

11204



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA
SUBDIRECCION DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION

7
2ep.

"ANALISIS DE LA QUIMIOTAXIS ESPERMATICA EN VARONES CON ASTENOZOOSPERMIA"

DR. ERNESIO CASTELAZO MORALES, ANTONIO ESPINOSA DE LOS MONTEROS M.,
DIRECTOR DE T E N S E N A N Z A PROFESOR TITULAR

PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION HUMANA
P R E S E N T A : DR. MARIO ALFREDO OSPINA MUÑOZ



ASESOR: DR. ALFONSO G. CARRERA RIVAPALACIO

INPer MEXICO, D. F.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

259064

1998

I



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Dedicatorias

**Al
Instituto Nacional de Perinatología**

Por los conocimientos adquiridos

A mis Maestros:

**Por la enseñanza recibida...
la mejor de las herencias**

**Al Doctor:
Alfonso Carrera R.**

**Por su amistad y su valiosa colaboración en la realización de
este trabajo.**

A mi Esposa:

Bélida

Sin su amor, comprensión y paciencia no hubiera sido posible la terminación de mi formación... Gracias!

A mis Padres:

Graciela y Jaime

por que solo quien te da la vida puede darte la fuerza y la confianza para continuar.

A mi Tía:

Teresa

**Por tu amor infinito, tu cariño incondicional...
y tu apoyo siempre presente.**

TABLA DE CONTENIDO

I.	Introducción.....	5
II.	Antecedentes Científicos.....	6
III.	Planteamiento Del Problema.....	12
IV.	Justificación.....	13
V.	Hipótesis.....	14
VI.	Objetivos.....	15
	1. General.....	15
	2. Específicos.....	15
VII.	Metodología.....	16
	1. Diseño del Estudio.....	16
	2. Criterios de Inclusión Generales.....	16
	3. Criterios de Inclusión Particulares.....	17
	4. Criterios de Exclusión.....	18
	5. Variables en Estudio.....	18
	6. Material.....	19
	7. Procedimiento Experimental.....	21
	8. Modelo Experimental.....	22
VIII.	Resultados.....	24
IX.	Discusión.....	30
X.	Conclusiones.....	33
X.	Bibliografía.....	34

I. Introducción:

Desde hace muchos años se tiene evidencia de la necesidad de una señal química para que se lleve a cabo la unión de los gametos en plantas y animales inferiores. Se trata de un requisito indispensable para asegurar la conservación de especies que se reproducen por fertilización externa. El gameto masculino tiene la capacidad de movimiento y este aspecto se ha conservado a través del desarrollo filogenético. Sin embargo, los mecanismos que intervienen en la modulación de la respuesta espermática a su medio externo dependen de las necesidades biológicas de cada especie.

En la última década ha existido mucho interés por definir la presencia de un efecto quimiotáctico en animales en los cuales la naturaleza a "asegurado" su contacto, a través de un sistema de transporte endógeno especializado. Actualmente parece claro que este encuentro no es producto de la coincidencia de los sistemas anatómicos involucrados. Por el contrario, hay una señal derivada del gameto estático o sus células que garantiza esta reunión. Aún más, se sabe que la respuesta quimiotáctica espermática humana no es homogénea ni total, pero sí dinámica y paulatina. Esto quiere decir, que involucra exclusivamente a una subpoblación de espermatozoides, y asegura así, que el huevo tenga un aporte constante de células para su fertilización.

En este trabajo se explora el potencial del fenómeno quimiotáctico para modular la respuesta espermática y se correlaciona con la movilidad espermática, parámetro pronóstico fundamental de la espermatobioscopia directa para inferir fecundación. Ya que en principio, sin movilidad espermática no existe aporte al sitio de fertilización ni penetración en la zona pelúcida. Para evaluar este efecto, se escogió inicialmente el índice de movilidad con la finalidad de clasificar dos categorías de pacientes que presentaban movilidad espermática anormal y contrastarles con un grupo control de pacientes con cinética espermática normal.

II. Antecedentes Científicos:

El encuentro de los gametos de manera interna o externa ha sido objeto de múltiples estudios. Es claro el papel que juega la quimiotaxis en especies animales y vegetales de fertilización externa ante la necesidad de un quimioatrayente, el cual es aportado por el ovocito para que se lleve a cabo el encuentro exitosamente.

La actividad de los espermatozoides de uncinaria marina y otros equinoides es promovida por péptidos que son secretados por ovocitos de la misma especie, habiéndose identificado más de 74 péptidos pertenecientes a cinco clases (Susuky et al., 1992). Es importante establecer la diferencia entre quimiotaxis y quimioquinesis, la primera es una respuesta de las células móviles a un gradiente de estímulo químico. Es decir, la modulación en la dirección de la respuesta del espermatozoide por un químico liberado por el huevo o sus células subyacentes (Eisenbach et al., 1992). La segunda es la activación inespecífica del movimiento de los espermatozoides.

En humanos, se ha investigado la presencia de quimiotaxis espermática al líquido folicular, que puede contener un quimioatrayente secretado por el huevo o las células subyacentes. Villanueva-Díaz y colaboradores mostraron evidencia experimental de la atracción química que el líquido folicular humano crudo ejerce sobre el espermatozoide (Villanueva-Días et al., 1990). Sin embargo, los resultados de estos estudios no son del todo concluyentes, presentando en algunos casos falta de respuesta al líquido folicular (Makler et al., 1992) a una respuesta masiva en el 70% de la población espermática (villanueva-Días et al., 1992). Estas discrepancias han sido dilucidadas por estudios que argumentan la variabilidad de respuesta espermática a un quimioatrayente (Cohen et al., 1994), en comparación con organismos de fertilización externa (Ward et al., 1985). Es decir, solamente una fracción de espermatozoides en un tiempo dado es capaz de responder al quimioatrayente. La transición de un estado fisiológico a otro presumiblemente no ocurre espontáneamente, si no que es mediada por cambios en el medio ambiente espermático. Esta transición ocurre de manera natural "in vivo" pero también, puede ser inducida artificialmente "in vitro". Por ejemplo, la capacitación es necesaria para fertilizar al huevo y crucial para la quimiotaxis (Makler et al., 1992; Villanueva-Días et al., 1992).

Los espermatozoides en el tracto genital femenino llevan a cabo un continuo proceso de adquisición y pérdida de la respuesta al atrayente. Por lo cual, siempre hay un número suficiente de espermatozoides en el tracto genital femenino con capacidad de responder al "llamado" (Cohen et al., 1994). Por otro lado, la inconsistencia en los resultados pueden ser debida a factores técnicos, que incluyen la dilución no apropiada del líquido folicular y la falta de distinción entre quimiotaxis y otros procesos que causan acumulación espermática (Eisenbach et al., 1994). En el primer caso la quimiotaxis es un proceso caracterizado por una estrecha ventana, que depende de la concentración del estimulante para que se inicie y pueda ser detectada (Cohen et al., 1994) La magnitud de la ventana es determinada por el umbral del receptor y las concentraciones de saturación para el estimulante específico. En el segundo caso, existe un reporte en donde se distingue y demuestra la presencia de quimiotaxis acompañada de incremento en la velocidad de los espermatozoides humanos (Rall et al., 1994) Consecuentemente, los ensayos de quimiotaxis son muy vulnerables a cualquier desviación de las condiciones fisiológicas y experimentales óptimas.

La falta aparente de un fenómeno de precontacto en la comunicación espermato-ovocito en el proceso de fertilización interna ha permitido proponer una hipótesis (Eisenbach et al., 1992) ante la presencia fisiológica de una población espermática heterogénea: algunos espermatozoides se encuentran listos para fertilizar el huevo, mientras que otros están prematuros o postmaduros. De acuerdo con esta hipótesis, la población de espermatozoides fertilizantes muestra un estado dinámico con pérdida gradual de su potencia, pero al mismo tiempo otros espermatozoides maduran y adquieren capacidad fertilizante. Después de la ovulación, solamente los espermatozoides en estado fertilizante son atraídos hacia el huevo, mientras los restantes son repelidos o inhibidos.

Algunas hipótesis basan la selección espermática en relación a su morfología (Mortimer et al., 1982). Mientras que otras, proponen que el eyaculado de los animales es polimórfico y adaptado a una variedad de roles (Baker et al., 1988)

Básicamente se han realizado dos tipos de estudios en mamíferos:

- a) quimiotaxis a péptidos sintéticos de la clase de *N-formyl-Met-Leu-Phe(N-formylmethinyl)* y,
- b) quimiotaxis al líquido folicular.

Los péptidos sintéticos son derivados de bacterias y se sabe que son atrayentes para los leucocitos (Schiffmann et al., 1975). La atracción de estos péptidos fue estudiada con espermatozoides de toros (Iqbal et al., 1980) y en

espermatozoides humanos (Gnessi., 1985) sin llegar a conclusiones firmes en relación a un efecto quimiotáctico real o sólo un fenómeno de "atrapamiento".

El primer estudio que presenta evidencia experimental de que el líquido folicular humano ejerce una atracción química sobre el espermatozoide se realizó en un modelo "*in vitro*" usando platos con una matriz de agarosa al 0.8% (Villanueva-Días., 1990), utilizada originalmente para el estudio de quimiotaxis en leucocitos o de células que se mueven lentamente en ensayos inmunológicos (Cutler, 1974). Este tipo de ensayo no era el método ideal para el estudio de estructuras de movimiento rápido, como los espermatozoides, debido a que su movilidad es fácilmente afectada por condiciones ambientales y artefactos durante cada prueba (Makler et al., 1992). Makler y colaboradores (1992) describen un modelo, en el que se sugiere un nuevo abordaje en la investigación de la quimiotaxis espermática. Así, se desarrolló una cámara sellada en la cual una muestra de espermatozoides puede ser mantenida y observada microscópicamente por largos periodos de tiempo, sin pérdida de líquidos por evaporación, además la muestra puede ser comprimida hasta 10 μm sin inducir alteraciones dentro del líquido examinado. La cámara se ensayo con líquido folicular y con N-formil, sustancias que las que se ha probado su efecto quimioatrayente. Curiosamente, en este ensayo no se demostró efecto quimiotáctico alguno con ninguno de los dos compuestos.

Villanueva-Díaz y colaboradores (1992) describen de igual forma un modelo para el estudio de la quimiotaxis espermática basado en un diseño de doble cámara, conectadas por un tubo de plástico que contenía una matriz de ácido hialurónico al 0.5% (el patrón de movilidad espermática en esta solución es similar al encontrado en el moco cervical [Ishijima et al., 1986]). Raitt y colaboradores (1992) cuestionan sus resultados debido a no poder distinguir entre quimiotaxis y quimioquinesis. En su trabajo se demuestra que el líquido folicular estimula ambas actividades: quimiotaxis y quimioquinesis, además de ser responsable de movimientos similares a la hiperactivación espermática. De igual forma, propone que los factores responsables de esta actividad deben ser (si es que son más de uno) no hidrofóbicos, con un tamaño menor de 10 kDa y aparentemente no es una proteína, pero si puede ser un péptido de cadena corta.

Actualmente se han identificado sustancias específicas que pueden actuar como quimioatrayentes. Villanueva-Díaz y colaboradores (1995) usando su modelo de doble cámara sugiere que la sustancia responsable en líquido folicular del efecto quimioatrayente debe ser un compuesto con propiedades

fisicoquímicas lipídicas, debido a su resistencia a la tripsina, termoestabilidad y bajo peso molecular. El experimento reveló que la progesterona, en concentraciones similares a las encontradas durante la ovulación, produjo una respuesta quimiotáctica no distinguible de la inducida por el líquido folicular maduro.

Por otro lado, se ha reportado que la progesterona puede iniciar la reacción acrosomal *in vitro* (Osman et al., 1989), al igual que estimular la capacitación de espermatozoides humanos y porcinos (Barboni et al., 1995). Evidencias recientes apoyan la teoría de que los efectos esteroideos no genómicos de varios tipos celulares son debidos a la interacción del esteroide con receptores de la membrana plasmática. El efecto de la progesterona sobre los espermatozoides de mamíferos también parece involucrar estos receptores. Ya que, la respuesta de los espermatozoides a la progesterona se inicia muy rápido para ser atribuida al mecanismo esteroideo clásico que incluye unión intracelular del complejo receptor/hormona a la cromatina y nueva síntesis proteica. En un trabajo reciente (Sabeur et al., 1996), se mostró evidencia de que la progesterona inicia la reacción acrosomal a través de un receptor de membrana plasmática en el espermatozoide. En este estudio, se investigó por análisis inmunoblot e inmunofluorescencia la habilidad del anticuerpo monoclonal C-262 (contra el dominio C-terminal de la unión esteroidea del receptor intracelular de progesterona) para detectar una proteína específica del espermatozoide humano y localizar tal proteína en una región específica del espermatozoide además de identificar si este anticuerpo podría bloquear específicamente los efectos mediados por la progesterona en la membrana plasmática del espermatozoide humano. Así, se identificó una proteína de 50-52 kDa como receptor de progesterona en la membrana plasmática.

El péptido atrial natriurético, fue identificado en células de la granulosa y ovocitos de mamíferos (Kim et al., 1992). Inicialmente se reportó su capacidad de inducir la reacción acrosomal en humanos (Anderson et al., 1992). Más adelante, se identificó como uno de los factores responsables de la actividad quimiotáctica del líquido folicular, al actuar a través de receptores para la guanilato ciclasa (Anderson et al., 1995). Se han identificado sitios de unión específicos en los espermatozoides humanos para este péptido (Silvestroni et al., 1992). Su localización en áreas de la pieza intermedia puede tener significado particular en relación a la actividad quimioatrayente del péptido natriurético atrial y/o su modulación de la movilidad espermática.

La Movilidad espermática es uno de los principales determinantes de fertilidad masculina (MacLeod et al., 1953; Hartman, 1965). Los espermatozoides con pobre movilidad no pueden penetrar a través del moco cervical y arribar al sitio de fertilización. La capacidad de movimiento flagelar activo es esencia para una adecuada función espermática y básica para su transporte en el tracto genital femenino y su contacto final con el ovocito. La movilidad del espermatozoide depende de un refinado aparato de locomoción denominado axonema, que si bien se ha conservado durante la evolución, no lo han hecho los mecanismos que inician y modulan su movimiento (Lipshultz and Howards., 1991).

La movilidad espermática anormal (astenozoospermia) como un desorden aislado puede existir hasta en 20% de las parejas que se atienden en clínicas de esterilidad y puede ser un factor significativo en otro 55% de pacientes en los que se presenta combinado con otras alteraciones espermáticas (Lipshultz, 1980).

El criterio usado para determinar astenozoospermia esta dado por un porcentaje de espermatozoides menor del 50% con progresión anterógrada categorías A (rápidos y lineales) y B (no lineales) o menos de 25% de espermatozoides con categoría A. En el laboratorio de andrología INPer, tras un intento de clasificar las subpoblaciones de pacientes con problemas de astenozoospermia, se ha calificado de manera arbitraria la alteración en diferentes grados usando los mismos criterios que la OMS establece. La astenozoospermia relativa se refiere a un índice de movilidad normal ($A+B/100 > 0.5$) con una movilidad tipo A menor de 25%; la astenozoospermia leve se refiere a un índice de movilidad de 0.30 a 0.50, la moderada con un índice de 0.20 a 0.29 y la severa menor de 0.19.

La astenozoospermia puede ser debida a un amplio rango de condiciones, incluyendo anomalías como infección de la vía seminal, varicocele, trastornos inmunitarios, disfunción epididimaria, alteraciones ultraestructurales espermáticas, alteraciones del plasma seminal e idiopática. La mayoría de estas condiciones son responsables de otras alteraciones seminales y generalmente se presentan en conjunto.

En la astenozoospermia como desorden aislado es importante descartar causas condicionadas por artefactos en el momento de la recolección o en las técnicas de análisis (Lipshultz and Howards, 1991). Una importante causa de astenozoospermia aislada es el síndrome de los cilios inmóviles, que en la mitad de los casos se asocia con situs inversus (síndrome de Kartagener) (Kartagener, 1933). Esta alteración es causada por una anomalía estructural de los cilios (Afzelius, 1976). Otra causa documentada de esta alteración es la deficiencia de

la proteína carboxil metilasa (Lipshultz and Howards). Si bien, existen reportes en los que no se encuentra asociación entre su disminución y la movilidad espermática. Por el momento, de cualquier manera, su uso se limita al campo de la investigación.

En la actualidad no existe ningún trabajo que investigue si existe alguna relación entre una movilidad espermática disminuida en grado leve y el movimiento direccional del espermatozoide hacia una fuente atrayente, mas aún cuando hablamos de un índice de movilidad normal, pero con una movilidad tipo A menor de 25%.

III. Planteamiento del Problema:

La movilidad espermática ha sido y es el mejor parámetro pronóstico de fertilización (MacLeod et al., 1953; Hartman, -1965). Las herramientas diagnósticas para definir entidades patológicas en astenozoospermia son poco específicas. Más aún, para definir la astenozoospermia la OMS reporta dos parámetros de medición dentro del análisis seminal. No se sabe, si la reducción de la movilidad A es característica de la astenozoospermia con la consecuente reducción del potencial fertilizante espermático. En tanto que, el índice de movilidad $(a+b/100)$ es el parámetro más sólido de pronóstico en la capacidad fertilizante. La duda resalta en la evaluación diagnóstica de los pacientes con astenozoospermia en donde la movilidad tipo A es menor a 25% con un índice de movilidad normal (>0.50). ¿Será una entidad diferente? o ¿Será una manifestación más leve de la enfermedad?, ¿Valdrá la pena monitorizarla clínicamente?.

Desde hace algún tiempo han aparecido en la literatura mundial, estudios que proponen la necesidad de conocer los mecanismos que intervienen en el encuentro de los gametos. De manera clara, se estableció que esto era un requisito indispensable en organismos con fertilización externa, pero no resultaba tan obvio para organismos, como los mamíferos, con un sistema interno encargado de asegurar el encuentro. En base a observaciones recientes, se ha demostrado que existe quimiotaxis espermática en organismos con fertilización interna, así como también, se han identificado sustancias específicas que cumplen con esta función. Será posible que en pacientes con astenozoospermia que difícilmente llegan al sitio de fertilización también manifiesten alteraciones en su movimiento quimiotáctico? o ¿el modelo de estudio de quimiotaxis mostrará diferencias entre estas dos entidades cuando se comparen con varones eupérmicos?. El siguiente paso es aplicar estos conocimientos a la clínica, empezando por evaluar la respuesta quimiotáctica espermática a un quimioatrayente específico (progesterona) en pacientes con astenozoospermia idiopática aislada relativa y leve en relación con pacientes sin alteración en los parámetros seminales sin olvidar si, ¿El modelo de doble cámara será útil para esta evaluación?.

IV. Justificación:

La movilidad espermática anormal (astenozoospermia), como desorden aislado, se observa en alrededor de 26% de los pacientes que se presentan para evaluación de subfertilidad y puede ser un factor significativo en otro 55% de pacientes, cuando se presenta junto con otras alteraciones seminales. A pesar de su frecuencia es poco lo que se sabe acerca de los factores que la condicionan y, por lo tanto, poco lo que se les puede ofrecer a estos pacientes. Más aún, se desconoce el significado real de los diferentes grados de astenozoospermia. Sobre todo, cuando hablamos de un índice de movilidad normal pero con progresión lineal rápida menor de 25% (astenozoospermia relativa). Se sabe de la capacidad inherente de movimiento de los espermatozoides para realizar un largo recorrido en busca de la unión con el otro gameto. La dirección y la velocidad de este viaje no es un fenómeno al azar, por el contrario, dependen de un adecuado gradiente químico para que se lleven a cabo en forma adecuada. Establecido esto, sería de importancia trascendente evaluar la capacidad de quimiotaxis de los espermatozoides con movilidad alterada en comparación con espermatozoides sin alteraciones. Las implicaciones clínicas serían importantes, no sólo para la evaluación del factor masculino, si no también para establecer una guía terapéutica más adecuada.

V. Hipótesis:

- 1.- Los pacientes astenozoopérmicos leves tienen una migración específica menor que la de los astenozoopérmicos relativos.
- 2.- Los pacientes astenozoopérmicos relativos tienen una migración específica menor comparados con pacientes euspermicos sanos.
- 3.- El índice de movilidad correlaciona positivamente con la migración específica del modelo de quimiotaxis de doble cámara.

VI. Objetivos

1.- GENERAL

Evaluar la quimiotaxis a progesterona en varones con astenozoospermia aislada idiopática.

2.- ESPECIFICOS

- a) Comparar la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de varones con astenozoospermia aislada idiopática relativa Vs leve mediante la utilización de un modelo de doble cámara de migración.
- b) Comparar la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de varones con astenozoospermia aislada idiopática relativa Vs controles euspermicos mediante la utilización de un modelo de doble cámara de migración.
- c) Correlacionar el índice de movilidad espermática con el resultado de migración específica de los mismos pacientes.

VII. Metodología

1.- DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio experimental en el que se incluyeron 29 pacientes de la clínica de andrología y del departamento de esterilidad e infertilidad del Instituto Nacional de Perinatología. Los pacientes se dividieron en tres grupos de acuerdo al índice de movilidad en 2 a 3 espermátobioscopías directas. El grupo control se formó de 10 pacientes con espermátobioscopia directa normal con un índice de movilidad mayor de 0.5 y una movilidad tipo A mayor de 25. El grupo con astenozoospermia relativa lo constituyeron pacientes con un índice de movilidad mayor de 0.5 pero con movilidad tipo A menor de 25 y, finalmente, el grupo con astenozoospermia leve se formó con pacientes con un índice de movilidad de 0.25 a 0.50

Todas las espermátobioscopias fueron evaluadas de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud. En la recolección de las muestras se usaron las siguientes normas:

- a) Abstinencia sexual de 3 a 6 días
- b) Eliminar Orina
- c) Efectuar lavado genital con jabón y abundante agua
- d) Colectar la muestra por masturbación únicamente.
- e) Depositarla en un recipiente provisto por el laboratorio
- f) El paciente debe ser instruido para que recolecte la muestra completa y no solo una porción de esta.
- g) Las muestras de semen deben ser mantuvieron a 33°C inmediatamente después de la recolección.
- h) Se permitió que el semen se licuara durante 60 minutos después de la eyaculación.
- k) Posterior a la licuefacción, el semen es transferido a un tubo cónico de plástico estéril de 15 ml usando una pipeta Pasteur. Las alícuotas se obtuvieron para examen después de haber medido el volumen total y haber mezclado el semen de manera gentil.

2.- CRITERIOS DE INCLUSION GENERALES

- a) Pacientes clínicamente sanos, con biometría hemática, examen general de orina y química sanguínea dentro de parámetros normales.

4.- CRITERIOS DE EXCLUSION

a) Pacientes portadores de enfermedad sistémica conocida, evaluados por exploración física y paraclínicos: biometría hemática, química sanguínea, exámen general de orina.

b) Pacientes con una alteración diferente a la astenozoospermia en el seminograma: oligozoospermia (densidad espermática menor de $20 \times 10^6 / \text{ml}$); teratozoospermia (mayor de 70% de espermatozoides anormales)

c) Pacientes con espermocultivo o urocultivo positivos

d) Pacientes con evidencia de :

- Varicocele: diagnosticado por exploración física.
- Prueba de MAR positiva: más de 10% de anticuerpos antiespermatozoides
- Volumen testicular menor de 10 (calculado por la siguiente formula: $[\text{Dme}^2] \times [\text{Dma}^2] \times 4.188$)

5.- VARIABLES EN ESTUDIO

a) Variable Dependiente

- *Migración Específica:*

Definida como la diferencia entre el número de espermatozoides en las cámaras con progesterona versus los espermatozoides que migraron a las cámaras control.

B) Variables Independientes

- *Astenozoospermia Aislada Relativa Idiopática:*

Se refiere a un índice de movilidad espermática mayor de 0.50, con progresión lineal rápida (tipo A) menor de 25%. Sin otra alteración en los parámetros seminales de etiología desconocida.

- *Astenozoospermia Aislada Leve Idiopática:*

se refiere a un índice de movilidad espermática entre 0.25 y 0.50, sin otra alteración de los parámetros seminales de etiología desconocida.

C) Definiciones Operativas

• *Parámetros de movilidad espermática:*

Velocidad curvilínea (VCL) es calculada por la suma de las líneas rectas que unen posiciones secuenciales de la cabeza espermática a lo largo de su pista. Los valores serán reportados en micrómetros por segundo.

Velocidad en línea recta (VSL) es la velocidad lineal de la célula o "progresión". Se calcula como la distancia en una línea recta entre el inicio y el final de la pista observada. Se expresa en micrómetros por segundo.

Velocidad promedio (VAP) es la velocidad promedio calculada por el promedio de los puntos secuenciales de la cabeza espermática a lo largo de su pista. Los valores se reportan en micrómetros por segundo.

Movimiento lateral de la cabeza (ALH) se calcula por la media de las amplitudes de sus desviaciones laterales en relación al eje de progresión. Se reporta en micrómetros.

Frecuencia de batimiento flagelar (BCF) es el número de veces que una pista curvilínea cruza la pista promedio por unidad de tiempo. Se expresa en Hertz.

Linealidad (LIN) es el cociente de progresión espermática expresada como porcentaje y se calcula al dividir la $VSL/VCL \times 100$.

Rectitud (STR) es el cociente de progresión espermática expresada como porcentaje y se calcula al dividir la $VSL/VAP \times 100$.

6.- MATERIAL

a) Equipo:

- Recipientes colectores estériles de polipropileno con tapa de rosca
- Tubos cónicos de 15 ml de polipropileno con tapa de rosca
- Pipetas de transferencia estériles de polipropileno de 6 ml
- Pipetas automáticas de 10 a 100 μ l
- Pipetas automáticas de 100 a 1000 μ l
- Puntas respectivas para cada rango
- Hemocitómetro
- Cajas petri
- Tubos de 13 x 100 mm
- Gradilla para 40 tubos

- Portaobjetos de 22 x 22 y de 24 x 40 mm
- Aplicadores de madera
- Hamilton Thom IVOS 2000 V 7.0 computerized analyzer (Hamilton Thom Research, Beverly, MA)
- Sistema de doble cámara. (Villanueva-Díaz, 1992)
- Microscopio de campo claro o contraste de fase
- Contador de Células
- Centrífuga de mesa

b) Lista de reactivos

- 1.- Progesterona : SIGMA, Catálogo # P0130 de 5 gr.
- 2.- Albúmina sérica Humana: Bovina... SIGMA, Catálogo # A7034 de 100 ml
- 3.- Acido Hialurónico: SIGMA, Catálogo # H1751 de 100 mg.
- 4.- Dimetil Sulfoxido (DMSO): SIGMA, Catálogo # D5879 de 500 ml
- 5.- HEPES: SIGMA, Catálogo, # H3375 de 25 gr.
- 6.- Ham F-10: SIGMA, Catálogo, #66635 de 10 gr.

C) Preparación de reactivos:

• **Progesterona (10ug/ml.)**

- a.- Pesamos 0.0284 g de progesterona
- b.- Se coloca en 1 tubo estéril y se le agregan 2 ml de Dimetil sulfóxido (DMSO), concentración final de 14200 ugP₄/1 ml
- c.- Tomamos 7.04 ul del stock de progesterona y se afora a 10ml agregando 992.96 ul de albúmina al 10% en Ham F-10 (ya preparado)
- d.- Para preparar 10 ml de esta solución tomamos 70.4 ul del Stock II y le agregamos 9.929 ml de albúmina al 10% en Ham F-10, con lo que obtenemos la solución de trabajo. Por cada mililitro de esta solución tendremos 10 ug de progesterona.

• **Albúmina al 10% en Ham F-10**

Con una jeringa estéril se toma 4.5 ml de albúmina y se coloca en un tubo estéril y se toman después 5.5 ml de Ham F-10 que debe contener
- HEPES 21 mm

- Penicilina G 100,000 UI/lt
- Estreptomina 100,000 UI/lt

• **Solución. Stock Ac. Hialurónico al 0.5%**

- 1.- Se pesan 0.050 gr. de ácido hialurónico y le agregamos 5 ml de Ham F-10
- 2.- Esta solución se deja reposar 12 hs
- 3.- Se afora la solución a 10 ml con Ham F-10
- 4.- Se alicuota 1 ml en tubos ependorff y se refrigera

• **Ham F-10 + BSA al 1%:**

- 1.- Se pesa 0.1 gr albumina sérica bobina
- 2.- Aforar a 10 ml con Ham F-10

• **Gradientes de Optiprep (Nycodenz) + BSA al 1%:**

- 1.- Tomar 10 ml de Ficoll y le agregamos 0.10 gr.
- 2.- Para preparar el Nycodenz al 35%:
Tomar 3.5 ml del stock de nycodenz
Agregar 6.5 ml de Ham F-10 + BSA 1%
- 3.- Para preparar el Nycodenz al 15%:
Tomar 1.5 ml del stock de nycodenz
Agregar 8.5 ml de Ham F-10 + BSA 1%

7.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

- Preparación espermática por método de gradientes de nycodenz y sobrenadante:

- 1.- Se realizan los gradientes discontinuos de Nycodenz colocando Ficoll al 35% en el tubo e inmediatamente arriba Ficoll al 15%, finalmente se coloca con cuidado de no mezclar la muestra de semen (1 ml de cada uno)
- 2.- Centrifugar por 20 minutos a 1100 RPM (250 x g) a temperatura ambiente
- 3.- Resuspender pastilla en 1ml de Ham F-10 + BSA 1%
- 4.- Centrifugar por 5 minutos a 1100 RPM (250 x g) a temperatura ambiente
- 5.- Resuspender en 500 ml de Ham F-10 + BSA 1%

6.- Se realiza swim up agregando 500 μ l de Ham F-10 + BSA 1% al tubo cónico inclinado en un ángulo de 45 grados sin agitar.

10.- Se incuba por 45 minutos a 37°C.

11.- De la parte superior del tubo tomamos 300 μ l, de este tomamos una alícuota de 10 μ l y se diluye 1:10 con agua destilada para determinar concentración en el hemocitometro.

8. MODELO EXPERIMENTAL

La migración directa de los espermatozoides (quimiotaxis) en un gradiente de quimioatrayente (Progesterona) se estudió para cada uno de los siguientes grupos: astenozoospermia leve idiopática, astenozoospermia relativa idiopática, y grupo control sano de la siguiente manera:

(a) Se usó un sistema de doble cámara conectadas por un tubo de plástico lleno con 100 μ l de una solución de ácido hialurónico al 0.5% en medio de Ham F-10 (peso/Vol)

(b) La preparación se preincubó por 30 minutos a 37°C en una atmósfera controlada (5% de CO₂ en aire)

(c) Una alícuota de 10 μ l de una preparación que contendrá 0.75 x 10⁶ espermatozoide /ml serán depositados en el tubo de plástico y tanto los controles como las muestras experimentales fueron agregadas simultáneamente a las cámaras e incubadas por 10 minutos a 37°C.

(d) El experimento se detuvo extrayendo simultáneamente el líquido de ambas cámaras.

(e) Los líquidos de cada cámara se transfirieron separadamente a tubos cónicos de 12 x 75-mm y se centrifugaron por 10 minutos a 1500 x g a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó por aspiración.

(f) La pastilla será resuspendió en 1 ml de medio de Ham F-10

(g) Una alícuota de 10 μ l se contó en el hemocitómetro, los fluidos contenidos en cada tubo de plástico se analizaron usando el mismo procedimiento.

(h) Invariablemente las muestras se incluyeron por triplicado.

(i) La migración específica se calculó sustrayendo el número de espermatozoides en las cámaras con fluidos controles de espermatozoides que migraron a las cámaras con progesterona.

VIII. Resultados

En este estudio experimental, se incluyeron 29 pacientes estériles: 9 pacientes con diagnóstico seminal de astenozoospermia leve aislada idiopática (grupo I); 10 pacientes con diagnóstico seminal de astenozoospermia relativa idiopática (grupo II), 10 pacientes euspermicos, todos seleccionados de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (WHO., 1992). La edad promedio de los pacientes que ingresaron al estudio fue de 31 años, con un valor máximo de 41 y un valor mínimo de 24.

De los 29 pacientes que entraron al estudio en 14 se recolectaron datos en relación a determinaciones hormonales básicas: hormona luteinizante, hormona foliculo estimulante, estradiol, prolactina y testosterona (LH, FSH, E2, PRL, T). Así como también, índice de masa corporal, ultrasonido y exploración física testicular en relación a la presencia de varicocele; volúmenes testiculares y urocultivos. En todos los casos el periodo de abstinencia se encontró entre 2 y 5 días, el diagnóstico seminal se establecía por la presencia de al menos 2 espermaticidas directas. Las evaluaciones seminales fueron hechas de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud.

Los tres grupos de pacientes tenían las siguientes características al momento del estudio: a) Un espermocultivo negativo. b) Evaluación de anticuerpos antiesperma negativos por el método de reacción de antiglobulinas mixta. c) determinación de los patrones de cinética espermática: VAP, VCL, VSL, LIN, STR, ALH, BCF. D) Parámetros seminales normales (volumen, licuefacción, viscosidad, concentración, morfología).

El resultado del índice de movilidad determinó la asignación de los pacientes a uno de los tres grupos en estudio. En ningún paciente este índice fue menor de 0.25. Debido a que un índice de movilidad menor de al señalado pudiere ciertamente y tendenciosamente modificar la quimiotaxis espermática.

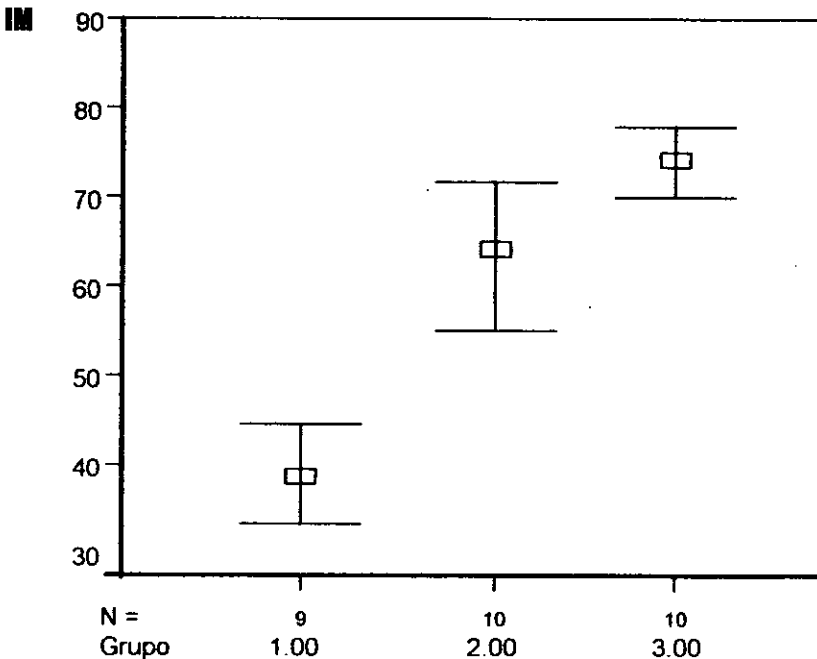
El análisis de los resultados se efectuó con comparaciones no paramétricas debida a la distribución sesgada de los datos y al tamaño muestral.

Con respecto a las determinaciones hormonales, La LH tubo un valor máximo de 8.6 y un valor mínimo de 3.6, con un promedio de 5.26; la FSH con un valor máximo de 43 y un valor mínimo de 3.0 y un promedio de 9.1; la testosterona con

un valor máximo de 21 y un valor mínimo de 8.5 con un promedio de 14.8; el estradiol con un valor máximo de 93 y un valor mínimo de 10 con un promedio de 36.2, la prolactina con un valor máximo de 19 y un valor mínimo de 6.5 con un promedio de 9.2

En cuanto al análisis del índice de movilidad por grupo encontramos los siguientes datos basados en la fórmula $A+B/100$. En el grupo I con un valor máximo de 46 y un valor mínimo de 26 con un promedio de 38.44, una mediana de 42, una desviación estandar de 7.05, con intervalos de confianza del 95% (33.02, 43.87). Para el grupo II un valor máximo de 88, un valor mínimo de 51 con un promedio de 64.90, una mediana de 64.50, una desviación estandar de 12.63, con intervalos de confianza del 95% (55.86, 73.93). Y el grupo III con un valor máximo de 82 y un valor mínimo de 66, con un promedio de 73.70, una mediana de 73, una desviación estandar de 5.55, con intervalos de confianza del 95% (69.72, 77.67) Gráfica 1.

INDICE DE MOVILIDAD POR GRUPO



Gráfica 1

En análisis de la movilidad total por grupos encontramos los siguientes resultados. En el grupo I con un valor máximo de 63 y un valor mínimo de 37 con un promedio de 49.55, una mediana de 50, una desviación estandar de 7.71 con intervalos de confianza del 95% (43.62, 55.48). Para el grupo II un valor máximo de 96, un valor mínimo de 57 con un promedio de 72.10, una mediana de 73.50, una desviación estandar de 11.60, con intervalos de confianza del 95% (63.79, 80.40). y el grupo III con un valor máximo de 85 y un valor mínimo de 70, con un promedio de 76.50, una mediana de 76, una desviación estandar de 5.35, con intervalos de confianza del 95% (72.66, 80.33). Tabla 1

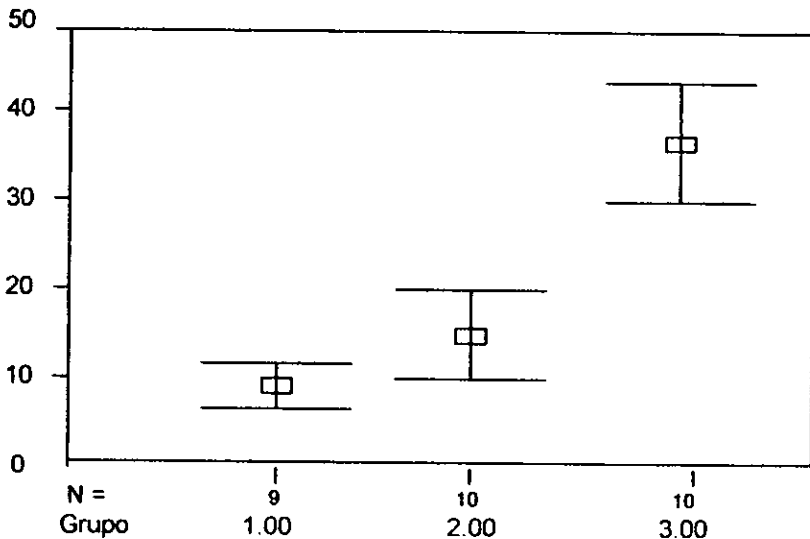
MOVILIDAD TOTAL POR GRUPOS

GRUPO	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR	MEDIANA
I	49.55	7.71	50
II	72.10	11.60	73.50
III	76.50	5.35	76

Tabla 1

El análisis del de la movilidad espermática tipo A por grupos arroja lo siguientes resultados. El grupo Y con un valor máximo de 14 y un valor mínimo de 6, con un promedio de 9.55, una mediana de 10, una desviación estandar de 2.60, con intervalo de confianza del 95% (7.55, 11.55). El grupo II con un valor máximo de 24 y un valor mínimo de 2, con un promedio de 14.5, una mediana de 14.5, una desviación estandar de 6.05, con intervalo de confianza del 95% (10.16, 18.83). El grupo III con un valor máximo de, un valor mínimo de 27, con un promedio de 36.4, una mediana de 36, una desviación estandar de 9.25, con intervalo de confianza del 95% (29.78, 43.01). Gráfica 2.

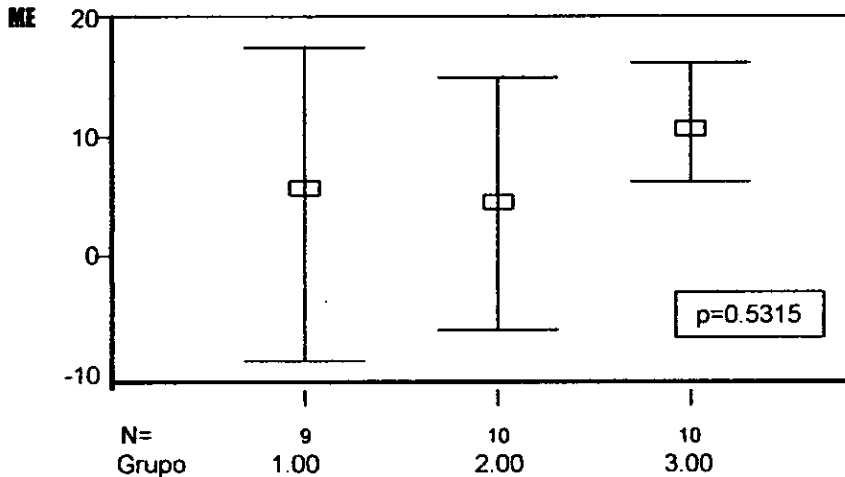
MOVILIDAD A POR GRUPO



Gráfica 2

El análisis de la migración específica (ME) por grupos dió los siguientes resultados basados en la fórmula: ME= Diferencia entre el número de espermatozoides en las cámaras con progesterona versus los espermatozoides que migraron a las cámaras control. El grupo I con un valor máximo de 26.66, un valor mínimo de - 28.50, con un promedio de 4.90, una mediana de 3.33, una desviación estandar de 15.88, con intervalos de confianza del 95% (- 7.30, 17.12). El grupo II con un valor máximo de 21.0, un valor mínimo de - 27.66, con un promedio de 4.05, una mediana de 6.33, una desviación estandar de 14.90, con intervalos de confianza del 95% (- 6.61, 14.71). El grupo III con un valor máximo de 18 y un valor mínimo de 1.0 con un promedio de 10.96, una mediana de 11.0, una desviación estandar de 6.16, , con intervalos de confianza del 95% (6.55, 15.37). El análisis de varianza no paramétrico efectuado no mostró significancia estadística como se muestra en la Gráfica 3 ($p=0.5315$)

MIGRACION ESPECIFICA POR GRUPO



Gráfica 3

En cuanto al análisis de linealidad (LIN) por grupos, como una medida de la progresión lineal espermática, encontramos los siguientes resultados. El grupo I con un valor máximo de 28 y un valor mínimo de 23, con un promedio de 26.44, una mediana de 27.00, una desviación estandar de 1.50, con intervalos de confianza del 95% (25.28, 27.60). El grupo II con un valor máximo de 30, un valor mínimo de 11, con un promedio de 21.70, una mediana de 22.50, una desviación estandar de 5.88, con intervalos de confianza del 95% (17.48, 25.91). El grupo III con un valor máximo de 32, un valor mínimo de 22, con un promedio de 26.50, una mediana de 26.50, una desviación estandar de 3.24, con intervalos de confianza del 95% (24.18, 28.81). El análisis de varianza de kruscall wallis mostró diferencia estadística con $p=0.03$. Tabla 2

LINEARIDAD POR GRUPOS

GRUPO	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR	MEDIANA
I	26.44	1.50	27.00
II	21.70	5.88	22.50
III	26.50	3.24	26.50

Tabla 2

$p=0.03$

No existió correlación de los parámetros de movilidad espermática con la migración específica cuando se analizó prueba de Spearman para datos no paramétricos (datos no presentados).

IX. Discusión:

El papel que juega la quimiotaxis espermática en animales de fertilización interna y, en particular en el humano, ha sido objeto de gran debate en la última década. Diversos son los experimentos que se han hecho tratando de explicar el fenómeno con resultados en ocasiones contradictorios. Sin embargo, es posible que la diversidad de los reportes represente la heterogeneidad de este proceso *in vitro*. Es lógico el tratar de asociar el parámetro seminal pronóstico más importante para la fertilización con el proceso de quimiotaxis. Hasta el momento no existe ninguna publicación en la cual se relacione la quimiotaxis con la alteración de la movilidad espermática, particularmente en aquel subgrupo de pacientes que tienen un índice de movilidad normal con movilidad tipo A menor de 25 (astenozoospermicos relativos).

Inicialmente se podría pensar que el modelo biológico no es el más adecuado, ya que si esta comprometida la movilidad espermática, desconocemos la repercusión que pueda tener sobre el efecto quimiotáctico. Sin embargo, se trabajó con pacientes con un índice de movilidad por arriba de 0.25 sin ninguna otra alteración seminal. En este caso es más probable que la astenozoospermia se asocie con alteración de la respuesta quimiotáctica.

Nuestra variable dependiente evaluada como migración específica muestra una dispersión acentuada. Esta dispersión de los datos se hace más evidente en el grupo de pacientes leves, cuando se compara con el grupo de pacientes euspermicos. Al comparar los datos en los diferentes grupos no encontramos diferencias significativas como esperábamos, esto puede ser debido a varias circunstancias.

Primero, el tamaño de la muestra pudo no haber sido suficiente como para demostrarnos una tendencia real entre los diferentes grupos. Esto era esperado, ya que, el diseño del estudio fue planeado como estudio piloto.

Segundo, los grupos pueden ser heterogéneos por lo que descartaríamos la hipótesis alterna. En tal caso los pacientes astenozoospermicos leves no tienen una migración específica menor que la de los astenozoospermicos relativos y los pacientes astenozoospermicos relativos no tienen una migración específica menor comparados con pacientes euspermicos sanos.

Tercero, en el grupo de euspermicos la distribución de los datos fue más homogénea, posiblemente debido a que realmente es un grupo uniforme y , a que el modelo experimental utilizado si nos permite la evaluación de la quimiotaxis en este grupo de pacientes.

Así pues, podemos sugerir en este estudio que el índice de movilidad no correlaciona positivamente con la migración específica del modelo de quimiotaxis de doble cámara (datos no presentados), aunque la tendencia al evaluar las medianas sugiere que si aumentáramos el tamaño muestral, podríamos alcanzar diferencias estadísticas.

Obviamente, la linealidad como parámetro de progresión mostró diferencias significativas entre los tres grupos. Esto, es resultado de los parámetros de evaluación en la cinética espermática (VAP, VCL, y VSL). La linealidad, como parámetro de progresión lineal del espermatozoide parece ser un mejor indicador de la progresión espermática cuando se comparó entre los grupos que cuando se comparó la rectitud STR. Este hallazgo coincide con lo reportado en la literatura (Davis., 1992).

La quimiotaxis es un fenómeno que se ha estudiado *in vitro*, con diferentes tipos de modelos experimentales, desconocemos el impacto del medio endógeno sobre este proceso (Villanueva et al., 1992; Makler et al.,1992; Anderson et al., 1995). Aparentemente la respuesta quimiotáctica no es uniforme, si no por el contrario, se desencadena de manera progresiva para una subpoblación de espermatozoides, lo que le da un carácter de continuidad a través del tiempo, sobre todo en el periodo periovulatorio (Ralt et al., 1994; Villanueva et al., 1995). Nosotros encontramos la respuesta de las subpoblación espermáticas en los grupos de pacientes astenozoospermicos pudiera contener una heterogeneidad causal que no permite separar adecuadamente los grupos.

La migración específica que valoró la diferencia entre el número de espermatozoides encontrados en las cámaras control del número de espermatozoides encontrados en las cámaras con progesterona, encontramos que el grupo euspermicos (DE: 6.16) fue el que tubo una distribución de datos más uniforme, seguido por el grupo de astenozoospermicos relativos (DE: 14.90) y el grupo III (DE: 15.88). Estos resultados podrían correlacionar con el hecho de que es más predecible la respuesta quimiotáctica espermática en los pacientes sanos que en los otros dos grupos de pacientes. Posiblemente, esto es debido a la distribución heterogénea de los datos en los grupos II y III.

Otro aspecto importante es la relación temporal que tiene la quimiotaxis con otros procesos espermáticos que se llevan a cabo *in vivo* previo a la fecundación

del ovocito. Al parecer, por lo menos *in vitro*, la capacitación es un requisito para que haya una respuesta quimiotáctica. Sin embargo, no se ha estudiado la asociación con la reacción acrosomal. Sabemos que esta última depende de la concentración de calcio en el medio externo y que se han identificado receptores a progesterona a nivel espermático. ¿ será la reacción acrosomal un proceso independiente del fenómeno quimiotactico ?, de ser así ¿seran toda la población espermática capaz de llevarlo a cabo? O por el contrario, ¿será solamente la población espermática quimiotacticamente "activa" la beneficiada de este proceso?

Este es un estudio piloto para evaluar la respuesta quimiotáctica en presencia de alteración de la movilidad espermática. Por lo tanto, es necesario continuar el estudio con una población mayor para determinar el impacto real de este fenómeno sobre la movilidad espermática. Además es necesario correlacionarlo con otros fenómenos como la hiperactivación y la reacción acrosomal.

Conclusiones

- 1) La respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de varones con astenozoospermia aislada idiopática relativa Vs leve es semejante, demostrado mediante la utilización del modelo de doble cámara de migración.
- 2) La respuesta quimiotáctica de los espermatozoides de varones con astenozoospermia (leves y relativos) no mostró diferencias significativas con varones controles euspermicos.
- 3) El número de pacientes en el presente estudio requiere incremento en el tamaño muestral para mostrar diferencias estadísticas, si es que las hay.
- 4) Existe una tendencia a incrementarse la migración específica conforme incrementa el índice de movilidad cuando se analizan las medianas en los grupos del presente estudio.
- 5) El índice de movilidad espermática no correlaciona con el resultado de migración específica de los pacientes estudiados.
- 6) La linearidad es un parámetro de la cinética espermática que debe de ser considerado cuando se analizan grupos de pacientes.

Bibliografía:

- Afzelius, B.A. (1976) A human syndrome caused by inmóvil cilia., *Science*, **193**,317-319.
- Anderson, R.A., Feathergill, K.A., Rawlins, R.G., Mack, S.R., Zaneveld, J.D. (1995) Atrial natriurtic peptide: A chemoattractant of human spermatozoa by a guanylate cyclase-dependent pathway. *Molecular. Reprod. Develop.*, **40**, 371-378
- Anderson, R.A., Feathergill, K.A. De Jonge C.J., Mack, S.R., Zaneveld, L.J.D. (1992) Facilitative effect of pulsed addition of dibutyryl cAMP on the acrosome reaction of noncapacitated human spermatozoa. *J. Androl.*, **13**, 398-408.
- Baker, R.R., Bellis, M.A. (1988) "Kamikaze" sperm in mammals? *Anim. Behav.*, **36**, 936-939.
- Barboni, B., Mattioli, M., Seren, E. (1995) Influence of progesterone on boar sperm capacitation. *J. Endocrinol.*, **144**, 13-18
- Cohen, D.A., Ralt, D., Tur K.I., Manor, M., Makler, A. Et al. (1994) Sequential acquisition of chemotactic responsiveness by human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, **50**, 786-790.
- Cutler, J.E. (1974) A simple in vitro method for studies on chemotaxis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **147**, 471.
- Davis, RO: The promise and pitfalls of computer-aided sperm analysis. *Infertil Reprod Med Clin North Am* 1992;3:341
- Einsenbach, M., Ralt D. (1992) Precontact mammalian sperm-egg communication and role in fertilitation. *Am. J. Physiol.*, **262**, C1095-101.
- Einsenbach, M., Tur, K.I. (1994) Human Sperm chemotaxis is not enigmatic anymore. *Fertil. Steril.*, **62**, 233-235.
- Gnessi, L., Ruff, M.R., Fraioli, F., Pert, C.B. (1985) demonstration of receptor-mediated chemotaxis by human spermatozoa. A novel quantitative bioassay. *Exp. Cell. Res.*, **161**, 219-230.

- Hartman, H.G. (1965) Correlation among criteria of semen quality. *Fertil. Steril.*, **16**, 632-644.
- Iqbal, M., Shivaji, S., Vijayasathy, S., Balaram, P. (1980) Synthetic peptides as chemoattractants for bull spermatozoa: structure activity correlations *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **96**, 235-242.
- Ishijima, S., Oshio, S., Mohri, H. (1986) Flagellar movement of human spermatozoa. *Gamet. Research.*, **13**, 185-197.
- Kartagener, M. (1933) Zur pathogenese der bronchiektasien bei situs viscerum inversus. *Beitr. Klin. Tuberk.*, **83**, 489-501.
- Kim, S.H., Cho, K.W., Lim, S.H., Hwang, Y.H., Ryu, H., Oh, S.H. et al. (1992) Presence and release of immunoreactive atrial natriuretic peptide in granulosa cells of the pig ovarian follicle. *Regul. Pept.*, **42**, 153-162.
- Lipshultz, L. (1980) subfertility, in Kaufman J (ed). *Current Urologic Therapy*, Philadelphia, WB Saunders, 399-404.
- MacLeod, J., Gold, R. (1953) The male factor in fertility and infertility. *Fertil. Steril.*, **4**, 10.
- Makler, A., reichler, A., Stoller, J., Feigin, P.D. (1992) A new model for investigating in real-time the existence of chemotaxis in human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, **57**, 1066-1074.
- Mortiner, D., Leslie, E.E., Kelly, R.W., Templeton, A.A. (1982) Morphological selection of human spermatozoa in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, **64**, 391-399.
- Osman, R.A., Andria, M.L., Jones, A.D., Meizel, S. (1989) Steroid induced exocytosis: The human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**, 828-833.
- Ralt, D., Manor, M., Cohen, D.A., Tur, K.I., Ben, S.I. et al. (1994) Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors. *Biol. Reprod.*, **50**, 774-785.
-