



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

130 1276/96
ej.1

"ALTERACIONES FUNCIONALES ESPERMATICAS
ASOCIADAS AL VARICOCELE"

T E S I S

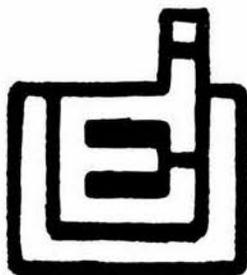
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

VEGA HERNANDEZ EVA

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



MEXICO, D. F.

1996



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.

GRACIAS

Quiero darle las gracias a DIOS.

Y a una persona que es muy especial para mí, que con su confianza, cariño y apoyo, sin escatimar esfuerzo alguno, me ha convertido en una persona de provecho, ayudándome a realizar la más grande de mis metas: mi carrera profesional, la cual constituye la herencia más valiosa que pudieras darme.

También por compartir conmigo tristezas y alegrías, éxitos y fracasos, por todo eso que me has brindado durante toda vida como estudiante y por hacer de mí lo que soy; porque eres un ejemplo de mujer, una excelente madre, a tí MAMÁ va dedicado todo éste trabajo, con mucho amor y cariño.

Gracias a mis HERMANOS:

ANALILIA (mi hermana menor) que me alientas a que cada día me siga superando más y por tu ayuda que siempre me has brindado a lo largo de toda mi carrera profesional;

ISRAEL, EVANGELINA, MARCELA, ARTURO Y MARISOL, por ser unos excelentes hermano y por toda su ayuda que me han brindado

A mis tios (as) les quiero agradecer infinitamente toda su ayuda que me han proporcionado.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle a mi asesor de tesis al Dr. Carlos Villanueva Diaz, por su valiosa ayuda que me brindo a lo largo de este trabajo, asi como por todos sus conocimientos impartidos durante estos dos años, los cuales fueron de mucha utilidad para mí y que jamas olvidare, también por sus consejos que siempre me ha dado para que continúe superándome profesionalmente. De igual forma quiero darle las gracias por ser una extraordinaria persona en lo profesional y en lo personal, gracias.

A la Q.F.I Maria de los Ángeles Diaz por su asesoramiento y sus consejos que fueron de utilidad para el desarrollo de éste proyecto, también por toda su ayuda incondicional que me brindo en el laboratorio y que gracias a esto se consolido una gran amistad.

A la Dra. Mirna Echavarría (Jefa del Departamento de Andrologia) por ser una excelente persona y por su valiosa cooperación para la culminación de este trabajo.

Y a todo el personal del Departamento de Andrología por su ayuda brindada a lo largo de este tiempo.

Quiero darle las gracias a mis sinodales Arturo Baiza, Martín Martínez, Carmen Álvarez y Leticia Verdín, por su tiempo disponible para la revisión del trabajo de tesis, así como de sus comentarios y sugerencias que fueron de utilidad para la culminación de este trabajo de tesis .

A mis compañeros y amigos de la carrera de Biología que siempre estuvieron apoyándome en todo momento y a los cuales jamás olvidare.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	5
HIPÓTESIS	8
OBJETIVOS	
generales	9
particulares	9
METODOLOGÍA	
análisis seminal	10
movilidad	11
morfología	12
viabilidad	12
recuento de espermatozoides	13
prueba hipoosmótica	14
integridad acrosomal	16
supervivencia	17
RESULTADOS	18
tabla	21
gráficas	23
ANÁLISIS DE RESULTADOS	33
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	39
APÉNDICE	44

RESUMEN

Con la finalidad de averiguar si existen alteraciones funcionales en los espermatozoides de hombres infértiles que tienen varicocele, se llevó a cabo un estudio en el que se analizaron en forma comparativa los parámetros seminales: concentración espermática, formas normales, índice de células recuperables (ICR), movilidad progresiva, pruebas de inchamiento del flagelo (HOST), inducción acrosomal (IA) y supervivencia de espermatozoides. Además se valoró el porcentaje de localización del varicocele, el volumen testicular y la concentración sérica basal de FSH; en sujetos clínicamente sanos con fertilidad probada y pacientes con varicocele corroborado por ultrasonido testicular.

El análisis seminal mostró diferencias tanto en la concentración espermática (varicocele 56.14 ± 37.63 vs control 93.52 ± 24.32 millones/mL) como en morfología (varicocele 32.87 ± 12.40 vs control 65.88 ± 323 % de formas normales) y la movilidad espermática total en varicocele fue de 60.35 ± 12.35 % y en el grupo control 79.80 ± 8.69 %.

El índice de células recuperables de los pacientes con varicocele (25.96 ± 43.99) fue menor que en los sujetos normales $25.96 + 176.44$ ($p= 0.00001$) así como el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra ($43.93 \pm 20.07\%$ vs 79.55 ± 5.85 %; $p= 0.00001$), el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro (68.29 ± 17.09 vs 87.22 ± 11.44 %; $p=0.001$), el índice de movilidad (35.83 ± 26.32 vs $77.55 \pm 32\%$; $p= 0.0001$) y el porcentaje de supervivencia a 24 hr (68 ± 27.3 vs 85 ± 10.57 %) ($p= 0.0001$) y 48 hr (37 ± 29 vs 73 ± 16.2 %) ($p= 0.00001$).

Estos datos demuestran que en los pacientes con varicocele la calidad seminal se encuentra disminuida por alteraciones funcionales de los espermatozoides que se pueden relacionar con fallas en su transporte desde el cuello uterino hasta su ascenso hacia el sitio de localización del ovocito y en la fecundidad de éste.

INTRODUCCION

El varicocele es una tortuosidad y dilatación anormal de las venas testiculares dentro del cordón espermático, esta anomalía vascular está asociada con la infertilidad masculina (Dublin y Amelar, 1971; Pryor y Howards, 1987) fig. 1, aunque la relación causa-efecto entre el varicocele y la infertilidad aún es controversial (Saypol, 1981a; Lewis y Harrison, 1982), se ha visto que numerosos hombres con varicocele han podido procrear.



Fig 1. Representación del varicocele

Muestra la dilatación anormal del plexo pampiniforme que se presenta en las venas testiculares, denominado varicocele

La incidencia del varicocele palpable en varones infértiles tiene un intervalo de 21 a 41% que es mayor en comparación con la que se observa en la población general, la cual se ha

visto que ocurre entre 4.4 y 22.6% (Saypol, 1981). En un estudio dirigido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre el diagnóstico de la pareja infértil, se informó que un 11.7% de la población en estudio presentaron varicocele y 25.4% de estos hombres mostraron anomalías en los parámetros seminales (OMS, 1992).

Se piensa que el varicocele se origina por el aumento de la presión hidrostática en las venas testiculares por un mal funcionamiento de las válvulas venosas lo cual origina una dilatación de las venas testiculares. Aunque este aspecto también es controversial con la información que existe en la actualidad ya que los modelos de estudio en animales no se aproximan a la enfermedad en el humano. El varicocele se asocia con un aumento en la temperatura testicular y en la presión hidrostática en el terreno venoso testicular, provocando alteraciones en la espermatogénesis y muy probablemente a nivel del epidídimo (Zorgnoitti, 1973; Bedford, 1991).

Observaciones al microscopio de cortes del testículo de pacientes con varicocele unilateral revelan desorganización y adelgazamiento del epitelio germinal, además se ha visto detención de la espermatogénesis en fases tardías (Dubin y Hotchkiss, 1969; Johnsen y Agger, 1978). Estudios de microscopía electrónica del tejido testicular muestran además retardo en la maduración de los espermatoцитos primarios, mala orientación de las espermátides y alteraciones estructurales de las células Sertoli (Cameron, 1980; Chakraborty, 1976).

El efecto perjudicial del varicocele sobre la espermatogénesis en los hombres subfértiles muchas veces se refleja por anomalías de los parámetros seminales, provocando así una mala calidad del semen la cual tiene como principales características: la disminución de la concentración de espermatozoides, el decremento en la movilidad espermática y un aumento en las anomalías morfológicas.

Se ha visto también que la calidad del semen en hombres subfértiles se deteriora progresivamente llegando a presentarse hasta un 95% de formas anormales, descenso de la movilidad en un 90% y de la densidad espermática hasta un 70% en estos pacientes (MacLeod, 1965).

Aún cuando la fisiopatogenia de la alteración seminal en los pacientes con varicocele no se ha aclarado, las anomalías presentes en el semen son constantes y se supone que son el resultado del impacto de la lesión en la función testicular o epididimaria, sin embargo en algunos pacientes las alteraciones seminales parecen influir en otras funciones espermáticas. Esto se hace patente cuando se analizan las causas de infertilidad/subfertilidad en los pacientes con varicocele que no muestran grandes alteraciones seminales. Aspectos tales como la capacidad de migración, la sobrevivencia en el tracto genital femenino, la unión a la zona pelúcida, la fusión membranal; son funciones que pudieran alterarse en esta condición clínica pero que no han sido investigadas de manera sistemática.

Algunos de los cambios seminales que se reportan en el varicocele en el humano sugieren también que se encuentra impedida la función del epidídimo. Estas son, principalmente, el incremento en el porcentaje de espermatozoides acintados (cabezas alargadas) (Aafjjs, 1985). La inferencia de que estos defectos morfológicos de los espermatozoides en el varicocele sean debidos a la disfunción del epidídimo se deriva del hecho que el mismo tipo de anomalías espermáticas se han descrito también en los pacientes con epididimitis (Peng, 1990)

En fechas recientes se han generado pruebas de laboratorio que permiten valorar de manera general e indirecta la función de la membrana plasmática y la reacción acrosomal que resultan de utilidad para el estudio de algunas causas ocultas de infertilidad masculina. Aunque esto es controversial también, las pruebas de función espermática parecen relacionarse con la capacidad fertilizante del gameto masculino.

En un análisis extenso de la información que existe en la literatura al respecto del varicocele, no hemos encontrado que estas pruebas de fertilidad del espermatozoide se hubieran realizado en pacientes con varicocele y semen marginal (son los parámetros seminales que se encuentran en el límite de los establecidos por el criterio de la OMS)*.

* Ver apéndice I

A N T E C E D E N T E S

A principios de siglo Celso realizó una observación de un paciente con varicocele. El notó la dilatación de las venas sobre el testículo y disminución de su tamaño en comparación con el testículo opuesto. Esta primera relación de las características anatómicas del varicocele se continuó con algunos intentos de correlacionarlas con la capacidad fecundante de los individuos que lo padecen y así en 1856 Curling reportó la disminución en el "poder de las secreciones de la glándula" sugiriendo su relación con la infertilidad masculina. Treinta años mas tarde Bennett describió la mejoría de la calidad del semen después de realizar la intervención quirúrgica en pacientes con varicocele.

Numerosos estudios en animales (Saypol,1981; Harrison,1986) y humanos (Russell,1957; Lipshultz,1977) sugieren que el varicocele produce infertilidad por lesiones del epitelio germinal, lo que puede ocurrir en forma progresiva (Gorelick y Goldstein, 1993; Saypol 1981).

El efecto perjudicial del varicocele sobre la espermatogénesis en los hombres subfértiles se ve reflejado en la mala calidad del semen, ya que en estos pacientes se encuentra una densidad espermática menor a los 20 millones/mL, un decremento en la movilidad y un aumento en la morfología anormal de los espermatozoides. La asociación entre el varicocele en el humano y las alteraciones seminales ha podido corroborarse en modelos experimentales. Moblely en 1976 y Al-Jubur en 1979 estudiando el varicocele experimental en perros y Kay y colaboradores (1979) en primates no humanos han descrito que la oclusión de la vena espermática produce un incremento en la temperatura testicular, alteraciones seminales y lesiones testiculares similares a las que se presentan en el humano. Turner y colaboradores (1987) han observado en el modelo de la rata la presencia del epitelio germinal desorganizado así como un decremento en el diámetro de los túbulos seminíferos. También se ha visto por citometría de flujo las anomalías de la espermatogénesis provocadas por el varicocele (Nagler, 1985). y se ha reportado que la densidad espermática se deteriora progresivamente y disminuye el volumen testicular conforme progresa la lesión (Cheval y Purcell, 1992).

En 1995 Lund y Sorensen realizaron una investigación sobre la calidad del semen en pacientes con varicocele comparándolos con pacientes normales, observando que los pacientes con varicocele presentaban una disminución en la calidad del semen en comparación con los pacientes sanos. En este mismo año Baccetti y cols. realizaron un estudio en microscopía electrónica de espermatozoides de pacientes afectados por diferentes grados de varicocele reportando que la incidencia de las anomalías submicroscópicas están claramente relacionadas con el grado de varicocele que presenten los pacientes. En forma similar Weiss y col. (1995) evaluaron las características ultraestructurales de los espermatozoides de pacientes infértiles con varicocele testicular, observando malformaciones y anomalías de los organelos subcelulares principalmente en la región de la cabeza y del flagelo.

La calidad seminal de los pacientes con varicocele se encuentra afectada al disminuir la concentración espermática y los porcentajes de espermatozoides móviles así como las formas normales. Sin embargo, algunos pacientes con varicocele pueden tener características seminales normales o marginales lo cual sugiere que en ellos la infertilidad podría deberse a la presencia de defectos funcionales como se señala en algunos estudios en los que se ha explorado la función espermática en el modelo de la fertilización in vitro. En estos estudios se ha identificado que la tasa de fertilización de los espermatozoides de pacientes con varicocele es menor que la que se observa en los sujetos fértiles.

Hoy en día existen varios métodos de tratamiento para el varicocele (Yavetz., 1992; Lerchl; 1993, Madgar 1995) con los cuales se ha intentado mejorar la calidad del semen. A pesar de los múltiples trabajos que se han publicado al respecto, el tema sigue siendo controversial ya que algunos autores reportan tasas de éxito en fertilidad entre 24 y 51% , pero otros autores han negado que el tratamiento quirúrgico o por embolización de las venas espermáticas tenga algún beneficio para estos pacientes. La principal dificultad que se encuentra al analizar objetivamente la información que se ha ofrecido en relación al impacto reproductivo de esta patología es la falta de estudios controlados.

Hasta la fecha no se cuenta con indicadores pronósticos adecuados en los parámetros seminales ordinarios para la selección de los pacientes con varicocele que son candidatos a la

cirugía. Esto hace necesario explorar de manera sistemática otros marcadores de fertilidad en un intento de definir con mejor eficiencia los grupos de tratamiento. Recientemente se han incorporado al estudio del semen diversas pruebas de laboratorio que no requieren alta tecnología para realizarse y que aparentemente tienen buena correlación con el potencial de fertilidad masculina, estas pruebas estudian de manera indirecta la integridad anatómico-funcional de la membrana plasmática (prueba hiposmótica, HOST) y la integridad del acrosoma (AR). Ambas muestran una buena correlación con las pruebas de fertilización heteróloga u homóloga, por lo cual debieran considerarse como herramientas útiles en el diagnóstico de fertilidad en pacientes con varicocele.

Dentro de la información a nuestro alcance no hemos encontrado que se hubiera estudiado la capacidad de estas pruebas (prueba hipoosmótica, integridad acrosomal y prueba de supervivencia) para investigar la subfertilidad en pacientes con varicocele que tienen semen limitrofe (alteración de un solo parámetro seminal). Esta población de pacientes con varicocele es interesante desde el punto de vista que nos permite identificar alteraciones subclínicas de la fertilidad que muy probablemente se pudieran convertir en mejores indicadores pronósticos de mejoría en el tratamiento quirúrgico.

En el presente trabajo se analizarán en forma comparativa las características funcionales en espermatozoides de sujetos con varicocele clínico que tienen semen marginal y en hombres con fertilidad probada con el fin de demostrar que en los pacientes con fertilidad masculina asociada a varicocele se encuentra disminuida la población de espermatozoides con potencial fértil.

HIPOTESIS

Los porcentajes de espermatozoides con membrana funcionalmente íntegra, acrosoma íntacto y viabilidad (supervivencia) en hombres infértiles con varicocele y semen marginal o normal son menores que en individuos sanos con fertilidad probada.

O B J E T I V O S

1.-GENERAL

Demostrar que existen alteraciones en la función membranal, la integridad acrosomal y la viabilidad de los espermatozoides en pacientes con varicocele clínico y semen marginal.

2.- PARTICULARES

2.1 .Conocer los valores de los parámetros seminales: concentración espermática, movilidad y morfología de los espermatozoides en pacientes con varicocele.

2.2. Evaluar el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional integra por medio de la prueba hipoosmótica (HOST), en pacientes con varicocele.

2.3. Evaluar el porcentaje de espermatozoides con integridad acrosomal (empleando la técnica de triple tinción) (IA) en pacientes con varicocele.

2.4. Determinar el porcentaje de supervivencia (viabilidad) de los espermatozoides obtenidos de pacientes con varicocele a las 24 y 48h de ser capacitados.

2.5. Comparar todos los valores anteriores con un grupo de sujetos con fertilidad comprobada.

M E T O D O L O G I A

PACIENTES

1. Hombres infértiles de 25 a 45 años
2. Varicocele clínico corroborado por ultrasonido testicular
3. Que no presentaron otra patología que se asociara con infertilidad (tóxicos, infecciones, medicamentos, endocrinopatías)
4. Con análisis seminal dentro de los parámetros de la OMS que tengan alteración en uno solo de éstos: concentración espermática, movilidad total de los espermatozoides, porcentaje de formas normales de los espermatozoides.
5. Que desearon participar en el estudio.

NORMALES

1. Edad de 25 a 45 años
2. Seminograma normal (OMS)
3. Sin enfermedades sistémicas o localizadas en el aparato urogenital en los últimos seis meses.
4. Con pareja que se encuentre cursando dentro de las primeras 20 semanas de embarazo o que ya tengan hijos
5. Que no hayan tomado medicamentos en los últimos 6 meses
6. Que aceptaron participar en el estudio.

ANÁLISIS SEMINAL

Se estudiaron un total de 80 sujetos con edades de 25 a 45 años los cuales se dividieron en dos grupos, el primero se integró con los individuos que acudieron a la consulta de Andrología del Instituto Nacional de Perinatología por esterilidad primaria y semen anormal. En estos sujetos el diagnóstico de varicocele se corroboró mediante el ecosonograma testicular. Se excluyeron de este grupo a los sujetos con historia de infección genitourinaria, trauma testicular, orquido-epididimitis, alteraciones endocrinas del eje testicular, contacto con gonodotóxicos conocidos, exposición a altas temperaturas. El grupo 2 se formó con 40 individuos sanos (seminograma normal), con fertilidad probada; este grupo fue tomado de la consulta externa del mismo instituto entre las parejas que acudieron para solicitar atención perinatal y se incluyeron hombres sin enfermedades genitourinarias o sistémicas recientes. También se eliminaron del estudio a los sujetos con bacteriospermia o anticuerpos antiesperma mayor al 30%.

Las muestras de semen de los individuos estudiados se obtuvieron por masturbación en recipientes de plástico estériles no tóxicos, después de un período de abstinencia de 3 a 6 días. Estas muestras fueron incubadas a 37°C hasta su licuefacción para que posteriormente se realizara el análisis seminal completo de acuerdo con el criterio descrito por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1994), los parámetros a valorar fueron: volumen, color, viscosidad, movilidad, concentración, morfología y viabilidad.

MOVILIDAD:

Se analizó una alícuota de 10µL de semen en un portaobjetos de 25 X 75mm utilizando un cubreobjetos de 22 X 22mm. Se valoraron 100 espermatozoides para obtener el porcentaje de movilidad de cada grado. La movilidad del espermatozoide se clasificó en 4 grados:

Grado "A" o movilidad progresiva rápida, que comprende a los que atraviesan el campo con movimientos de traslación rápida y lineal.

Grado "B" ó movilidad progresiva lenta, incluye a los espermatozoides con movimientos lentos o aquellos que pese a moverse rápidamente no progresan en su movilidad.

Grado "C" o con movilidad no progresiva, son aquellos que se mueven en su lugar.

Grado "D" comprende a los inmóviles que a través de estudios de viabilidad puede diferenciar a los vivos de los muertos. (Tildit et al., 1990)

Con los valores de movilidad se obtuvo la movilidad total (MT) y el índice de movilidad (IM)

$$MT = \%movilidad A + \%movilidad B + \%movilidad C$$

$$IM = \frac{\%movilidad A + \%movilidad B}{100}$$

MORFOLOGÍA:

Para observar la morfología de los espermatozoides se emplearon los portaobjetos Blustan (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) preteñidos con azul de metileno y acetato de violeta de cresilo en éste se aplicó de 3 a 5µL de muestra y se observó en objetivo de inmersión valorando 100 espermatozoides para clasificarlos en normales o con defectos de cabeza, del flagelo y de la pieza intermedia y con esto se obtuvo el porcentaje de formas normales (Menkveld, 1990) fig. 2.

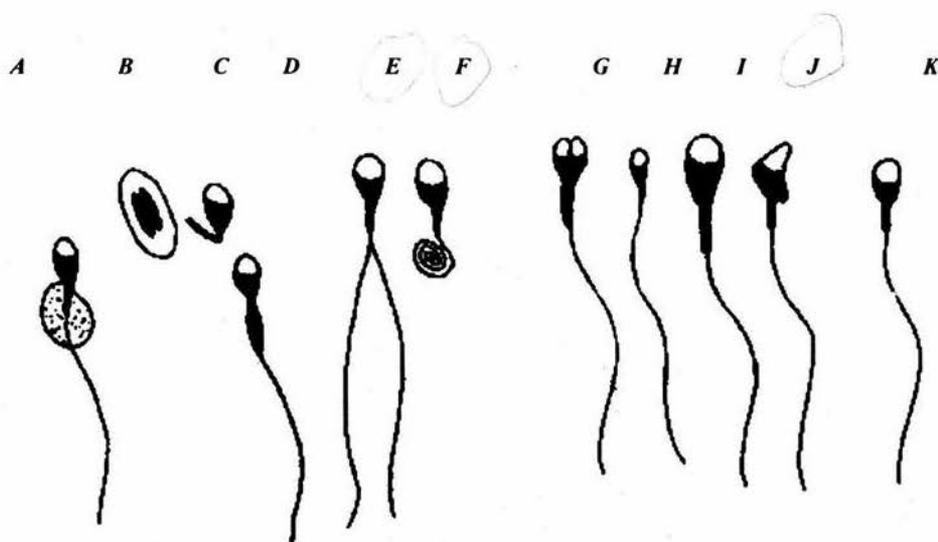


Fig. 2. Representación esquemática de la clasificación de la morfología. *A y D)* espermatozoide con defecto de pieza intermedia; *B y C)* células inmaduras; *E y F)* defectos de flagelo; *G-J)* diferentes tipos de anomalías de cabeza, *G)* cabeza doble, *H)* cabeza de alfiler, *I)* cabeza grande, *J)* cabeza amorfa y *K)* espermatozoide normal.

VIABILIDAD:

Solo se realizaron en muestras que tuvieron una movilidad total (MT) <60% (movilidad grado A + B + C). Esta consistió en colocar 10µL de semen y 10µL de eosina Y al 2% en PBS (solución salina amortiguadora con fosfatos) 0.1M pH 7.9. Se contaron 100 espermatozoides para diferenciar a los vivos sin teñir de los muertos teñidos.

RECUESTO DE ESPERMATOZOIDES :

La cuenta de espermatozoides se realizó mediante la lectura en la cámara de Neubauer utilizando diluciones en la muestra original con formaldehído al 3.5%.

Con los valores anteriores también obtuvo el índice de células recuperables (ICR) (Villanueva y col. 1993) por medio de la siguiente fórmula:

ICR = cuenta total X índice movilidad X formas normales.

cuenta total: volumen por densidad espermática

índice de movilidad: movilidad A + movilidad B/100

formas normales: porcentaje de morfología normal

Para evaluar la integridad funcional membranal y la integridad acrosomal se empleó la prueba hipoosmótica modificada de Jeyendran (1984) y la triple tinción de Talbot y Chacon (1981) respectivamente. La primera estudia de manera indirecta la integridad anatómico-funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides en relación al transporte selectivo de moléculas de bajo peso. La segunda identifica la viabilidad de la célula y la integridad anatómica del acrosoma por medio de una tinción. Ambas pruebas fueron estandarizadas y modificadas previamente. NO

PRUEBA HIPOOSMÓTICA

A 100µL de semen se le adicionó 1 mL de solución hipoosmótica (fructosa 0.15M y citrato de sodio 0.05M) posteriormente fueron incubados a 37°C por 30 min. Después de este periodo se

preparó una alicuota de 10 μ L en un portaobjetos, con un cubreobjetos de 22 X 22mm y se analizó de manera indirecta la integridad funcional de la membrana en respuesta a condiciones hiposmóticas (encurvamiento de flagelo) (fig. 3), valorando el número de espermatozoides con membrana íntegra o el encurvamiento del flagelo en 100 espermatozoides y se restaron a esta el valor previamente analizado en la muestra inicial (Jeyendran et al. 1984)

Jeyendran en 1984 demostró que cuando el espermatozoide se somete a condiciones hiposmóticas el flujo acuoso atraviesa la membrana, si ésta se encuentra íntegra, originando un aumento de volumen, fundamentalmente en el flagelo que parece ser la porción más susceptible a este fenómeno. Mientras que los espermatozoides con alteraciones estructurales dejan pasar libremente el agua en ambas direcciones sin alterar su forma.

Esta prueba valora el porcentaje de espermatozoides que presentan integridad funcional de membrana al ser sometidos a condiciones hiposmóticas

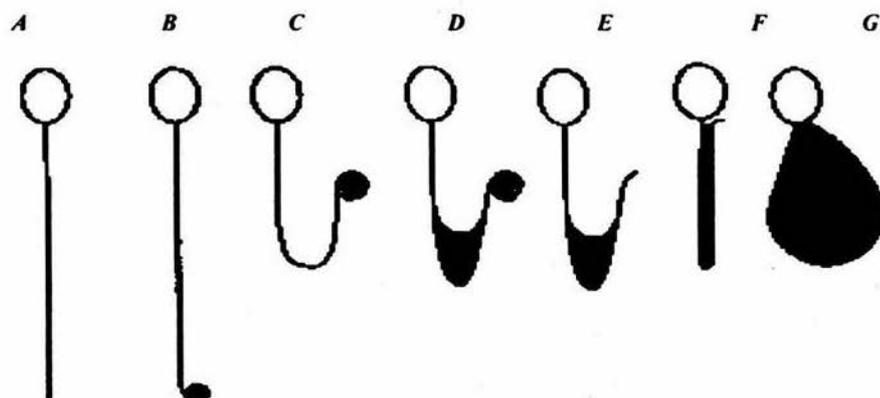


Fig. 3. Representación esquemática de la integridad funcional de la membrana del espermatozoide humano al ser sometido a condiciones hiposmóticas. A espermatozoide con membrana funcional alterada (deja pasar libremente el flujo acuoso); B, C, D, E, F, G, muestra los diferentes tipos de encurvamiento del flagelo (de esta manera se observa el flagelo de los espermatozoides cuando su membrana se encuentra íntegra, ya que no deja pasar libremente el agua, provocando así hinchazón del flagelo que es la porción más susceptible a este fenómeno).

INTEGRIDAD ACROSOMAL

La integridad acrosomal fue valorada empleando el método de triple tinción (Talbot y Chacon, 1981) el cual consistió en colocar en un tubo cónico volumen a volumen de muestra de semen y azul de tripan al 2% durante 15min a 37°C, posteriormente se fijó con glutaraldehído al 3% en amortiguador de cacodilato 0.01M pH 7.4 para ser centrifugado 5min. a 1200 r.p.m. A la pastilla se le adicionó 1 mL de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) 0.1M pH7.4 para eliminar el exceso de colorante. Con el paquete celular se realizaron los frotis para que se dejaran secar a temperatura ambiente y se tiñó con café Bismark (0.8%) a 40°C por 5min y con rosa de bengala (0.8%) 1 min a temperatura ambiente. Al final de este proceso se contó en el microscopio de campo claro en el objetivo de inmersión 100 espermatozoides, clasificándolos en aquellos que presentaron acrosoma intacto (teñidos de rosa en la región acrosomal) y los que presentaron acrosoma degenerativo (no se tiñe la región acrosomal). (fig. 4)

Esta prueba valora el porcentaje de espermatozoides que presentan el acrosoma integro.

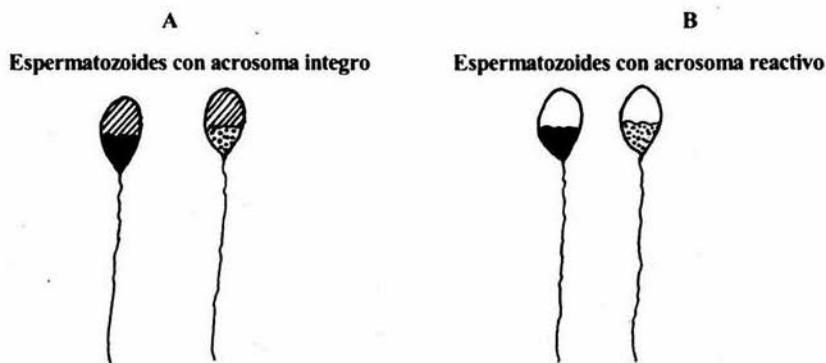


Fig 4. Muestra esquemáticamente la integridad acrosomal del espermatozoide humano. A) espermatozoides con acrosoma intacto, B) espermatozoides con acrosoma reactivo.

■ azul ■ café ▨ rosa □ transparente

SUPERVIVENCIA

Después del análisis seminal previo se adicionó volumen a volumen de semen y albúmina humana al 5% diluida con fluido tubarico humano (HTF) se mezcló perfectamente y se colocó en una columna de percoll (70, 50, 30%) de 300 μ L a 1 mL; ésto se centrifugó a 1700 r.p.m. por 13 min. Al paquete celular se le agregó cuidadosamente por las paredes 500 μ L de albúmina humana al 5% ,el tubo se inclinó en un ángulo de 45° y se dejo incubar por 45 min, después de este tiempo se separó un 70% del sobrenadante y se mezcló para tomar 10 μ L de la muestra en un portaobjetos de 25 X 75mm con cubreobjetos de 22 X 22mm en la cual se valoró la movilidad y la densidad espermática. La muestra se ajustó a 5 millones por mL y se valoro a la 24 y 48 hrs. (Florence et al, 1992; OMS, 1994).

Nota: los valores normales de los parámetros seminales se encuentran en el apéndice I

ANÁLISIS ESTADÍSTICO : Se les realizaron medidas estadísticas descriptivas a ambos grupos y las diferencias entre ambos grupos se analizaron con la prueba de U de Mann-Whitney.

RESULTADOS

Los datos clínicos de los pacientes estudiados se presentan en la tabla 1. El 72% de los pacientes tuvieron varicocele izquierdo, 22% presentaron lesión bilateral y 5% varicocele derecho, ver gráfica 1. No se encontraron diferencias significativas en el volumen testicular total entre los dos grupos ni entre ambos testículos en los pacientes con varicocele, gráfica 2. La concentración sérica basal de FSH fue más alta en pacientes con varicocele (4.97 ± 3.24 mIU/mL) que en el grupo control (4.42 ± 2.14 mIU/mL), pero esta diferencia no fue significativa ($p=0.07$). Por otra parte no se encontró ninguna correlación entre el nivel de FSH sérico y el volumen testicular ($r=0.21$).

Los resultados del análisis seminal de ambos grupos se presentan en la tabla 2. El promedio de la concentración de espermatozoides por mL de semen de los sujetos normales fue de $93.52 \pm 24.32 \times 10^6$ /mL mientras que el de los pacientes con varicocele fue de $56.14 \pm 37.63 \times 10^6$ /mL, ver gráfica 3; la movilidad total en los pacientes con varicocele fue de 60.35 ± 12.35 % y en el grupo control 79.80 ± 8.69 % ($p= 0.00001$). El porcentaje de espermatozoides normales fue menor en los pacientes con varicocele (32.87 ± 12.40 %) que en los individuos normales con fertilidad probada (65.88 ± 23 %) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.00001$), gráfica 4.

El porcentaje de movilidad progresiva (IM= movilidad tipo A + movilidad tipo B/100) mostró diferencias significativas entre los dos grupos de estudio (tabla 3). En los pacientes con varicocele clínico el índice de movilidad fue de 35.83 ± 26.32 % y en los sujetos con fertilidad probada de 77.55 ± 32 % ($p= 0.0001$). (gráfica 4)

Con los valores de la cuenta total de espermatozoides por eyaculado, los valores del índice de movilidad y el porcentaje de espermatozoides normales es posible establecer una medida mas uniforme de la calidad seminal. La calidad seminal global valorada por el índice de células recuperables (ICR= cuenta total X índice de movilidad X formas normales) es un cálculo estadístico del total de espermatozoides potencialmente fértiles en el semen. En los pacientes con varicocele el ICR fue significativamente menor ($p= 0.00001$) que en los hombre sanos con fertilidad probada (25.96 ± 43.99 vs $176.44 \pm 133.48 \times 10^6$). (gráfica 5)

Los datos de las pruebas funcionales se describen en la tabla 3. La integridad funcional de la membrana y la integridad anatómica del acrosoma, estudiada por la prueba de HOST y la técnica de triple tinción respectivamente, mostraron diferencias entre los grupos estudiados. El valor de la prueba hiposmótica en los pacientes con varicocele fue de 43.93 ± 20.7 % de encurvamiento del flagelo, mientras que en los hombres fértiles esto fue de 79.55 ± 5.85 % de encurvamiento del flagelo ($p < 0.001$). El porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto en el grupo 1 (experimental) fue 68.29 ± 17.09 % y en el grupo 2 (control) 87.22 ± 11.44 % ($p < 0.001$), gráfica 6.

La supervivencia de los espermatozoides de los pacientes con varicocele fue disminuyendo en comparación con los hombre fértiles, gráfica 7. A las 24 horas la movilidad declinó un 32% en los pacientes del grupo 1 mientras que la movilidad progresiva del grupo 2 solo disminuyó en un 15% ($p < 0.001$). A las 48 horas la movilidad progresiva de los pacientes con varicocele fue 37% y en los hombres normales 73% ($p < 0.001$).

El análisis de correlación de las variables estudiadas en estos pacientes son presentadas de la gráfica 8 a 11. Se puede observar una alta correlación entre la morfología espermática y la prueba hiposmótica ($r = 0.69$) (gráfica 8 y 9) y entre la prueba hiposmótica y el índice de movilidad ($r = 0.85$) (gráfica 10 y 11), pero solo fue en los pacientes con varicocele. En los pacientes normales con fertilidad comprobada el grado de correlación de las variables estudiadas fue 0.46 y 0.49 respectivamente.

TABLA 1. Características clínicas de los pacientes con varicocele estudiados. Se presenta la localización testicular del varicocele, el volumen testicular y el valor de FSH sérica basal. (estos datos fueron tomados de los expedientes clínicos de los sujetos en estudio).

LOCALIZACIÓN DEL VARICOCELE TESTICULAR			VOLUMEN TESTICULAR (mm)			FSH (μ IU/mL)
IZQUIERDO	DERECHO	BILATERAL	IZQUIERDO	DERECHO	TOTAL	
72%	5%	22%	11.71	11.81	23.52	4.97 \pm 3.24
			\pm	\pm	\pm	
			4.53	5.86	9.54	

Nota: se representa la media y la desviación estándar ($X \pm D.E$) de 40 individuos con varicocele.

TABLA 2. Características de los parámetros seminales en individuos con varicocele y en sujetos normale.

GRUPO	CONCENTRACIÓN	MOV. TOTAL (%)	MORFOLOGÍA
	ESPERMÁTICA MILLONES/mL		(porcentaje de formas normales)
VARICOCELE (n=40)	56.14 \pm 37.63 *	60.35 \pm 12.35	32.87 \pm 12.40 *
CONTROL (n=40)	93.52 \pm 24.32	79.80 \pm 8.69	65.88 \pm 23

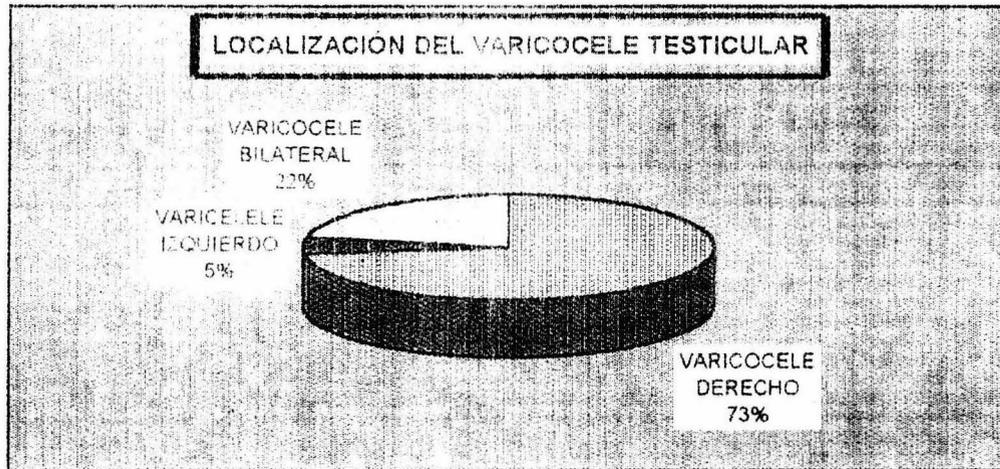
Nota: los datos se presentan en $X \pm D.E$. Los asteriscos nos indican que hubieron diferencias significativas de los individuos con varicocele con respecto al control ($p \leq 0.00001$)

TABLA 3. Valores de las pruebas funcionales de sujetos normales y pacientes con varicocele. Se presenta los valores de movilidad progresiva y el índice de células recuperables (ICR).

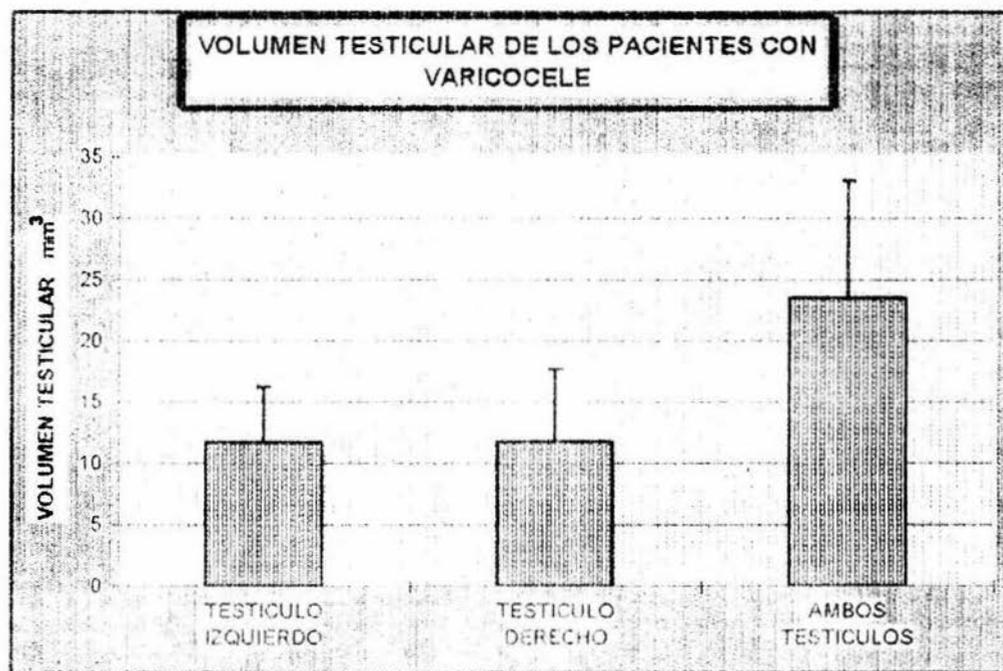
GRUPO	ÍNDICE MOV. PORCENTAJE	ICR (X 10 ⁶)	PRUEBA	INTEGRIDAD
			HIPOOSMÓTICA PORCENTAJE	ACROSOMAL PORCENTAJE
VARICOCELE (n=40)	35.83 ± 26.32*	25.96 ± 43.99*	43.93 ± 20.07*	68.29 ± 17.09
CONTROL (n=40)	77.55 ± 32	176.44 ± 133.48	79.55 ± 5.85	87.22 ± 11.44

Nota: todos los datos se presentan en X ± D.E. Los asteriscos nos indican que hubo diferencias significativas con respecto al grupo control. (p= 0.0001).

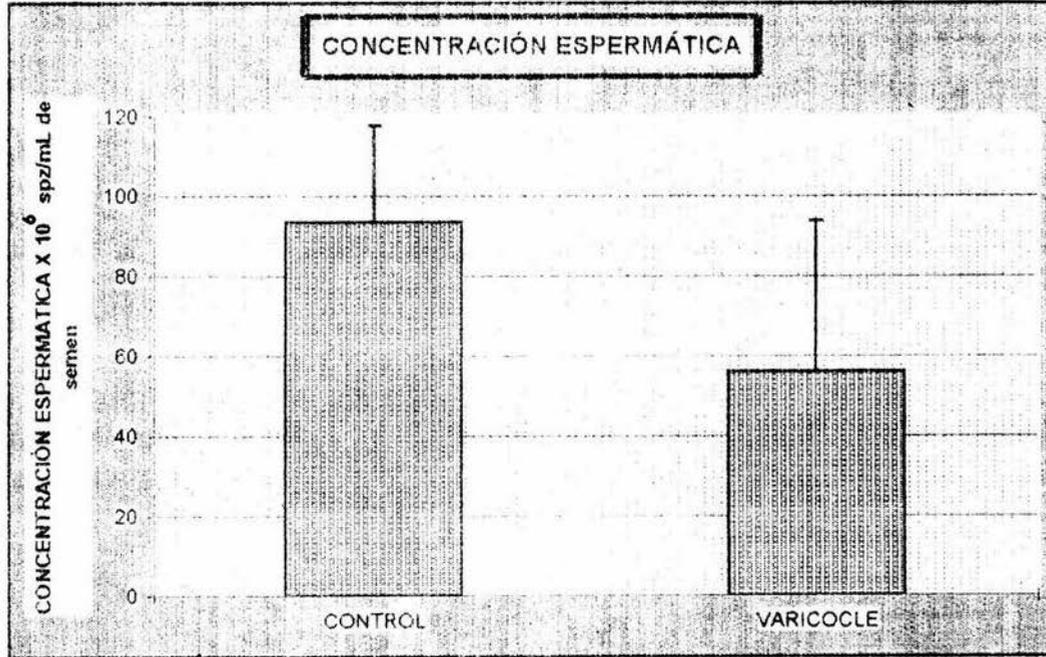
ICR=es en número total de espermatozoides por eyaculado potencialmente fértiles.



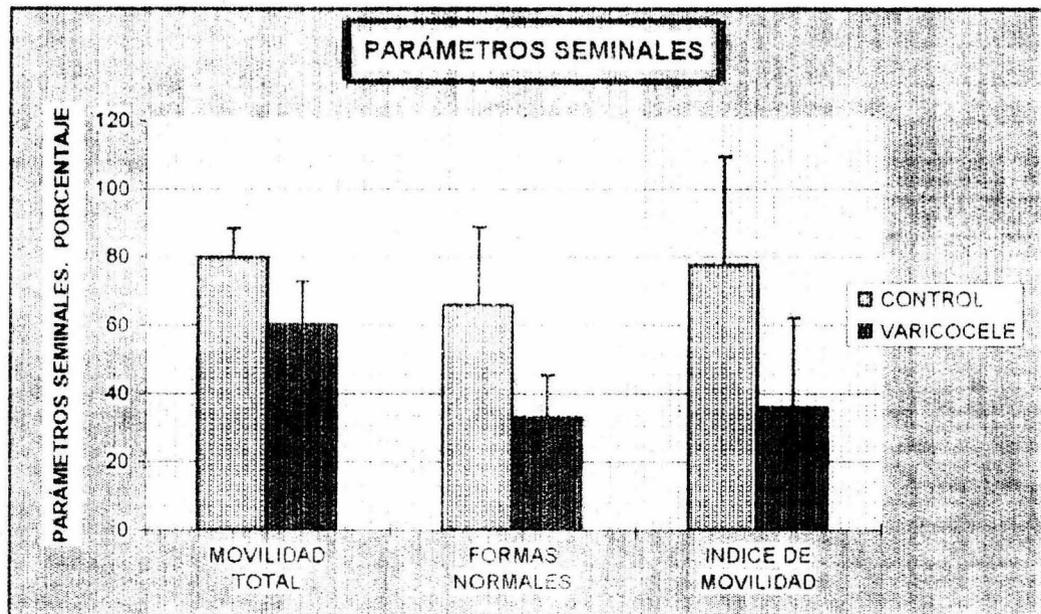
Grafica 1. Localización del varicocele testicular en los pacientes estudiados, observando que predomina el varicocele izquierdo.



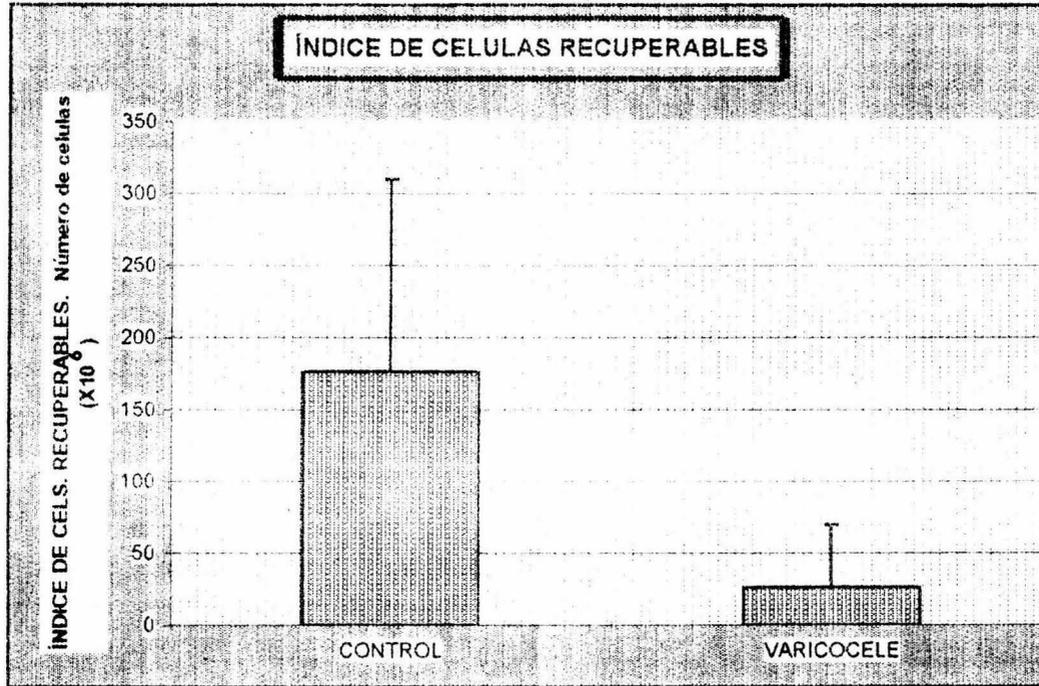
Gráfica 2. Volumen de los testículos de los pacientes afectados con varicocele. Los valores se presentan en $X \pm D.E.$ de 40 individuos.



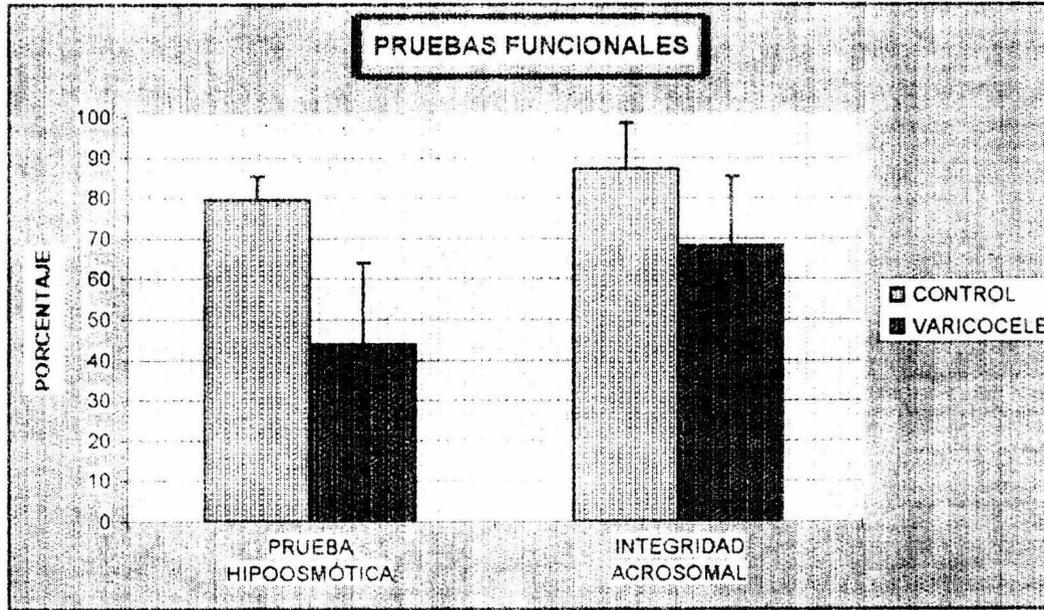
Gráfica 3. Concentración espermática de ambos grupos. Representa la $X \pm D.E$ de los sujetos con varicocele ($n=40$) y los normales ($n=40$). Observando una diferencia significativa



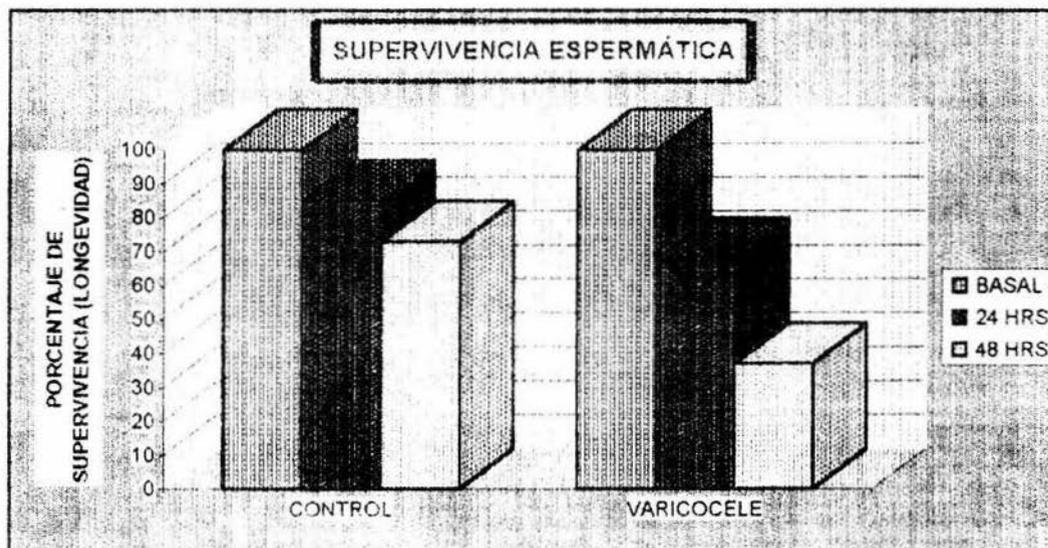
Gráfica 4 Parámetros seminales. Se representa la $\bar{X} \pm D.E$ de pacientes con varicocele (n=40) y del grupo control (n=40). Observando diferencias significativas en el porcentaje de formas normales y en el índice de movilidad ($p=0.00001$).



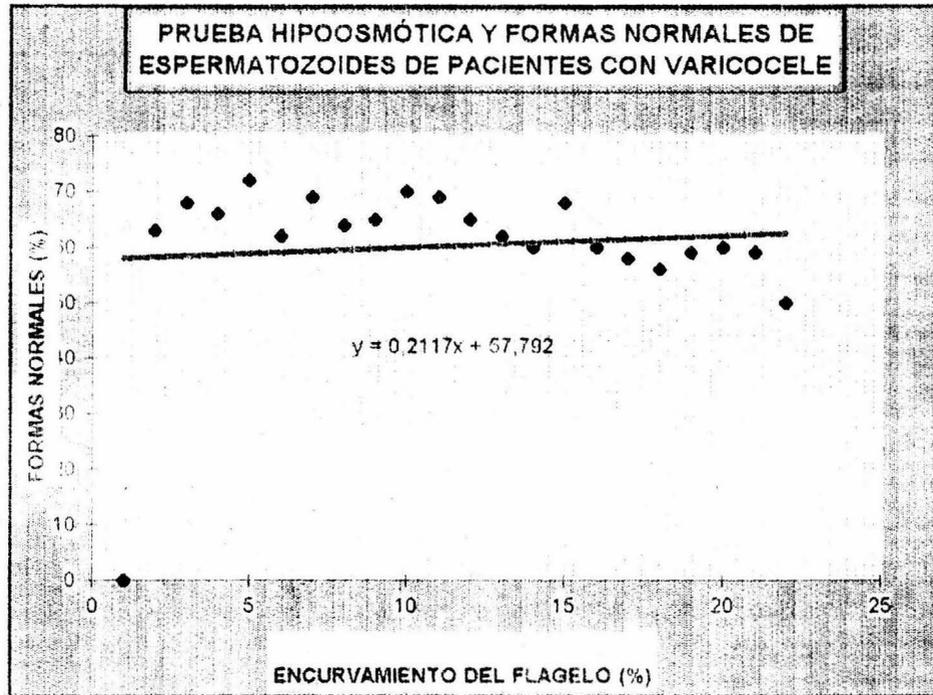
Gráfica 5. Índice de células recuperables. Representa la cantidad de espermatozoides potencialmente fértiles por eyaculado de cada grupo (varicocele n=40; control n=40) ($X \pm D.E.$), observando diferencias significativas en ambos grupos ($p=0.00001$)



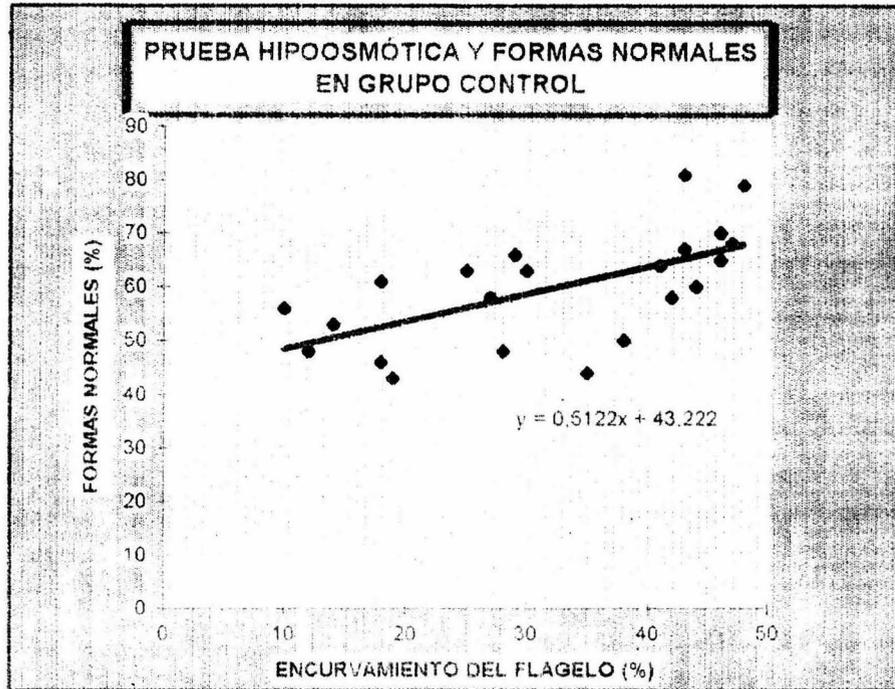
Gráfica 6. Pruebas funcionales. Representa los valores ($X \pm D.E$) de 40 individuos con varicocele y 40 Individuos normales con fertilidad probada. Se observa una diferencia significativa en los resultados de la prueba hipoosmótica ($p < 0.00001$).



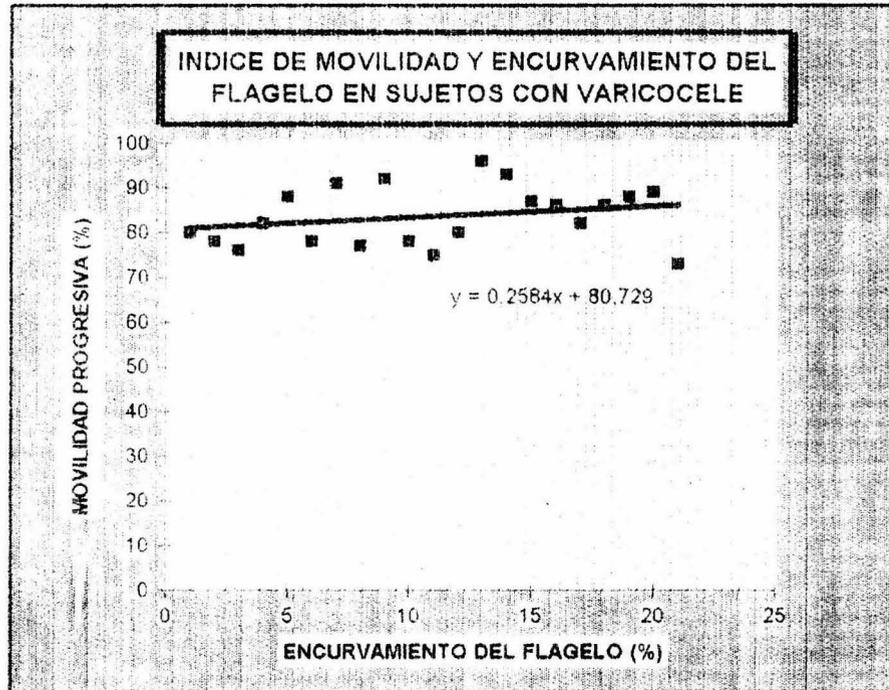
Gráfica 7. Supervivencia espermática in vitro. Muestra el declive de los espermatozoides de sujetos con varicocele (n=40) en comparación con los sujetos normales (n=40), a las 24 y 48 horas de ser capacitados en condiciones in vitro.



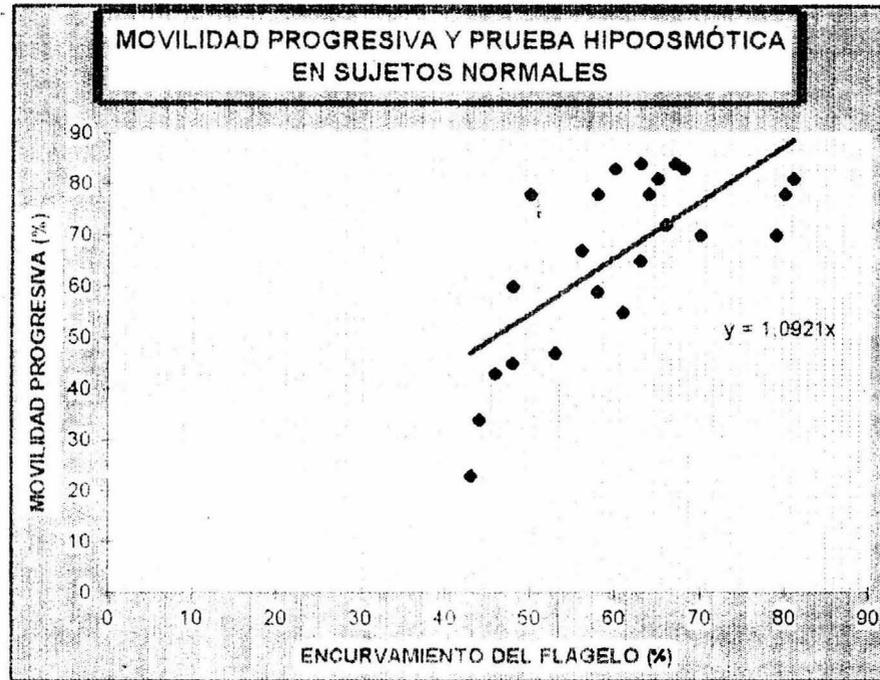
Gráfica 8. Correlación entre la prueba hipoosmótica y el porcentaje de formas normales de los espermatozoides de sujetos con varicocele.



Gráfica 9. Correlación entre la prueba hipoosmótica y las formas normales de los espermatozoides de sujetos normales con fertilidad comprobada.



Gráfica 10. Correlación entre la prueba hiposmótica y la movilidad progresiva en sujetos con varicocele.



Gráfica 11. Correlación entre la prueba hipoosmótica y la movilidad progresiva en sujetos normales con fertilidad comprobada.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este trabajo se describen los valores obtenidos en los parámetros seminales, así como en la prueba hipoosmótica (HOST), la integridad acrosomal (IA) y la prueba de viabilidad (supervivencia) in vitro del espermatozoide, en un grupo selecto de pacientes con varicocele, comparándolos con hombres normales con fertilidad probada. Todos los pacientes que presentaron varicocele clínico con o sin aparente causa de infertilidad presentaron una densidad espermática de 56 millones/mL y una movilidad total de 60%, lo que es muy similar a lo obtenido por otros autores (Lund y Sorensen en 1995). Clínicamente estos sujetos no revelaron alguna otra causa de infertilidad que no sea la del varicocele, cabe mencionar que sus cónyuges son aparentemente fértiles aunque emplearon durante 2 años aproximadamente algún tipo de anticonceptivo.

La concentración espermática y la movilidad total en estos pacientes con varicocele presentaron valores considerados como normales según los criterios establecido por la OMS. Sin embargo estos resultados fueron significativamente menores que los obtenidos por el grupo control, estos se puede apreciar claramente en la gráfica 3 y 4. La densidad espermática en hombres normales acorde a observaciones previas (Villanueva y col. 1993) fue arriba de 90 millones/mL y un ICR arriba de 176 millones. Es importante destacar que los resultados obtenidos en la proporción de espermatozoides con morfología normal (32.87%) están por debajo de los establecidos por la OMS, pero al compararlos con los obtenidos por otros autores para pacientes con varicocele son muy similares, esto se debe a que el varicocele ocasiona un daño en la función epididimaria, provocando una mala maduración de los espermatozoides principalmente en su morfología. Cuando persisten densidades espermáticas menores de 50 millones/mL o variaciones en la concentración espermática en ausencia de otros factores como periodos de abstinencia cortos, enfermedades febriles recientes, epididimitis, es un diagnostico importante para sospechar de un varicocele subclínico en la Clínica de Andrología del INPer.

La presencia de un alto porcentaje de formas anormales en los espermatozoides en estos pacientes (teratozoospermia) esta considerado ya en reportes previos por Aafjis en 1995. La principal alteración morfológica encontrada fue en la pieza intermedia, esta es una anomalía que puede estar relacionada con la inadecuada reabsorción de la gota citoplásmica; mientras que la baja movilidad presentada en estos pacientes se puede deber a la alteración en los mecanismos fisiológicos implicados en la formación de la membrana espermática así como en las proteínas funcionales relacionadas e implicadas en la movilidad del espermatozoide. Como estos dos procesos se llevan a cabo en el epidídimo, entonces las alteraciones ocasionadas se pueden asumir al impacto que ocasiona el varicocele en este órgano, ya que al exponer al epidídimo a altas temperaturas (que es lo que provoca de alguna manera el varicocele) se provoca un decremento en la calidad semina (Bedford, 1991).

Un mejor indicador para conocer el grado de severidad de la disfunción epidídimo/testicular puede ser calculado por medio del ICR, el cual relaciona a la cuenta total de espermatozoides con la movilidad progresiva (IM) y las formas normales espermáticas. Este índice representa el número total de espermatozoides potencialmente fértiles por eyaculado, y representa un mejor parámetro para valorar la fertilidad masculina y la calidad seminal de cada individuo. Sin embargo los resultados obtenidos en este estudio nos indican que existe un severo daño en estos pacientes, lo que muchas veces les llega a provocar infertilidad.

Como se ha reportado previamente, el ICR refleja de manera más fiel el impacto de los cambios en la movilidad y morfología espermática en la calidad global del semen. Como puede apreciarse, de haberse utilizado exclusivamente los criterios de definición de la fertilidad propuestos por la OMS solamente en un 30% de estos pacientes se habría identificado alguna anomalía seminal. Los criterios de la OMS, obtenidos a partir del intervalo de valores reportados como normales por diferentes laboratorios alrededor del mundo, no definen la capacidad fértil de los individuos. También puede observarse que los valores de la concentración espermática en sujetos con fertilidad probada oscila entre 60 y 150 millones/mL. Si se consideran estos valores como normales para la muestra, 40% de los pacientes con varicocele tuvieron concentración

espermática normal. Al observar la integridad funcional de la membrana espermática y la integridad acrosomal (HOST y triple tinción respectivamente) se aprecia que también mostraron alteraciones considerables en comparación con los sujetos normales con fertilidad probada (gráfica 6); y esto se debe como ya se explicó principalmente a los defectos o a la mala maduración de los espermatozoides al pasar por el epididimo, que es la porción más afectada por el varicocele y que se puede corroborar por estas pruebas. La valoración de la integridad de estas estructuras (membrana acrosomal y plasmática),son de suma importancia para evaluar la fertilidad, ya que son de muy bajo costo, y nos indica el que tan dañada se encuentra la membrana y de alguna manera su potencial para fertilizar al óvulo (Wolf y col., 1986).

Un aspecto interesante de este estudio es que se demostró el decremento en la capacidad de supervivencia del espermatozoide de individuos con varicocele, por medio de una prueba sencilla que se estandarizó en el laboratorio y que puede ser empleada como un análisis de rutina para cualquier laboratorio. Esta fue una prueba realizada in vitro, en la cual pudimos observar una clara disminución en la longevidad de los espermatozoides de sujetos con varicocele (gráfica 7) ya que a las 24 y 48 horas, está declino significativamente en comparación con los sujetos normales. Con estos resultados podemos suponer que pasa con el decline de los espermatozoides que pasan por el tracto genital femenino y si de alguna manera pueden alcanzar a llegar al óvulo y poder fecundarlo, también con esta prueba se puede sugerir que por la baja capacidad de supervivencia de estos espermatozoides no pueden llegar a fertilizar al gameto femenino y lo cual esta relacionado con la condición de infertilidad o subfertilidad.

Algunos autores han estudiado el potencial fértil de los individuos con varicocele por medio del ensayo de la fertilización del ovocito de hámster y han demostrado que la capacidad funcional de los espermatozoides de estos sujetos mejora posterior al tratamiento quirúrgico (Margalioth, 1983): sin embargo la prueba de penetración del ovocito de hámster es una prueba costosa, no fácilmente accesible y que por el momento no se ha validado.

En lo que se refiere a la correlación de las pruebas funcionales con los parámetros seminales

solo se pudo observar una buena correlación entre la prueba hiposmótica y la movilidad progresiva ($r= 0.85$) y entre la prueba hiposmótica y el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales ($r= 0.69$), pero solo en los pacientes con varicocele se observa más claramente. Esto se debe a que la movilidad de los espermatozoides de alguna manera también depende en parte de compuestos que atraviesan la membrana y así la prueba hiposmótica nos indica la integridad de su membrana y su funcionalidad, entonces si su membrana se encuentra íntegra su movilidad progresiva tiene que estar bien. Aunque la movilidad no solo depende del transporte en la membrana, también depende del metabolismo espermático, así como de la buena función de los microtúbulos y de las fibras del flagelo que de alguna manera participan en la movilidad del espermatozoide. Esto puede explicar en parte la correlación que existe entre la prueba hiposmótica y la movilidad ya que si la movilidad es menor la HOST tienen que ser menor. Esto ya fue reportado en estudios previos por Jeyendran y cols. en 1984, observando resultados similares.

Con los datos presentados solo se puede concluir que existen una serie de anomalías subclínicas de la función espermática, algunos se pueden relacionar con la deficiencia para interactuar con el mucus cervical y en la migración por el tracto genital femenino y además estar implicadas con la interacción esperma-ovocito., puede esto explicar la subfertilidad de los pacientes con varicocele. Estas pruebas sencillas realizadas en el laboratorio puede constituir una alternativa menos sofisticada que nos valide la fertilidad y pueda proporcionar un pronóstico clínico para estos pacientes u otros y que nos de una idea más exacta del problema de subfertilidad ó infertilidad masculina

CONCLUSIONES

En los pacientes con varicocele con características aparentemente normal se encontró una disminución importante de la movilidad progresiva, un mayor porcentaje de espermatozoides anormales y menor proporción de espermatozoides con membrana funcional integra y acrosoma intacto. También se demostró que los espermatozoides de estos pacientes tienen su longevidad disminuida en comparación a los individuos sanos con fertilidad probada, además se observó que aunque tengan parámetros considerados dentro de los normales según el criterio de la OMS su supervivencia declina considerablemente.

Las alteraciones en la movilidad y morfología espermática se reflejaron en el cálculo del índice de células potencialmente fértiles ya que en el ICR fue aproximadamente del 15% del que se encontró en los sujetos normales.

El análisis sistemático de la calidad de movimiento de los espermatozoides para el diagnóstico de infertilidad masculina es también de gran ayuda debido a que tiene mayor sensibilidad que la movilidad total.

Los pacientes con varicocele tienen un menor porcentaje de espermatozoides con membrana funcional integra. La significancia clínica de estos resultados resalta si se considera que la prueba de integridad membranal (prueba hipoosmótica) se relaciona con la tasa de fertilización en los programas de reproducción asistida (Zaneveld y col., 1990).

Además con los resultados de la prueba de integridad membranal ó prueba hipoosmótica apoyan la idea de que uno de los sitios anatómicos de impacto del varicocele es el epidídimo ya que es en este sitio donde se lleva a cabo el remodelamiento de la membrana plasmática en los mamíferos (Jones y col., 1989).

La integridad anatómica del acrosoma ó integridad acrosomal, estudiado por la prueba de la triple tinción, también fue menor en los pacientes con varicocele. Esta podría relacionarse con una menor capacidad para la penetración de la zona pelúcida del óvulo lo cual contribuiría en la génesis de infertilidad de los pacientes con varicocele. Sin embargo, con los datos que arroja esta prueba no se puede demostrar que se encuentre alterada la funcionalidad del acrosoma ya que la prueba solamente mide la integridad de esta estructura.

Las pruebas de membrana e integridad acrosomal, no son costosas, no requieren de tecnología avanzada y pueden ser incorporadas al laboratorio de rutina para incrementar la sensibilidad del estudio del semen en la valoración de infertilidad masculina. Y algunos de estos índices funcionales espermáticos podrían ser de utilidad como pronósticos de la respuesta al tratamiento quirúrgico por lo cual se propone que deberían ser investigados en estudios epidemiológicos para definirlo.

Las alteraciones seminales en estos pacientes con varicocele clínico sugieren que la fertilidad puede disminuir por diferentes mecanismos, algunos de los cuales se pudieran relacionar con el transporte espermático y sobrevivencia de los espermatozoides en el tracto genital femenino y otros con la unión/penetración de la zona pelúcida y la fusión membranal del ovocito..

BIBLIOGRAFIA

- Aafjis JH, Van der Vijner JCM: Fertility of men with and without a varicocele. *Fertil Steril*. 1985; 43: 901-908
- Al-Juburi A., Pranikoff K., Dougherty KA.: Alteration of semen quality in dogs after creation of varicocele. *Urology*. 1979; 13:535.
- Baccetti B, Bemieri G, Burrin AG, Capitani S, Collodel G, Miroll M, Pimboni P, Renier T: Noulae seminologicae. Mathematical evaluation of submicroscopical alterations in spermatozoa of steril men with varicocele. *Androl*, 1995; 27(1):7-13.
- Bedford JM., Yanagimachi R: Epididymal storage at abdominal temperature reduces the time required for capacitation of hamster spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1991; 91:403-410.
- Bennett WH. Varicocele, particularly with reference to its radical cure. *Lancet*, 1989; 1:261
- Cameron DF, Snyder FE, Ross MH: Ultrastructural alterations in the adluminal testicular compartment in men with varicocele. *Fertil Steril* 1980; 33:526
- Chakraborty J, Nelson C, Jhunjhunwala J: Alteration in fine morphology of human germinal epithelium in presence of varicocele (abstract). *Society for the Study of Reproduction. 9th Annual meeting 1976.*
- Chan SYW, Fox J, Chan MMC, Tsoi W, Tang LCM, Tang GWK, Ho P: The relationship between the human sperm hyposmotic swelling test, routine semen analysis and the human zona-free hamster ovum penetration test. *Fertil Steril* 1985; 44:668

Cheval MJ, Purcell MH: Deterioration of semen parameters over time in men with untreated varicocele: evidence of progressive testicular damage. *Fertil Steril* 1992; 57:174-177.

Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JI, Hartmann PE: A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge relationship to fertility and other seminal parameter. *J. Androl* 1991; 12:98-103.

Curling TB: A practical treatise on the diseases of testis and the Spermatic cord and scrotum. *Blanchard and Lea. 1856, Philadelphia*

Dubin L y Amelar RD: Etiologic factors in 1294 consecutive causes of male infertility. *Fertil Steril* 1971; 22:469-472.

Dubin L, Hotchkiss RR: Testis biopsy in subfertile men with varicocele. *Fertil Steril* 1969; 20-50.

Florence LH, De Yi Liu HW, Gordon Bakeer: Comparison of Percoll, Mini Percoll and Swim-up Methods for sperm preparation from abnormal semen. *Hum Reprod* 1992; 7(2):261-266.

Gorelick JI, Goldstein M: Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil Steril* 1993; 59(3):613-616

Harrison RM, Lewis RW, Roberts JA: Pathophysiology of varicocele in nonhuman primates: long-term seminal and testicular Changer. *Fertil Steril* 1986; 46:500-510.

Jeyendran RS, Van der Ven HM, Perez-Pelaez M, Gravo BG, Zaneveld LJD: Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J.Reprod Fertil* 1984; 70:219-228.

Johnsen SG, Agger P: Quantitative evaluation of testicular biopsies before and after operation for varicocele. *Fertil Steril* 1978; 29:58.

- Jones R: Membrane remodeling during sperm maturation in the epididymis. *Oxford Rev Reprod Biol* 1989; 11:285-335
- Kay R, Alexander NJ, Baughamm WL: Induced varicoceles in Rhesus monkeys. *Fertil Steril* 1979; 31:195.
- Kennedy WP, Kaminski JM, Van der Ven HH, Jeyendran RS, Ried DS, Blackwell J, Bielfeld P, Zaneveld L.J.D. A simple clinical assay to evaluate the acrosin activity of human spermatozoa. *J Androl* 1989; 10:221-231.
- Lerchl A, Keck C, Spiteri -Grech J, Nieschlag E. Diurnal variation in scrotal temperature of normal men and patients with varicocele before and after treatment . *Int. J. Androl* 1993; 16:196-200.
- Lewis RW, Harrison RM: Diagnosis and treatment of varicocele. *Clin Obst Gynec*. 1982; 25:501-523.
- Lipshultz JI, Corriere JN: Progressive testicular atrophy in the varicocele patient. *J Urol* 1977; 117:175-176.
- Lund L, Sarensen HT : High educational level associated with reduced semen quality in men with asymptomatic varicocele testis. *Br J Urol* 1995; 71(1):7-25.
- MacLeod J: Seminal cytology in the presence of varicocele. *Fertil Steril* 1965; 16:735.
- Madgar I, Weissenberg R, Lunenfeld B, Karasik A, Goldwasser B: Controlled trial of high spermatic vein ligation for varicocele in infertile men. *Fertil Steril* 1995; 63(1): 120-124.
- Margalioth EJ, Navot D, Laufer N: Reduced fertilization rate of zone-free hamster ova by spermatozoa from male partners of normal infertile couples. *Arch Androl* 1983; 10:67
- Menkveld R, Stander FSH, Theunis JWK ,Thinus F, Kruger JA, Van Zl: The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* 1990; 5(5):586-592.

Mobley DF, Baum N, Carleton CE: Studies in Infertility: experimental models of varicocele in the dog. *Presented at the 71st Annual Meeting of the American Urological Association, Las Vegas Nevada. 1976.*

Nagler HM, Li XZ, Lizza EF, Deitch A, White RD: Varicocele: temporal considerations. *J Urol 1985; 134:411-413.*

Organización Mundial de la Salud (1994) Manual del Laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical, 3ª edición, Ed. Panamericana, pp88

Peng BCH, Tomashefsky P, Nagler HM: The cofactor effect: Varicocele and infertility. *Fertil Steril. 1990; 54:143*

Pryor JL Jr, Howards SS: Varicocele. *Urologic Clinics of North America. 1987; 14:499-513.*

Russell JK: Varicocele, age and fertility. *Lancet. 1957; 2:222.*

Saypol DC: Varicocele. *J Androl. 1981; 2:61-71*

Saypol DC, Howards SS, Turner TT, Miler ED: Influence of surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature, and histology in adult rats and dogs. *J Clin Invest. 1981; 68:39-45.*

Spencer WG: Celso de Medicina [English translation]. Cambridge, MA Harvard Medical Press, 1938.

Talbot P, Chacon RS: A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J Exp Zool. 1981; 215:210-208.*

Tildit Y, Wright WH, Vafa O, Ord T, Asch RH, Bern MW: Force generated by human sperm correlated to velocity and determined using a laser generated optical trap. *Fertil Steril*. 1990; 53:944-947.

Turner TT, Jones CE, Roddy MS: Experimental varicocele does not affect the blood-testis barrier, epididymal electrolyte concentrations, or testicular blood gas concentration. *Biol Reprod* 1987; 36: 926-932.

Villanueva DC, Diaz PM, Villegas CH, Pineda FJ, Alvarado DA: Indice de células recuperables del semen: ¿Indicador de fertilidad?. *Ginec Obst Mex*; 1993:138-141.

Weiss DB, Abbu-Arafeh W, Bartoov B: Ultramorphological changes in sperm cells of infertile men with testicular varicocele. *Fertil Steril*; 1995; 27

Wolf DP, Lanzendorf SE: Fertilization in male. En: Dunbar BS, O'Rand MG (Eds): A comparative overview of mammalian fertilization. *Plenum, New York, 1991*, pp 385-400

World Health Organization. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. *Fertil Steril* 1992; 57:1289-1293.

Yavetz H, Levy R, Papo J, Yogev L, Paz G, Jaffa AJ, Homonnai ZT: Efficacy of varicocele embolization versus ligation of the left internal spermatic vein for improvement of sperm quality. *Int J Androl* 1992; 15: 338-344.

Zaneveld LJD, Jeyendran RS, Krajeski P: Hypo-osmotic swelling test. En Acosta A, Swanson R, Akerman S. (Eds): Human spermatozoa in assisted reproduction. *Williams & Wilkins, Baltimore MA, 1990*, pp 223-229

Zorgnoiotti AW, MacLeod J: Studies in temperature, human semen quality and varicocele. *Fertil Steril* 1973; 24:854.

APENDICE I

PARÁMETROS SEMINALES NORMALES DE ACUERDO AL CRITERIO DESCRITO POR LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1992

Volumen seminal:	1 A 6 mL
pH:	7.2 a 7.8
Color:	amarillo-grisáceo
Abstinencia sexual:	3 a 6 días
Concentración:	20 X 10 ⁶ A 250 X 10 ⁶ millones/mL
Movilidad Total:	> 40%
Movilidad Progresiva (IM)	
(total de A + B/100):	> 50% (0.50)
Movilidad Tipo A:	> 25%
Morfología:	> 40% de formas normales
Viabilidad:	> 40%
Bacterias:	presentes (+)

PRUEBA HIPOSMÓTICA

Normal:	>60% de encurvamiento del flagelo
Dudoso:	50-60% de encurvamiento del flagelo
Anormal:	<50% de encurvamiento del flagelo

INTEGRIDAD ACROSOMAL:

Normal:	>75% de integridad acrosomal
Anormal:	<74% de integridad acrosomal