

25

2 ef.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

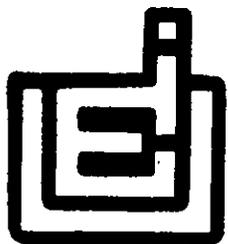
CAMPUS IZTACALA

“CAPACITACION ESPERMATICA IN VITRO: IMPACTO DE LA ALBUMINA HUMANA EN LA MOVILIDAD Y VIABILIDAD ESPERMATICA”

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO PRESENTA DURAN MONTERROSAS LEONOR ANGELA

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



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

260553

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

A una excelente mujer, mi madre por su apoyo incondicional

Dr. Carlos A. Villanueva Díaz, por su confianza y su constante ayuda así como por su gran labor académica.

Al personal del Departamento de Andrología del INper, por la ayuda brindada durante mi estancia.

Todo lo que se ve como una victoria no siempre significa ganar; y perder, no siempre significa estar derrotado.

Idries Shah

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
JUSTIFICACIÓN.....	9
OBJETIVOS.....	10
HIPÓTESIS.....	11
METODOLOGÍA.....	12
<i>Análisis seminal</i>	12
<i>Capacitación espermática</i>	15
<i>Centrifugado y swim-up con HTF</i>	16
<i>Centrifugado y swim-up con albúmina humana al 10%</i>	16
<i>Viabilidad a las 24 horas</i>	16
<i>Prueba hiposmótica</i>	17
<i>Integridad acrosomal</i>	19
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20
RESULTADOS.....	21
GRÁFICAS.....	22
<i>Índice de movilidad post-capacitación</i>	22
<i>Índice de movilidad a las 24 horas</i>	23
<i>Velocidad en línea recta</i>	23
<i>Velocidad curvilínea</i>	24
<i>Frecuencia de batido del flagelo</i>	25
<i>Amplitud y desplazamiento lateral de la cabeza</i>	26
<i>Linearidad</i>	26
<i>Rectitud</i>	27
<i>Prueba hiposmótica</i>	28
<i>Integridad acrosomal</i>	29
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	30
CONCLUSIONES.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35

INTRODUCCIÓN

A diferencia de otras especies, el espermatozoide de los mamíferos no posee la capacidad para fertilizar al óvulo inmediatamente después de ser eyaculado. Aún cuando después de abandonar el tracto genital masculino ya ha adquirido movilidad y se encuentra morfológicamente maduro; debe sufrir una serie de cambios metabólicos y estructurales a nivel de la membrana plasmática, que en conjunto se denominan capacitación espermática. Estos procesos fueron originalmente descritos por Austin y Chang en 1951 después de las observaciones que hicieron en espermatozoides de conejo. En estos primeros estudios se demostró que los espermatozoides que migran a través del aparato genital femenino tienen mejor capacidad para fecundar que los que se encuentran en el epidídimo. Más tarde estos hallazgos se han extendido a prácticamente todas las especies de mamíferos.

La capacitación espermática implica una serie de cambios funcionales en la membrana plasmática que preparan al espermatozoide para llevar a cabo la reacción acrosomal (Dentwood,1982). Bioquímicamente, la capacitación espermática se caracteriza por un incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática, disminución en su contenido de fosfolípidos, colesterol y cambio de carga neta de la membrana plasmática (Dukelow,1971; Vaidya,1971). Funcionalmente estos cambios se asocian con incremento del metabolismo de la célula y modificación de su patrón de movimiento. La secuencia de eventos de que se compone la capacitación espermática se inician desde su paso por el epidídimo ya que se ha podido demostrar que una variedad de sustancias que son absorbidas en la superficie del espermatozoide durante la maduración espermática en este órgano son eliminadas o modificadas en el aparato genital femenino (Yanagimachi,1981; Eddy, 1988).

La capacidad fecundante del espermatozoide de los mamíferos requiere de la expresión de diversas funciones, algunas de las cuales aún no han sido bien caracterizadas. Sin embargo, cuando el espermatozoide ha desarrollado su capacidad total para la fecundación, ya han ocurrido las modificaciones en la membrana plasmática descritas anteriormente así como un cambio en el patrón de movilidad. Las evidencias actuales apuntan a la teoría de que existen diferentes vías a través de las cuales el espermatozoide de los mamíferos puede iniciar la capacitación espermática pero uno de los eventos finales parece ser la fosforilación de proteínas en la región de la cauda (Garbers y Kopf, 1980; Lindemann y Kanous, 1989).

La capacitación espermática ocurre fisiológicamente en el aparato reproductor femenino pero puede lograrse *in vitro* por diferentes métodos de laboratorio entre los que se incluye la filtración en gel, columnas de fibra de vidrio o matriz de ácido hialurónico y la citosedimentación. Estos tienen en común que eliminan el plasma seminal, por lo que se ha considerado que existe algún factor en el que el plasma seminal se asocia a la membrana plasmática del espermatozoide que inhibe el proceso de capacitación (Berger, 1985). Después de que el plasma seminal es retirado, se requiere de un tiempo, que es variable entre las especies y probablemente también entre los individuos, para que se manifiesten las propiedades que conducen al incremento de la capacidad de fertilización (Ckeck y col, 1992).

Los métodos más prácticos de separación de células espermáticas son los que se basan en la citosedimentación bien sea en medios asociados con albúmina o en gradientes de Percoll. (Ng y col, 1991). En los primeros se realiza la capacitación espermática mediante la incubación de los gametos masculinos en soluciones balanceadas que contengan concentraciones apropiadas de componentes similares a las del fluido del oviducto (Yanagimachi, 1994; Quinn, 1985). La presencia de tales componentes juega un papel importante en los procesos de la capacitación como es el caso del albúmina que es responsable de remover el colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide (Davis, 1976; Go y Wolf, 1985). Además existen evidencias que sugieren que la albúmina

estabiliza las membranas plasmática y acrosomal externa del espermatozoide humano (Villanueva y col,1993). Recientemente se ha apoyado con abundante bibliografía que los métodos de laboratorio que se basan en la separación en gradientes de Percoll son más eficientes y dejan células que son funcionalmente mejores. Sin embargo, todos los métodos en los que se emplea la citosedimentación pueden causar daños irreversibles para el espermatozoide. (Aitken y Clarkson,1987; Alvarez y col,1987; De Lamirande y Ganong,1992,1995). han demostrado que la centrifugación induce la formación de especies de oxígeno reactivo (ROS) que pueden dañar la membrana plasmática del espermatozoide y reducir la capacidad de unión con el óvulo.

Uno de los indicadores directos de la capacitación espermática es la expresión de un patrón de movimiento diferente llamado hiperactivación, el cual se caracteriza por movimientos flagelares vigorosos. Este patrón de movimiento también ha sido descrito con otros nombres como son: "fase de transición", "helicoidal" y "latigazo" entre otras (Mortimer,1990 y Burkman,1991). Este patrón de movilidad implica un desplazamiento lateral amplio de la cabeza y oscilaciones de baja frecuencia de la cauda que provocan un desplazamiento menos lineal, incrementándose el movimiento curvilíneo del espermatozoide. Teleológicamente este patrón de movilidad tendría como finalidad que la célula masculina no se alejara del óvulo y se incrementara la posibilidad de contacto entre los dos gametos. Recientemente se ha incorporado la tecnología del análisis de imagen por computadora en el estudio de la hiperactivación del espermatozoide ya que este nos permite la medición de las características seminales relacionadas con la capacidad fecundante del espermatozoide (Díaz y col,1995).

En el presente trabajo se pretende analizar el efecto de la preparación *in vitro* de semen sobre las características cinéticas del espermatozoide: índice de movilidad (IM), velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL), amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), frecuencia de batido del flagelo (BCF) y los índices de rectitud (STR) y linealidad (LIN) antes y después de la capacitación *in vitro* y su relación con la sobrevivencia del gameto masculino.

ANTECEDENTES

La membrana del espermatozoide juega un papel importante durante la maduración en el epidídimo y su tránsito a través del tracto genital femenino para que se lleve a cabo la fertilización. Estudios ultraestructurales han demostrado que la apariencia y configuración topográfica de la membrana plasmática del espermatozoide se altera durante la maduración del epidídimo (Ajay y col,1991).

Después de la maduración epididimaria, los espermatozoides de mamíferos deben sufrir la capacitación y la reacción acrosomal antes de que se pueda llevar a cabo la fecundación (Austin,1952; Yanagimachi, 1981; Eddy , 1988). En la capacitación como en la reacción acrosomal la membrana plasmática del acrosoma juega un papel importante. Es evidente que muchas secreciones de los componentes del aparato reproductor masculino son absorbidos en la superficie del espermatozoide durante la maduración epididimaria y son subsecuentemente removidos o alterados durante la capacitación (Suzuki y Yanagimachi,1989).

Cuando los espermatozoides llegan al útero se producen alteraciones que requieren un periodo de permanencia en el aparato reproductor femenino para que se lleve a cabo la fertilización. A este fenómeno se le ha denominado "capacitación" , y fue descrita originalmente por Austin y Chang, (1951 y 1952). La capacitación fue originalmente definida como el intervalo de tiempo de incubación del espermatozoide (tanto *in vivo* como en condiciones de *in vitro*) que se requiere para la maduración funcional del espermatozoide (Chang ,1984). No conoce con exactitud la naturaleza de la capacitación, pero algunos experimentos que se han efectuado en varias especies animales demuestran que los espermatozoides eyaculados deben permanecer un tiempo definido dentro del aparato femenino o en condiciones específicas *in vitro* antes de poder atravesar las capas que encierran al óvulo. (Chang,1984) descubrió que cuando estos espermatozoides se regresaban al plasma seminal perdían dicha facultad, pero la volvían a adquirir cuando

pasaban nuevamente al conducto femenino. Este efecto se atribuyó a un componente del plasma seminal al que se le ha llamado factor de descapacitación. De acuerdo con algunos autores la capacitación involucra un desenmascaramiento de sitios receptores o quizá una remoción de una capa inhibitoria o estabilizadora de la superficie del espermatozoides y al microscopio electrónico se ha descubierto que los principales cambio se presentan en la estructura del mosaico de lípidos de la membrana. (Evans y col, 1979; Hall y col,1991)

Se ha demostrado que la capacitación está relacionada con cambios intracelulares en la concentración de iones como el Ca^{2+} y Na HCO_3 , aumento de la fluidez de la membrana plasmática y modificación de la carga superficial de la célula. Estos cambios pueden lograrse también si se incuban espermatozoides en medios de cultivo formados por soluciones balanceadas que contengan concentraciones apropiadas de electrolitos.

Entre los medios para la capacitación se encuentra el medio HTF (Human Tubal Fluid) que tiene una composición iónica que se aproxima a la del fluido del oviducto (Yanagimachi,1994). La presencia de tales componentes juega un papel importante en los procesos de la capacitación. Investigaciones realizadas en gametos de varias especies sugieren que la albúmina, el Ca^{2+} y el NHCO_3 (Go y Wolf, 1985) son requeridos para la capacitación aunque Fraser (1981) y Ruknudin y Silver (1990) sugieren que la albúmina se requiere para la reacción acrosomal y no para la capacitación . Se cree que la albúmina es responsable de remover el colesterol de la membrana plasmática (Davis, 1976, 1980; Go y Wolf, 1985). También existen evidencias que sugieren que la albúmina estabiliza la membrana acrosomal externa del espermatozoide humano e incrementa la viabilidad de esta célula. (Villanueva y col,1993). Se tiene reportes de que la albúmina es requerida para la inducción de la reacción acrosomal en espermatozoides de hámster (Lui y Meized, 1979).

Los eventos centrales de la capacitación espermática ocurren en las membranas acrosomal interna y externa. Algunos de los que se han descrito son cambios en la

concentración de iones durante el tiempo de la capacitación, así como cambios en las concentraciones de nucleótidos cíclicos, consumo de oxígeno del espermatozoide y la fosforilación de las proteínas en la cauda. Estos cambios están implicados en varias funciones incluyendo la iniciación y mantenimiento de la movilidad (Garbers y Kopf 1980; Tash y Means, 1983; Lindermann y Kanous, 1989; Yanagimachi, 1994), inducción de la reacción acrosomal (Kopf y Gerton, 1991) y capacitación (Stein y Frase, 1984; Monks y col, 1986). La fosforilación de los residuos de tirosina de una proteína específica del espermatozoide que tiene un peso molecular aproximado de 80 kD también ocurre durante la capacitación (Duncan y Fraser, 1993) aunque la correlación de la causa y efecto entre los dos eventos no está bien definido.

En el pasado se consideraba que la reacción acrosomal era el único indicador de que la capacitación espermática se había llevado a cabo, sin embargo, Bedford (1983), Chang (1984) y Yanagimachi (1981) están de acuerdo que la movilidad hiperactivada es una de las formas como se expresa la capacitación espermática. Evidencias presentadas por Fleming y Yanagimachi (1982) y Fraser (1981) indican que existen varios tipos de movimiento en el espermatozoide y que algunos de ellos son necesarios para que ocurra la penetración de la zona pelúcida.

La movilidad hiperactivada del espermatozoide fue inicialmente reconocida en 1969 por Yanagimachi y Gwatkin y desde entonces ha sido descrita en varias especies de mamíferos (Visconti, 1995). El movimiento que presentan los espermatozoides hiperactivados se caracteriza por ser extremadamente vigorosos con amplias curvaturas flagelares, lo que conduce a una menor progresión y a un amplio desplazamiento lateral de la cabeza. Trabajos recientes han demostrado que puede haber relación entre hiperactivación y el porcentaje de fertilización *in vitro*. Coddington y col (1984) fueron los primeros en observar que los espermatozoides humanos preparados para la fertilización *in vitro* expresan este tipo de movimiento. Estas observaciones se hicieron de manera subjetiva al valorar la movilidad del gameto masculino, pero a partir de 1986 todos los reportes de hiperactivación en espermatozoides humanos durante la

capacitación se han hecho en estudios en los que se han usado métodos de análisis computarizado. (Burkman 1991, Davis 1992, Díaz y col 1995).

La mayoría de los métodos empleados para la capacitación espermática en muestras de humano requieren de la centrifugación para separar los espermatozoides del plasma seminal (Makler y col, 1984; Gorus y Pepellers, 1981; Berger y col, 1985). Estos métodos pueden causar daño irreversible al espermatozoide lo cual se traduce en disminución de la capacidad de fertilización. (Aitken y Clarkson, 1988, Mortimer, 1991). A la fecha han aparecido diversas publicaciones en las que se reportan los resultados de estudios en los que se comparan los diferentes métodos de separación de espermatozoides móviles (Berger y col, 1985; Check y col, 1992; Matsuoka y col, 1995, Ng y col, 1991). En estos estudios se han reportado los pros y contras de cada uno de ellos y se ha sugerido que algunos de ellos podrían tener efectos deletéreos sobre la funcionalidad del gameto masculino (Aitken y Clarkson, 1987). Diferentes funciones espermáticas parecen alterarse con el procesamiento *in vitro* para los métodos de reproducción asistida. Algunas de estas podrían relacionarse con reducción en la capacidad de unión a la zona pelúcida (Aitken y Clarkson, 1988).

El efecto deletéreo de estos métodos de preparación de semen parece estar relacionado con la generación de radicales libres que ocurre como consecuencia de la centrifugación. Debido que la membrana plasmática del espermatozoide tiene un alto contenido de ácidos grasos polisaturados es muy sensible para la oxidación y en consecuencia para la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) y anión superóxido (O_2^-). Los efectos de las funciones del espermatozoide que resultan de los métodos de separación parecen estar asociados con la peroxidación de lípidos (Aitken y Clarkson, 1987; Aitken y col, 1993; Alvarez y col, 1987; De Lamirande y Gagnon, 1992).

La forma como finalmente podría expresarse el daño membranal del espermatozoide con los métodos de preparación *in vitro*, además de la posible alteración en la fusogenicidad de la membrana plasmática, serían las alteraciones en el patrón de

movimiento y en la viabilidad de esta célula. Existen evidencias en ambos sentidos ya que como se ha planteado anteriormente la capacitación espermática *in vitro* induce cambios específicos de la movilidad. Por otra parte se ha documentado que la reacción acrosomal (cambio membranal en una zona específica del gameto) se asocia con disminución de la viabilidad de la célula.

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se han desarrollado técnicas para el estudio y tratamiento del hombre con problemas de infertilidad que han dado un impulso extraordinario a la especialización en reproducción y en particular al conocimiento íntimo de la fisiología y patología del proceso reproductivo.

Se han empleado muchos métodos de preparación de semen diseñados específicamente para lograr la hiperactivación de espermatozoides, sin embargo es evidente que los métodos de preparación de semen para la reproducción asistida no son los ideales dado que durante el procesamiento del semen en el laboratorio puede ocurrir daño a las membranas del espermatozoide. Esto parece estar asociado a la formación de radicales superóxido durante la centrifugación que se emplea en todos los métodos.

La investigación en esta área de la reproducción humana sigue siendo de gran importancia debido a que la única alternativa real con la que cuentan los hombres infértiles que tienen semen anormal es la fertilización *in vitro* y la micromanipulación de gametos, procedimientos ambos que tienen un costo muy elevado y ofrecen cifras de éxito bajas. Una de las líneas de investigación que podría conducir a mejorar la tasa de éxito de los métodos de reproducción asistida en el caso de pacientes con alteraciones seminales es intentar mantener una cuota constante de espermatozoides en el sitio de la fertilización tanto en condiciones *in vivo* (inseminación artificial, GIFT) como en la fertilización extracorpórea (FIVTE). Para tal efecto debería poder decidirse la frecuencia de inseminación en función de la viabilidad de los gametos masculinos y de la sobrevivencia del óvulo. Aunque existen diversas formas de valorar la viabilidad de los espermatozoides *in vitro* por medio de los colorantes supravitales, una forma probablemente más funcional es definirla en relación a la movilidad de los espermatozoides.

Uno de los aspectos que debe analizarse en cuanto a los efectos de la preparación seminal para la reproducción asistida es el impacto de las diferentes técnicas

en la movilidad y en la supervivencia del espermatozoide dado que, a partir de reconocer los cambios que ocurren en estas propiedades de la célula germinal masculina, podría identificarse algún método que ofreciera ventajas para el manejo de los gametos masculinos.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la cinética y sobrevivencia de espermatozoides humanos separados por los métodos de *swim-up* con medio HTF sin albúmina y *swim-up* con medio HTF con albúmina al 10%.

OBJETIVOS PARTICULARES

Describir las características cinéticas del espermatozoide antes y después de la preparación seminal, por medio del análisis computarizado (VCL, VSL, LIN, STR, ALH y BCF).

Comparar la viabilidad a 24 horas de espermatozoides móviles separados por los métodos de *swim-up* con medio de HTF sin albúmina y *swim-up* con albúmina al 10%

Analizar en forma comparativa la integridad membranal y acrosomal de espermatozoides antes y después de la capacitación espermática *in vitro* por los métodos de *swim-up* con medio de HTF sin albúmina y *swim-up* con albúmina al 10%

HIPÓTESIS 1

Debido a su efecto protector en la membrana plasmática del espermatozoide, los medios de preparación de semen que contienen albúmina al 10% ofrecen mejores condiciones para la separación de la fracción móvil de células para la reproducción asistida. Esto se puede corroborar por medio de una prueba de viabilidad de espermatozoides en la que se demuestre que la sobrevivencia de células separadas por centrifugación en medios con estas características es mayor que con otros medios.

HIPÓTESIS 2

El efecto protector de los medios de separación que contienen albúmina a una concentración del 10% se manifiesta en la calidad del movimiento de los espermatozoides principalmente en incremento de la velocidad curvilínea.

METODOLOGÍA

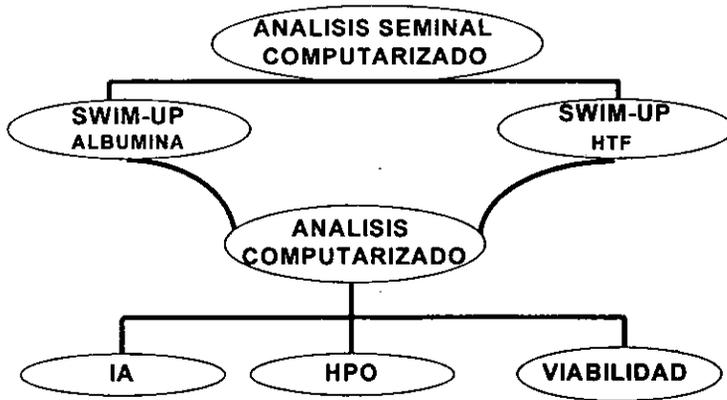


Fig.1. Diagrama de flujo de la metodología

Análisis seminal

Se analizaron 15 muestras de semen con características normales de acuerdo a los criterios propuestos por la OMS (1992). Concentración $>20 \times 10^6$ espermatozoides por mL, movilidad $>50\%$, movilidad progresiva rápida $>25\%$. Las muestras fueron obtenidas en recipientes de plástico no tóxico después de un periodo de abstinencia sexual de 3-6 días y posteriormente incubadas a 37°C hasta que ocurrió la licuefacción. Posteriormente se analizaron las características fisicoquímicas y se registraron los siguientes datos: aspecto, color, volumen, viscosidad y pH.

El análisis seminal es el estudio básico del laboratorio que comprendió la evaluación fisicoquímica y microscópica del semen. La primera nos da información

importante sobre la contribución secretora de las glándulas sexuales accesorias. La segunda refleja la función espermatogénica, así como la presencia de otros tipos celulares como leucocitos, células inmaduras, bacterias y zonas de aglutinación que darán indicios sobre algún proceso infeccioso o inmunológico.

La tecnología del video y la computación nos ha permitido seguir la trayectoria de cada espermatozoide y, por lo tanto, calcular ciertos parámetros que caracterizan la "cinemática" (geometría dependiendo del tiempo) de su movimiento (Morales y col.,1988; Mortimer,1990).

Las muestras seminales se analizaron con ayuda del analizador automático de semen Hamilton-Thorn IVOS 2000 según se describe a continuación. Una alícuota de 13.5 μ L de la muestra original se colocó en un portaobjetos de 25 x 75 mm con cubreobjetos de 24 x 40 mm. Una vez que se logró el extendido, la muestra se revisó para asegurarse de que se encontrara distribuida de manera homogénea y se colocó en la platina automática del equipo. La lectura de concentración y movilidad se llevó a cabo utilizando el Set A que ha sido prefijado con las siguientes condiciones: Tiempo de lectura: 30 segundos; Contraste mínimo: 7; Tamaño mínimo: 5; ventana de tamaño: 0.5-1.8; ventana de intensidad: 0.4-1.6; Tamaño de cabeza de espermatozoide inmóvil: 10; Intensidad de espermatozoide inmóvil: 20; valor medio de velocidad progresiva: 15; valor mínimo de la velocidad progresiva: 5. Todas las lecturas se realizaron en 5 campos seleccionados al azar, en un mínimo de 30 exposiciones y con una velocidad de adquisición de 60 Hz, condiciones que fueron previamente estandarizadas en el laboratorio de Andrología (Díaz y col.,1995).

Bajo estas condiciones experimentales se registraron los siguientes parámetros de movimiento de los espermatozoides: Velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL), amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), frecuencia de batido del flagelo (BCF) y los índices de rectitud (STR), linealidad (LIN), e índice de movilidad (IM).

A: movilidad progresiva rápida y lineal

B: movilidad lineal o no lineal lento

C: movimiento no progresivo

D: inmóviles

IM : % movilidad A + % movilidad B

100

VCL: velocidad curvilínea ($\mu\text{m}/\text{s}$). Velocidad (tiempo promedio)de una cabeza de espermatozoide en su trayectoria curvilínea real.

VSL: velocidad en línea recta ($\mu\text{m}/\text{s}$). Velocidad (tiempo promedio) de una cabeza de espermatozoide en su trayectoria rectilínea entre su posición inicial y final.

ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm). Es la magnitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide con respecto a su trayectoria espacial.

BCF: frecuencia de batido del flagelo. frecuencia de cruce (veces/ s). Promedio de la frecuencia (en el tiempo) con que la trayectoria curvilínea del espermatozoide cruza la trayectoria espacial media.

STR: rectitud (%) . Linearidad de la trayectoria espacial promedio VSL/VAP .

LIN: linearidad (%) .Linearidad de la trayectoria curvilínea VSL/VCL .

La fecundación de gametos *in vitro* se convirtió en un método útil cuando se logró capacitar a los espermatozoides fuera del útero con ayuda de diferentes soluciones estimuladoras como: solución de Alsener, Thyrode, Thysa, Eagle, Medio HAM F10, HAM, F12 y HTF (líquido folicular tubárico) (Roger, 1978; Quinn, 1985)

La capacitación espermática *in vitro* requiere los siguientes pasos:

1) Lavado: Durante esta etapa se logra eliminar el plasma seminal en el que es probable existan factores que de alguna manera afecten la calidad del semen, así como componentes que se adhieren al espermatozoide que en etapas posteriores afectarán la fecundación.

2) Capacidad estimuladora: Las diferentes soluciones utilizadas en la capacitación espermática muestran una capacidad de estimulación en la movilidad aunque se desconocen los verdaderos mecanismos estimuladores, se cree pueden deberse a : efecto de dilución , eliminación de factores bloqueadores o tóxicos en la etapa del lavado, por la adición rica de nutrientes, escasos en el semen o bien la adición de algún factor estimulador.

3) Selección: Los espermatozoides morfológicamente normales y con mayor grado de movilidad son los que ascienden a la superficie del medio en tanto que los de menor movilidad y morfológicamente anormales quedan en el fondo junto con leucocitos, células inmaduras, epiteliales así como detritus celulares.

Las técnicas de capacitación de los espermatozoides empleadas fueron : Centrifugado y *swim-up* con HTF (Fluido Tubárico Humano) y Centrifugado y *swim-up* con Albúmina humana al 10% .

Centrifugado y swim-up con HTF (fluido tubárico humano): Se colocó el semen en tubos cónicos de 13 X 100 mm con un volumen igual al medio HTF(Fluido tubárico humano) se homogeneizó la muestra y se centrifugó a 1200 rpm durante 7 minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante y a la pastilla se le adicionó 0.5mL de medio HTF con el tubo inclinado en un ángulo de 45°C se incubó treinta minutos, transcurrido ese tiempo se separó aproximadamente el 70% de sobrenadante y se transfirió a otro tubo. Este se homogeneizó para tomar 8.0 µL de muestra en un portaobjetos de 25 X 75 mm con cubreobjetos de 24 X 40 mm y se valoraron los parámetros de movilidad.

Centrifugado y swim-up con albúmina humana al 10%: Se mezcló un volumen igual con albúmina al 10%, (suplementado con HTF)en un tubo cónico de 13 X 100 y se centrifugaron a 1200 rpm durante 7 minutos, el sobrenadante fue desechado y a la pastilla se le adicionó 0.5 mL de medio con albúmina al 5 % con el tubo inclinado en un ángulo de 45° C, se incubaron 30 minutos, transcurrido ese tiempo se separó aproximadamente el 70% de sobrenadante colocándolo en otro tubo, los espermatozoides contenidos en esta fracción fueron los que presentaron mayor movilidad. Se tomaron 8µL de la muestra y se analizaron los parámetros cinéticos como se describió anteriormente.

La viabilidad del espermatozoide capacitado por los dos métodos se realizó valorando los parámetros de cinética del espermatozoide a las 24 horas de haber sido capacitado *in vitro* , la muestra se ajustó a 20 millones por mL, se homogeneizó y se tomaron 8 µL de la muestra en un portaobjetos de 25 X 75 mm con cubreobjetos de 24 X 40 mm.

Esta prueba se basa en valorar la viabilidad espermática a las 24 horas de ser capacitadas las células cuyo valor promedio de viabilidad dependerá de su integridad y funcionalidad membranar factores indispensables para el metabolismo espermático (Check,1992).

El grado de disminución en la movilidad total encontrada a las 24 horas nos indica de una manera indirecta el grado de alteración en la integridad y funcionalidad espermática.

Para evaluar la integridad funcional membranal se empleó la prueba hiposmótica de Jeyendran (1984). Esta prueba estudia de manera indirecta la integridad anatomofuncional de la membrana plasmática de los espermatozoides en relación al transporte selectivo de moléculas de bajo peso. Jeyendran en 1984 demostró que cuando el espermatozoide se somete a condiciones hiposmótica de 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 hiposmótica.

Prueba hiposmótica

Se preparó una solución que contenía fructosa 0.15 M y citrato de sodio 0.05 M (150 mOsm) a la que se denominó solución hiposmótica. A 1 ml de esta solución se agregó 100 µL del preparado de espermatozoides incubándose 30 minutos a 37°C en baño María. Después de este período se colocó una alícuota de 10 µL en portaobjetos de 25 mm con cubreobjetos de 22 x 22 mm y se analizó de manera indirecta (enrollamiento del flagelo) la acumulación de agua dentro del espermatozoide. En total se contaron 100 espermatozoides restando a esta cuenta el valor de la muestra inicial para obtener los valores de respuesta específica.

VALORES NORMALES

Normal: mayor del 60% de encurvamiento del flagelo

Dudoso: 50-60% de encurvamiento del flagelo

Anormal: menor del 50% de encurvamiento del flagelo

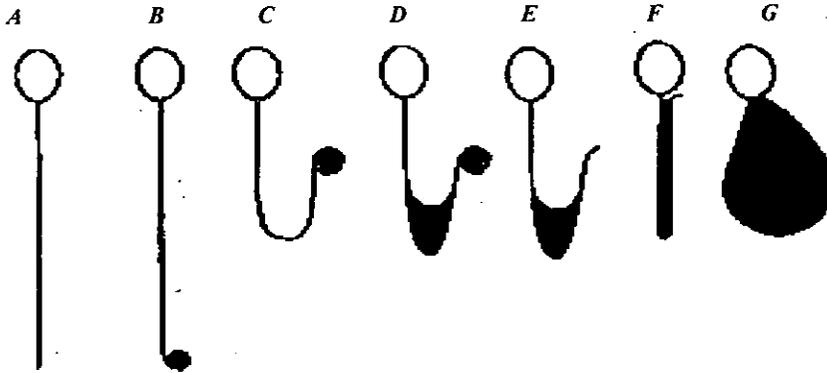


Fig. 2. Representación esquemática de la integridad funcional de la membrana del espermatozoide humano al ser sometido a condiciones hiposmóticas. *A* espermatozoide con membrana funcional alterada (deja pasar libremente el flujo acuoso); *B, C, D, E, F, G*, muestra los diferentes tipos de encurvamiento 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).

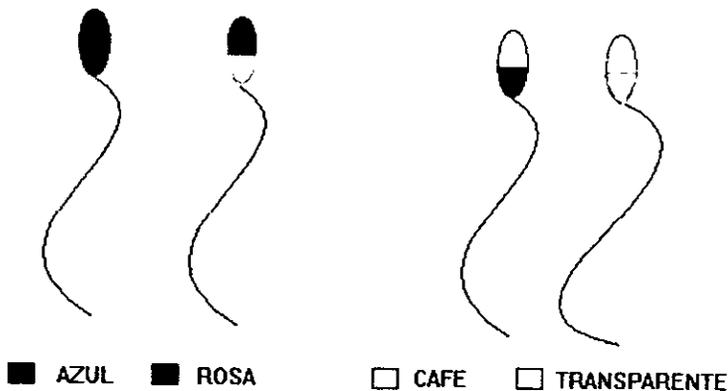
El acrosoma ocupa las 2/3 partes de la cabeza anterior del espermatozoide. Está constituida por 4 membranas: la plasmática, acrosomal externa, acrosomal interna, y la nuclear. Contiene un gran número de enzimas como la hialuronidasa que desdobra el ácido hialurónico de las células del cumulus ooforus y la acrosina que actúa sobre las glucoproteínas de la zona pelúcida del ovocito.

La reacción acrosomal es un proceso dependiente del calcio que involucra la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa con la subsiguiente liberación de enzima hialuronidasa, formándose invaginaciones para posteriormente desaparecer y dejar expuesta la membrana acrosomal interna que libera acrosina este proceso tiene lugar en condiciones fisiológicas mientras el espermatozoide atraviesa la capa del cúmulus.

Por este motivo es indispensable que tanto el semen fresco como el capacitado contenga un número adecuado de espermatozoides con acrosoma integro capaces de realizar la reacción acrosomal y de esta forma se lleve a cabo la fertilización.(Zanevel, 1986).

Integridad acrosomal

La integridad acrosomal se valoró empleando el método de la triple tinción de (Talbot y Chacon 1981). Una alícuota de semen se incubó en una solución de azul tripán al 2% durante 15 min. a 37° C. Posteriormente se fijó durante una hora con 1 ml de glutaraldehído al 3% en buffer de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4 y se centrifugó 5 minutos a 1200 rpm. Se separó el sobrenadante y se agregó buffer fosfosalino (PBS 0.1 M, pH 7.4) para eliminar el exceso de colorante. El paquete celular obtenido se resuspendió para hacer un frotis que se dejó secar a temperatura ambiente y se realizó una tinción con café Bismarck (0.8%) y rosa de Bengala (0.8%). Al final de este proceso se contaron en el microscopio de campo claro con el objetivo de 100 x un total de 100 células en las que se definen las células muertas (teñidas en azul), acrosomas reactivos (teñidos en café en la región acrosomal) y acrosomas intactos (teñidos de rosa en la región acrosomal). Un valor mayor o igual al 75% teñidos de color rosa en la región acrosomal indica un número adecuado de espermatozoides con membrana intacta.



Espermatozoides con acrosoma íntegro

Espermatozoides acrosoma reactivo

A

B

Fig 3. Muestra esquemáticamente la integridad acrosomal del espermatozoide humano. A) espermatozoides con acrosoma íntegro, B) espermatozoides con acrosoma reactivo.

VALORES NORMALES

% de espermatozoides con integridad acrosomal : 75%

% de espermatozoides con acrosoma reactivo : 25%

Valores fuera de estos rangos nos indican una integridad membranar acrosomal alterada que puede estar asociada a una disminución en la tasa de fertilidad.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se les realizaron medidas estadísticas descriptivas a ambos métodos y las diferencias entre ambos procedimientos se analizaron con la prueba *t* pareada con nivel $\alpha < 0.05$

RESULTADOS

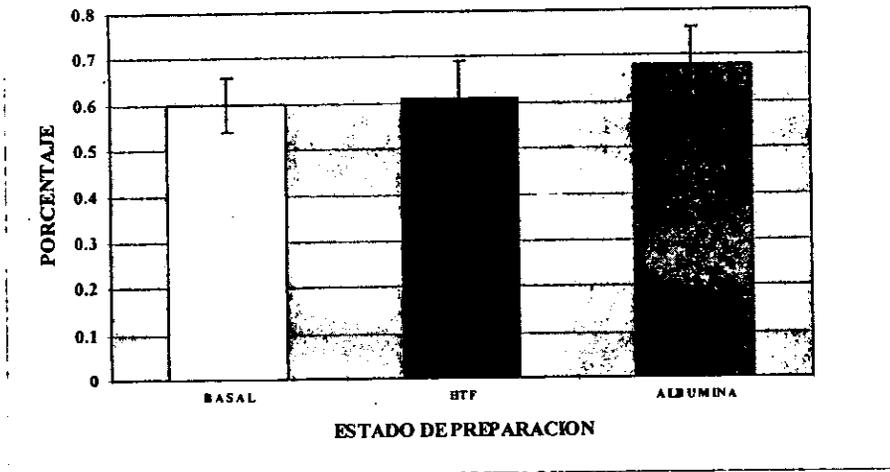
Los resultados de los dos métodos de preparación seminal de 15 muestras de semen sobre la movilidad espermática se presentan en la tabla 1. Los valores basales de movilidad progresiva (IM), VCL y VSL fueron respectivamente 0.60 ± 0.06 , 60 ± 9.13 , 17.1 ± 5.67 .

Estos valores se modificaron con los procedimientos de separación, apreciándose que el índice de movilidad disminuyó en forma significativa cuando se utilizó la separación por centrifugación en medio HTF, comparado con la separación en albúmina al 10%.

PARAMETROS DE MOVILIDAD	POST-CAPACITACION		VIABILIDAD	
	BASAL	HTF	ALBÚMINA 10%	HTF
IM	0.60 ± 0.06	0.61 ± 0.08	0.57 ± 0.08	0.47 ± 0.11
VCL	60 ± 9.13	63.2 ± 7.13	62.2 ± 8.3	57.1 ± 6.59
VSL	17.1 ± 5.67	12.1 ± 3.13	13.5 ± 3.3	9.14 ± 2.98
LIN	18.9 ± 3.9	18.9 ± 3.4	16.2 ± 3.86	18.6 ± 3.02
STR	53.7 ± 4.38	53.7 ± 4.38	49.8 ± 6.2	50.3 ± 8.04
ALH	2.5 ± 0.79	2.5 ± 0.79	2.1 ± 0.8	1.94 ± 0.55
BCF	45.8 ± 4.53	45.8 ± 4.53	43.1 ± 5.3	43.1 ± 5.30

Tabla 1. Características cinéticas de espermatozoides antes y después de la preparación seminal con diferentes métodos. Los valores corresponden a la media \pm D.E. de un total de 15 muestras seminales de diferentes individuos.

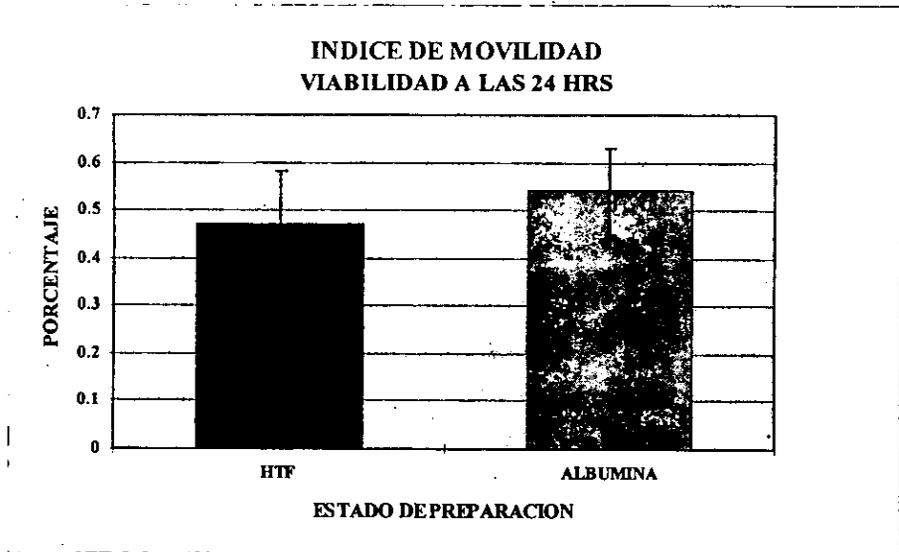
INDICE DE MOVILIDAD POST-CAPACITACION



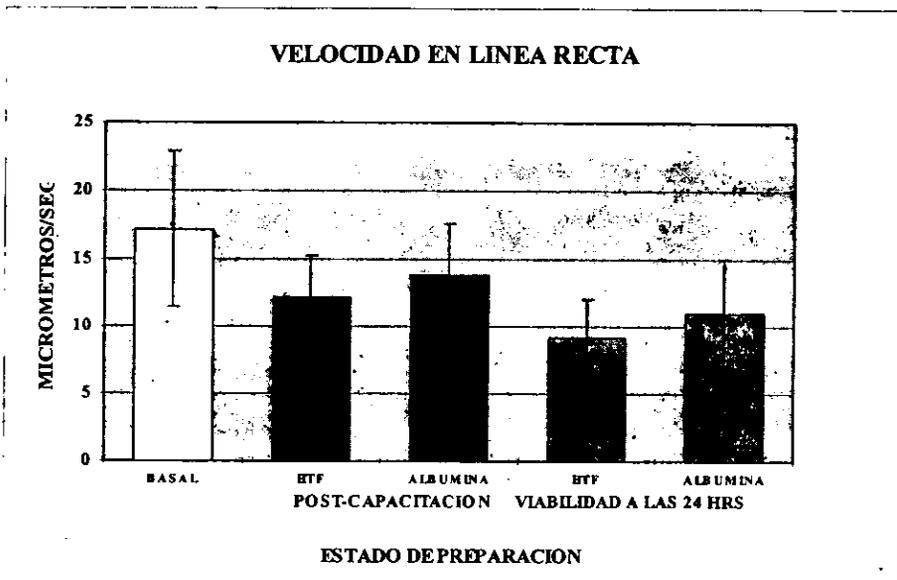
Gráfica 1. Índice de movilidad post-capacitación.

Resultado de la preparación seminal con albúmina al 10% y medio de cultivo HTF. Los resultados corresponden a un total de 15 muestras seminales. La separación en albúmina al 10% se relacionó con una mayor viabilidad de espermatozoides que el procesamiento con HTF (0.61 ± 0.08 vs 0.68 ± 0.08 ; $p=0.02$).

En relación al IM a las 24 Hrs post-preparación se hicieron evidentes diferencias entre los métodos utilizados. Tomando este índice como sinónimo de viabilidad funcional de los espermatozoides, los resultados de la separación con albúmina al 10% (0.54 ± 0.09 ; $p=0.04$) fueron mejores que el procedimiento con HTF (0.47 ± 0.11).

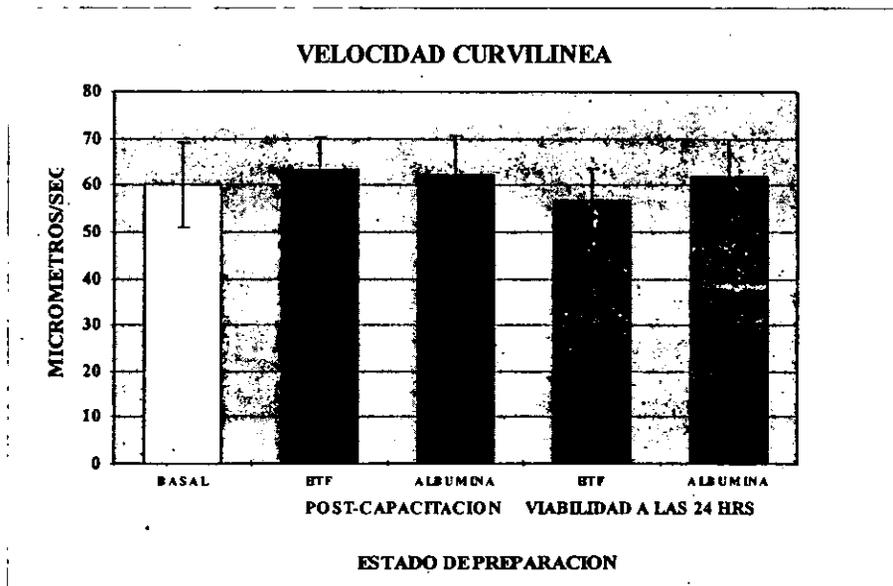


Gráfica 2. Índice de movilidad a las 24 hrs.



Gráfica 3. Velocidad en línea recta.

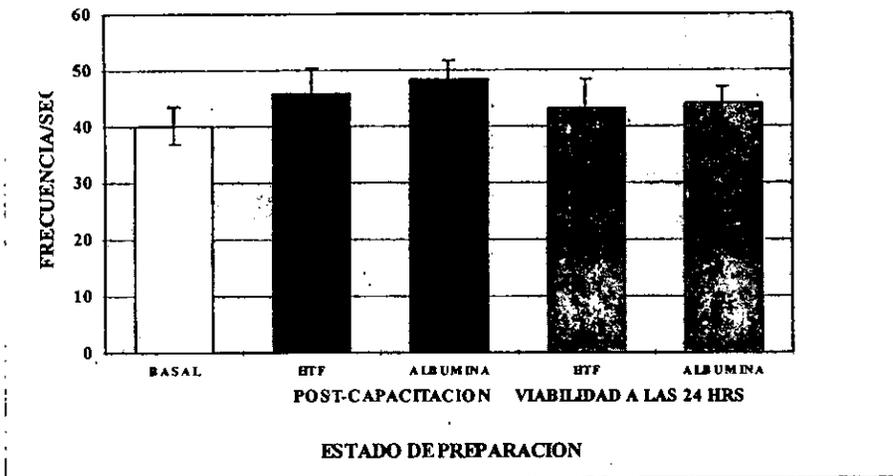
También se observó disminución importante en la VSL cuando se compararon los valores basales con los que se obtuvieron posterior a la separación. La separación con ambos métodos mostraron diferencias significativas, con HTF la velocidad en línea recta fue $p=0.006$ y con albúmina al 10% $p=0.005$. En el estado post-capacitación no se encontraron diferencias significativas en ambos métodos $p=0.04$ y de igual manera a las 24 Hrs ($p=0.08$)



Gráfica 4. Velocidad curvilínea.

Resultado de la preparación seminal con albúmina al 10% y medio de cultivo HTF. Cuando se comparó el estado basal con ambos métodos en el estado post-capacitación no se encontraron diferencias HTF $p=0.15$, albúmina al 10% $p=0.24$. Al analizar la VCL en forma inmediata a la separación se observó que esta fue menor en los especímenes que se separaron con albúmina que en los que se separaron con HTF $p=(0.2)$. A las 24 Hrs se observó que la separación en ambos métodos no mostraron diferencias estadísticas ($p=0.33$).

FRECUENCIA DE BATIDO DEL FLAGELO

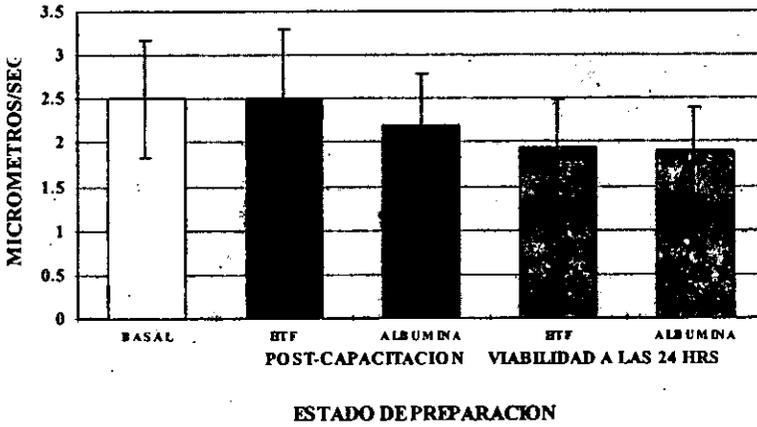


Gráfica 5. Frecuencia de batido del flagelo.

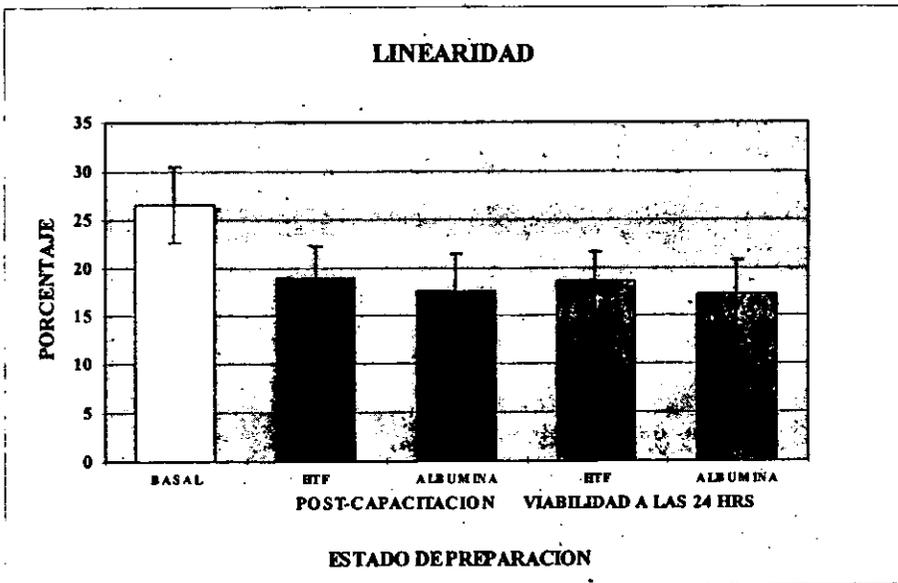
Los resultados de la preparación seminal con albúmina al 10% y medio de cultivo HTF en la frecuencia de batido del flagelo (BCF) solamente se encontraron diferencias cuando se compararon los valores basales con las muestras post-capacitación ($p < 0.0001$). A las 24 Hrs. de la separación de los espermatozoides no se encontraron diferencias estadísticas.

Resultados de la preparación seminal con albúmina al 10% y con medio de cultivo HTF. En la amplitud y desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) no se encontraron diferencias estadísticas cuando se compararon con los parámetros basales, en el estado post-capacitación no se encontraron diferencias en ambos métodos $p=0.07$ y a las 24 Hrs. de la separación tampoco se mostraron diferencias significativas. $p=0.4$

**AMPLITUD Y DESPLAZAMIENTO
LATERAL DE LA CABEZA**

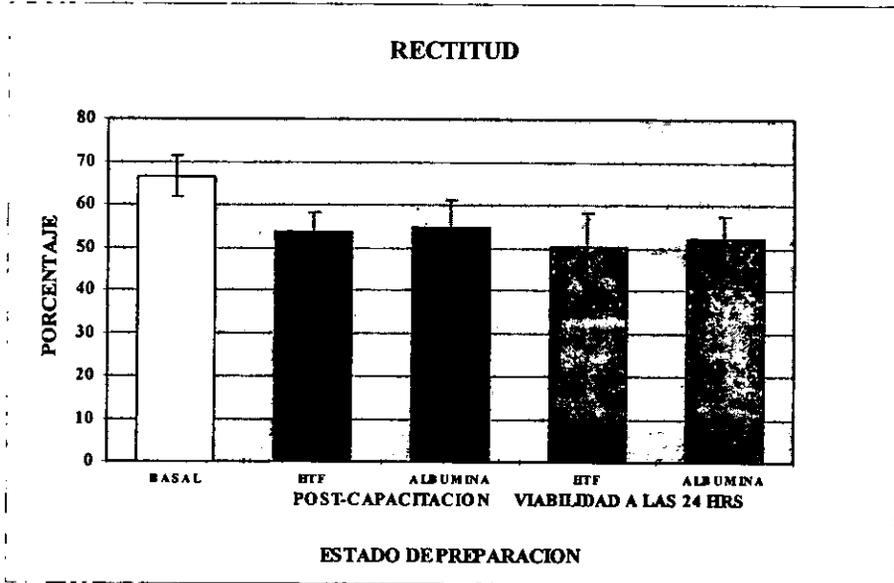


Gráfica 6. Amplitud y desplazamiento lateral de la cabeza.



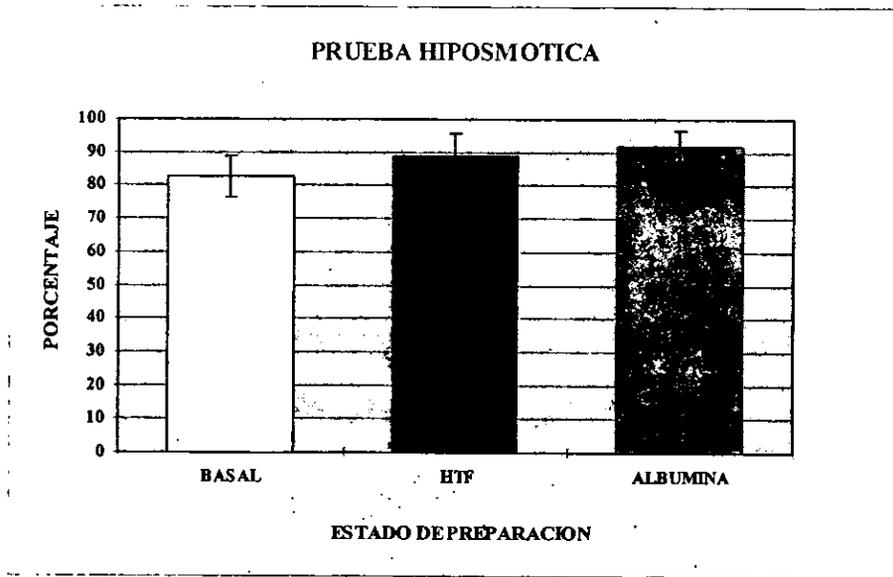
Gráfica 7. Linealidad.

Los resultados de la preparación seminal en ambos métodos sobre el parámetro de linearidad no mostró diferencias en el estado post- capacitación excepto, cuando se compararon con los valores basales $p < 0.0001$) y a las 24 Hrs. tampoco se encontraron diferencias $p = 0.15$.



Gráfica 8. Rectitud

El resultado de la preparación seminal sobre el parámetro de rectitud con albúmina al 10% y medio de cultivo HTF. No mostró diferencias significativas posterior a su separación $p = 0.3$, excepto cuando se compararon con los valores basales $p < 0.0001$). A las 24 Hrs. No mostraron diferencias $p = 0.1$

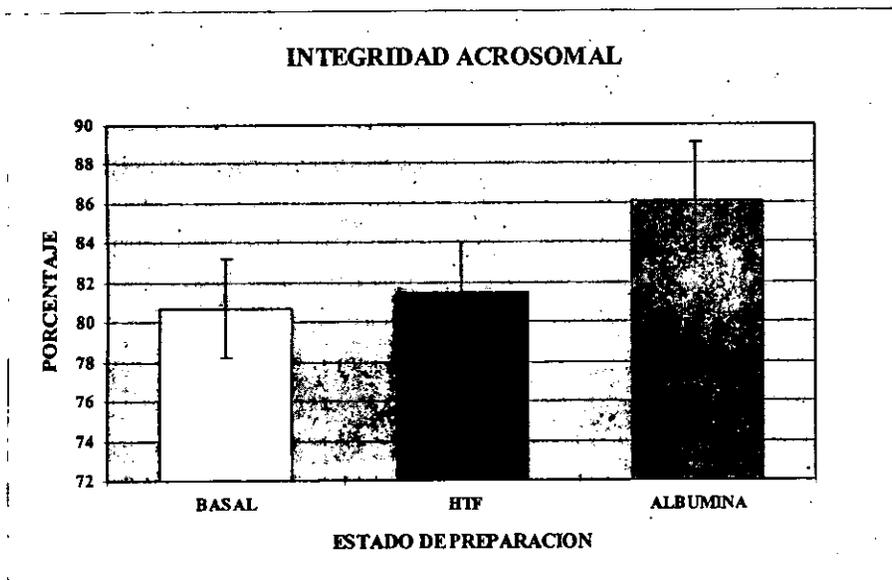


Gráfica 9. Prueba hiposmótica.

Resultado de la prueba hiposmótica con albúmina al 10% y medio de cultivo HTF. Los resultados corresponden a un total de 15 muestras seminales. El impacto de la separación seminal también fue evidente en los indicadores de integridad de las membranas del espermatozoide (prueba hiposmótica, integridad acrosomal). Posterior a la separación por los dos métodos se encontró un incremento en el porcentaje de células con membrana plasmática funcional con diferencias significativas ($p < 0.001$). El procesamiento por el método de albúmina al 10% ofreció mejores resultados que con el HTF ($p = 0.016$). Al comparar el estado basal con ambos métodos reflejaron diferencias $p = 0.001$.

Algo similar a lo anterior se encontró cuando se compararon los resultados de la preparación seminal en cuanto al porcentaje de células con acrosoma íntegro. El método de centrifugación en medio HTF también dio valores bajos en este parámetro y fue menor que los que se encontraron en la separación con albúmina al 10% ($p < 0.001$).

El estado basal comparado con las muestras post-capacitación también mostró diferencias
 $p=0.001$



Gráfica 10. Integridad acrosomal

Los resultados de las medias de la integridad membranal y acrosomal se encuentran en la tabla 2.

PARAMETRO	HTF
HPO	88.58 ± 6.90
IA	81.5 ± 2.53

Tabla 2. Estado de la integridad membranal y acrosomal antes y después de la preparación seminal con los dos métodos. Los valores corresponden a la media ± D.E. de un total de 15 muestras seminales de diferentes individuos.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Evidencias derivadas de los protocolos clínicos en el área de la reproducción asistida indican que el mejoramiento de los métodos de separación de espermatozoides móviles del semen llevan a un incremento en las tasas de FIV, por lo cual se ha buscado incrementar el rendimiento de los métodos de preparación seminal (Paulson y Polakoski, 1977 Yener y col, 1990). El *swim-up* es el método más usado en la selección de espermatozoides por ser el más sencillo de realizar, sin embargo en el laboratorio de andrología del Instituto Nacional de Perinatología se ha demostrado que este método no solamente produce bajas tasas de recuperación sino que parece inducir alteraciones morfológicas a la membrana del espermatozoide humano (Villanueva y col, 1993). En trabajos publicados recientemente se ha reportado también que los métodos de separación de espermatozoides móviles modifican de manera negativa una serie de marcadores de funciones espermáticas que se encuentran relacionadas con la fertilización (De Lamirande, 1991).

La mayoría de las alteraciones morfológicas y funcionales que se producen como resultado de la preparación seminal pueden ser atribuidos al daño que se produce por la generación de agentes oxidantes (Aitken, 1988). Este evento guarda una relación directa con el tiempo de la centrifugación y con la fuerza centrífuga que se emplea en la separación de la fracción móvil de espermatozoides.

Los métodos que se emplean regularmente en la preparación de semen para la reproducción asistida tiene la posibilidad de dañar a los espermatozoides debido a la fuerza mecánica de la citosedimentación, lo cual a su vez estaría implicado en la generación de radicales libres en una reacción en cadena que culminaría con el daño a un número mayor de células. (De Lamirande, 1995; Ng, 1991).

En un estudio previo se ha demostrado que la separación de espermatozoides móviles en medios que contienen concentraciones de albúmina mayores de las que se utilizan habitualmente en los programas de reproducción asistida parece tener un efecto protector sobre la membrana plasmática del espermatozoide. Esto podría explicarse tanto

por el efecto protector que tiene la albúmina en el daño inducido por los radicales libres, como por la reducción del impacto mecánico de la citosedimentación. (Villanueva y col,1993).

Uno de los métodos de preparación seminal que se emplea cada vez con mayor frecuencia en la reproducción asistida es el método de separación de espermatozoides móvil utilizando un gradiente discontinuo de percoll del que se ha dicho que ofrece ventajas en relación al método de *swim-up* en cuanto a su rendimiento. Sin embargo algunos datos de publicaciones recientes plantean la duda de que sea el mejor método de preparación seminal debido a que se ha documentado que este también puede producir daño membranal.(Check,1992)

El objetivo del presente trabajo fue analizar la viabilidad de espermatozoides móviles recuperados por dos métodos diferentes, debido a que nadie ha analizado previamente la sobrevivencia de los espermatozoides comparando los métodos de preparación seminal. En este caso se eligió la viabilidad del espermatozoide como un parámetro más fidedigno de la integridad anatómica y funcional de la membrana del espermatozoide y no como habitualmente se analiza este índice espermático. La razón para hacerlo de esta manera es que como se ha demostrado previamente, el daño a la membrana plasmática se refleja en la movilidad. Por otra parte, la viabilidad espermática medida por tinciones supravitales, que solamente estudia la capacidad de la célula de excluir los colorantes, en realidad mide la función de la permeabilidad iónica o de moléculas de bajo peso.

El tratamiento del semen por citosedimentación con HTF se asoció con una disminución significativa de la viabilidad de los espermatozoides lo cual confirma los datos que se han reportado anteriormente. En cambio los espermatozoides que se prepararon con albúmina al 10%, tuvieron una mejor sobrevivencia a 24 Hr.

Considerando que los resultados de la preparación seminal utilizando albúmina al 10%, puede afirmarse con cierto índice de certeza que esta diferencia en la sobrevivencia posterior a la preparación seminal puede ser explicada por el impacto mecánico de la

centrifugación en medios de cultivo con baja densidad (Díaz y Col, 1994). Sin embargo existe la posibilidad como se ha reportado anteriormente que el papel que juega la albúmina como un amortiguador/intercambiador de colesterol de la membrana permita la estabilización de esta estructura celular y en consecuencia una integridad estructural y funcional de las proteínas de la membrana plasmática.

El modelo de la capacitación espermática más aceptado actualmente se basa en el concepto de la modificación en el contenido y proporción de colesterol y fosfolípidos de la membrana celular del espermatozoide. Este cambio puede ocurrir a través de diferentes mecanismos bioquímicos en que se incluyen los cambios en el pH, la remoción de colesterol por acción de lipasas, la activación de la adenilciclase por el calcio etc. (Visconti, 1995).

La preparación seminal con albúmina al 10% parece relacionarse con mejores condiciones en cuanto a los parámetros de movimiento de los espermatozoides como es el caso de la velocidad curvilínea a las 24 Hr de la separación. El hecho de que la VCL se conserva solamente en los espermatozoides tratados con albúmina plantea la posibilidad de que esta se relacione con una sobrevivencia funcional mayor de los espermatozoides que la que se encuentra con la centrifugación en medio HTF.

Diferencias similares a la anterior se demostraron al comparar otros índices de funcionalidad espermática como son la integridad membranal y acrosomal y la sobrevivencia de los espermatozoides. Se sabe que el índice de movilidad es mejor sensor de los cambios en la viabilidad de las células. De hecho, parece ser el que mejor correlaciona con la capacidad fecundante. Tomado así, el índice de movilidad fue más alto con el método de separación que tiene una densidad mayor y aunque las diferencias no se hicieron patentes en este estudio, se notó una tendencia a mayor sobrevivencia con el método de albúmina. Este último dato pudiera explicarse ya no solamente por el efecto protector

de este medio durante la centrifugación sino también por su reconocido efecto como agente que previene el daño originado por los radicales libres.

Los resultados de las pruebas indirectas de función de la membrana plasmática e integridad acrosomal mostraron un comportamiento similar a los parámetros cinéticos de los espermatozoides. De acuerdo con nuestros datos, parece confirmarse que la separación en medio con albúmina al 10% conserva mejor la estructura y función de la célula espermática que con el método que se comparó. Nuevamente, en este la explicación de tal comportamiento podría ser que la centrifugación en medios de alta densidad protege a la membrana plasmática como se ha demostrado previamente y a la reducción de los efectos deletéreos de los radicales libres que se generan durante la citosedimentación. (Aitken,1988; De Lamirande,1995)

Es interesante notar que algunas evidencias presentadas en la literatura sugieren que la albúmina es un promotor de la capacitación espermática lo cual podría también explicar que el estado de hiperactivación se alcanza inmediatamente después de la separación de la fracción móvil y se sostiene a lo largo de 24 Hr. Aquí es importante recalcar que a diferencia de lo que ocurrió con la separación en el medio HTF, la viabilidad de las células se conserva mejor cuando se separan en albúmina al 10%. La separación en HTF parece relacionarse con una inducción tardía de la capacitación espermática *in vitro*.

Esta serie de diferencias es digna de tomarse en cuenta debido a que cuando se realiza la inseminación artificial las células masculinas se depositan en el útero después de la separación y de ahí migran hacia la trompa de Falopio. Si las células se encontraran inducidas en su estado de hiperactivación, es de esperarse que la sobrevivencia de estas en el aparato genital femenino sería menor, fenómeno que no solamente se demuestra en nuestro estudio sino que también puede ser apoyado por publicaciones en las que se ha indicado que espermatozoides capacitados están expuestos a sufrir reacción acrosomal temprana con la consecuente pérdida de viabilidad.

CONCLUSIONES

El significado clínico de estas diferencias no se puede identificar en este tipo de estudios pero por el momento es importante considerar que el método de separación de espermatozoides móviles empleando albúmina a concentraciones mayores que las que se usan habitualmente en la reproducción asistida es un método sencillo, no costoso, que puede ofrecer resultados similares a los que se obtienen con la separación por métodos más costosos.

Sería interesante en el futuro evaluar estos y otros métodos en cuanto a la sobrevivencia a tiempos más prolongados y a la capacidad de fusión membranal en el ensayo de fertilización de Hámster. También es importante definir en estudios posteriores el impacto de la preparación seminal con albúmina al 10% en muestras seminales anormales y limítrofes debido a que es en este tipo de biológicos en los cuales los métodos de separación tienen mayores efectos deletéreos.

De manera indirecta, queda implícito las evidencias presentadas en los trabajos clínicos de fertilización *in vitro* por causas del factor masculino, en los que se ha documentado repetidamente que para lograr tasas de fertilización semejantes a las de los hombres con semen normal se requieren cantidades 10 veces mayores de espermatozoides.

El estudio de los parámetros cinéticos del espermatozoide inducidos por la manipulación *in vitro* es importante para diseñar mejores métodos de recuperación de espermatozoides para la reproducción asistida basados no solamente en su movilidad sino también en otras características funcionales que son importantes como la viabilidad.

El modelo de la capacitación *in vitro* ofrece también la oportunidad para estudiar los factores fisiológicos a través de los cuales el espermatozoide humano adquiere su capacidad fertilizante con el objeto de investigar nuevos métodos de control de la fertilidad.

BIBLIOGRAFÍA

-Ajay PS; Gopal CM, Suniti, M and Amitabha G.1991. Lipid change of goatsperm plasma membrane during epididymal maturation. *Physical. Acta* 1061:185-196.

-Alvarez JG. Touchstone,JC, Blasco,L. and Story BT.1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa.Superoxide dismutase as major enzyme protectant. Against oxygen toxicity. *J. Androl* 8:338- 348.

-Aitken R.J. Clarkson JS. 1987. Cellular basis of defectiva sperm funtion and its association with genesis of rective oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod Fertil* . 81:459-469.

-Aitken RJ and Clarkson JS. 1988. Significance of reactive oxigen species and antioxidant in defining efficiency of sperm preparation techniques, *J. Androl* 9:367-376.

-Aitken RJ .Buckingham DW.& Harkiss D. 1993. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J. Reprod Fertil* . 97:441-450.

-Austin, C.R.1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J. Sci .Res* 4:581-596.

-Austin, CR. 1952. The capacitation of the mammalian sperm . *Nature* . 170-326.

-Berger TD. 1985. Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fertil Steril* 43(2):268-273.

-Bedford, JM . 1983. Significance of the need form sperm capacitation before fertilization in eutherian mamals. *Biol.Reprod* . 28 :108-120.

- Burkman, L.J.1991. Discrimination between nonhyperactivated and classical hyperactivated motility patterns in human spermatozoa using computerized analysis. *Fertil Steril*. 55:363-371.
- Chang, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168:697-698.
- Chang, M:C:1984. The meaning of sperm capacitation *J. Androl* .5: 45-50.
- Check JH, Katsoff D, Kozak J, Lurie D. 1992. Effect of swim-up, Percoll and sephadex sperm separation methods on the hypo-osmotic swelling test. *Human Reprod* . 7: 109-111.
- Coddington CC, Franken DF, Burkman LJ, Oosthuizen WT, Kruger TF 1984. Functional aspects of human sperm binding to the zona pellucida using the hemizona assay. *J. Androl* 118:87-92.
- Davis, BK. 1976. Inhibitory effect of synthetic phospholipid vesicles containing cholesterol on the fertilizing ability of rabbit spermatozoa. *Biol. Med.* 152:257-261.
- Davis, BK.1980. Interactions of lipids with the plasma membrane of sperm cells I. The antifertilization action of cholesterol. *Arch. Androl.* 5:249-2.
- Davis, RO, Rothmann.SA. & Ovarstree,JW. 1992. Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. *Fertil Steril* 57:648-653.
- De Lamirande E. and Gagnon , C. 1991 b. Reactiveoxygen species and human spermatozoa II.Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J. Androl.* 13:379-386.
- De Lamirande E. and Gagnon, C. 1992 a. Reactive oxygen species and human spermatozoa I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sper axonemes . *J. Androl.* 13:368.378.

- De Lamirande E. and Gagnon, C. 1995. Capacitation- associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free. Radic. Biol. Med.* **18**:487-495.
- Dentwood JB. 1982. Capacitation, acrosome reaction and fertilization . *Biochemistry of mammalian reproduction* .New York, *Jonh Wiley & sons* .203-256.
- Díaz PM, Zarate G, Carballo E, Barron A, Villegas H y Alvarado A. 1994. Efecto protector de la albúmina sobre las membranas del espermatozoide humano en la capacitación espermática *in vitro*. *Perinatol Reprod Hum.* **8**:77-82.
- Díaz PM, Zarate G, Sanchez M, Flores A. y Villanueva C. 1995. Factores que alteran los resultados del análisis computarizado de semen . *Perinatol. Reprod Human* **9**:208-215.
- Dukelow, W.R. 1971. Bioassay technique related ot sperm capacitation . *Acta Endocrinol.* **66**:503-514.
- Duncan, A. E. and Frase, L.R: 1993. Cyclic AMP-dependent fosforilation of epididymal mouse sperrm proteins during capacitation *in vitro*. *Reprod Fertil.* **97**:287-299.
- Eddy E.M, Knobil JD, Neill LL, Ewing GS, Greenwald CL, Markent DW. 1988. *The physiology of reproduction* .New York. *Raven Press.* 27-68.
- Evans WH, Setchell BP. 1979. Lipids changes during epididymal maturation in ram spermataozoa collected at different times of the year. *J. Reprod Fertil.* **57**: 197-203.
- Fleming AD, Yanagimachi R. 1982. Fertile life of acrosome-reacted guinea pig sperm. *J. Exp Zool.* **220**: 109-122.
- Fraser LR. 1981. Dibutiryl cyclic AMP decrease capacitation times *in vitro* in mouse spermatozoa. *J. Reprod Fertil.* **62**: 63-71.

- Garbers, D.L. and Kopf, G.S. 1980. The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides. *Adv. Cyclic Nuc. Res.* **13**: 251-306.
- Go, K.J and Wolf, D. P. 1985. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol. Reprod.* **32**:145-153.
- Gorus, FK Pipellers DG. 1981. A rapid method for the fraction of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertil Steril.* **35**: 662-667.
- Gwatkin RBL, Anderson Of. 1969. Capacitation of hamster spermatozoa by bovine follicular fluid. *Nature* **224**:1111.
- Hall CJ, Hadley J, Doman T. 1991. Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and the membrane physical state during epididymal maturation. *J. Androl* **12**: 76-87.
- Jeyendran RS, Van der ven J, Pelaez PM, and Crabo BG. 1984 Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod Fertil* **70**: 219-228.
- Yener, S. Mathur B. 1990. Comparison of two sperm preparation techniques using automated sperm motion analysis: migration sedimentation versus swim-up. *Arch. Androl.* **25**:17-20.
- Kopf, G.S. and Gerton, G. L. 1991. The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. In *Elements of Mammalian Fertilization*. Boca Ratan Press. 153-203.
- Lindemann, C.B and Kanous, K.S. 1989. Regulation of mammalian sperm motility. *Arch. Androl.* **23**:1-22.
- Lui C.W. and Meized S. 1979. Further evidence in support of a role for hamster sperm hydrolytic enzymes in the acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* **207**:173-186.

- Makler A, Murillo O, Huszar G, Tarlatzis B, De Cherney A. 1984. Improved techniques for separating motile spermatozoa from human semen. *Int J Androl* 7:71-78.
- Matsuoka Y, Fugino Y, Koh B, Kojita T, Ogita S. 1995. Comparison of sperm preparation methods: Was and concentration, swim-up, Migration-Gravity sedimentation, 80% Percoll and semen Filtration Column. *J.Reprod Med.* 40:342-346.
- Monks, N.J, Stein, D.M and Fraser, L.R . 1986. Adenylate cyclase activity of mouse sperm during capacitation in vitro: effect of calcium and a GTP analogue *Int. J. Androl.* 9:67-76.
- Morales, P.,Overstreet,JW and Katz DF . 1988. Changes in human sperm motion during capacitation *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 83: 119-128.
- Mortimer, S.T and Mortimer .D. 1990. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J. Androl.* 11:195-203.
- Ng FLH, Liv DY, Gordon HW. 1991. Comparison of percoll, mini-percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Human Reprod* 7: 261-266.
- OMS. 1992 Manual de laboratorio de la Organización Mundial de la salud para el examen de semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. De. *Panamericana, Buenos Aires.*
- Quinn, P.J., Kerin, J.F. and Warnes, G.M. 1985. Imporved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil. Steril* 44: 493-498.
- Paulson JD, Poiakoski KL. 1977. A glass wool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate. *Fertil Steril* .28: 178.

- Rogers BJ. 1978. Mammalian sperm capacitation and fertilization in vitro: A critique of methodology . *Gamete Res.* 1:165-223.
- Ruknudin , A. And Silver, I.A. 1990. Ca²⁺ uptake during capacitation of mouse spermatozoa and the effect of an anion transport inhibitor on Ca²⁺ uptake. *Mol. Reprod. Dev.* 26: 63-68.
- Stein , D.M. and Fraser,L.R.1984. Cyclic nucleotide metabolism in mouse epididymal spermatozoa during capacitation in vitro. *Gamete Res.* 10:283-299.
- Suzuki, F. And Yanagimachi, R. 1989. Changes in the distributich of intramembranous particles and filipin -reactive membrane sterols during in vitro capacitation of golden hamster spermatozoa. *Gamete Res.* 23:335-347.
- Talbot P and Chacon SR. 1981. A triple-stain technique for evalution of normal acrosome reaction of human sperm. *J. Exp Zool* 215:202-208.
- Tash, J.S. and Means, A.R.1983. Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate calcium and protein phosphorylation in flegellar motility . *Biol. Reprod.* 28:75-104.
- Vaidya R.A, Glass R.H. Danderkar P, et al. 1971. Decrease in the electrophoretic mobility of rabbit spermatozoa following intrauterine incubation . *J. Reprod. Fertil.* 24:299-301.
- Villanueva,CD. Díaz P.Barrón G. López C.Villegas C. 1993. Ultrastructural change of human sperm during in vitro capacitation. *Mol Androl* 5: 101-104.
- Visconti, P.E. Moore GD,Bailey J.L. and Kopf G.S. 1995. Capacitation in mouse spermatozoa II. *Development* 121:1139-1150.
- Yanagimachi R. 1969. In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J Reprod Fertil* 18: 275-

-Yanagimachi R. 1981. Mechanisms of fertilization in mammals. In Mastroianni .Fertilization and embryonic development in vitro . New York. *Plenum publishing corporation* . 81-182.

-Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization . In: Knobil E, Neill JD (eds): The Physiology of Reproduction. New York: *Raven Press*. 189- 317.

-Zaneveld. LJ, Schumacher GF. 1986. Capacitación y fecundación Reproducción humana(Fertilidad, Esterilidad y Contracepción). Editorial Salvat, S.A Barcelona España. 123-137.