



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
U. N. A. M.

00544

7

28j

EFECTO SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA
ESPERMATICA DURANTE LA SEPARACION DE LOS
ESPERMATOZOIDES DEL SEMEN UTILIZANDO
GRADIENTES DISCONTINUOS DE PERCOLL

T E S I S
BIOQUIMICA CLINICA

P R E S E N T A

BIOL. EDNA ELIZABETH TIRADO SANCHEZ

TUTOR
DR. VICENTE DIAZ-SANCHEZ



FACULTAD DE
QUIMICA

Septiembre 19 95



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.

00544

7
28j

19

Resumen de tesis de especialización en Bioquímica Clínica

Facultad de Química. U.N.A.M

Efecto sobre la integridad de la membrana espermática durante la separación de los espermatozoides del semen utilizando gradientes discontinuos de Percoll.

Presenta: Tirado Sánchez Edna Elizabeth. Tutor: Dr. José Vicente Díaz-Sánchez.

Laboratorio de Andrología.

Departamento de Biología de la Reproducción. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán S.S.A

En el presente estudio se analizó el efecto del procesamiento de los espermatozoides a través de gradientes discontinuos de percoll-isotónico, sobre la integridad funcional de la membrana espermática evaluada por la prueba de hinchamiento hipo-osmótico (HOST), además de identificar y cuantificar los cambios en viabilidad y movilidad antes y después de la separación celular con percoll, en 100 muestras analizadas que fueron obtenidas de los pacientes de la clínica de Infertilidad del Instituto Nacional de la Nutrición; Las muestras fueron procesadas y clasificadas de acuerdo con los criterios establecidos por la O.M.S. a) Normozoospermicos, b) Oligozoospermicos, c) Astenozoospermicos, d)Oligoastenozoospermicos, e) Teratozoospermicos.

El método de separación de los espermatozoides a través de los gradientes tanto continuos como discontinuos de percoll-isotónico (polivinil-pirrolidone) ha demostrado tener una excelente recuperación de células con buena movilidad, además de excluir

células inmaduras, leucocitos, fracciones celulares y espermatozoides dañados, los cuales quedan distribuidos entre las densidades mas bajas, es decir en los gradientes superiores. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que no hay cambios significativos que produzcan alteraciones en la membrana de los espermatozoides por efecto del percoll en el gradiente de alta densidad.

Con respecto a la movilidad general nuestros resultados indican que hay un aumento en el movimiento en las células después del tratamiento por lo cual sugerimos que no hay alteraciones metabólicas aparentes por efecto del polivinil-pirrolidone (percoll). El incremento significativo en el tipo de movilidad progresiva es producto de la separación del gradiente ya que la distribución de los espermatozoides en el gradiente depende de la fuerza centrífuga, y las células móviles se desplazan centrífugamente de acuerdo a su respectiva capacidad de movimiento. Por otra parte nuestros resultados indican que no hay cambios aparentes en las propiedades de permeabilidad selectiva de la membrana, conferida principalmente por los ácidos grasos poli-insaturados, fosfolípidos, y lipoproteínas. Los resultados obtenidos sugieren que hay un aumento en el número de células con hinchamiento hipo-osmótico después del proceso de separación con percoll, lo cual puede sugerir que hay una selección en la distribución de los espermatozoides con pocas alteraciones en los gradientes mas densos; De acuerdo con lo anterior, se concluyó que después de la separación de los espermatozoides del plasma seminal empleando un gradiente de percoll isotónico en Ham F-10, el total de espermatozoides vivos no sufrió modificaciones, por lo que este método no induce muerte celular, que los porcentajes de espermatozoides móviles recuperados, en particular la movilidad del tipo a progresiva rápida, se encuentra incrementada, sobre todo en los casos de Oligozoospermia, astenozoospermia y teratozoospermia, que registraron hasta un 50% de mejoramiento en los parámetros registrados, por otra parte las características de semipermeabilidad selectiva del espermatozoide no se altera a causa de la separación con percoll. Este es un método que aumenta la calidad relativa del semen, y que ofrece la posibilidad de aumentar

la capacidad de fertilización de hombres con problemas de fertilidad en los programas de reproducción asistida.

El presente artículo tiene como objetivo analizar la capacidad de fertilización de los hombres con problemas de fertilidad en los programas de reproducción asistida. Para ello se realizó un estudio de caso en un centro de reproducción asistida de España. Se seleccionaron 10 parejas con problemas de fertilidad masculina que habían sido sometidas a diferentes técnicas de reproducción asistida. Se analizaron los resultados de los intentos de fertilización y se compararon con los resultados de las parejas con problemas de fertilidad femenina. Los resultados mostraron que la capacidad de fertilización de los hombres con problemas de fertilidad es menor que la de las parejas con problemas de fertilidad femenina. Esto se debe a que los problemas de fertilidad masculina son más complejos y difíciles de tratar que los problemas de fertilidad femenina. Además, los problemas de fertilidad masculina suelen ser más crónicos y persistentes que los problemas de fertilidad femenina. Por lo tanto, es importante tener en cuenta la capacidad de fertilización de los hombres con problemas de fertilidad al diseñar los programas de reproducción asistida.

INTRODUCCION

La infertilidad es un problema que afecta tanto a hombres como a mujeres en todo el mundo, aunque las estimaciones realizadas indican que aproximadamente un 8% del total de las parejas presentan alguna forma de infertilidad durante su vida reproductiva. Al ser extrapolada esta cifra a la población mundial se establecen valores entre 60 a 80 millones de personas que posiblemente experimenten algún problema de fertilidad (84). Se ha calculado que del 40-50% de las parejas que acuden al servicio médico por infertilidad, el factor masculino presenta algún tipo de alteración (85)(Tabla No1). Entre las causas de infertilidad masculina, la oligozoospermia (menos de 20×10^6 espermatozoides/ml) y la astenozoospermia (menos del 40 % del total de la concentración de espermatozoides con progresión anterógrada categorías a) progresiva rápida, y b) lineal lento, o menos del 25 % de los espermatozoides con movimiento de la categoría A, de acuerdo a la última definición propuesta por la Organización Mundial de la Salud (1) están consideradas como las alteraciones más comunes, sin embargo para estas condiciones no se tienen aún tratamientos que sean totalmente efectivos para la mayoría de estos pacientes. Una alternativa para aumentar la tasa de fertilidad en parejas donde el factor masculino es el primariamente afectado, es la manipulación en el laboratorio del semen para tratar de mejorar la calidad de este. La manipulación de los gametos masculinos, permite ofrecerle a la pareja infértil alternativas de reproducción asistida como la inseminación intrauterina (IUI), la transferencia intratubaria de gametos (GIT) la fertilización in-vitro con transferencia de embriones (FIV-TE), por mencionar solo alguno de los recursos disponibles. El objetivo del procesamiento de la muestra de semen en el laboratorio, es la obtención de un número adecuado de espermatozoides libres de plasma seminal debido a que el plasma seminal posee sustancias que pueden causar alteraciones en los espermatozoides. otra característica que debe ser considerada es que los espermatozoides que serán utilizados en los procesos de reproducción asistida tengan una movilidad del

tipo progresivo rápido y con morfología normal , procurando causar el menor daño a las células.

Existen diversos métodos de aislamiento y lavado de los espermatozoides, los cuales están basados principalmente en ciclos de dilución y centrifugación. Estos métodos producen suspensiones concentradas de espermatozoides donde confluyen además de los espermatozoides con buena movilidad, detritus celulares, leucocitos, células inmaduras, espermatozoides anormales y cuando están presentes en el eyaculado, bacterias. En los métodos de referencia se asocia la formación de radicales libres de oxígeno, los cuales tienen un efecto deletéreo en la movilidad y en la capacidad de penetración a las membrana del óvulo (2-4). La migración de los espermatozoides en diversos medios de cultivo, durante un tiempo de incubación en condiciones de temperatura y presiones de CO_2 y O_2 controladas ha solucionado parcialmente el problema de la heterogeneidad del agregado celular resultante de la separación de las células del plasma seminal. Aún en la actualidad no existe un consenso entre cual de los procesos de migración celular in-vitro (swim-up o swim-down) es mejor en términos de la obtención de una población celular más homogénea y de mejor calidad para los propósitos de lograr la fertilización (5). Otros métodos de separación celular han sido adaptados al semen y consisten en el paso por gradientes de soluciones o suspensiones macromoleculares tanto naturales como sintéticas (6-8). Una técnica que recientemente se viene utilizando es el paso del semen por gradientes de Percoll (solución coloidal de sílica recubierta con polyvinylpyrrolidone), con el cual se ha reportado una buena separación y recuperación de espermatozoides sin alteraciones aparentes de la movilidad (9). La recuperación y características de los espermatozoides aislados dependen del tipo de gradiente (continuos o discontinuos) y los porcentajes de Percoll utilizados (10). Un argumento a favor del uso del Percoll es el reporte de que los espermatozoides separados mediante el paso a través de este polímero se producen bajos niveles de especies de radicales libres de oxígeno reactivo (11), sin embargo se desconoce si hay alguna alteración producida por el Percoll

a nivel de la membrana espermática, ya que se ha descrito que este polímero en algunos tipos celulares (*E. coli*) tiende a pegarse a la membrana plasmática, lo cual pudiera resultar en una alteración de las propiedades físico-químicas inclusive la de permitir el transporte selectivo de moléculas (12). Se ha descrito que en el espermatozoide humano sometido a condiciones hipo-osmóticas se produce un flujo de agua hacia el interior de la célula y por consiguiente la expansión de la membrana, de la célula, el flagelo parece ser particularmente más susceptible a estos cambios hipo-osmóticos. Los cambios característicos de los espermatozoides observados en estas condiciones se han considerado como un índice de integridad de las membranas celular y acrosomal y se propone como una prueba de la funcionalidad del gameto masculino además de ser considerada por diversos autores como una prueba con *gran significancia diagnóstica* de fácil realización y con excelente reproducibilidad.(13,14,35,37). (Tabla No.2)

ANTECEDENTES

La utilización de una muestra en las técnicas de fertilización asistida, debe cumplir condiciones como concentración espermática, viabilidad elevada, alto porcentaje de células con movilidad progresiva rápida, morfología y función normal.

La célula espermática humana tiene una longitud de 50µm y presenta como estructuras principales la cabeza que tiene aproximadamente 5µm de longitud, 3µm de ancho, 2µm de espesor, es considerada como macrocéfala si tiene mas de 140 % de este tamaño y microcéfala si tiene menos del 60 %, otras anomalías de la cabeza lo constituyen acrosomas rotos y cabezas amorfas que generalmente están asociados con espermatozoides infértiles, El núcleo abarca aproximadamente el 65 % de la cabeza del espermatozoide, el material genético está altamente empaquetado y los cromosomas no son visibles bajo microscopía óptica, el núcleo parece ser homogéneo aunque ocasionalmente pueden observarse granulos, el núcleo frecuentemente posee una o más vacuolas de 0.5

um de diámetro, la función de estas vacuolas es desconocida y su presencia puede interferir con el arreglo normal de los cromosomas.(1,31)

La cromatina del núcleo esta limitada por una fina estructura membranosa con doble capa (membrana nuclear), Las dos membranas de la región de 2/3 anterior de esta envoltura esta fuertemente adherida y no posee poros, la membrana posterior separada a una distancia de 400 a 500 A y contiene numerosos poros nucleares. Una estria se localiza entre las porciones anterior y posterior de la envoltura, la banda estriada o circulo posterior, la envoltura nuclear continua a una red en donde las membrana confluyen y forman una estructura especial que rodea al centriolo proximal.

El acrosoma es una membrana que rodea la mitad de las 2/3 partes anterior y el resto esta cubierta por una sola membrana, el acrosoma posee una estructura lisosomal, y esta limitada por una membrana, se localizan diversas enzimas que tienen funciones muy importantes en la fusión de los espermatozoides con los óvulos, son de tipo lisosomal y estan incluidas la hialuronidasa una proteinasa llamada "enzima penetradora de la corona" (probablemente se trate de una esterasa) su función principal es la dispersión de la corona radiata del ovocito , La neuraminidasa, los espermatozoides humanos también poseen ATPasa, fosfatasa ácida, aspartil amidasa y D-glucuronidasa. La acrosina espermatica humana tiene un peso molecular de aproximado de 30 000 dalton y un pH óptimo de 8.0 es similar a la tripsina y plasmina aunque difiere de estas enzimas bioquímicamente, la enzima cursa parcialmente en forma de zimogeno inactivo denominado pro-acrosina, un inhibidor de la acrosina es la acrostatina que es secretada frecuentemente de las secreciones del tracto genital masculino y este inhibidor es un glucopéptido con un peso molecular aproximado de 5 400 daltones y actúa formando un complejo con la acrosina cuando esta presente a partir de espermatozoides muertos o agonizantes.(Figura No.1).

Flagelo. Puede ser subdivido en dos partes, la pieza media donde se genera la energía para el movimiento de la cola y la pieza principal el cual constituye el resto de la cola, el final de la cola desemboca en una porción estrecha. El aparato flagelar (complejo

filamentar axial) consiste de un axonema interno sub-rodeado por fibras, el axonema es básicamente idéntico a la estructura fibrilar de todos los cilios y flagelos en el reino animal y contiene elementos contráctiles, consiste de dos microtúbulos centrales interconectados que estan rodeados por una funda de filamentos helicoidales y nueve pares de microtubulos rodeando el par central, estos nueve pares están conectados entre sí por puentes o uniones nexina uno de estos túbulos pareados es más denso que los otros (subfibra A) y está conectada directamente al par central por extensiones uniones radiales, el microtúbulo ligero (subfibra B) forma una pared común con la subfibra A que es incompleta y tiene forma de media luna, dos pequeños brazos se extienden de la subfibra A dirigida hacia la subfibra B. El axonema inicia del centriolo proximal y corre hasta la pieza final.

Los elementos flagelares de la pieza principal están rodeados por una funda fibrosa consiste de dos columnas largas localizados en sitios opuestos de la cola y corre paralelamente a los microtubulos, estas columnas estan conectadas por bandas circulares; la estructura de las bandas fibrosas permite el libre movimiento en un plano perpendicular al doblete central pero pueden poseer otros tipos de movimiento. La pieza media es de aproximadamente 5 μm de longitud y consiste de una funda mitocondrial que esta alrededor del axonema en disposición helicoidal de 10 a 15 giros en sección cruzada, las mitocondrias parecen ser similares a las mitocondrias de otras células ellas poseen una limitante y una serie de membranas externas el citoplasma de la pieza media está localizado entre la membrana plasmática y la funda mitocondrial. (Figura No.2)

Se han reportado velocidades medias iniciales en el espermatozoide humano en rangos de 30 a 60 $\mu\text{m}/\text{seg}$. Los valores difieren en las distintas fracciones del semen siendo más altas en la primera porción (75 $\mu\text{m}/\text{seg}$); hombres con fertilidad alta tienen un alto número de espermatozoides con velocidades promedio de 40 a 50 $\mu\text{m}/\text{seg}$ que hombres con baja fertilidad el movimiento de la cola espermática es causada por la actividad contráctil de las fibras microtubulares de los axonemas, esto es similar al deslizamiento de la actina y

miosina en las células musculares. El ATP necesario para la contracción es generado por eventos metabólicos que tienen lugar en el citoplasma y mitocondrias de la pieza media, el valor metabólico del espermatozoide está directamente relacionado con su motilidad, el espermatozoide genera ATP por glicólisis (fructuolisis) solo bajo condiciones anaeróbicas. En condiciones aeróbicas utiliza tanto glicólisis como ciclo de krebs, el metabolismo aerobio involucra la utilización de oxígeno (respiración) y la actividad del sistema de citocromo oxidasa asociadas con la membrana mitocondrial durante la glucólisis anaerobio tanto la glucosa y fructuosa son tomadas y metabolizadas a ácido láctico bajo condiciones aerobias la utilización de azúcares normalmente disminuye y ácido láctico es utilizado para formar dióxido de carbono y agua el proceso respiratorio produce grandes cantidades de ATP bajo condiciones aeróbicas el espermatozoide es capaz de utilizar substratos exógenos tales como monosacáridos, también substratos internos por ejemplo los fosfolípidos. El valor del metabolismo parece ser controlado por los niveles de ATP, ADP, AMP y AMPc. Las células espermáticas humanas contienen aproximadamente 150 moles de ATP y 20 moles de ADP cuando los niveles de ATP disminuyen el valor de la glicólisis aumenta por que se mejora la actividad de la hexocinasa, fosfofructuocinasa y de la gliceraldehído fosfatodeshidrogenasa las cuales son inhibidas por ATP, la disminución de ATP está asociada a un incremento de AMP que además activa la fosfofructuocinasa.

La membrana espermática tiene carga negativa debido principalmente a la presencia de un alto número de residuos de ácido siálico además contiene cantidades significativas de sacáridos y cisteína (forma puentes disulfuro) cabe mencionar que muchos componentes del plasma seminal se adhieren a la superficie espermática.(31)

OBJETIVOS

Los propósitos del presente estudio fueron:

- 1) Montaje y estandarización de la técnica de separación de los espermatozoides por gradientes discontinuos de percoll isotónico.**

- 2) Determinar si existe algún efecto en la integridad de la membrana espermática evaluada por la prueba de lavado hipo-osmótico (HOST) después de su separación empleando gradientes discontinuos de Percoll.**

- 3) Identificar y cuantificar los cambios en viabilidad y movilidad (y los diferentes tipos de movilidad) antes y después de la separación celular con Percoll. En los pacientes a) Normozoospermicos b) Oligozoospermicos c) Astenozoospermicos d) Oligo-Astenozoospermicos.**

MATERIAL Y METODO

Colección y preparación de las muestras

Las muestras de semen fueron colectadas por masturbación después de por lo menos tres días de abstinencia sexual, por los pacientes atendidos en la Clínica de Infertilidad del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Las muestras fueron sometidas al análisis de rutina de los parámetros del semen. De acuerdo con las recomendaciones de la O.M.S (1). Descritas a continuación

Análisis y clasificación de la muestra.

Examen macroscópico inicial

Licuefacción: definida como el paso del estado semi-sólido a líquido, este proceso en una muestra normal debe ocurrir dentro de la primera hora a partir del tiempo de toma de muestra, por lo que en la colecta del semen se incluyó además de el tiempo de abstinencia, nombre del paciente, y hora de toma de muestra. La presencia de filamentos y grumos mucosos se consideraron como señales de licuefacción incompleta. Las muestras con consistencia acuosa y en algunos casos con la presencia de pequeños granos gelatinosos los cuales no presentan licuefacción, se considerando con licuefacción completa.

Volumen: El volumen del eyaculado fue medido en un tubo de centrifuga graduado estéril, se aspiró la muestra del recipiente de la colecta, por medio de una pipeta pasteur. los valores fueron reportados en mililitros.

Viscosidad Se evaluó tomando del tubo de centrifuga la muestra por aspiración leve con una pipeta pasteur y se dejó caer una gota de semen, por gravedad se observó si la gota formaba al caer un filamento.

pH Fue determinado con papel pH y el rango comprendido fue entre 6.0 a 10.0, después de someter una gota de semen en papel pH después de 30 segundos, el color de la zona impregnada en forma uniforme y comparada con el rango de referencia (pHydrion Micro essential Laboratory, B'klyn N.Y. 11210 U.S.A.), el pH fue registrado en un tiempo promedio de una hora

Color fue considerada la coloración de la muestra comparada en un fondo blanco. La coloración normal es blanco grisáceo opalescente homogénea.

Análisis microscópico

Se colocó una gota de semen fresco (10 µl) en un porta objetos junto con una gota de colorante vital (5 µl eosina al 5% en solución fisiológica) y fue examinada en el microscopio de contraste de fases

Viability Se evaluó el porcentaje de células vivas, la técnica basada en el principio de alteración en las propiedades de permeabilidad selectiva de las células muertas ya que incluyen el colorante, se realizaron tres conteos de 100 células en tres campos evaluados a 400X.

Movilidad Se realizaron barridos sistemáticos de tres campos y cada espermatozoide fue clasificado de acuerdo con los criterios de la O.M.S (1)(Tabla No 3). este conteo se realizó hasta concluir con 100 células.

Conteo espermático. La concentración de los espermatozoides se determinó por el método del hemocitómetro, se realizó una dilución 1:20 (50µl de semen fresco con 950µl de diluyente). Los resultados fueron reportados en millones/ ml.

con estos datos se clasificaron a las muestras como se muestra en la tabla No4

Procesamiento de la muestra

Para la prueba hipo-osmótica (HOST) se tomaron 100 microlitros de la muestra y se colocaron en un 1 ml de medio hipo-osmótico (150 mOsm) el cual contenía 7.35 g de citrato de sodio (Merck) y 15.31g de fructuosa (Merck) disueltos en 1000 ml de agua deionizada. Se siguió el procedimiento descrito por Jeyendran (13), el cual en resumen consiste en incubar en la solución hipo-osmótica a 37°C durante 30 minutos y después de ese tiempo realizar el conteo de las células con respuesta positiva (hinchamiento) (Figuras No. 5 y 6). se calculó bajo microscopio de contraste de fases y cámara de Neubauer. Para el procesamiento de la muestra total de semen, se formaron gradientes discontinuos a partir de una solución de Percoll (Sigma chemical, St Louis M) con un pH de 8.9 y osmolaridad de 20 mOsm para realizar el percoll isotónico se utilizaron 10 ml de

medio de Earle's concentrado 10 X en 90 ml de percoll puro, se le adicionaron 300 mg de albumina bovina, 3mg de piruvato de sodio 0.37ml de lactato de sodio, 200mg de bicarbonato de sodio. usando como diluyente el medio Ham F-10 (Gibco) suplementado con 1% de albúmina bovina (Sigma chemical) a un pH= 7.5. para formar el percoll al 80 % se utilizaron 40 ml de percoll isotónico con 10 ml de medio diluyente, y para formar el percoll al 40 % se utilizaron 20 ml de percoll isotónico con 30 ml de diluyente. Las muestras biológicas fueron colocadas sobre un gradiente formado con 1 ml de Percoll al 80% y 2 ml de Percoll al 40%. Una vez dispuestas las muestras de semen sobre el gradiente, fueron centrifugadas a 1000g por 15 minutos a temperatura ambiente. Se obtuvieron tres fases, en la fase superior y media quedan el plasma seminal, los detritus celulares, leucocitos, células inmaduras, y espermatozoides dañados. Estas dos fases son desechadas y se colecta la tercera fase (fondo del gradiente) que es la que contiene el concentrado de espermatozoides, los cuales son resuspendidos y lavados del Percoll con medio de Ham F-10 mediante una segunda centrifugación a 1000g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se elimina y el concentrado de células se diluye con el medio de Ham F-10 (Figura No.4).hasta obtener una concentración final de 8.0×10^6 /ml espermatozoides. A esta preparación se le cuantifica la viabilidad, la movilidad y sus características y se repite la prueba de HOST.

Análisis estadístico

La razón para ajustar a una misma concentración celular (8.0×10^6 /ml) todos los análisis obedeció a que cuando se realizó el estudio en el conteo total de células por muestra, la distribución de las frecuencias de las muestras no correspondía a la de una población normal (Gráfica No.1).por tal razón en este parámetro se realizó una transformación logarítmica (Gráfica No.2).Al ajustar la concentración en 8 millones de células por mililitro y graficar el parámetro de la movilidad se observó distribución normal (Gráfica

No. 3). Por lo tanto la evaluación de los parámetros de este estudio se hizo empleando una prueba de t de Student "pareada" y como variables las condiciones pre y post tratamiento de las células con Percoll.

RESULTADOS

De las 100 muestras analizadas, en las Tablas No. 5 y 6, se presentan la estadística descriptiva (valores medios, desviaciones estándar, y el valor de t calculada) del conteo de los espermatozoides y los valores obtenidos con las muestras ajustadas a 8 millones de células (viabilidad, motilidad total, prueba de HOST y los diferentes tipos de movilidad) tanto para el pre-tratamiento como en el pos-tratamiento. con un $\alpha = 0.05$ %

En función de el análisis estadístico realizado en los datos se demuestra que: Para el parámetro de viabilidad no existieron diferencias estadísticamente significativas entre el pretratamiento y el postratamiento Para las cuatro categorías (Normozoospermico; Oligozoospermicos, Astenozoospermicos, y oligo Astenozoospermicos) un valor calculado de t menores a la T de tablas $t=2.228$ y -2.228 (Gráficas No. 4, 5, 6, 7 y 8). En cuanto a la movilidad general el análisis reveló que existieron diferencias significativas en la categoría de Oligozoospermicos ya que como se aprecia en la tabla No.5 aumentó la movilidad general en el postratamiento $t=-2.24$ lo mismo sucedió en el caso de los Astenozoospermicos con un $t=-2.86$ existió un aumento en la movilidad (Gráficas No.9, 6, 7) para las categorías de Normozoospermicos y Oligoastenozoospermicos no se registraron diferencias significativas (Gráfica No. 9, 5 y 8). Para la prueba de lavado hipo-osmótico (HOST), se registraron diferencias estadísticamente significativas ya que aumentó el número de células positivas en el postratamiento en las categorías de Oligozoospermicos, Astenozoospermicos y Oligo Astenozoospermicos, obteniéndose un valor de $t=-2.27$ $t=-2.73$, $t=-4.51$

respectivamente (Gráficas No. 10, 6, 7, 8). En el caso de la categoría de normozoospermicos no existieron diferencias estadísticas (Tabla No.5).

El análisis realizado en los tipos de movilidad sugieren que, en la categoría a) tipo progresiva rápida si hubo diferencias estadísticamente significativas entre antes y después del tratamiento siendo superior en el postratamiento en todas las categorías con una t calculada de -2.89 para los normozoospermicos, $t = -3.03$ en Oligozoospermicos, $t = -3.76$ para Astenozoospermicos y $t = -3.95$ para OligoAstenozoospermicos en relación con la t del intervalo de confianza de 2.28 y -2.228 (Gráficas No.11, 12, 13, 14). En la movilidad progresiva lenta sólo existió diferencia estadística para los Normozoospermicos con una $t = 2.72$ es decir que disminuyó el número de células con movilidad progresiva lenta (Gráfica No.11).

El tipo de movilidad no progresivo, No se registraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos para las cuatro categorías estudiadas (Gráficas No. 11, 12,13, 14). En lo que respecta a el tipo de movimiento d) o inmóviles, no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones de pretratamiento y postratamiento para las categorías Oligozoospermico y Oligoastenozoospermico. Sin embargo para los Normozoospermicos y Astenozoospermicos si existieron diferencias estadísticas ya que en ambos casos se presenta una disminución en el número de células que presentan este tipo de movimiento registrándose una $t = 2.76$ y $t = 2.84$ respectivamente (Gráficas No.11 y 13).

A manera demostrativa se realizó el análisis de morfología evaluado con la tinción PAP y con los criterios de la O.M.S 1992. (1). en el pre tratamiento y post- tratamiento sólo en la categoría de Normozoospermicos $n=10$, observándose que en este parámetro aumentó la cantidad de células con morfología normal de un 50 +/- 10 % a un 65 +/- 10% (Figuras 7 y 8).

Además se realizó a una muestra Normozoospermica post-tratamiento microscopia electrónica de barrido, y fue analizada a 1 000X, 5 000X, 10 000X y 20 000x. (Figuras 9,

10, 11, y 12). En las cuáles se aprecian que no hay cambios ultraestructurales causados por efecto del Percoll.

DISCUSION

El método de separación de los espermatozoides através de los gradientes tanto continuos como discontinuos de Percoll ha demostrado tener una excelente recuperación de células con buena movilidad, además de excluir células inmaduras, leucocitos, fracciones celulares y espermatozoides dañados, los cuales quedan distribuidos entre las densidades más bajas, es decir en los gradientes superiores. Por otra parte se ha reportado que la separación en Percoll no altera la funcionalidad del espermatozoide cuando es evaluado mediante la penetración al huevo de hamster (15). (Lamirande et. al. 1991).

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que no hay cambios significativos que produzcan alteraciones severas en la membrana de los espermatozoides por efecto del Percoll en el gradiente de alta densidad.

Con respecto a la motilidad general nuestros resultados indican que hay un aumento en el movimiento, en las células después del tratamiento por lo cual inferimos que no hay alteraciones metabólicas aparentes por efecto de la polivinilpirrolidone. El incremento significativo en el tipo de movilidad progresiva concuerda con los resultados reportados por otros autores (16, 17, 83). La distribución de los espermatozoides en el gradiente depende de la fuerza centrífuga (por tal motivo es de suma importancia el calculo de las rpm en la centrifuga del laboratorio donde se procesan las muestras), y las células motiles se desplazan centrifugamente de acuerdo a su respectiva capacidad de movimiento. Un estudio ultraestructural sugiere que la recuperación de espermatozoides en las regiones de 90 y 100% de densidad, tienen menos anormalidades a nivel axonemal y periaxonemal (16) Esto concuerda con nuestras observaciones a nivel de microscopía óptica en donde se obtiene un mejoramiento significativo en células con morfología normal en las muestras

procesadas por gradientes discontinuos de percoll isotónico, lo cual puede explicar la excelente recuperación de formas vivas y además con un incremento en su motilidad en general. Nuestros resultados indican que no hay cambios aparentes en las propiedades de permeabilidad selectiva de la membrana, conferida principalmente por los ácidos grasos poli-insaturados(ácido docosahexanoico), ácidos grasos saturados (ácido palmítico), fosfolípidos(particularmente fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina y esfingomiélin), colesterol, glicolípidos, palmitaldehído y lipoproteínas. Los resultados obtenidos indican que hay un aumento en las células con hinchamiento hipo-osmótico después del proceso del Percoll, lo cual puede sugerir que hay una selección en la distribución de espermatozoides con pocas alteraciones en los gradientes mas densos, en los estudios de microscopía óptica, y microscopía electrónica de transmisión se muestra un incremento de las formas normales, en los espermatozoides recuperados de las zonas mas densas (18).Lo cual concuerda con las observaciones realizadas a nivel ultraestructural en el presente estudio.

Las propiedades de semipermeabilidad selectiva de la membrana espermática es de suma importancia en la funcionalidad de la célula, Aunque el espermatozoide tiene capacidad fertilizante después de su proceso de maduración en el epidídimo, requieren de un proceso de activación adicional, denominado como Capacitación y que en condiciones normales se realiza en el aparato reproductor femenino en el útero, trompas de falopio o en ambos. y básicamente la capacitación induce a cambios bioquímicos en la membrana plasmática y membrana acrosomal que permite al espermatozoide a realizar la reacción acrosomal, cuando pasa através de las capa externas del ovocito, durante la capacitación no se registran cambios morfológicos, sin embargo una característica es la fusión de las membranas plasmática y acrosomal, la reacción acrosomal es un evento dependiente de calcio, en este periodo la permeabilidad a los iones de calcio se ve incrementada. Los eventos Bioquímicos son dependientes de la regulación, estructura y fluidez de la membrana plasmática durante la capacitación y reacción acrosomal. entre los aspectos

más importantes durante los procesos de capacitación y que deben ser considerados durante la separación celular para fines de reproducción asistida. De acuerdo con Langlais (31) son 1) Cambios en la carga negativa de la superficie celular, 2) Niveles de colesterol de la membrana y 3) Estructura de los fosfolípidos de la membrana celular.

CONCLUSIONES

Después de la separación de espermatozoides del plasma seminal empleando un gradiente de Percoll en Ham F-10, El total de espermatozoides vivos no sufrió modificaciones, por lo que este método no induce muerte celular.

Los porcentajes de espermatozoides móviles recuperados puede ser incrementados por la utilización de esta técnica de separación, en particular la movilidad del tipo a progresiva rápida, está incrementada en todos los tratamientos como producto de la selectividad del método.

De acuerdo con los resultados obtenidos por la prueba de lavado hipo-osmótico (HOST) y las observaciones realizadas a nivel de microscopía electrónica de barrido. Las características de semipermeabilidad selectiva del espermatozoide no se alteran a causa de la separación con Percoll.

Este es un método que aumenta la calidad relativa del semen ya que permite la utilización de muestras con alta calidad en concentración, movilidad, viabilidad, morfología y con patrones de semipermeabilidad selectiva normal, que pueden ofrecer la posibilidad de aumentar la capacidad de fertilización de hombres con problemas de fertilidad (principalmente en los casos de Oligozoospermia, Astenozoospermia y OligoAstenozoospermia) en los programas de reproducción asistida.

REFERENCIAS

1. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. (1992). Third Edition. Cambridge.
2. Aitken RJ, and Clarkson JS. (1988). Significance of reactive oxygen species and anti-oxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology* 9: 367-376.
3. Aitken RJ. (1989). The role of free oxygen radicals and sperm function. *International Journal of Andrology* 12:98-97.
4. Lamirande E, and Gagnon C. (1993). A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *International Journal of Andrology* 16:21-25.
5. Makler A, Stoller J, Blumenfeld Z, Feigin P, and Brandes J. (1993). Investigation in real time of the effects of gravitation on human spermatozoa and their tendency to swim-up and swim-down. *International Journal of Andrology* 16:251-257.
6. Urry RL, Middleton RG, McNamara L, and Vikan A. (1983). The effects of single density bovine serum albumin column on sperm concentration, motility and morphology. *Fertility and Sterility* 40: 666-669.
7. Harrison R.A.P (1976). A highly efficient method for washing mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 48: 347-353.

8. Pertoff H, Laurent TC, Laas T. (1978). Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone. *Annals of Biochemistry* 88:271-282
9. Lessley BA, and Garner DL. (1983). Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in Percoll. *Gamete Research* 7:49-61.
10. Oshio S, Kaneko S, Iisuka R. (1987). Effects of gradient centrifugation on human sperm. *Archives of Andrology* 17:85-93.
11. Aitken J, and West M. (1990). Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *International Journal of Andrology* 13:433-451.
12. Rickwood, D. (1978). In centrifugal separations in Molecular and Cell biology, Birnie, G.D and Rickwood D. (eds), Butterworths, London and Boston. pp 219
13. Jeyendran RSH, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Grabo BG, and Zaneveld LJD. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility* 70:219-228.
14. Van der Veen HH, Jeyendran RSH, Al Hasani S, Perez-Pelaez M, Diedrich K, and Zaneveld LJD. (1987). Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypo-osmotic swelling test) and in vitro fertilization. *Journal of Andrology* 7:190-196.

15. Lamirande E, Gagnon C. (1991). Quantitative assessment of the serum-induced stimulation of human sperm motility. *International Journal of Andrology*. 14: 11-22.
16. Bartholomy G, Hamamah S, Lebos C, Lansac J, Tharanne M. (1992). Ultrastructural comparison of Human spermatozoa along a Percoll density gradient. *International journal fertility* 37: 365-367.
17. Arcidiacono A, Walt H, Campana A et al (1983). The use of Percoll gradients for the preparation of subpopulations of human spermatozoa. *International Journal Andrology*. 6: 443-445.
18. Rickwood, D. (1982). *Ann. Biochem*, 122: 33.
19. Leventhal A, Margalioth E, Schenker J, (1987). Testing fertilizing ability of motile spermatozoa separated by percoll in patients with abnormal sperm analysis or sperm penetration. *International journal Fertility*. 32: 302-305.
20. Chan P, Tredway D, Pang S. (1992). Assessment of sperm for cryopreservation using the hypoosmotic viability test. *Fertility and sterility*. 58 : 841-844.
21. Chan P, Prough S, Hening I, (1992). Predictive value of sperm hyperactivation measurement based on the dilution effect method in clinical in vitro fertilization. *International journal fertility*. 37 : 373-377.
22. Meschede D, Keck C, Zander M, et al (1993). Influence of three different preparation techniques on the results of human sperm morphology analysis. 16: 362-369.

23. Sato H. Kaneko S. (1990). Improved semen qualities after continuous-step density gradient centrifugation: application to artificial insemination and pregnancy outcome. *Archives of Androl.* 24: 87-93.
24. Engelmann U. Pärsh M. (1989). Modern Techniques of sperm preparation Do they influence the sex of offspring?. *Andrologia* 21 (6) : 523-528.
25. Mallidis C. Howard J. (1991). Variation of semen quality in normal men. *Int. J. Androl.* 14: 99-107.
26. Wetzel A. Herman J. Janssen G. (1993). The influence of sperm density on the motility characteristics of washed human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 16: 15-19.
27. Akerlöf E. Fedricsson B. (1991). Sperm count and motility influence the result of human fertilization in vitro. *Int. J. Androl.* 14: 79-86.
28. Preston C. Sacks M.D. (1991). Infectious complications of intrauterine insemination: a case report and literature review. *Int. J. Fertil* 36 (6): 331-339.
29. Yavetz M. Msek A. (1990). Intrauterine insemination in subfertile couples. *Andrologia* 22(1): 29-33.
30. Slotte H. Akerlöf E. (1993). Separation of human spermatozoa with hyaluronic acid inducer, and Percoll inhibits, The acrosome reaction. *Int. J. Fertil.* 16: 349-354.

31. Langlais J. Roberts K.D. (1985). A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa *Gamete research*. 12: 183-224.
32. Ramírez J. Carreras A. (1992). Sperm plasma membrane integrity in fertile and infertile men *Andrologia* (24): 141-144.
33. Sánchez R. Concha M. (1993). Demonstration of acrosomal membranes using the hypoosmotic swelling test. *Andrologia*. (25): 1-2.
34. Lomeo M. Giambersio M. (1991). "Water-test", a simple method to assess sperm-membrane integrity. *Int.J. Androl.*(14): 278-282.
35. Chan S. Fox W. Ho P. (1985). The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test routine semen analysis and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay. *Fertility and Sterility*.(44): 668-672.
36. Smith R. Maradiaga M. (1992). Reappraisal of the hypoosmotic swelling test to improve assessment of seminal fertility status. *Int. J. Androl.* (15): 5-13.
37. Chan S. Wang C. (1988). Multivariate discriminant analysis of the relationship between the hypoosmotic swelling test and in-vitro fertilizing capacity of human sperm. *Int. J. Androl* (11):369-378.
38. Engisu M.E, Dumoulin M. (1993). Predictive value of morphologically normal sperm concentration in the medium for in-vitro fertilization. *Int. J. Androl.* (16): 113-120.

39. Rodríguez L.J. Ayala C. (1989). Relationship between the results of sperm analysis and GIFT. *Int. J. Androl.* (10) 2: 139-144.
40. Magnus O, Brekkel (1991). Effects of seminal plasma from normal and astenozoopermic men on the progressive motility of washed human sperm. *Int. J. Androl* 14: 44-51.
41. Scheffler W. (1982). *Bioestadística*. 2a edición. editorial. Fondo educativo Interamericano S.A. México.
42. Snedecor G. Cochran G. (1978). *Statistical Methods* sixth edition. The Iowa state University Press, Ames IOWA. U.S.A
43. Smith S. Sundaram S (1993). The strict-criteria morphology, motility and survival parameters of spermatozoa after preparation using mini-percoll gradient, swim-up and sperm select separation. Abstracts of the scientific supplement (0-018). The American Fertility Society. and The Canadian fertility and Andrology society.
44. Kafka I, Almagor M. (1993). Preparation of high quality motile sperm by simultaneous swim-up-swim down method. Abstracts of the scientific supplement (0-019). The American Fertility Society and The Canadian fertility and Andrology society.
45. Johnson J. Trad F,S (1993). Development of human sperm motility assay for quality assessment of in vitro fertilization (IVF). medium. Abstracts of the scientific supplement (0-031). The American fertility Society and The Canadian fertility and Andrology Society.

46. Silverberg M. Dey T. (1993). Sperm morphology abnormalities among lead-exposed battery plant workers. Abstracts of the scientific supplement (0-119). The American fertility Society and The Canadian fertility and Andrology Society.

47. Qahwaji L, Descido C. (1993). Comparison of swim-up and discontinuous mini-percoll gradients (3 and 6 layers) for separation of the sperm motile fraction: motility parameters and fertilization outcome of sibling oocytes. Abstracts of the scientific supplement (P-042). The American fertility society and The Canadian fertility and Andrology Society.

48. Stein L.A. Marrs R.P. (1993). Mini-percoll sperm preparation improves pregnancy rates for donor intrauterine inseminations (D.I). Abstracts of the scientific supplement (P-075). The American fertility society and The Canadian fertility and Andrology Society.

49. Dubey A.K, Penzias S.A (1993). Sperm morphology by Kruger's strict criteria and oocyte fertilization in vitro: The beneficial effect of preparation by swim-up. Abstracts of the scientific supplement (P-077). The American fertility Society and The Canadian fertility and Andrology Society.

50. Pomeroy K.O, Collazo I. (1993). Quality control testing in the andrology laboratory. Toxicity in catheters used for intrauterine insemination. Abstracts of the scientific supplement (P-082). The American fertility society and The Canadian fertility and Andrology society.

51. Chan Y.M. Abuzed I:M (1993). A comparative auto- controlled study between mini-percoll in the preparation of abnormal semen sample. Abstracts of the scientific

supplement. (P-083). The American fertility society and The Canadian fertility and andrology society.

52. Hall J.L, Weingold D.E (1993). Comparison of percoll, nycodenz and swim-up, for oligozoospermic men where sperm are separated prior to storage in test yolk buffer. Abstracts of the scientific supplement (P-084). The American fertility society and The Canadian fertility and andrology society.

53. Boone W. Johnson J.E (1993). Improving the quality of donor serum an observation. Abstracts of the scientific supplement. (P-085). The American fertility society and The Canadian fertility and Andrology Society.

54. Check J. H, Lurie D. (1993). The correlation of the Hipo-osmotic swelling test (HOST) with outcome of in vitro fertilitation- embryo transfer (IVF-ET). Abstracts of the scientific supplement (P-199). The American fertility society and The Canadian fertility and andrology Society.

55. Katz D.F, Andrew J:B (1993). Initial analysis of semen characteristics: A report of the california mens reproductive health study. (CMRHS). Abstracts of the scientific supplement. (P-213). The American fertility society and The Canadian fertility and andrology society.

56. Díaz-Sánchez V. Martínez M. Noguera M. (1991). Investigación y diagnóstico del varón infértil. *Perinatol.Reprod.Hum.* Vol.5 No.2: 95.

57. Díaz-Sánchez V. Antonio S. Noguera M. Pérez-Palacios G. (1990). El programa de reproducción asistida del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán .

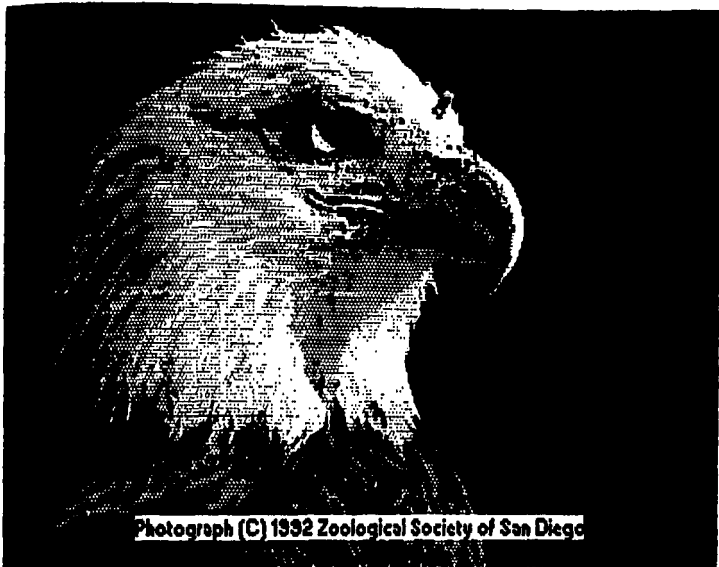
Experiencia con la transferencia intrauterina de gametos (TIUG). Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología.

- 58. Kruger T.F, Menkveld, Stander F.S (1986). Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization, fertility and sterility. 40: 1118-1123.**
- 59. Van Kooij R.J, Balerna M, Roatti A. (1986). Oocyte penetration and chromosome reactions of human sperm II with other seminal parameters. Andrologia 18: 503-508.**
- 60. Wang C, Chan S, Leung A. (1985). Cross-sectional study of semen parameters of a large group of normal chinese men. Int. J. of Androl. 8: 257-274.**
- 61. Pardo M, Barri P N, Coroleu B. (1988): Spermatozoa selection in discontinuous Percoll density gradient for use in artificial insemination. Fertil Steril 49: 505-509**
- 62. Iizuka R, Kaneko S, Kobayashi T (1987): Washing and concentration of human sperm by Percoll density gradients and its clinical application. Arch Androl 20:117-124.**
- 63. Glass RH, Eriksson RJ (1978). Intrauterine insemination of isolated motil sperm. Fertil Steril 29:53.**
- 64. Leong J, Haddad Y, Osborn RA, (1982). An improved method for preparation of semen for artificial insemination by husband. Med J.Aust. 2:474.**
- 65. Wiltbank MC, Kosasa S, Roger B: (1985) Treatment of infertile patients by intrauterine insemination of washed spermatozoa, Andrologia 17:22.**

66. Toffle RC, Nagel TC, Tagatz GE, Phansey SA, Okagaki T, Wavrin CA. (1985).
Intrauterine insemination: University of Minnesota experience. *Fertil, Steril* 43: 743.
67. Harris SJ Milligan MP, Masson GM, Dennis KJ (1981). Improved separation of motile sperm in asthenospermia and its application to artificial insemination homologous (AIH) *Fertil Steril* 36: 219.
68. Gavella M, Lipovac V.(1992). NADH- Dependent oxidorectasa (diaphorase) activity and isozymepattern of sperm in infertile men. *Arch. Androl.* 28:135-141.
69. Daya S, Gwatkin RBL, Bissessar H, (1987). Separation of motile human spermatozoa by means of a glass bead column. *Gamete Res.* 17:375.
70. Berger T, Marrs RP, Moyer DL: (1985). Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fertil Steril* 43:268.
71. Schader SM, Platek SF, Zaneveld LJD, Pérez-Peláez M, Jeyendran RS. (1986)Sperm viability:a comparison of analytical method. *Andrologia* 18:530.
72. Drevius LO, ErikssonL. (1966). Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp,Cell Res* 42:136.
73. Daya S, Gwatkin RBL (1987). Improvement in semen quality using glass bead column. *Arch Androl* 18:241.

74. Pousette A, Akerlof E, Rosenborg L, Fredricsson B. (1986). Increase in progressive motility and improved morphology of human spermatozoa following their migration through Percoll gradients. *Int. J. Androl* 9:1.
75. Smith S, Hosid S, Scott L. (1995). Use of post-separation to determine the method of choice for sperm preparation for assisted reproductive technology. *Fertil, Steril* Vol.63 : 3: 591-597.
76. ABU- Musa A, Takahashi K, Kitao M. (1993). Correlation between post- swim-up hypoosmotic swelling test and in vitro fertilization results. *Int.J. Fertil.* 38: 113-116.
77. Ng FLH, Liu DY, Baker HWG. (1992). Comparison of percoll, minipercoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Human Rep.* 7: 261-266.
78. Alvarez J, Lasso J, Blasco L, (1993). Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage, separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile life time. *Human Reprod.* 8: 1087-1092.
79. Jaroudi K A, Carver-Ward JA, Hamilton G. (1993). Percoll semen preparation enhances human oocyte fertilization in male-factor infertility as shown by a randomized cross-over trial. *Human Reprod.* 8: 1438-1442.
80. Zavos PM, (1992). Preparation of human frozen-thawed seminal specimens using the sperm pre filtration method: improvement over the conventional swim-up method. *Fertil Steril* 571: 1326-1330.

81. Lamirande E, Bernard E. (1995). Increased reactive oxygen species formation in semen of patient with spinal cord injury. *Fertil Steril* 63: 637-642.
82. Tauber PF, Propping, Schumacher D. (1980). Biochemical aspects of the coagulation and liquefaction of human semen. *J. of Androl.* 1: 280-288.
83. Vijatrasil S, Makamaharn O. (1995). Application of the hypo-osmotic swelling test to spermatozoa prepared by swim-up and discontinuous percoll separation. *Inter. J. of Androl.* 18, Suppl. 1:19-22.
84. Rowe P, Comhaire F. (1993). WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. World Health Organization, Cambridge University press. Great Britain.
85. Chavaria M. (1995). Bases bioestructurales del espermatozoide humano infertil. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biología de la Reproducción. Universidad Autónoma de Tlaxcala. México.



Photograph (C) 1992 Zoological Society of San Diego

Causas reconocidas de infertilidad masculina

- 1) Función testicular alterada**
- 2) Obstrucción del tracto genital**
- 3) Retroeyaculación**
- 4) Varicocele**
- 5) Infecciones genito-uritarias**
- 6) Anticuerpos-antiespermatozoide**
- 7) Efectos térmicos en los testículos**
- 8) Alteraciones endocrinas**
- 9) Infertilidad debida a etiología Desconocida**

Tabla 1. Causas reconocidas de infertilidad por factor masculino

Metodo	Ventaja	Desventajas
<p>Swim up</p> <p>Swim down (Aitken & Clarkson 1988).</p>	<p>Separan poblaciones de espermatozoides normales con buena motilidad desprovistos de contaminacion: con relativa facilidad.</p>	<p>Implican el clasico lavado por ciclos de dilusion y centrifugacion. No son satisfactorias porque concentran espermatozoides normales con anormales, fracciones celulares, bacterias, celulas inmaduras, leucocitos, con lo que la produccion de espermatozoides normales con buena motilidad usualmente es muy baja.</p>
<p>Columnas con perlas de vidrio. (Daya et. al. 1987)</p>	<p>Buena separacion de espermatozoides normales con buena motilidad: sin contaminacion (Normospermicos)</p>	<p>Baja recuperacion en concentracion (numero) de espermatozoides</p>
<p>Gradientes de Ficoll</p> <p>Gradientes de Albumina (Urry et. al. 1983)</p>	<p>Hay excelente recuperacion de espermatozoides</p>	<p>No se mejora la motilidad espermatica.</p>
<p>Gradientes de Percoll (Oshio et. al. 1987)</p>	<p>Muy buena recuperacion de espermatozoides con menor cantidad de contaminantes (nivel de pureza elevado).</p>	<p>La formacion de las fracciones dependen fuertemente de las condiciones de centrifugacion.</p>

Tabla 3 comparacion de los metodos mas comunes de separacion de los espermatozoides del plasma seminal.

Tabla 3.

Clasificación del semen de acuerdo a los criterios de la OMS (1992).

Normozoospermia	Eyaculado normal segun la defici3n precedente.
Oligozoospermia	Concentraci3n de espermatozoides menor de $20 \cdot 10^6/\text{ml}$.
Astenozoospermia	Menos del 50% de espermatozoides con progresi3n anter3grada (categorias <i>a</i> y <i>b</i>) o menos del 25% de espermatozoides con movimiento de la categoria <i>a</i> .
Teratozoospermia	Menos del 50% de espermatozoides con morfolog3a normal.
Oligoteratoastenozoospermia	Significa perturbaci3n de las tres variables.
Azoospermia	Ausencia de espermatozoides en el eyaculado.
Aspermia	No hay eyaculado.

Tabla 4.

Clasificación de los tipos de Movilidad de acuerdo a los criterios de la OMS (1992)

- a.- Si el espermatozoide tiene una movilidad progresiva rápida y lineal(antes se denominaba como progresión "excelente" o "buena");**
- b.- Si tiene un movimiento lineal o no lineal lento o perezoso (antes se denominaba como progresión "débil" o "moderada");**
- c.- Si tiene una motilidad no progresiva;**
- d.- Si el espermatozoide es inmóvil.**

Clsificacion
Parametro

	Viabilidad antes	Viabilidad despues	Movilidad antes	Movilidad despues	HOST antes	HOST desp.
Normosper- micos n= 25	$\bar{X}= 6.71$ $\sigma X=0.65$ $t= 2.10$	$\bar{X}= 5.95$ $\sigma X=0.77$	$\bar{X}= 4.03$ $\sigma X=0.27$ $t= -0.60$	$\bar{X}= 5.15$ $\sigma X=0.47$	$\bar{X}=6.2$ $\sigma X=0.7$ $t=1.59$	$\bar{X}=5.6$ $\sigma X=0.7$
Oligozoos- permicos n= 25	$\bar{X}=5.42$ $\sigma X=0.90$ $t=0.50$	$\bar{X}=5.03$ $\sigma X=1.15$	$\bar{X}=3.32$ $\sigma X=0.23$ $t=-2.24$	$\bar{X}=4.30$ $\sigma X=1.01$	$\bar{X}=3.90$ $\sigma X=1.3$ $t=-2.2$	$\bar{X}=5.37$ $\sigma X=0.4$
Astenozoos- permicos n= 25	$\bar{X}=4.14$ $\sigma X=0.84$ $t=-1.01$	$\bar{X}=4.79$ $\sigma X=1.16$	$\bar{X}=1.56$ $\sigma X=0.84$ $t=-2.06$	$\bar{X}=3.60$ $\sigma X=0.90$	$\bar{X}=3.32$ $\sigma X=0.8$ $t=-2.7$	$\bar{X}=5.14$ $\sigma X=1.1$
Oligoasteno- zoospermicos n= 25	$\bar{X}=4.47$ $\sigma X=1.10$ $t=-0.05$	$\bar{X}=4.53$ $\sigma X=1.03$	$\bar{X}=2.16$ $\sigma X=0.86$ $t=-1.56$	$\bar{X}=3.39$ $\sigma X=1.06$	$\bar{X}=3.17$ $\sigma X=0.7$ $t=-4.5$	$\bar{X}=5.33$ $\sigma X=0.4$

Tabla 5. Analisis estadistico comparando antes y despues (t de student pareada) de la separacion del Percoll (Media, Sx y t con $\alpha=0.95$) $t= 2.220 -2.220$.

Clasificación	Parametro							
	MOVILIDAD							
	tipo A antes	tipo A despues	tipo B antes	tipo B despues	tipo C antes	tipo C despues	tipo D antes	tipo D despues
Normozoos- pernicos	$\bar{X}= 2.27$ $\sigma X=0.76$ $t=-2.09$	$\bar{X}= 4.36$ $\sigma X=0.37$	$\bar{X}= 0.57$ $\sigma X=0.05$ $t= 2.72$	$\bar{X}= 0.053$ $\sigma X=0.47$	$\bar{X}=0.69$ $\sigma X=0.04$ $t=1.73$	$\bar{X}=0.37$ $\sigma X=0.03$	$\bar{X}=0.02$ $\sigma X=0.05$ $t=2.76$	$\bar{X}=0.29$ $\sigma X=0.02$
Oligozoos- pernicos	$\bar{X}=1.91$ $\sigma X=0.08$ $t=-3.03$	$\bar{X}=3.64$ $\sigma X=0.09$	$\bar{X}=0.65$ $\sigma X=0.06$ $t=1.96$	$\bar{X}=0.08$ $\sigma X=0.01$	$\bar{X}=0.38$ $\sigma X=0.02$ $t=-1.09$	$\bar{X}=0.66$ $\sigma X=0.05$	$\bar{X}=0.37$ $\sigma X=0.05$ $t=-0.28$	$\bar{X}=0.47$ $\sigma X=0.05$
Astenozoos- pernicos	$\bar{X}=0.72$ $\sigma X=0.05$ $t=-3.76$	$\bar{X}=2.73$ $\sigma X=0.98$	$\bar{X}=0.19$ $\sigma X=0.02$ $t=0.45$	$\bar{X}=0.13$ $\sigma X=0.19$	$\bar{X}=0.58$ $\sigma X=0.07$ $t=0.74$	$\bar{X}=0.38$ $\sigma X=0.04$	$\bar{X}=0.52$ $\sigma X=0.03$ $t=2.04$	$\bar{X}=0.06$ $\sigma X=0.00$
Oligoasteno- zoospernicos	$\bar{X}=0.08$ $\sigma X=0.21$ $t=-3.95$	$\bar{X}=2.38$ $\sigma X=0.52$	$\bar{X}=0.09$ $\sigma X=0.01$ $t=-1.72$	$\bar{X}=0.28$ $\sigma X=0.01$	$\bar{X}=0.57$ $\sigma X=0.04$ $t=0.77$	$\bar{X}=0.35$ $\sigma X=0.01$	$\bar{X}=0.08$ $\sigma X=0.00$ $t=-1.24$	$\bar{X}=0.37$ $\sigma X=0.04$

Tabla 6. Analisis estadistico comparando antes y despues de la separacion del Percoll (Media, Sx y t con $\alpha=0.05$) $t= 2.228 -2.228$.

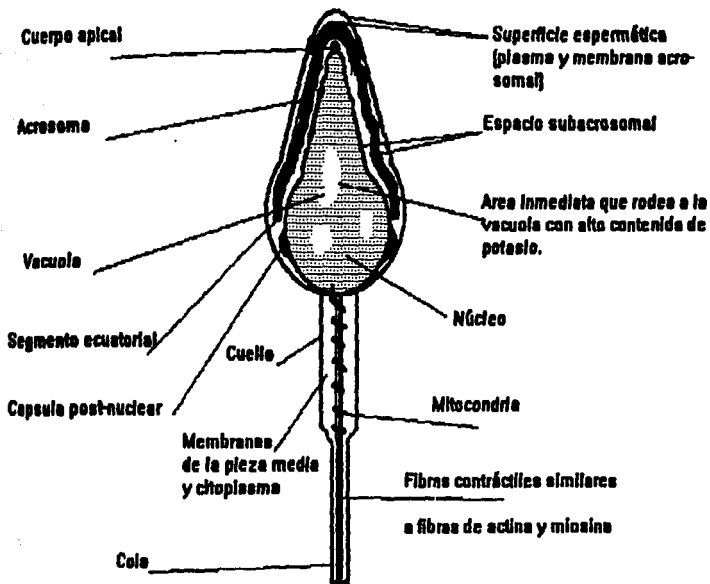


Figura 1. Algunos componentes bioquímicos del espermatozoide humano.

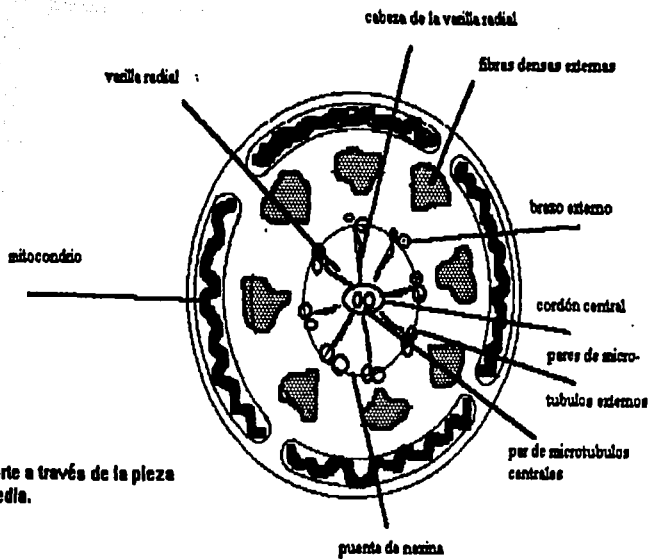
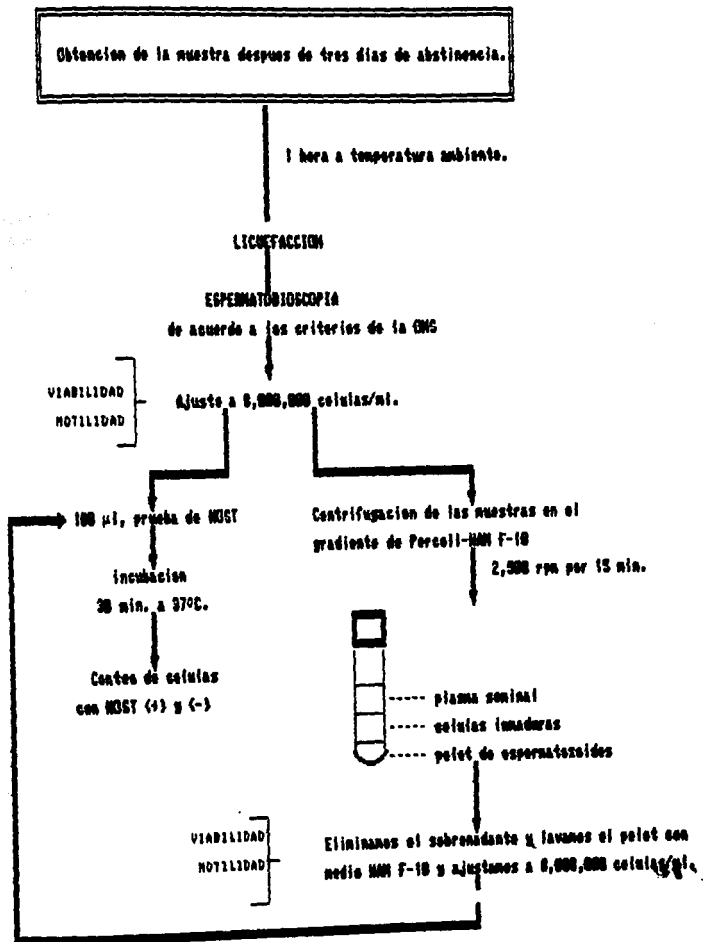


Fig. 2 Corte a través de la pieza media.

Figura 3. Metodología.



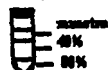
Separación por gradientes de Percoll-Ham F10

Células previamente suspendidas



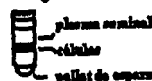
40%
90%

Se coloca la muestra sobre el gradiente



suero
40%
90%

centrifugar 20 min. a 1500 rpm.



plasma suero
células
pellet de separación

eliminar el sobrenadante y lavar con Ham-F10
eliminar el exceso de Percoll

Figura 4. separación de las células por gradientes de Percoll.

Todos los pasos
realizar
bajo condiciones
de esterilidad



centrifugar
2 min.
a 1500 rpm.



resuspender en
1 ml de
Ham-F10

incubar 30 min.
a 37° C.



colocar y
ver
medida.

Figura 4b Gradiente postcentrifugado por 20 minutos a 1500 rpm.

Gradiente post-centrifugado

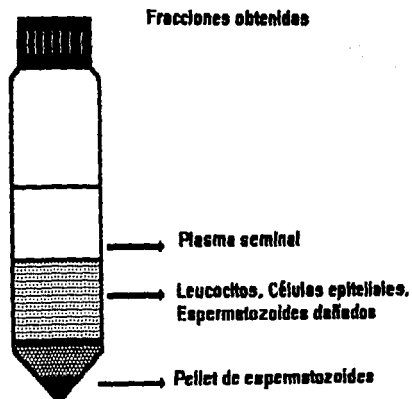


Figura 5. Procedimiento para evaluar efecto hipo-osmótico.

LAVADO HIPO-OSMOTICO

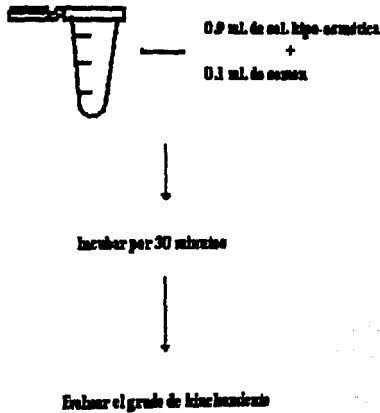


Figura 5. Procedimiento para evaluar efecto hipo-osmótico.

Figura 5. Procedimiento para evaluar efecto hipo-osmótico.

Patron de hinchamiento hipo-osmótico

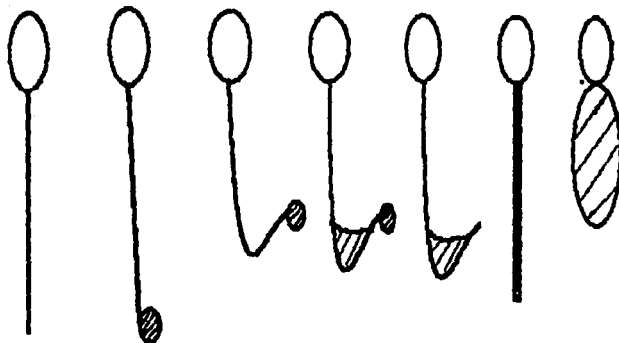


Figura 6. Representación esquemática de los cambios morfológicos típicos de los espermatozoides humanos sujetas a condiciones hipo-osmóticas. a) no hay cambio, b) a g) varios tipos de cambio a nivel de cola.

Kyriakos R.S. Van der Ven B.H. Pérez Palacios. M. Cuabo. D.G.Zerewald, LJD (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of a human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. and Fertility* 70:213-28.

Distribucion de muestras.
C1 N=35

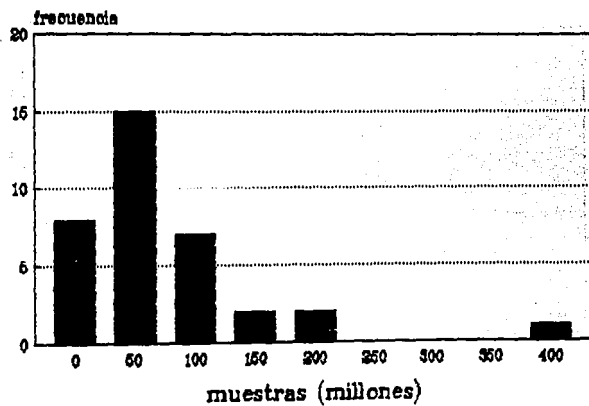


Grafico 1. Distribucion de las
muestras sin ajuste.

Distribucion de muestras.
C1 N=35

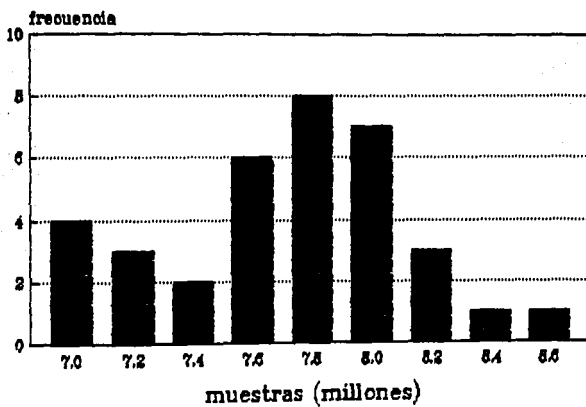


Grafico 2. Distribucion de las
muestras con ajuste log base 10

Distribucion de muestras.
C2 N=35

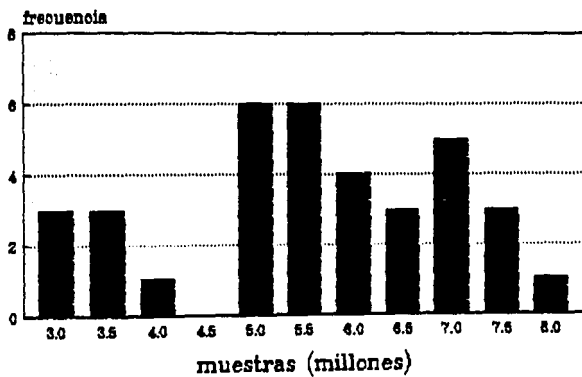


Grafico 3. Distribucion de las
muestras para variabilidad ajus-
tada a $8.0e8$

Comparacion: Percoll antes y despues

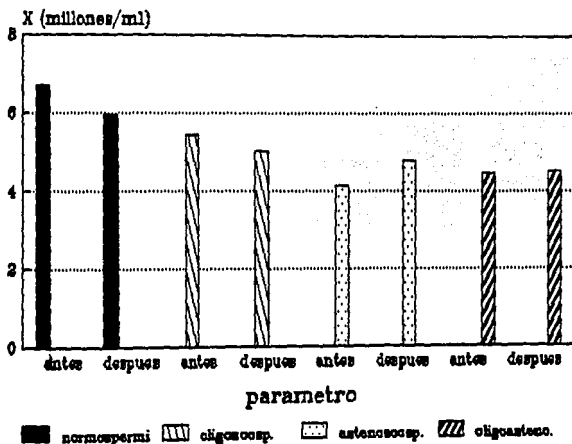


Gráfico 4. comparación antes y después de la separación con percoll, parametro viabilidad.

Normospermicos
Comparacion de los parametros.

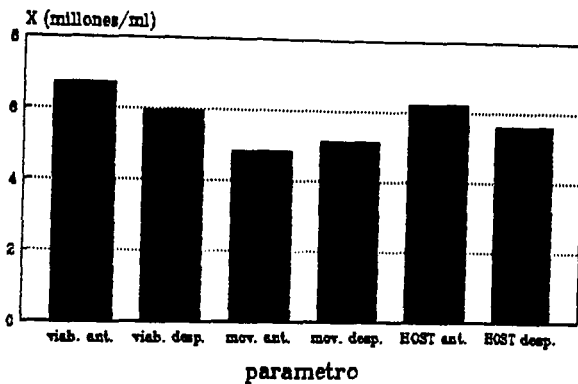
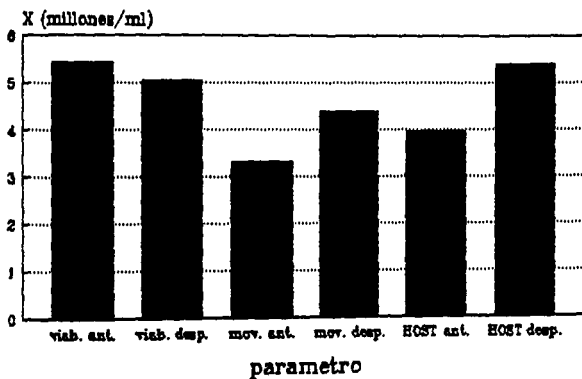


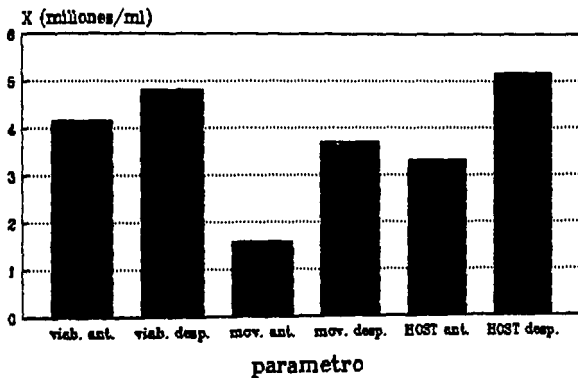
Grafico 5. normospermicos, comparacion antes y despues de percoll, para todos los parametros.

Oligozoospermicos
Comparacion de los parametros.



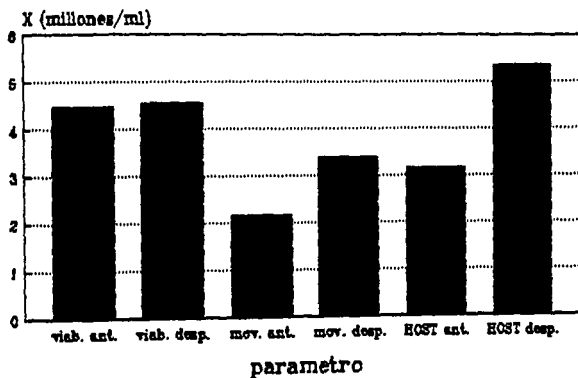
**Grafico 6. oligozoospermicos comparacion
antes y despues de percoll, para todos
los parametros.**

**Astenozoospermicos
Comparacion de los parametros.**



**Gráfico 7 astenozoospermicos comparacion
antes y despues de percoll, para todos
los parametros.**

Oligoastenozoospermicos
Comparacion de los parametros.



**Grafico 8 oligoastenozoosp. comparacion
antes y despues de percoll, para todos
los parametros.**

Comparacion: Percoll antes y despues
Tipo A

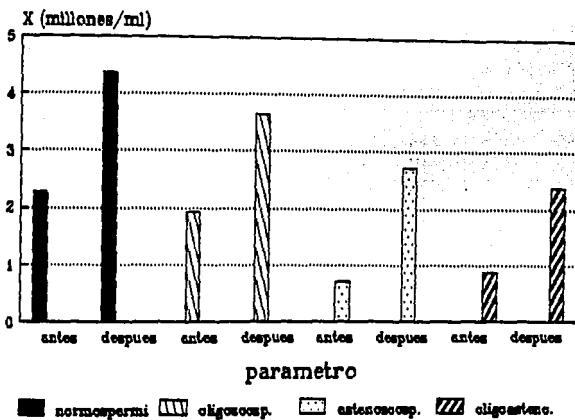


Grafico 9. comparacion antes y despues
de la separacion con percoll, parametro
movilidad tipo A.

Comparacion: Percoll antes y despues
HOST.

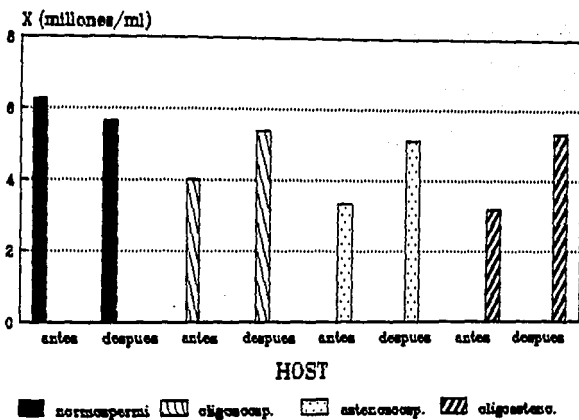


Grafico 10. comparacion antes y despues
de la separacion con percoll, parametro
HOST.

Normospermicos
Tipos de movilidad.

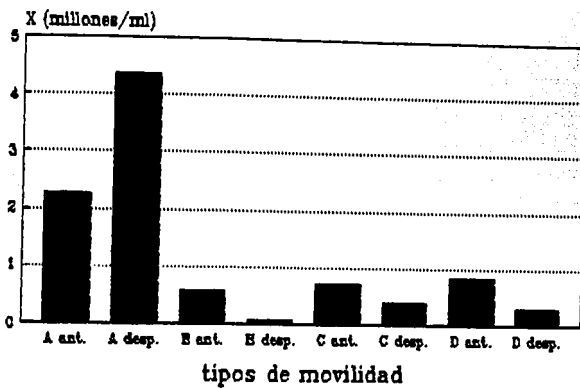


Grafico 11. normospermicos comparacion
antes y despues de percoll, para los
tipos de movilidad

Oligozoospermicos
Tipos de movilidad.

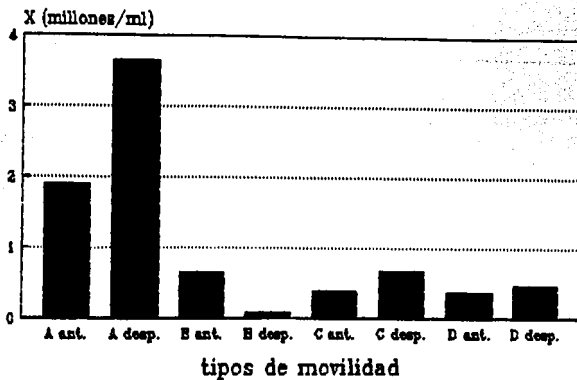
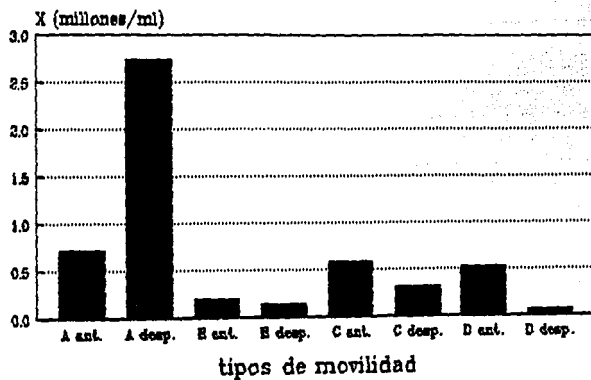


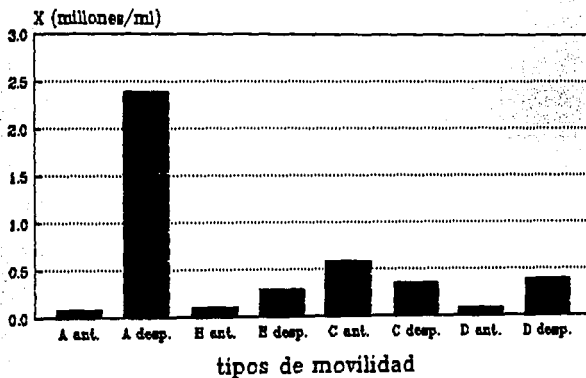
Grafico 12. oligozoospermicos comparacio
antes y despues de percoll, para los
tipos de movilidad

**Astenozoospermicos
Tipos de movilidad.**



**Grafico 13 astenozoosperm. comparacion
antes y despues de percoll, para los
tipos de movilidad.**

Oligoastenozoospermicos
Tipos de movilidad.



**Grafico 14 oligoastenozoosp. comparacion
antes y despues de percoll, para los
tipos de movilidad.**

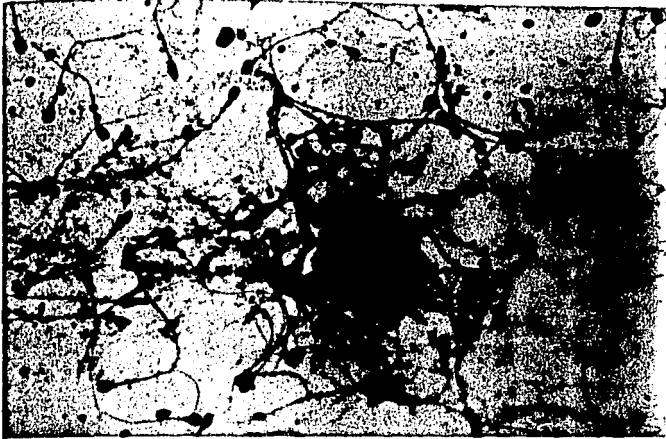


Figura 7a. Paciente Normospermico antes del Percoll (Micrografia óptica 400 X).

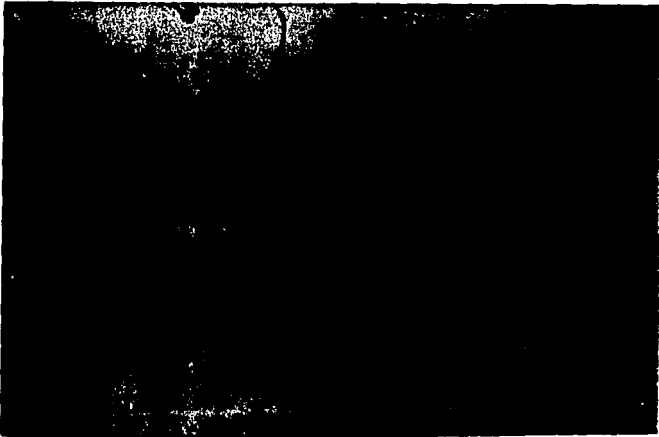


Figura 7b. Paciente Normospermico después del Percoll (Mic. óptica 400 X).



Figura 8a. Paciente Normospermico antes del Percoll (Micrografia óptica 400 X).

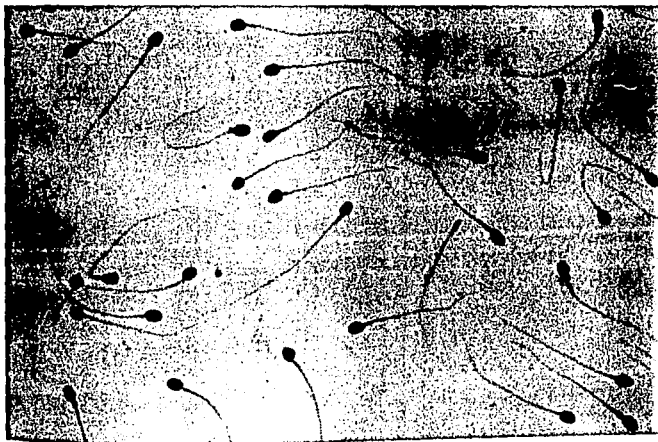


Figura 8b. Paciente Normospermico después del Percoll (Mic. óptica 400 X).

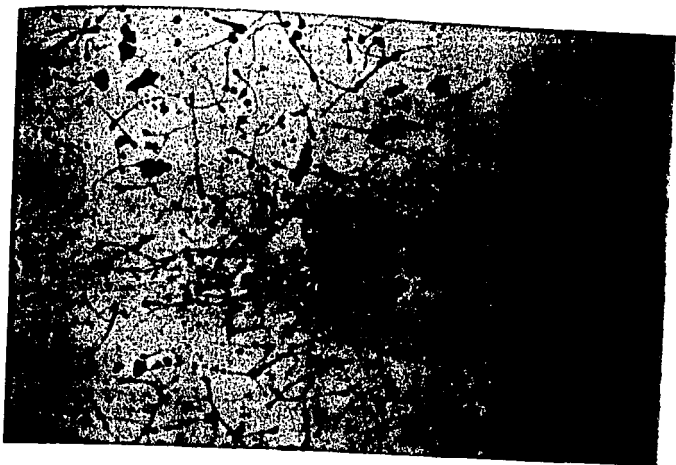


Figura 9a. Paciente Normospermico antes del Percoll (Micrografia óptica 160 X).

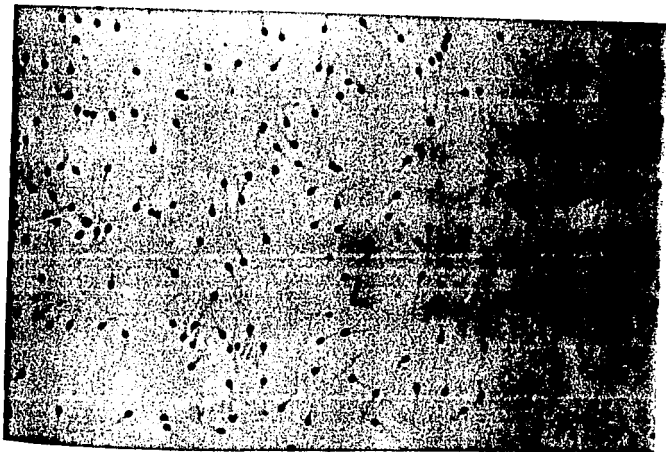


Figura 9b. Paciente Normospermico después del Percoll (Mic. óptica 160 X).

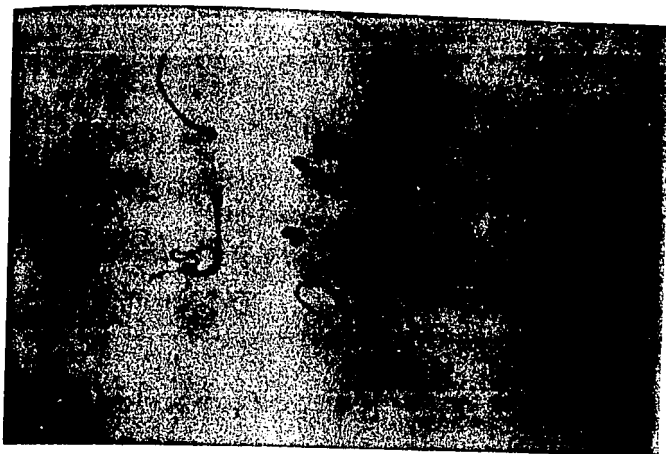


Figura 10a. Paciente Normospermico antes del Percoll (Micrografia óptica 400 X).

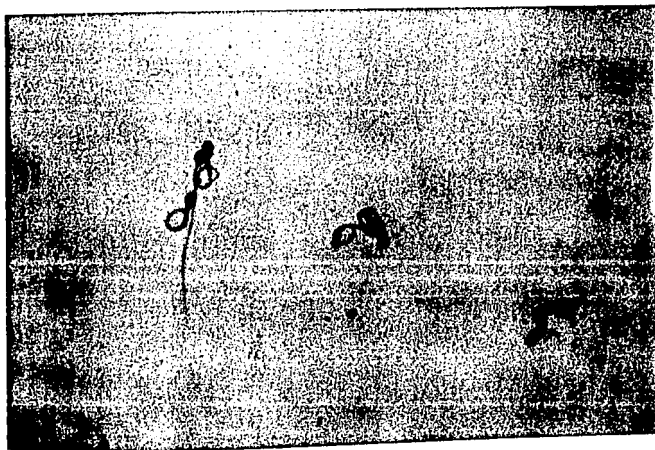


Figura 10b. Paciente Normospermico después del Percoll (Mic. óptica 400 X).



Figura 11. Espermatozoides pos-tratamiento, micrografía electrónica 1000 X aumentos (técnica de fijación por tetraóxido de osmio).

Cortesía Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina UNAM (bioq. Lourdes Palma y Biól. Amando Zepeda).

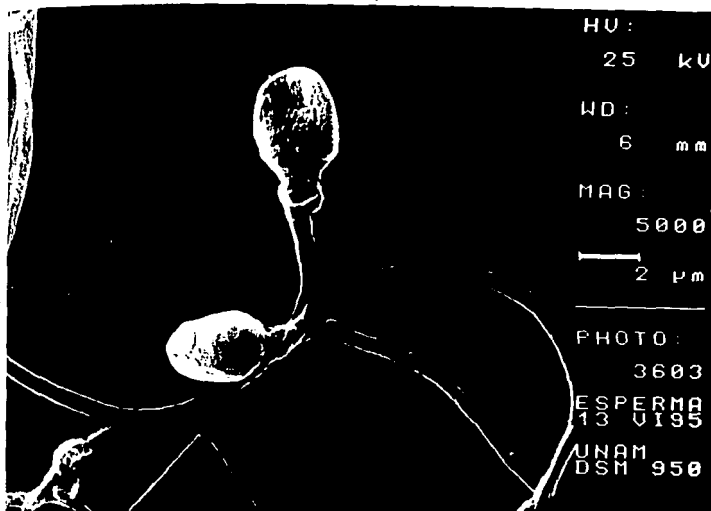


Figura 12. Espermatozoides pos-tratamiento, micrografía electrónica 5000 X aumentos (técnica de fijación por tetraóxido de osmio).

Cortesía Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina UNAM (bioq. Lourdes Palma y Biól. Armando Zepeda).



Figure 13. Espermatozoides pos-tratamiento, micrografía electrónica 10000 X aumentos (técnica de fijación por tetraóxido de osmio).

Cortesía Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina UNAM (bioq. Lourdes Palma y Biól. Armando Zepeda).

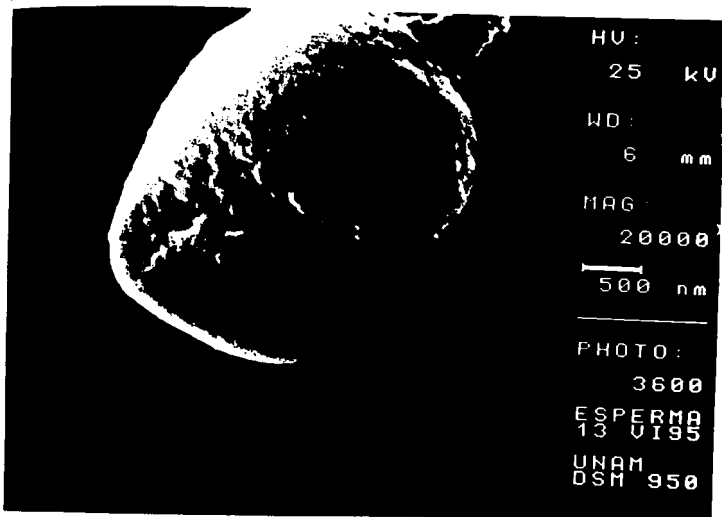


Figura 14. Espermatozoides pos-tratamiento, micrografía electrónica 20000 X aumentos (técnica de fijación por tetraóxido de osmio).

Cortesía Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina UNAM (bioq. Lourdes Palma y Biól. Armando Zepeda).