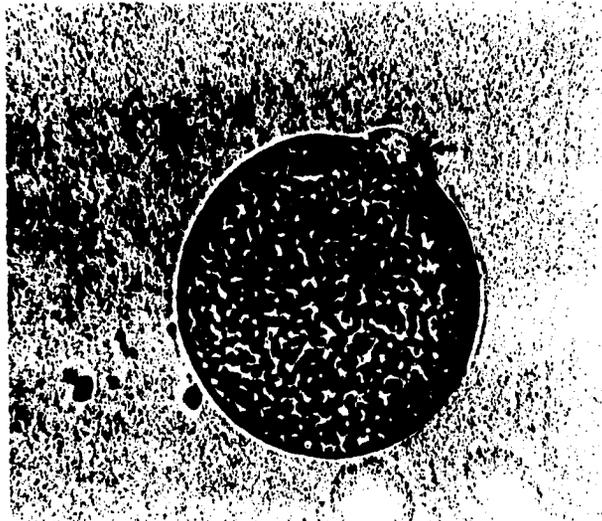


Figura 6. Dos ovocitos de criceto dorado que han sido activados por espermatozoides humanos, obsérvese que en uno de ellos ha comenzado la extrusión del segundo cuerpo polar, mientras que en el otro ya se ha hecho más aparente ( 40X ).



**Figura 7. Ovocito libre de zona pelúcida, 30 minutos después de la inseminación donde es evidente la extrusión del segundo cuerpo polar en la superficie del ovocito (40X).**

En algunos de los ovocitos, el desarrollo fue detenido en el estado de cabezas hinchadas del espermatozoide o estado temprano pronuclear.

Para determinar el porcentaje de penetración de los espermatozoides se cuantificó el número de cabezas descondensadas y/o pronúcleos dentro del citoplasma del ovocito. En la tabla 5 se muestran los resultados del número de ovocitos analizados para cada paciente estudiado; se muestra también el número de ovocitos con segundo cuerpo polar, el número de ovocitos con dos o más pronúcleos y el número de ovocitos con estructuras cromosómicas. Es importante indicar que hubo ovocitos en los cuales se cuantificaron hasta 5 pronúcleos.

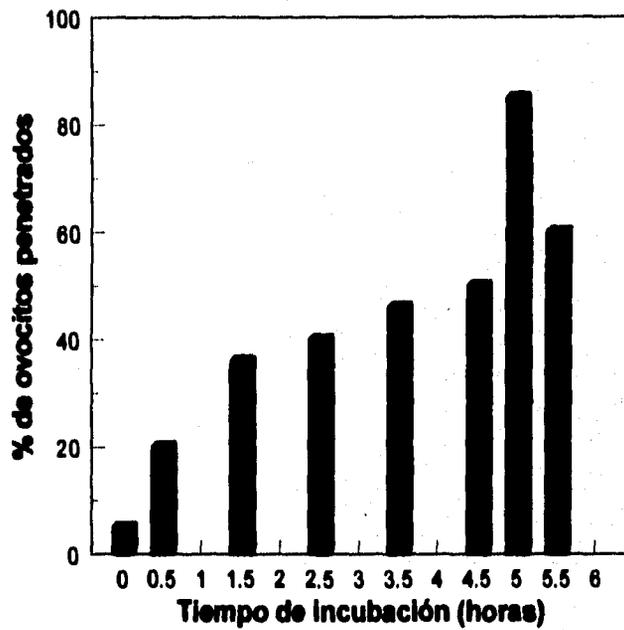
De los ovocitos que fueron inseminados, aproximadamente el 26% presentaba pronúcleos, otra porción tenía cabezas turgentes y/o extrusión del segundo cuerpo polar, el resto no presentaba evidencia de haber sido fertilizados.

Los espermatozoides comenzaron a fusionarse con los ovocitos en la primera hora de inseminación (aproximadamente el 40% penetrados) y para las 5 horas de incubación la mayoría de los ovocitos estaban penetrados con un número de 2 a 5 espermatozoides por ovocito.

La descondensación se observó desde los 15 minutos de coincubación, hasta las 3 horas; a las 3.5 horas la mayoría de los gametos femeninos fertilizados presentaban cabezas turgentes de los espermatozoides dentro de su citoplasma, pero después de las 5 horas de coincubación se menor número de ovocitos penetrados con relación al inicio de la incubación (Figura 8).

**TABLA 5**

RESULTADOS DE LA PENETRACION ESPERMATICA				
PACIENTE	OVOCITOS ANALIZADOS	OVOCITOS CON SEGUNDO CUERPO POLAR	OVOCITOS CON DOS OMAS PRONUCLEOS	OVOCITOS CON COMPLEMENTOS CROMOSOMICOS
1	85	24	12	10
2	65	13	18	7
3	25	9	24	14
4	70	32	14	4
5	85	25	14	8
6	47	19	27	12
7	52	14	7	5
8	34	27	23	9
9	96	24	10	7
10	59	13	16	4
11	63	21	10	5
12	79	26	9	6
13	84	11	25	14



**Figura 8. DESCONDENSACION DE LA CROMATINA**

### GRANULOS CORTICALES

En un número de ovocitos se observó liberación de gránulos corticales, pues al realizar las observaciones microscópicas para el análisis de la descondensación espermática, se observó diferencia en la rugosidad del ovocito, en comparación con los ovocitos no inseminados; esto se debió a que se redujo el número de gránulos corticales, lo cual es una importante evidencia de que ha ocurrido la penetración espermática (Maleszewski et al. 1995). En la figura 9 se muestra la diferencia entre los dos tipos de ovocitos a) no fertilizado y b) fertilizado, por la diferencia en los gránulos corticales.

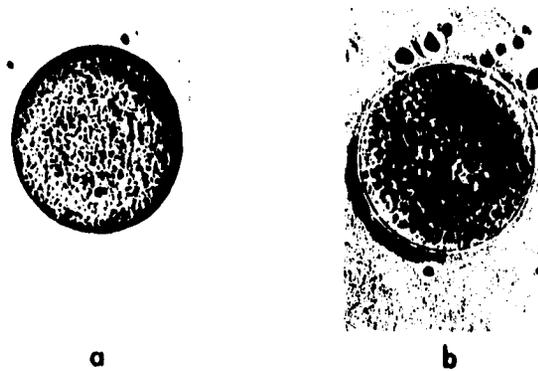


Figura 9. Se observan dos ovocitos libres de zona pelúcida; en a) se muestra un ovocito antes de ser inseminado, en b) un ovocito 15 minutos después de la inseminación. Nótese que antes de la fertilización los gránulos corticales son evidentes; después de la inseminación se observa una reducción de los mismos, también se nota la presencia de un pronúcleo (40X).

### DESARROLLO DE PRONUCLEOS

Los primeros pronúcleos se observaron a las 3-3.5 h de iniciada la coincubación de gametos; a las 4.5 h aproximadamente el 50% de los ovocitos habían sido penetrados y presentaban pronúcleos. En la figura 10 se aprecia un ovocito con presencia de tres pronúcleos.

Los pronúcleos totalmente desarrollados entran en estrecha aproximación, sus envolturas nucleares se desintegran y sus cromosomas se mezclan para la primera segmentación.

Los pronúcleos se clasificaron por tamaño y estado de descondensación en pequeños, grandes e intermedios. Los pronúcleos grandes aparecen como una red difusa, mientras que los chicos se observan más compactos, algunos no pudieron analizarse porque su morfología no estaba bien definida. La mayoría de los pronúcleos era de tamaño pequeño.

### OBSERVACION DE COMPLEMENTOS CROMOSOMICOS

Después de observar los pronúcleos en la mayoría de los ovocitos, se continuaron incubando con colchicina para la obtención de los cromosomas, pero al someterlos a la solución hipotónica para provocar la dispersión no fue posible observar los complementos cromosómicos. Sin embargo, el fluorocromo DAPI sí permitió la visualización de complementos cromosómicos dentro del ovocito, aunque no con una clara morfología.

Los complementos cromosómicos que lograron observarse con DAPI se muestran en la figura 11a, b y c, nótese que presentaron una morfología irregular, también se notan algunas cabezas turgentes de espermatozoides. En la mayoría de los casos se observaron estructuras cromosómicas pero sin una morfología definida.

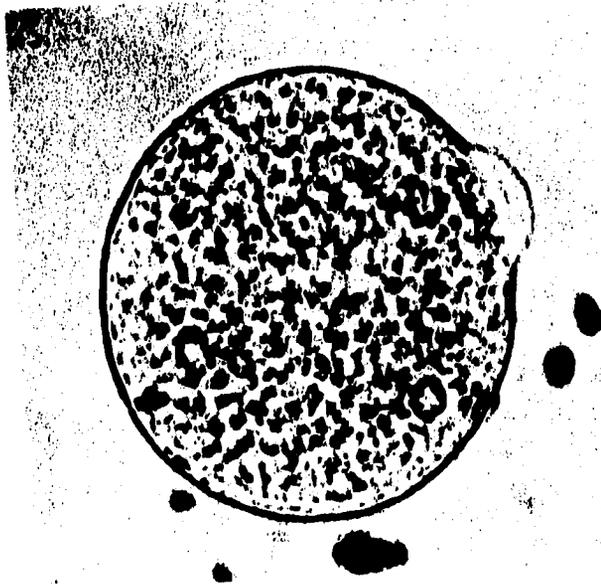


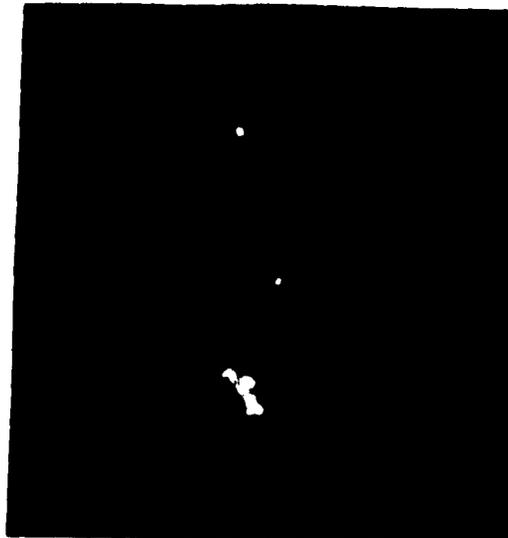
Figura 10 Nótese la presencia de un ovocito de criceto dorado libre de zona pelúcida 3 horas después de la inseminación, donde se observan claramente tres pronúcleos (100X).



**Figura 11a** Se observa un ovocito teñido con el fluorocromo DAPI donde se evidencian algunas cabezas de espermatozoides que empiezan a descondensarse y algunas donde ya tienen la forma de cromosomas.



**Figura 11b Ovocito después de 5 horas de co-incubación con presencia de cabezas espermáticas turgentes y un grupo de cromosomas que comenzaba a formarse (100X), también se observa el segundo cuerpo polar.**



**Figura 11c. Se observan tres complementos cromosómicos. También se observan algunas cabezas de espermatozoides que comienzan a descondensarse (100X).**

## DISCUSION

Los factores genéticos, especialmente las anomalías cromosómicas numéricas juegan un papel importante en la pérdida embrionaria. Debido a que el análisis de células somáticas no permite calcular el riesgo de errores que se presentan de novo durante la maduración de las células germinales, es muy interesante investigar si los gametos masculinos de varones sanos con fertilidad comprobada y/o no comprobada presentan anomalías.

La prueba de penetración espermática ha sido utilizada como una importante herramienta en la investigación de la infertilidad, pues permite detectar la función anormal de espermatozoides en pacientes que exhiben perfiles normales del semen (Overstreet et al. 1980; Rogers et al. 1979); sin embargo, la infertilidad también puede deberse a errores en la maduración de los gametos después de la penetración en los ovocitos, o muerte de cigotos primarios como resultado de la fertilización con un espermatozoide cromosómicamente anormal.

La fertilidad del hombre depende de la calidad de su semen; es decir, la concentración espermática, movilidad y morfología son indicadores fundamentales en la fertilidad masculina (Hall, 1981; Shaigi et al. 1985). Como lo muestran los resultados de la EBD, todos los donadores presentaron parámetros normales según los criterios establecidos por el Manual de la OMS para el análisis del semen humano (1987), independientemente de si su fertilidad estaba comprobada o no. Sin embargo, estos parámetros no proporcionan una información precisa diagnóstica o pronóstica para la fertilidad humana in vitro o in vivo (Aitken y Elton, 1984; Aitken et al. 1985; Cohen et al. 1982).

En los resultados mostrados se pudo observar que en todas las muestras el porcentaje de células móviles era normal, aunque después de la capacitación había disminuido; esto implica que las características de movilidad cambiaron significativamente después de la capacitación. Además del porcentaje de células móviles, es muy importante

considerar la calidad de sus movimientos; en las muestras estudiadas las células se movían en forma rápida y lineal, lo cual es vital para la penetración de los ovocitos (Stauss et al. 1995).

Benet et al. (1992) realizaron un estudio para comparar la frecuencia de anomalías cromosómicas en hombres a quienes se realizó la técnica de swim-up que selecciona a los espermatozoides altamente móviles, con ensayos donde no se hizo selección espermática, y los resultados no mostraron diferencia significativa, lo que indica que la selección de espermatozoides no implica selección cromosómica.

La densidad del eyaculado o concentración espermática es otro de los indicadores más importantes de la fertilidad masculina. Asimismo, la morfología de los espermatozoides es importante en la valoración del potencial de fertilidad, especialmente en pacientes con movilidad y concentración de espermatozoides normales. Un alto número de espermatozoides con morfología anormal está reflejando una pobre función testicular y debe evaluarse cuidadosamente debido a que puede haber un efecto significativo en la fertilización y en la tasa de embarazos (Hall, 1981; Kruger et al. 1988; Liu. 1992).

Los espermatozoides de mamífero recién eyaculados son incapaces de fertilizar ovocitos inmediatamente, aún cuando se pongan en contacto con ellos, pues deben ser capacitados, lo cual ocurre en condiciones normales a lo largo del tracto genital femenino, o in vitro se produce bajo ciertas condiciones. El tiempo requerido para la capacitación varía de especie a especie (Gould et al. 1985); en particular en los seres humanos requiere de varias horas. Pero este tiempo también depende del estado fisiológico de la hembra o de las condiciones del medio al que los espermatozoides sean expuestos (Yanagimachi, 1981). Los espermatozoide fueron incubados para la capacitación durante un mínimo de 6 horas; en este estudio se observó que no todos los espermatozoides son capacitados al mismo tiempo, pues aun en el mismo eyaculado, algunos se capacitan más rápido que otros, lo cual correlaciona con los resultados obtenidos por Gould et al. (1985), y más aún, entre varón y varón parece haber una variación considerable, la cual no tiene correlación con edad, raza o

tipo sanguíneo (Yanagimachi, 1981). Bajo las mismas condiciones experimentales algunos espermatozoides son capaces de penetrar a los ovocitos mucho más rápido que otros. Wrambsy y Yanagimachi (1988) han informado sobre el uso de un ionóforo para evitar el problema de los tiempos de incubación para la capacitación.

El período en que los espermatozoides son preincubados para la capacitación, también varía de investigador a investigador según la metodología utilizada, algunos los preincubaban varias horas (hasta 24 horas) y otros ni siquiera realizan la incubación; es difícil concluir si una preincubación larga o una corta es la adecuada para una buena penetración espermática; en este estudio el tiempo de incubación seleccionado dió buenos resultados. Después de la capacitación, los resultados sugerían que se llevaría a cabo una exitosa fertilización aún cuando los valores estimados disminuyeron significativamente, pues siempre se encontraron dentro de los establecidos como normales por el Manual de la OMS (1987). La disminución que se observó en la movilidad, viabilidad y concentración espermática particularmente se debió a los ciclos de centrifugación-resuspensión.

Una vez que los espermatozoides fueron lavados para eliminar el plasma seminal e incubados in vitro para efectuar la capacitación, las características de movilidad de los espermatozoides cambiaron significativamente; es decir, mostraron una hiperactivación con relación a su movimiento, desplazándose mejor y más rápidamente (movilidad de progresiva a excelente). Esto correlaciona con los resultados mostrados por Yanagimachi (1984).

Ya se mencionó que la densidad del eyaculado o concentración espermática es otra de las características importantes en la fertilidad. La concentración espermática que se empleó en esta prueba ( $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml para 40 ovocitos) fue adecuada para la penetración de los ovocitos; Binor et al. (1980) han demostrado que la concentración de espermatozoides está relacionada en forma lineal con el número de espermatozoides que penetran un ovocito, estos mismos autores describieron que con una concentración menor a  $6 \times 10^5$  no hay penetración; pero también han indicado que la concentración que da una mayor índice de penetración es la de  $5 \times 10^8$  (Binor et al. 1982).

El criterio más comunmente utilizado para la penetración del ovocito por el espermatozoide es la presencia de cabezas espermáticas turgentes o pronúcleos espermáticos dentro del citoplasma del ovocito (Hamdi et al. 1984); sin embargo, Yanagimachi (1984) propone que la ausencia de pronúcleos o segmentación, no necesariamente implica que la fertilización no haya ocurrido.

En los resultados obtenidos se muestra que hubo ovocitos que no parecieron haber sido fertilizados. Por otro lado, la presencia de un pronúcleo o pronúcleos sólo no es criterio confiable para la penetración espermática, ya que los ovocitos de criceto pueden activarse espontáneamente sin que exista penetración espermática (Maleszewski et al. 1995). Las cabezas turgentes y los pronúcleos son fácilmente vistos ya sea con un microscopio de contraste de fases o uno de contraste de interferencia.

Pero otra importante evidencia de que se realizó la penetración espermática fué la extrusión del segundo cuerpo polar, que logró observarse en la mayoría de los ovocitos fertilizados (Van-den-Bergh et al. 1995). Sin embargo, hay ovocitos con segundo cuerpo polar pero no se nota la presencia de cabezas turgentes o pronúcleos en su citoplasma, lo cual correlaciona con los resultados de Maleszewski et al. (1995) sobre la activación espontánea del ovocito.

Después de llevar a cabo la coincubación de gametos se observó que algunos ovocitos no habían sido penetrados, esto quizá sea deba a que el número de células móviles va disminuyendo durante la preincubación y además la actividad flagelar también se vio disminuida conforme pasaba el tiempo de incubación.

La activación de la descondensación de la cromatina nuclear en el espermatozoide humano inició a los 15 minutos de coincubación y duró hasta las 3 horas, momento en el que se observan las primeras cabezas turgentes o pronúcleos de los espermatozoides (Yanagimachi, 1984).

Deberían registrarse con más precisión los tiempos de observación de los ovocitos, es decir, hacer observaciones más frecuentes y a un tiempo determinado, ya que las colas de

los espermatozoides humanos se desintegran y no son detectables al microscopio de luz varias horas después de su entrada en el citoplasma. Solamente mediante microscopía electrónica es posible detectar los componentes de la cola del espermatozoide en el citoplasma (Yanagimachi, 1984).

La polispermia se produce cuando más de un espermatozoide penetra en el ovocito y el número de cromosomas será mayor que el de una dotación normal. Se sabe que las especies animales han desarrollado durante la evolución mecanismos que impiden que más de un espermatozoide penetre en el ovocito (Barros y Yanagimachi, 1972). Estudios realizados con ovocitos del erizo de mar sugieren la existencia de dos barreras distintas para evitar la polispermia: un bloqueo rápido e incompleto que tiene lugar durante los primeros segundos del contacto espermatozoide-óvulo, y otro bloqueo más lento, pero también más completo. El primero parece darse cuando después de un segundo del anclaje del espermatozoide existe un flujo de iones sodio hacia el interior de la célula, provocando una breve variación en el potencial, parecido al del impulso nervioso, parece ser que este cambio de tensión es lo que impide la entrada al ovocito, de más espermatozoides (Maleszewski et al. 1995).

El segundo bloqueo parece estar dirigido hacia la reacción cortical: un cambio estructural masivo que se produce en el huevo poco después de la fecundación. Debajo de la membrana del huevo no fecundado se encuentra la capa cortical que contiene unas vesículas llamadas gránulos corticales. Cuando el espermatozoide penetra al óvulo, éstos se fusionan con la membrana plasmática y descargan su contenido en el espacio que queda entre la membrana plasmática y la vitelina. En el contenido de estos gránulos hay dos enzimas importantes: una que altera específicamente las proteínas receptoras de la membrana vitelina, de forma que los espermatozoides extras unidos a ella quedan desenganchados y ningún otro puede tampoco adherirse posteriormente. La otra enzima degrada proteínas conectivas que unen la membrana vitelina con la plasmática, quedando

ambas separadas entre sí. Esta secuencia de acontecimientos que siguen a la reacción cortical supone un bloqueo formidable para la polispermia (Barros y Yanagimachi, 1972).

La desaparición o una abrupta reducción en el número de gránulos corticales de la corteza del ovocito es otra importante evidencia de que ha ocurrido la penetración espermática (Maleszewski et al. 1995). Los gránulos corticales del ovocito de criceto son lo suficientemente grandes como para observarse con un objetivo de 100X (Austin, 1965). Sería difícil evaluar si los ovocitos han sido penetrados cuando no se han observado los núcleos turgentes de los espermatozoides, pero es de gran utilidad evidenciar la densidad de los gránulos corticales en la corteza del ovocito (Kvist, 1980; Yanagimachi, 1984).

Cuando los ovocitos de criceto libres de zona pelúcida son inseminados con una alta concentración de espermatozoides, es común la entrada de múltiples espermatozoides, lo cual conduce a un pobre desarrollo de pronúcleos espermáticos. Esto se debe a que el ovocito del criceto no presenta los mecanismos de bloqueo de membrana a la polispermia (Yanagimachi, 1994).

No todas las cabezas espermáticas (núcleos) incorporadas en el citoplasma del ovocito se descondensan o hinchan (Brandriff y Gordon, 1989); en este trabajo las cabezas turgentes se observaron dentro del citoplasma del ovocito, mientras que los espermatozoides cuyos núcleos no estaban descondensados se encontraban sólo adheridos a la superficie del ovocito. Algunas pueden permanecer condensadas por muchas horas. Otras pueden descondensarse (hincharse), pero no transformarse en pronúcleos, ya que la cantidad de factores citoplásmicos presentes en el ovocito, que son los responsables del desarrollo del núcleo espermático a pronúcleo parecen estar limitados (Yanagimachi, 1984).

Los pronúcleos se empezaron a observar a las 3-3.5 horas de iniciada la cóncubación de gametos; algunos no pudieron analizarse debido a una pobre morfología, quizá esto sea también una consecuencia de la polispermia, pues ocasiona que se observen ovocitos con 3 o más pronúcleos de diferente tamaño y poco visibles (Yanagimachi, 1994).

La diferencia que se encontró en los tiempos de descondensación de los ovocitos (desde 15 minutos hasta 3 horas) quizá sea una consecuencia del distinto estado de maduración en que se encuentran los espermatozoides.

En un estudio donde se realizó la interacción entre ovocitos y espermatozoides humanos, la expansión de la cabeza de los espermatozoides se dió después de la incorporación en el citoplasma del ovocito; y la inflación y vesiculación de la envoltura nuclear precedieron a la descondensación de la cromatina. Sin embargo, aún cuando existan cabezas turgentes y formación de pronúcleos en un ovocito, puede haber unas cuantas cabezas espermáticas que no se hayan expandido (Sathananthan et al. 1986), hecho que fue corroborado en este estudio al observar ovocitos con presencia de complementos cromosómicos y algunas cabezas turgentes.

El porcentaje de ovocitos penetrados refleja la capacidad fertilizante de los espermatozoides, pero también es importante considerar el estado fisiológico en que se encuentran los ovocitos, ya que es un factor determinante para que se lleve a cabo la exitosa descondensación de los núcleos espermáticos.

Algunos otros factores involucrados en la penetración de los ovocitos por los espermatozoides, y por lo tanto involucrados en la descondensación nuclear, pueden ser: el tiempo de obtención de los ovocitos, el método para eliminar la zona pelúcida, el tiempo de capacitación de los espermatozoides, el medio BWV, la concentración de espermatozoides y el tiempo de coincubación de los gametos.

Sin embargo, la descondensación de la cromatina y la subsecuente separación de las fibras cromosómicas son procesos asociados con la acción de proteasas y agentes que reducen las uniones disulfuro en las protaminas. La descondensación incompleta de la cromatina se observa en pronúcleos de ovocitos inseminados con concentraciones excesivas de espermatozoides y que muestran una polispermia excesiva (Yanagimachi, 1984). Esto quizá se deba a la relativa carencia de ciertos factores citoplásmicos del ovocito de criceto. Quizá sería importante, en algunos casos, disminuir la concentración de

espermatozoides para evitar la polispermia. Por otro lado, Longo y Yanagimachi (1993) han sugerido que en los ovocitos maduros de los mamíferos deben existir factores que descondensan el núcleo espermático y que desarrollan los pronúcleos masculinos.

La propiedad del ovocito de criceto dorado que se explota en esta prueba es la aparente ausencia de cualquier especificidad a nivel de la membrana plasmática (Maleszewski et al. 1995). Además la membrana plasmática del ovocito de criceto es excepcional por su aparente incapacidad para controlar su propia penetración por el espermatozoide, a pesar de la evidente liberación de gránulos corticales del ovocito durante la fertilización (Binor et al. 1982).

Hamdi et al. (1984) reportaron que la prueba de penetración con ovocitos de criceto no correlaciona con % de movilidad, % de viabilidad y % de morfología normal; sin embargo sí lo hace con la concentración de espermatozoides, la movilidad progresiva y el pH (7.2 - 7.7). Esto está en concordancia con los resultados obtenidos, ya que la concentración utilizada fue la propuesta por otros autores y dió una buena penetración, después de la capacitación se logró que la movilidad fuera progresiva y el pH se ajustó a 7.4 en todos los medios empleados.

Brandriff et al. (1991) han señalado que el sistema criceto-humano podría actuar como un "sistema de expresión" para lesiones cromosómicas (en analogía a sitios frágiles) que son expresados como "gaps" (huecos) o rompimientos bajo condiciones específicas de cultivo.

Estudios de la expresión de sitios frágiles en cromosomas de espermatozoides y linfocitos de un varón normal indican que las lesiones cromosómicas no ocurren al azar y no son artefactos técnicos; así que probablemente corresponden a la expresión espontánea de fragilidad cromosómica en el espermatozoide (Benet et al. 1989).

Existe evidencia de que en la interacción del espermatozoide y el ovocito inicia una serie de reacciones químicas que producen moléculas mensajeras que causan la activación del ovocito (Maleszewski et al. 1995). Los principales mensajeros son iónicos: el calcio

comienza muchas de las respuestas para la fertilización y también puede ser importante una disminución en la concentración de iones hidrógeno (aumento en el pH).

Cuando ocurre la fusión de gametos, el genoma masculino es remodelado de un estado inerte transcripcional a un estado funcional reactivado, lo cual se cree que está bajo control bioquímico del citoplasma del ovocito. Esta activación de la descondensación nuclear se caracteriza por la síntesis de ADN y la condensación de la cromatina. Aún se desconoce el tiempo de la fase S en cigotos humanos, pero en esta cruce heteróloga ocurre entre las 3 y las 3.5 horas postinseminación (Brandriff y Gordon, 1989).

Los enlaces disulfuro en las protaminas de los espermatozoides, formados durante el paso de los espermatozoides a través del epidídimo, se cree que estabilizan el núcleo espermático condensado, incrementando su resistencia a la descondensación y quizá ayudando a evitar la disponibilidad del molde de ADN en el núcleo espermático (Naish et al. 1987). Durante la fertilización los enlaces disulfuro del núcleo espermático son reducidos y las protaminas son removidas del ADN espermático, el último proceso que coincide, al menos en parte, con la descondensación nuclear espermática (Perreault y Rogers, 1982). Parece ser que tanto la descondensación y la eliminación de las protaminas son prerequisites para que se produzca el comienzo de la síntesis de ADN; esto se basa en observaciones de que los núcleos espermáticos antes de formar pronúcleos son incapaces de incorporar precursores de ADN, aún cuando estén presentes en los ovocitos que utilizan moldes para la síntesis de ADN. Quizá aparte de la reducción de enlaces disulfuro, como uno de los factores involucrados en la descondensación de la cromatina, existan otros elementos desconocidos que permitan al genoma humano responder a señales del citoplasma, por ejemplo para iniciar la síntesis de ADN, pues ésta ocurre solamente después de que la membrana nuclear se ha reformado alrededor del pronúcleo masculino y cuando el pronúcleo se ha agrandado (Naish et al. 1987). Posiblemente la polispermia sea una de las respuestas de por qué la descondensación nuclear, así como la formación de pronúcleos ocurren a diferentes tiempos (Barros y Yanagimachi, 1972).

Los complementos cromosómicos observados tuvieron, desafortunadamente, una morfología inadecuada para la identificación de los cromosomas. No pudieron ser analizados probablemente porque no se dió una buena dispersión o debido al solapamiento de los cromosomas pronucleares masculinos o femeninos. Esto puede darse como resultado de colocar 5 ovocitos en el mismo portaobjetos. Por este motivo la metodología no puede ser aplicada en el laboratorio para propósitos clínicos y epidemiológicos.

Pero aún cuando no se obtuvo una buena dispersión y por lo tanto una buena morfología, se logró la descondensación de la cromatina en el espermatozoide humano, lo que implica un gran avance en el estudio de la genética humana, ya que con algunas modificaciones de la técnica se podrán obtener cromosomas metafásicos con una adecuada calidad, para realizar estudios posteriores sobre el tipo y la frecuencia de anomalías cromosómicas en los gametos masculinos humanos.

Actualmente los métodos para obtener cromosomas de espermatozoides humanos para análisis rutinarios presentan dificultades que deberán superarse mediante el desarrollo de nuevas tecnologías. Es recomendable enfocar la atención hacia aquellos procedimientos que son de crucial importancia para el éxito de esta técnica (tiempos de incubación, fijación y dispersión, entre otros) pues sería muy importante considerar la modificación de estos pasos fundamentales en la fertilización in vitro interespecífica y elaborar un método adicional al de los investigadores que han desarrollado esta metodología para incrementar el éxito en la obtención de cariotipos en la cantidad adecuada y de buena calidad.

Desde hace poco tiempo existen nuevas técnicas que ayudan a separar eficientemente espermatozoides humanos con complementos X o Y, por ejemplo, el análisis de ADN del espermatozoide, la técnica de sephadex para selección de complemento X y el análisis del cuerpo Y, lo cual podría incrementar la probabilidad de tener niños sanos para parejas que tengan riesgo para enfermedades recesivas ligadas al X (Beckett et al. 1989), y más recientemente se han desarrollado las técnicas de FISH ((Fluorescence in situ hybridization) (Bischoff et al. 1994, Chevret et al. 1995, 1996, Holmes, y Martin, 1993, Mihar

et al. 1994, Robbins et al. 1993, Rousseaux et al. 1999) y en otros (Piramed in situ) (Pellestor et al. 1996).

Otros investigadores concluyen que todavía está por evaluar la incidencia real de aberraciones estructurales en el espermatozoide humano, principalmente debido a que las lesiones cromosómicas como "gaps" (huecos) y rompimientos pueden no ser traducidos por el mismo sistema criceto-humano y en segundo lugar porque la mayoría de las anomalías estructurales detectadas en espermatozoides son aberraciones inestables o semiestables (rompimientos, intercambio de cromátidas, fragmentos acrocéntricos, cromosomas dicéntricos y en anillo) (Genesca et al. 1990b).

En un estudio realizado por Genesca et al. (1990) se observó un incremento en la incidencia de anomalías cromosómicas estructurales en ovocitos tratados con radio y/o quimioterapia para diferentes tipos de cáncer, mediante la técnica de penetración con ovocitos de criceto dorado, lo cual sugiere una capacidad de reparación en el citoplasma del ovocito de criceto. Por otro lado, se ha estudiado que bajo condiciones *in vivo*, aproximadamente el 90% o más de los rompimientos cromosómicos originales, son restituidos (Vig, 1983); según otro estudio, no existe evidencia de reparación en espermátides tardías y en espermatozoides (Sega, 1976); Pedersen y Pedersen (1981) y más recientemente Matsuda y Tobarí (1989) demostraron que el ADN de espermatozoide de ratón podría ser reparado dentro del citoplasma del ovocito durante el período que existe entre la entrada del espermatozoide en el ovocito y el comienzo de la fase S. Matsuda y Tobarí (1988) también dieron evidencia directa de que el daño inducido por radiación ultravioleta en espermatozoides, puede ser efectivamente reparado por mecanismos de reparación pre y post-replicación, después de la entrada del espermatozoide en el citoplasma del ovocito. Esto se logró mediante el análisis de la primera segmentación de embriones de ratón de una célula tratada con inhibidores de reparación del ADN; es decir, la actividad de reparación debe ocurrir durante el tiempo en que el espermatozoide penetra al ovocito y la metafase de la primera división.

Otro trabajo realizado por Genovese et al. (1979) reporta que el daño inducido químicamente en el genoma del ratón, es preferencialmente reparado en varios ovocitos de ratón, dependiendo de las condiciones de la hembra.

Los resultados de estos estudios tienen gran importancia ya que demuestran que pudiera existir la posibilidad de que los daños genéticos en los genomas masculino y femenino, inducidos por algún mutágeno antes de la fertilización, puedan ser reparados en los ovocitos después de la fertilización. Sin embargo, aún no se han realizado este tipo de estudios en el humano.

Examinando cromosomas de ovocitos humanos multipronucleares fertilizados *in vitro* se han podido identificar los cromosomas de origen espermático, pero todavía no se precisa el origen gamético de los cromosomas en la mayoría de los casos, aún cuando se ha utilizado análisis de heteromorfismo (Rudbak et al. 1984). Aunque este planteamiento es atractivo, la disponibilidad de los ovocitos humanos para análisis cromosómico de rutina es, obviamente, muy limitado. Los intentos de visualizar los cromosomas de espermatozoides humanos, fusionándolos con células somáticas no han tenido éxito (Yanagimachi, 1982b).

Actualmente se ha comenzado a utilizar la técnica de hibridación *in situ* con sondas de ADN específicas para X o Y biotiniladas que proporcionan una alternativa simple y factible para la evaluación de la proporción de espermatozoides X o Y y la frecuencia de aneuploidías en cromosomas específicos en estas células. Este método está especialmente diseñado para determinar las aberraciones numéricas en los espermatozoides humanos, además es mucho más rápido y eficiente que la fertilización *in vitro* de ovocitos de criceto dorado y espermatozoides humanos (Mharany et al. 1994; Robbins et al. 1993; Rousseaux et al. 1995; Wyrobek et al. 1994).

Distintos grupos de investigación continúan preparando experimentos de hibridación con sondas de ADN biotiniladas para los cromosomas X, 1 y 12 (Guttenbach y Schmid, 1990).

También se han reportado algunos trabajos sobre la aplicación de hibridación *in situ* no radioactiva (Guttenbach y Schmid, 1990; Guttenbach et al. 1994a; Guttenbach et al. 1994b; Pieters et al. 1990).

Holmes y Martin (1993) han descrito trabajos utilizando FISH en núcleos espermáticos en interfase para valorar la utilidad de esta técnica en la detección de aneuploidías, la cual ha mostrado ser muy sensible y fácil de realizar, además tiene la ventaja de que la técnica es independiente de la función espermática y tiene la potencialidad de proporcionar gran cantidad de información rápidamente (Holmes y Martin, 1993). Existen otros trabajos usando la misma metodología con algunas variantes (Bischoff et al. 1994; Chevret et al. 1995; Miharú et al. 1994).

Wyrobek et al. (1994) también ha investigado recientemente sobre la detección de aneuploidías X-X, Y-Y y X-Y en espermatozoides humanos empleando FISH para dos cromosomas. En el trabajo desarrollado por Griffin et al. (1995) empleando FISH, se presenta la primera evidencia directa de un aumento de no-disyunción meiótica relacionada con la edad en el varón; pues se demostró que existe una mayor incidencia de espermatozoides XY y disomías XX y YY entre los varones de mayor edad que entre hombres jóvenes, es decir, los hombres de edad madura tienen una mayor probabilidad de tener descendencia aneuploide en comparación con los más jóvenes.

La técnica de FISH es una herramienta confiable, sensible y rápida; sin embargo, no permite examinar aneuploidías en todos los cromosomas simultáneamente a menos que se utilicen múltiples sondas con diferentes marcas teñidas fluorescentemente (Holmes y Martin, 1993). Aún más actualizado es el uso de la técnica PRINS para la detección, por ejemplo, de disomía en el espermatozoide humano (Pellestor et al. 1996).

## CONCLUSIONES

1. La prueba de penetración de ovocitos de criceto libres de zona pelúcida es una poderosa herramienta para conocer algunos de los mecanismos biológicos implicados en la descondensación de la cromatina del espermatozoide humano, así como para conocer que la descondensación nuclear en el espermatozoide humano inicia a partir de los 15 minutos de coincubación de gametos y que los primeros pronúcleos se empiezan a formar desde las 3 a las 3.5 horas de iniciada la coincubación.
2. La diferencia en el tiempo de inicio de la descondensación quizá se deba al diferente estado de maduración en que se encuentran los espermatozoides, pero el estado fisiológico de los ovocitos también puede ser un factor determinante para una exitosa descondensación de núcleos espermáticos.
3. Algunos de los factores involucrados en la penetración espermática, descondensación nuclear, formación de pronúcleos y obtención de cromosomas pueden ser la concentración espermática, el tiempo de obtención de los ovocitos, el tiempo de capacitación espermática, la manipulación de los ovocitos al eliminar la zona pelúcida y el tiempo mínimo requerido de coincubación de gametos.
4. Un mayor número de pruebas permitirá obtener un sinnúmero de complementos cromosómicos con una mejor dispersión, lo que permitirá analizar el tipo y la frecuencia de anomalías cromosómicas en los espermatozoides humanos.
5. Esta prueba de penetración espermática no puede ser razonablemente aplicada para monitoreo de rutina de cromosomas metafásicos, pero sí puede aplicarse, en algunos casos, con propósitos diagnósticos en casos de infertilidad y esterilidad.
6. La prueba de criceto es actualmente el método más informativo para el estudio de cromosomas en los espermatozoides humanos, ya que permite determinar tanto anomalías numéricas como estructurales, pero ayudará en gran medida la aplicación complementaria de metodologías de vanguardia como son FISH y PRINS.

## REFERENCIAS

1. Aitken, R. J. y R. Elton. 1984. Significance of Poisson distribution theory in analyzing the interaction between human spermatozoa and zona-free hamster oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 72:311-321
2. Aitken, R. J., M. Sutton, P. Warner y D. W. Richardson. 1985. Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 73: 441-449
3. Austin, C. R. 1965. *Fertilization*. Prentice Hall, Englewood Cliff, New Jersey.
4. Barros, C. y R. Yanagimachi. 1972. Polyspermy-preventing mechanism in the golden hamster egg. *J. Exp. Zool.* 180:251-266
5. Beckett, T. A., R. H. Martin y D. I. Hoar. 1989. Assessment of the sephadex technique for selection of X-bearing human sperm by analysis of sperm chromosomes, deoxyribonucleic acid and Y-bodies. *Fertil. Steril.* 52:829-835
6. Benet, J., A. Genesca, J. Navarro, J. Egozcue y C. Templado. 1986. G-banding of human sperm chromosomes. *Human Genet.* 73:181-182
7. Benet, J., C. Fuster, A. Genesca, J. Navarro, R. Miró, J. Egozcue y C. Templado. 1989. Expression of fragile sites in human sperm and lymphocyte chromosomes. *Human Genet.* 81:239-242
8. Benet, J., A. Genesca, J. Navarro, J. Egozcue y C. Templado. 1992. Cytogenetic studies in motile sperm from normal men. *Human Genet.* 89:176-180
9. Biggers, J. D., W. K. Whitten y D. G. Whittingham. 1971. The culture of mouse embryos *in vitro*. En: *Methods in Mammalian Embriology*. (ed. J. C. Daniel). pp. 86-116 (W. H. Freeman and Co. (San Francisco).
10. Binor, Z., J. E. Sokoloski y D. P. Wolf. 1980. Penetration of zona-free hamster egg by human sperm. *Fertil. Steril.* 33:321-327
11. Binor, Z., J. E. Sokoloski y D. P. Wolf. 1982. Sperm interaction with the zona-free hamster egg. *J. Exp. Zool.* 222:187-193
12. Bischoff, F. Z., D. D. Nguyen, K. J. Burt y L. G. Shaffer. 1994. Estimates of aneuploidy using multicolor fluorescence *in situ* hybridization on human sperm. *Cytogenet. Cell Genet.* 66:237-243
13. Boué, J. G. y A. Boué. 1973. Increased frequency of chromosomal anomalies in abortions after induced ovulation. *Lancet* 1:679

14. Boué, J. G., A. Boué y P. Lazar. 1975. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology* 12:11-26
15. Brandriff, B. F. y R. A. Pedersen. 1981. Repair of the ultraviolet-irradiated male genome in fertilized mouse eggs. *Science* 211:1431-1433
16. Brandriff, B. F., L. A. Gordon, L. Ashworth, G. Watchmaker, A. V. Carrano y A. Wyrobek. 1984. Chromosomal abnormalities in human sperm: Comparisons among four healthy men. *Human Genet.* 66:193-201
17. Brandriff, B. F., L. A. Gordon, L. Ashworth, G. Watchmaker, D. Moore II., A. J. Wyrobek y A. V. Carrano. 1985a. Chromosomes of human sperm: Variability among normal individuals. *Human Genet.* 70:18-24
18. Brandriff, B. F., L. A. Gordon y G. Watchmaker. 1985b. Human sperm chromosomes obtained from hamster eggs after sperm capacitation in Test-Yolk buffer. *Gamete Res.* 11:253-259
19. Brandriff, B. F., L. A. Gordon, L. K. Ashworth, V. Littman, G. Watchmaker y A. V. Carrano. 1986. Cytogenetics of human sperm: Meiotic segregation in two translocation carriers. *Am. J. Human Genet.* 38:197-208
20. Brandriff, B. F., L. A. Gordon, D. Moore II y A. V. Carrano. 1988a. An analysis of structural aberrations in human sperm chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 47:29-36
21. Brandriff, B. F., L. A. Gordon, L. K. Ashworth y A. V. Carrano. 1988b. Chromosomal aberrations induced by *in vitro* irradiation: comparisons between human sperm and lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 12:167-177
22. Brandriff, B. F. y L. A. Gordon. 1989. Analysis of the first cell cycle in the cross between hamster eggs and human sperm. *Gamete Res.* 23:299-308
23. Brandriff, B. F., L. A. Gordon, R. Segraves y D. Pinkel. 1991. The male derived genome after sperm-egg fusion: Spatial distribution of chromosomal DNA and paternal-maternal genomic association. *Chromosoma* 100:262-266
24. Cohen, J., R. F. A. Weber, J. C. M. van der Vijver y G.H. Zelmaker. 1982. *In vitro* fertilizing capacity of human spermatozoa with the use of zona-free hamster ova: interassay variation and prognostic value. *Fertil. Steril.* 37:565-572
25. Caspersson, T., L. Zech, C. Johansson y E. J. Modest. 1970. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma* 30:215
26. Chaudhuri, J. P. y R. Yanagimachi. 1984. An improved method to visualize human sperm chromosomes using zona-free hamster eggs. *Gamete Res.* 10:233-239

27. Chevret, E., S. Rousseaux, M. Monteil, R. Pelletier, J. Cozzi y B. Sèle. 1995. Meiotic segregation of the X and Y chromosomes and chromosome 1 analyzed by three-color FISH in human interphase spermatozoa. *Cytogenet. Cell Genet.* 71:126-130
28. Chevret, E., S. Rousseaux, M. Monteil, Y. Osson, J. Cozzi, R. Pelletier y B. Sèle. 1996. Increased incidence of hyperhaploid 24,XY spermatozoa detected by three colour FISH in a 46,XY/47,XXY male. *Hum. Genet.* 97:171-175
29. Dutrillaux, B. y J. Lejeune. 1971. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C. R. Acad. Sci.* 272:2638
30. Estop, A. M., K. Cieply, V. Vankirk, S. Munne y K. Garver. 1991. Cytogenetic studies in human sperm. *Human Genet.* 87: 447-451
31. Estop, A. M., V. Vankirk y K. Cieply. 1995. Segregation analysis of four translocations, t(2;18), t(3;15), t(5;7) and t(10;12), by sperm chromosome studies and a review of the literature. *Cytogenet. Cell Genet.* 70:80-87
32. Generoso, W. M., K. T. Cain, M. Krishna y S. Huff. 1979. Genetic lesions induced by chemicals in spermatozoa and spermatids of mice are repaired in the egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:435-437
33. Genesca, A., M. R. Caballín, R. Miró, J. Benet, J. R. Germa y J. Egozcue. 1992. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Human Genet.* 89:181-186
34. Genesca, A., J. Benet, M. R. Caballín, R. Miró, J. R. Germa y J. Egozcue. 1990a. Significance of structural chromosome aberrations in human sperm: analysis of induced aberrations. *Human Genet.* 85:495-499
35. Genesca, A., L. Barrios, R. Miró, M. R. Caballín, J. Benet, C. Fuster, X. Bonfil y J. Egozcue. 1990b. Lymphocyte and sperm chromosome studies in cancer-treated men. *Human Genet.* 84:353-355
36. Gould, J. E., J. W. Overstreet y F. W. Hanson. 1985. Interaction of human spermatozoa with the human zona pellucida and zona-free hamster oocyte following capacitation by exposure to human cervical mucus. *Gamete Res.* 12:47-54
37. Griffin, D. K., M. A. Abruzzo, E. A. Millie, L. A. Sheean, E. Feingold, S. L. Sherman y T. J. Hassold. 1995. Non-dijunction in human sperm: evidence for an effect of increasing paternal age. *Human Molec. Genet.* 4:2227-2232
38. Guttenbach, M. y M. Schmid. 1990. Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive *in situ* hybridization. *Am. J. Human Genet.* 46:553-558

39. Guttenbach, M., R. Schakowski y M. Schmid. 1994a. Incidence of chromosome 18 disomy in human sperm nuclei as detected by nonisotopic in situ hybridization. *Human Genet.* 93:421-423
40. Guttenbach, M., R. Schakowski y M. Schmid. 1994b. Incidence of chromosome 3, 7, 10, 11, 17 and X disomy in mature human sperm nuclei as determined by nonradioactive in situ hybridization. *Human Genet.* 93:7-12
41. Hall, J. L. 1981. Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova. *Fertil. Steril.* 35:457-463
42. Hamdi, S. A., H. H. Ibrahim, S. M. Girgis, E. S. E. Hafez y A. H. Bassalamah. 1984. Zona-free hamster egg-sperm penetration assay: II. Correlative study with routine semen analysis. *Arch. Androl.* 32:59-63
43. Hassold, T., N. Chen y J. Funkhouser. 1980. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann. Hum. Genet.* 44:151-164
44. Hassold, T., S. Sherman y P. A. Hunt. 1995. The origin of trisomy in humans. *Proc. Clin. Biol. Res.* 393:1-12
45. Holmes, J. M. y R. H. Martin. 1993. Aneuploidy detection in human sperm nuclei using fluorescence in situ hybridization. *Human Genet.* 91:20-24
46. Jacobs, P. A. 1971. En Proc. Int. Symp. The Genetics of the spermatozoon (eds. Beatly, R. A. and Gluecksohn-Waelsch, S.) pp. 346-358 (Edinburgh).
47. Jenderny, J. y G. Röhrborn. 1987. Chromosome analysis of human sperm. I. First results with a modified method. *Human Genet.* 76:385-388
48. Kamiguchi, Y. y K. Mikamo. 1986. An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. *Am. J. Human Genet.* 38:724-740
49. Kline, D. 1991. Activation of the egg by the sperm. *Bioscience* 41:89-95
50. Kruger, T. F., R. J. Swanson, M. Hamilton, K. F. Simmons, A. A. Acosta, J. F. Matta, S. Oehniger y M. Morshedi. 1988. Abnormal sperm morphology and other semen parameters related to the outcome of the hamster oocyte human sperm penetration assay. *Int. J. Andrology* 11:107-113
51. Kvist, U. 1980. Sperm nuclear chromatin decondensation ability. An in vitro study on ejaculated human spermatozoa. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 486:1-24
52. Liu, D. Y. 1992. Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil. Steril.* 58:465-483

53. Longo, F. J. y M. Kunkle. 1978. Transformations of sperm nuclei upon insemination. En: Current topics in developmental biology, Fertilization. (eds. A. A. Moscona and A. Monroy). pp. 149-184 Academic. Press.
54. Longo, F. y R. Yanagimachi. 1993. Detection of sperm-egg fusion. En: Methods in Enzymology. 221B:249-260 (ed. N. Duzgunes). Academic Press, San Diego/New York
55. Ma, S., D. K. Kalousek, C. Zouves, Y. B. Ho, V. Gomel y Y. S. Moon. 1989. Chromosome analysis of human oocytes failing to fertilize *in vitro*. Fertil. Steril. 51:992-997
56. Maleszewski, M., D. Kline y R. Yanagimachi. 1995. Activation of hamster zona-free oocytes by homologous and heterologous spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 105:99-107
57. Martin, R. H. y P. J. Taylor. 1982. Reliability and accuracy of the zona-free hamster ova assay in the assessment of male fertility. Br. J. Obstet. Gynaecol. 89:951-956
58. Martin, R. H., C. C. Lin, V. Balkan y K. Burns. 1982. Direct chromosomal analysis of human spermatozoa: Preliminary results from 18 normal men. Am. J. Human Genet. 34:459-468
59. Martin, R. H. 1983. A detailed method for obtaining preparations of human sperm chromosomes. Cytogenet. Cell Genet. 35:252-256
60. Martin, R. H. y P. J. Taylor. 1983. Effect of sperm concentration in the zona-free hamster ova penetration assay. Fertil. Steril. 39:379-381
61. Martin, R. H., V. Balkan, A. W. Rademaker, K. Burns, C. C. Lin, y N. L. Rudd. 1983a. The chromosome constitution of 1000 human spermatozoa. Human Genet. 63:305-309
62. Martin, R. H., V. Balkan, C. C. Lin, P. J. Taylor y N. L. Rudd. 1983b. Sperm chromosome abnormalities in men of proven and unproven fertility. Fertil. Steril. 39:441
63. Martin, R. H. 1984. Comparison of chromosomal abnormalities in hamster egg and human sperm pronuclei. Biol. Reprod. 31:819-825
64. Martin, R. H. 1986. Sperm chromosome analysis in a man heterozygous for a paracentric inversion of chromosome 7(q11q22). Human Genet. 73:97-100
65. Martin, R. H., K. Hildebrand, J. Yamamoto, A. Rademaker, M. Barnes, G. Douglas, K. Arthur, T. Ringrose y I. S. Brown. 1986. An increased frequency of human sperm chromosomal abnormalities after radiotherapy. Mutation Res. 174:219-225
66. Martin, R. H. y A. W. Rademaker. 1987. The effect of age on the frequency of sperm chromosomal abnormalities in normal men. Am. J. Human Genet. 41:484-492

67. Martin, R. H., A. Rademaker, L. Long-Simpson, D. Peterson y J. Yamamoto. 1987. Variation in the frequency and type of sperm chromosomal abnormalities among normal men. *Human Genet.* 77:108-114
68. Martin, R. H. 1988a. Cytogenetic analysis of sperm from a male heterozygous for a 13:14 Robertsonian translocation. *Human Genet.* 80:357-361
69. Martin, R. H. 1988b. Meiotic segregation of human sperm chromosomes in translocation heterozygotes: Report of a t(9;10) (q34-q11) and a review of the literature. *Cytogenet. Cell Genet.* 47:48-51
70. Martin, R. H. 1988c. Human sperm chromosomes complements after microinjection of hamster eggs. *J. Reprod. Fertil.* 84:179-186
71. Martin, R. H., C. Templado, E. Ko y A. Rademaker. 1990a. Effect of culture conditions and media on the frequency of chromosomal abnormalities in human sperm chromosome complements. *Mol. Reprod. Develop.* 26:101-104
72. Martin, R. H. 1990. Analysis of human sperm chromosomes complements. En: *Fertilization in mammals.* (eds. Bavister, B. D., J. Cummins and E. Roldan. R. S), Symposium Sero, U.S.A. Norwell, Massachusetts. pp. 365-372
73. Martin, R. H. y A Rademaker. 1990. The frequency of aneuploidy among individual chromosomes in 6,821 human sperm chromosome complements. *Cytogenet. Cell Genet.* 53:103-107
74. Martin, R. H., L. Barclay, K. Hildebrand, E. Ko y S. B. Fowlow. 1990. Cytogenetic analysis of 400 sperm from three translocation heterozygotes. *Human Genet.* 86:33-39
75. Martin, R. H. 1992. Sperm chromosome analysis of two men heterozygous for reciprocal translocations: t(1;9)(q22;q31) and t(16;19)(q11.1;q13.3). *Cytogenet. Cell Genet.* 60:18-21
76. Martin, R. H. y E. L. Spriggs. 1995. Sperm chromosome complements in a man heterozygous for a reciprocal translocation 46, XY, t(9;13)(q21.1;q21.2) and a review of the literature. *Clin. Genet.* 47:42-46
77. Matsuda, Y. e I. Tobarí. 1988. Chromosomal analysis on mouse eggs fertilized *in vitro* with sperm exposed to ultraviolet light (UV) and methyl- and ethyl-methanesulfonate (MMS and EMS). *Mutat. Res.* 198:131-144
78. Matsuda, Y. e I. Tobarí. 1989. Repair capacity of fertilized mouse eggs for X-ray damage induced in sperm and mature oocytes. *Mutat. Res.* 210:35-47
79. Miharú, N., R. G. Best y R. Young. 1994. Numerical chromosome abnormalities in spermatozoa of fertile and infertile men detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Human Genet.* 93:502-506

80. Mikamo, K. 1970. Anatomic and chromosomal anomalies in spontaneous abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 106:253-254
81. Moorhead, P. S., P. C. Nowel, Mellman D. Battips y D. A. Hungerford. 1960. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20:613-616
82. Naish, S. J., S. D. Perreault, A. L. Foehner y B. R. Zirkin. 1987. DNA synthesis in the fertilizing hamster sperm nucleus: sperm template availability and egg cytoplasmic control. *Biol. Reproduction.* 36:245-253
83. OMS (Organización Mundial de la Salud). 1987. Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Ed. Panamericana.
84. Overstreet, J. W., R. Yanagimachi, D. F. Katz, K. Hayashi y F. W. Hanson. 1980. Penetration of human spermatozoa into the zona pellucida and the zona-free hamster egg: A study of fertile donors and infertile patients. *Fertil. Steril.* 33:534-542
85. Pellestor, F., B. Sèle, H. Jalbert y P. Jalbert. 1989. Direct segregation analysis of reciprocal translocations: a study of 280 sperm karyotypes from four carriers. *Am. J. Human Genet.* 44:464-473
86. Pellestor, F., I. Quennesson, L. Coignet, A. Girardet, B. Andréo y J. P. Charliou. 1996. Direct detection of disomy in human sperm by the PRINS technique. *Human Genet.* 97:21-25
87. Perreault, S. D. y B. J. Rogers. 1982. Capacitation pattern of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 38:258-260
88. Pieters, M. H. E. C., J. P. M. Geraedts, H. Meyer, J. C. M. Dumoulin, J. L. H. Evers R. J. E. Jongbloed, P. M. Nederlof y S. van der Flier. 1990. Human gametes and zygotes studied by nonradioactive *in situ* hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 53:15-19
89. Reyes, A., M. E. Chavarría y A. Rosado. 1980. Interference with spermatozoa capacitation. En: *Regulation of male fertility.* (ed G. R. Cunningham, W. B. Schill, E. S. E. Hafez). Martinus Nijhoff Publishers by The Hague (Boston) London.
90. Robbins, W. A., R. Segraves, D. Pinkel y A. J. Wyrobek. 1993. Detection of aneuploid human sperm by fluorescence *in situ* hybridization: Evidence for a donor difference in frequency of sperm disomic for chromosomes 1 and Y. *Am. J. Human Genet.* 52:799-807
91. Rogers, B. J., H. Vancampen, M. Veno, H. Lambert, R. Bronson y R. Hale. 1979. Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. *Fertil. Steril.* 32:664-670
92. Rosenbush, B. y K. Sterzik. 1991. Sperm chromosomes and habitual abortion. *Fertil. Steril.* 56:370-372

93. Rousseaux, S., E. Chevret, M. Monteil, J. Cozzi, R. Pelletier, D. Delafontaine y B. Sèle. 1995. Sperm nuclei analysis of a Robertsonian t(14q21q) carrier, by FISH, using three plasmids and two YAC probes. *Human Genet.* 96:655-660
94. Rudak, E., P. Jacobs y R. Yanagimachi. 1978. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 274:911-913
95. Rudak, E., J. Dor, S. Mashlach, L. Nebel y B. Goldman. 1984. Chromosome analysis of multipronuclear human oocytes fertilized *in vitro*. *Fertil. Steril.* 41:538-545
96. Salamanca, G. F. 1990. Citogenética humana: Fundamentos y aplicaciones clínicas. Ed. Panamericana. México. 400 p.
97. Sathananthan, A. H., N. R. Edirisinghe, S. S. Ratnam y P. C. Wong. 1986. Human sperm-egg interaction *in vitro*. *Gamete Res.* 15:317-326
98. Sega, G. A. 1976. Molecular dosimetry of chemical mutagens: measurement of molecular dose and DNA repair in mammalian germ cells. *Mutat. Res.* 38:217
99. Shalgi, R., J. Dor, E. Rudak, A. Lusky, B. Goldman, S. Mashlach y L. Nebel. 1985. Penetration of sperm from teratospermic men into zona-free hamster eggs. *Int. J. Andrology* 8:285-294
100. Singer, S. L., H. Lambert, J. W. Overstreet, F. W. Hanson y R. Yanagimachi. 1985. The kinetics of human sperm binding to the human zona pellucida and zona-free hamster oocyte *in vitro*. *Gamete Res.* 12:29-39
101. Stauss, C. R., T. J. Votta y S. S. Suárez. 1995. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol. Reprod.* 53:1280
102. Syme, R. M. y R. H. Martin. 1992. Meiotic segregation of a 21;22 Robertsonian translocation. *Human Reprod.* 7:825-829
103. Tarin, J. J., E. Gómez y A. Pellicer. 1991. Chromosome anomalies in human oocytes *in vitro*. *Fertil. Steril.* 55:964-969
104. Tarkowski, A. K. 1966. An air drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *Cytogenetics* 5:394-400
105. Templado, C., J. Navarro, J. Benet, A. Genesca, M. Mar Pérez y J. Egozcue. 1988. Human sperm chromosome studies in a reciprocal translocation t(2;5). *Human Genet.* 79:24-28
106. Tesarik, J. y V. Kopečný. 1989. Development of human male pronucleus: Ultrastructure and timing. *Gamete Res.* 24:135-149

107. Van-den-Bergh, M., E. Bertrand y Y. Englert. 1995. Second polar body extrusion is highly predictive for oocyte fertilization as soon as 3 hr after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *J. Assist. Reprod. Genet.* 12:258-262
108. Vig, B. K. 1983. Sequence of centromere separation: occurrence possible significance and control. *Cancer Genet. Cytogenet.* 8:249-274
109. Wall, J. L., A. A. Templeton, I. Massinis, L. Bell, P. Cunningham y R. O. Duncan. 1987. Trisomy in an eight cell human pre-embryo. *J. Med. Genet.* 24:60-64
110. Wramsby, H. y R. Yanagimachi. 1986. Human sperm chromosomes in zona-free hamster eggs: pretreatment of spermatozoa with calcium ionophore facilitates later examination of chromosomes. *Gamete Res.* 15:295-303
111. Wyrobek, A.J., W. A. Robbins, Y. Mehraein, D. Pinkel y H. Weier. 1994. Detection of sex chromosomal aneuploidies X-X, Y-Y and X-Y in human sperm using two-chromosome fluorescence *in situ* hybridization. *Am. J. Med. Genet.* 53(1):1-7
112. Yanagimachi, R. y M. C. Chang. 1964. *In vitro* fertilization of golden hamster ova. *J. Exp. Zool.* 156:361-376
113. Yanagimachi, R., H. Yanagimachi y B. J. Rogers. 1976. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 15:471-476
114. Yanagimachi, R. 1981. Mechanisms of fertilization in mammals. En: *Fertilization and embryonic development in vitro*. (eds: Mastroiani, L. Jr. and J. D. Biggers). Plenum Press Publishing. New York.
115. Yanagimachi, R. 1982a. Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization related phenomena in the hamster. *Gamete Res.* 5:323-244
116. Yanagimachi, R. 1982b. *In vitro* sperm capacitation and fertilization of golden hamster eggs in a chemically defined medium. En: *In vitro fertilization and embryo transfer*. (eds. E. S. E. Hafez and K. Semm). MTP Press, Lancaster, Reino Unido.
117. Yanagimachi, R. 1984. Zona-free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res.* 10:187-232
118. Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. En: *The Physiology of reproduction*. pp:169-319 (eds. Knobil, E. y J. D. Neill). Raven Press. New York.
119. Zalensky, A. O., J. W. Breneman, I. A. Zalenskaya, B. R. Brinkley y E. Morton Bradbury. 1993. Organization of centromeres in the decondensed nuclei of mature human sperm. *Chromosoma* 102: 509-518