



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

11261

10
2ej

U.N.A.M.
FACULTAD DE MEDICINA

"LIPOPEROXIDACION DE LA MEMBRANA ESPERMATICA"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
P R E S E N T A :
EDNA ELIZABETH TIRADO SANCHEZ

TUTORES: *DRA. REBECCA FRANCO Y BOURLAND.
DR. VICENTE DIAZ-SANCHEZ

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN S.S.A.
*DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
DEPARTAMENTO BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION

TESIS CON MEXICO, D. F.
FALLA DE ORIGEN

272071

1999



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

SIN

PAGINACION

Agradecimientos

Expreso mi mas profundo agradecimiento a la Dra. Rebecca Franco y Bourland por su sincero apoyo y orientación.

Al Departamento de Biología de la Reproducción de la ENEP Iztacala y en particular a los Doctores Luis Arturo Baiza y Martin Martinez por su apoyo.

Al Dr Miguel Betancourt y su grupo en la UAM Iztapalapa.

A la Bioquímica Lourdes Palma Tirado

Al Ph D. David B. Brown de la University of Texas Medical Branch por su sincero apoyo y orientación.

Al comité tutorial:

Dr. Enrique Pedernera A.

Dr. Carlos Villanueva Díaz.

Dr. Vicente Díaz S.

Por sus valiosos comentarios y sugerencias.

Al comité revisor:

Dra. Victoria Chagoya de Díaz.

Por sus valiosos comentarios y sugerencias.

En particular a todos los *Voluntarios* que participaron en el presente estudio, va dedicado este trabajo.

Y finalmente a Mi familia (Gloria, Anita, buky y tachito)

Indice:

-Introducción

-Objetivos

-Material y Métodos

-Resultados

-Discusión

-Bibliografía

-Apéndice:

-Valores de referencia

-Análisis Estadístico

-Condiciones óptimas de experimentación

Resumen

En el presente trabajo se analizan los posibles efectos de las especies de oxígeno reactivo (EOR), generados por leucocitos polimorfo nucleares activados con un éster de forbol 12 mirsitato 13 acetato de forbol (PMA) sobre la funcionalidad espermática. También se estudió el posible efecto protector de dos antioxidantes alfa-tocoferol (vitamina E) y trolox.

Partiendo de poblaciones celulares controladas: Leucocitos polimorfo nucleares (PMN) sin activación, se obtuvieron de sangre periférica de voluntarios sanos y espermatozoides a partir de voluntarios normozoospermicos con fertilidad probada y con 3 días de abstinencia sexual.

Los resultados de los experimentos in vitro sugieren que existe un efecto deletéreo de las especies de oxígeno reactivo generado por la activación de poblaciones de leucocitos PMN sobre los parámetros de funcionalidad espermática dependientes de la integridad de la membrana espermática. El daño producido por EOR sobre la membrana espermática presente tanto en el análisis histoquímico como de microscopía electrónica de transmisión demostró que el efecto deletéreo depende de la dosis y tiempo de exposición. La concentración celular presente juega un papel importante ya que entre menor es la concentración y proporción entre las células, las poblaciones espermáticas son más susceptibles a daño, en comparación con poblaciones que presentan concentraciones normozoospermicas. El parámetro de funcionalidad más afectado fue la movilidad progresiva y la movilidad general, que influyeron en los niveles negativos de la prueba de penetración del huevo de hamster.

Por otro lado, los resultados de la medición de los parámetros de funcionalidad espermática, mostraron que los antioxidantes utilizados con dos mecanismos de acción son eficientes para contrarrestar los efectos de las especies de oxígeno reactivo ya que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos con antioxidantes y los controles.

De acuerdo con los resultados registrados para el ensayo de activación espermática, aparentemente no existen efectos de las especies de oxígeno reactivo sobre la respuesta de los núcleos espermáticos, los cuáles en condiciones oxidativas son capaces de descondensación, realizar síntesis de DNA y formación de pro núcleos morfológicamente normales.

Introducción.

La infertilidad se define como la incapacidad de producir embarazo en un periodo mínimo de un año con actividad sexual normal y sin la utilización de métodos anticonceptivos. La infertilidad se clasifica en primaria, que se refiere a un individuo que no ha procreado descendencia con su pareja o con parejas anteriores y la secundaria se refiere a sujetos que han tenido descendencia previa ya sea con su pareja o con parejas anteriores.

La infertilidad es un problema que afecta tanto a hombres como a mujeres en todo el mundo. Se ha estimado que la frecuencia de las parejas que han tenido alguna experiencia con infertilidad a lo largo de su vida reproductiva es de aproximadamente de 8% a 15%. Cuando se extrapola esta cifra a nivel mundial representa de 50 a 80 millones de personas con probables problemas de fertilidad. Si se estima que por año 2 millones de nuevas parejas manifiestan posibles problemas de concepción, esta cifra parece tener tendencias a crecer (1,2,3).

Dentro de las parejas con problemas de infertilidad se ha calculado que un 40 a 50% de los casos la alteración proviene del factor masculino, además dentro de la población general esta cifra representa del 5 al 10% de la población de sujetos casados (4,5).

La investigación de las posibles causas de infertilidad en el factor masculino es sin duda un campo muy apasionante en el área de la medicina reproductiva a nivel mundial. Para su estudio la infertilidad masculina se ha clasificado en 6 grupos etiológicos de acuerdo con Alvarez (6).

1) Causas testiculares (factores que afectan la espermatogénesis)

- a) Defectos en la espermatogénesis que pueden estar asociados con alteraciones testiculares primarias dadas tanto por alguna anomalía genética o por desórdenes en el desarrollo gonadal (Anorquia congénita "vanishing testes syndrome", aplasia de células germinales síndrome del castillo, síndrome de Klinefelter, XX y anomalías del cromosoma Y, síndrome XYY).
- b) Anomalías hetero o autosómicas ligadas al sexo (distrofia miotónica "enfermedad de Steiner", síndrome de Noonan "turner masculino").

- c) Alteraciones en el descenso testicular, varicocele, factores medio ambientales, temperatura, insuficiencia renal crónica, enfermedad crónica hepática, alcohol, tabaco, estrés, factores emocionales, insecticidas, pesticidas y herbicidas, algunos solventes tales como el benceno, ciertos fármacos, radiación, quimioterapia etc.

2) Causas post-testiculares

- a) Las malformaciones u obstrucciones en los ductos excretores o glándulas sexuales accesorias pueden producir oligozoospermia o azoospermia. Lo anterior puede ser producto de anomalías congénitas (ausencia de vasos deferentes o estenosis de ductos eyaculadores) o adquiridas, ya sea por condiciones post-infecciosas (epididimitis o prolatitis) o causas post-quirúrgicas voluntarias como vasectomías.
- b) La Retroeyaculación es otra causa relativamente frecuente, que se forma como consecuencia de neuropatía diabética o por daños a sistema nervioso

3) Causas pre-testiculares (alteraciones hipotálamo -pituitaria y otras endocrinopatías)

Las endocrinopatías asociadas con infertilidad masculina incluyen hipopituitarismo, desórdenes de gonadotrofinas específicas, prolactinomas, estados de insensibilidad a andrógenos.

En la población masculina que actualmente consulta la clínica de infertilidad alrededor del 35% presentan valores hormonales de FSH y testosterona por debajo de los límites establecidos como normales. Esto se traduce en algunos casos de oligoastenozoospermia

Hipogonadismo prepuberal (Síndrome de Kallman, Eunucos hipogonadotropos "fértils")

Hipogonadismo post puberales exceso de estrógenos a) endógenos, b) exógenos.

Hiperprolactinemia. Exceso de glucocorticoides a) endógenos, b) exógenos.

Hipotiroidismo, hipertiroidismo, Diabetes mellitus.

4) Infecciones genito-urinarias

Las infecciones del tracto genito urinario son causas potenciales de infertilidad en el hombre. Algunos autores han presentado evidencias que con la infección de *Chlamydia trachomatis* y otras bacterias gram-negativo, así como micoplasma pueden causar infertilidad. Solo por mencionar un ejemplo; del 8 al 12 % de los sujetos con infertilidad cursan con azoospermia obstructiva debida a infecciones a nivel de glándulas accesorias (la epididimitis tuberculosa puede originar obstrucción completa o incompleta unilateral o bilateral y consecuentemente desencadenar desde oligozoospermia; hasta azoospermia, la orquitis urliana cuando es severa compromete ambos testículos, fundamentalmente en edad puberal o post puberal puede evolucionar frecuentemente en atrofia gonadal). En Inglaterra, Finlandia y Suecia se reporta que entre 21 a 51% de las parejas con infertilidad presentan infección por Clamidia (7). Algunos autores consideran posible que infecciones del tracto reproductor masculino que evoluciona subclínicamente pueden ser la causa de infertilidad masculina idiopática (8,9).

5) Causas inmunológicas

El aparato reproductor femenino con actividad sexual constante, pudiera tener inoculaciones periódicas con cientos de espermatozoides que inmunológicamente son cuerpos extraños. Las estadísticas revelan que son pocas las mujeres que desarrollan una respuesta inmune. Similarmente, la presencia en el tracto reproductor masculino de antígenos asociados a los espermatozoides, pueden aparecer durante la pubertad y después generar tolerancia hacia los mismos antígenos, sólo ocasionalmente involucra estimulación autoinmune. Se han postulado diversos mecanismos para explicar la formación de anticuerpos anti espermatozoides. En el hombre se ha reconocido que en casos de infección o daño en testículo o epidídimo tanto el fluido seminal y factores espermáticos han demostrado ser capaces de activar células T. Estos pueden generar en sujetos normales respuesta de inmuno-supresión a los antígenos espermáticos. Los factores de inmuno supresión en el semen reducen la habilidad de respuesta a tales factores, permitiendo la generación de inmunidad antiespermática. También estos factores se han señalado como activadores de células inmunes dentro del aparato reproductor, aumentando también la concentración de bacterias, virus, células

epiteliales, células linfoides y la presencia en la membrana espermática de anticuerpos (antígenos de superficie aberrantes).(10, 11)

6) Causas de origen desconocido

Se refiere principalmente a varones en los cuáles es difícil establecer la presencia de algún factor que permita determinar las causas de infertilidad. A esta condición se le ha denominado como "infertilidad idiopática" (12)

Las alteraciones responsables de la pérdida de la funcionalidad de los espermatozoides humanos pueden resultar de una combinación de varios factores. Actualmente la investigación en Andrología esta en gran parte enfocada en determinar las causas involucradas en la infertilidad en el varón.

Es de suma importancia conocer los mecanismos bioquímicos precisos que intervienen en los procesos tanto de la capacidad fertilizante como de la pérdida de la funcionalidad de los espermatozoides.

Cerca del 27% de las parejas que asisten a la clínica por problemas de infertilidad presentan características espermáticas alteradas con respecto a los valores convencionales . (13)

En las muestras de semen, tanto de sujetos sanos como de pacientes que cursan con problemas de infertilidad, además de espermatozoides hay una significativa concentración de células nucleadas, entre ellas se encuentran células germinales, células del epitelio y leucocitos(14). De la población que asistió al laboratorio de Andrología, el 18.5% de las muestras analizadas presentaron concentraciones de leucocitos superiores a los niveles establecidos como normales (Datos no publicados).

Concentraciones de leucocitos polimorfo nucleares en el semen superiores a un millón por ml con tinción positiva a la peroxidasa . Indican que el paciente cursa con leucospermia. Esta condición está asociada con procesos inflamatorios y/o infecciosos del tracto reproductor masculino, que a su vez resultan ser causas potenciales de infertilidad en el hombre (15, 16). Se ha intentado determinar el significado funcional de la población de leucocitos seminales. Los resultados de las investigaciones realizadas hasta el momento sugieren que estas células pueden estar involucradas en diversos mecanismos; por ejemplo los linfocitos pudieran participar en respuestas importantes de modulación inmunológica y auto inmunidad del tracto genital. Los macrófagos

participan en la fagocitosis de los espermatozoides. La presencia de neutrófilos es un marcador de prostatitis en las modalidades:

- 1) bacteriana a) crónica
- b) aguda

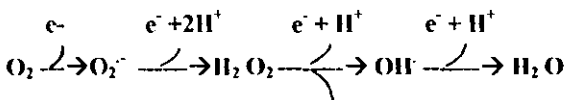
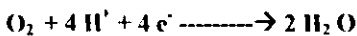
2) no bacteriana.

Sin embargo el significado clínico de la leucospermia permanece controversial. Existen evidencias que sugieren que la presencia de leucocitos pueden afectar severamente la función espermática, siendo un factor potencial en la infertilidad.

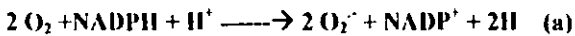
Los mecanismos involucrados en el efecto deletéreo de los leucocitos que alteran la función espermática aun se desconocen (17,18, 19).

Los leucocitos polimorfo nucleares desechan, al medio circundante, elementos tóxicos producto de su metabolismo. Entre estos se encuentran las especies de oxígeno reactivo (radical superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrogeno, radical hipoclorito) que en elevadas concentraciones son altamente tóxicas. Se ha sugerido una posible relación entre estas especies de oxígeno reactivo en semen de pacientes con problemas de infertilidad con la pérdida de potencial fértil.

En 1979 Jones & Mann (20) son los primeros en proponer la presencia de elementos oxidativos en el semen que pudieran tener efectos dañinos para el desempeño normal de los espermatozoides humanos. Es a partir de la década de los 80 y parte de los 90 que se ha generado una gran información al respecto. Los resultados obtenidos sugieren que el estrés oxidativo juega un papel importante en la etiología de los espermatozoides con función alterada. La generación de las especies de oxígeno reactivo se inicia cuando el oxígeno utilizado por la célula es reducida en agua mediante el complejo citocromo oxidasa (citocromo a +a3) de la cadena respiratoria mitocondrial

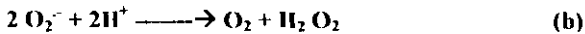


Los intermediarios quedan unidos a los sitios activos de la citocromo oxidasa evitando que se dispersen en la célula. Sin embargo, se ha reportado que una proporción de 1 a 2% del oxígeno consumido escapa como superóxido (21). La fuente más importante de producción de especies de oxígeno reactivo es la cadena respiratoria en condiciones de aumento súbito de consumo de oxígeno. En el caso de las células fagocitarias cuando son activadas por contacto con partículas extrañas, la respuesta a esta activación se presenta en la membrana citoplásmica donde se localiza el complejo enzimático denominado NADPH oxidasa que cataliza la reacción

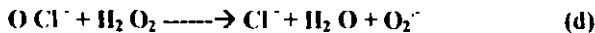


que en presencia de la enzima superóxido dismutasa formará oxígeno y peróxido de hidrógeno.

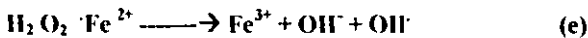
SOD



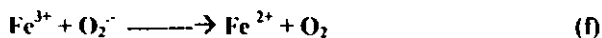
Los fagocitos contienen una mieloperoxidasa que transforma halógenos, hipohalógenos a partir de peróxido de hidrógeno.



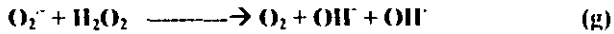
El peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición Cu^+ y Fe^{2+} dará lugar a la reacción de Fenton



La presencia del radical hidroxilo que con un anión superóxido aumenta la producción de Fe^{2+} permitiendo la formación continua de radical hidroxilo.



La reacción final producto del conjunto de las reacciones ya descritas constituyen el ciclo de Haber-Weiss.



El espermatozoide humano cuenta con mecanismos de defensa contra un estrés oxidativo, entre los cuáles se encuentran los sistemas enzimáticos de superóxido dismutasa, principalmente de localización citoplásmica dependiente de cobre Cu y cinc Zn, y SOD dependiente de Mn presente en la matriz mitocondrial. También cuenta con glutatión peroxidasa y catalasa (22,23,24). Sin embargo, se ha establecido que el espermatozoide al ser una célula altamente especializada con una función muy específica, no cuenta con actividades enzimáticas tan eficientes como lo poseen otros tipos celulares. Comparando la actividad de la superóxido dismutasa del hepatocito en relación con la del espermatozoide este último posee la mitad de la actividad que registra el hepatocito. La actividad enzimática de la superóxido dismutasa de pacientes con problemas de infertilidad es sólo una tercera parte de la actividad con respecto a sujetos fértiles (25,26). Lo anterior sugiere que el espermatozoide humano es particularmente susceptible de ataques mediados por especies de oxígeno reactivo, generados ya sea por ellos mismos o bien por otros grupos celulares presentes en el semen, en específico leucocitos (neutrófilos). Dado que el micro ambiente (variaciones del pH principalmente) puede favorecer la producción del radical hidroxilo por protonación del radical super óxido (fórmula g), las peroxidasas del espermatozoide pueden catalizar la formación de ácido hipocloroso en presencia de peróxido de hidrógeno y iones cloro.(27).

La presencia de peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo producen un estímulo a la reacción en cadena "lipoperoxidación" principalmente dada en ácidos grasos poli insaturados ya que la presencia de dobles ligaduras debilita el enlace C-H de los átomos de carbono adyacentes.

Los ácidos grasos poli insaturados son susceptibles a un proceso de peroxidación, el cual inicia con la remoción de un átomo de hidrógeno y la creación de un radical libre. Este último complementa su par electrónico mediante la sustracción de un electrón de otra molécula creando un radical orgánico, que se estabiliza gracias a un arreglo interno que produce un dieno conjugado, el cual reacciona rápidamente con un oxígeno para formar radical peroxilo (dioxilo). El radical lipoperoxilo puede atacar a un lipido vecino, sustrayendo un átomo de hidrógeno para producir un hidroperóxido y un nuevo

radical. Los hidroperóxidos lipídicos son estables en estado puro pero en presencia de metales de transición se descomponen dando un radical alcoxilo. Tanto los radicales alcoxilos como peroxilos estimulan la reacción en cadena al sustraer átomos de hidrógeno de otros lípidos.

El espermatozoide puede sufrir daño por peroxidación, debido a que su membrana plasmática contiene altas concentraciones de fosfolípidos (fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, esfingo mielina) unidos como muchas células principalmente a ácidos grasos poli insaturados (hexadodecanoico) (28) y al presentarse en el semen especies de oxígeno reactivo, que en presencia de pequeñas cantidades de elementos de transición principalmente el hierro, dispara la iniciación de una reacción en cadena de la lipoperoxidación, principalmente el ataque es realizado por los radicales hidroxilo a las dobles ligaduras de los ácidos grasos poli insaturados (reacción g).

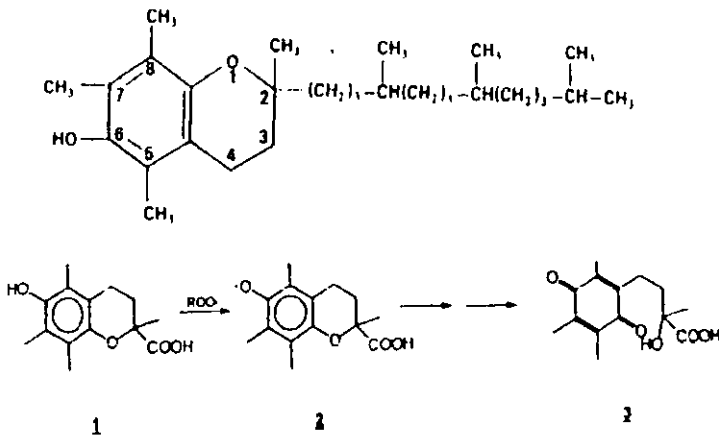
El efecto de la lipoperoxidación sobre la membrana espermática se traduce en la disminución de la fluidez de la membrana, como consecuencia de lo anterior la capacidad del espermatozoide en la participación de la fusión de membranas con el ovocito y en los eventos previos asociados con el proceso de fertilización se ven disminuidos.

En la población clínica se ha establecido, mediante diferentes estudios, que existe una relación directa en donde los niveles de especies de oxígeno reactivo generados en el medio disminuyen la competencia del espermatozoide para fusionarse con el ovocito.(29,30)

Para contrarrestar el posible efecto deletéreo de las especies de oxígeno reactivo sobre la funcionalidad celular se ha propuesto la utilización de agentes denominados antioxidantes que tienen una función protectora tanto en condiciones in vitro como in vivo. Se conoce ampliamente la función de la vitamina E como un agente antioxidante **Chain-breaking**. Ésta ingresa a la membrana celular teniendo un mecanismo de acción endógeno.

El agente Trolox (6 hidroxil-2,7,8,tetrametil croman-2-ácido carboxílico) es un antioxidante soluble en agua, que actúa como atrapador de los radicales libres. Su estructura química proporciona actividad antioxidante por el grupo cromanol y el grupo carboxilo, le permite tener solubilidad en el agua, lo cual tiene ventajas sobre otros antioxidantes que son lipo solubles que se deben incorporar al interior de la membrana mediante la utilización de métodos de extracción y co-evaporación, en tanto que el

trolox mantiene intacto el sistema ya que su mecanismo de acción antioxidante es exógeno (31,32,33)



Scheme 1.

Figura 1. Representaciones de las fórmulas de los antioxidantes α -Tocoferol (parte superior) y Trolox (parte inferior donde 1. la estructura del trolox exhibe los requisitos para un antioxidante efectivo 2. Transfiere un átomo de hidrógeno a un radical de oxígeno reactivo tal como el peroxilo 3. Molécula sin actividad (34, 35)

Objetivo General

Determinar los posibles efectos de las especies de oxígeno reactivo (EOR) generados por leucocitos polimorfo nucleares activados con un ester de forbol PMA 12 miristato 13 acetato de forbol sobre la funcionalidad espermática.

Probar en condiciones in vitro, el posible efecto protector de 2 antioxidantes con diferentes mecanismos de acción. α -Tocoferol (vitamina E liposoluble) y Trolox (6 hidroxil-2,7,8,tetrametil croman-2-ácido carboxílico). Cuya acción antioxidante es el exterior de la célula

Objetivos particulares.

1. Establecer las condiciones experimentales óptimas, determinando las curvas de dosis mínima de respuesta para el acetato de forbol, así como de los antioxidantes α -Tocoferol y trolox.

2. Montaje de la técnica de medición de especies de oxígeno reactivo. Mediante un método colorimétrico de Nitrozul de tetrazolium NBT.

3. Curva de calibración de peróxido de hidrógeno con concentraciones conocidas.

4. Montaje de las curvas de respuesta de leucocitos polimorfo nucleares variando su concentración en condiciones de estimulación con PMA (ester de forbol) y sin estimulación. Mediante técnica colorimétrica y por daño celular.

5. Montaje y validación de los parámetros de funcionalidad espermática (Viabilidad, movilidad general, movilidad tipo a progresiva rápida, lavado hipo osmótico, integridad acrosomal, daño celular. Prueba de penetración del hamster, activación espermática HSA y microscopía electrónica de transmisión).

6. Establecer la relación que pudiera existir entre la proporción de leucocitos (neutrófilos) con respecto a la concentración espermática, en condiciones basales (Sin estimulación) y observar el posible efecto de la generación de especies de oxígeno reactivo de los leucocitos sobre la función espermática, en condiciones de estimulación de los leucocitos polimorfo nucleares con PMA (acetato de forbol) aplicado a los tratamientos experimentales que incluyen las proporciones celulares (Espermatozoides: PMN) 1:1, 2:1 5:1 10:1 y 20:1, a lo largo de 120 minutos de incubación.

7. Establecer el efecto de especies de oxígeno reactivo sobre la funcionalidad espermática, así como el posible efecto protector de dos antioxidantes con diferente mecanismo de acción el tocoferol (vitamina E lipo soluble) y trolox (derivado sintético de la vitamina E, soluble en agua) a lo largo de 90 minutos de incubación con proporciones celulares 10:1 (espermatozoides:PMN), en 8 grupos experimentales que incluyen los dos antioxidantes.

Material y Métodos

Condiciones experimentales

En el estudio participaron voluntarios sanos para la donación de sangre periférica. A cada participante se le aplicó un historial clínico previo a la toma de muestra, además de los estudios de biometría hemática (Cell Dyn Abbot Systems) que comprendieron los valores de hematocrito, hemoglobina, conteo diferencial. En cuanto a la obtención de espermatozoides se realizó a partir de sujetos voluntarios normozoospermicos con fertilidad probada y con 3 días de abstinencia sexual.

Reactivos

Percoll de Sigma Chemical (St.Louis M.). 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) de ICN Biochemicals (Cleveland OH). Nitroazul de tetrazolium (NBT) de Sigma Chemicals. Tinción de Mieloperoxidasa para determinación de leucocitos (procedur : no. 390) con un kit para histoquímica con NBT (procedure no. 840).lectina de *Physum sativa* marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) de Sigma Chemicals. Trolox (6-hidroxy-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico) de Aldrich Chemical Company ,Inc. (Milwaukee, WI). α -tocoferol (vitamina E) de Sigma Chemicals . Todos los medios de cultivo utilizados fueron de la marca Sigma Chemicals.(Ham F-10. pH 7.3 medio 199 pH7.3,medio BWWpH 7.4, Eagle pH 7.4) . Suero de yegua preñada (PMS) de sigma chemical (St. Louis M). Gonadotropina coriónica humana (hGC) Pregnil de organon. Las enzimas hialuronidasa y tripsina asi como Ionophoro de calcio A23187. de Sigma-Aldrich Co. dimethyl sulfoxido (DMSO) de Backer peróxido de hidrógeno grado reactivo de Backer. tinción laemoid de Fertility Products 800-334-5487(Raleigh, NC).Adenosina 3'5'-monofosfato ciclico41.7AMP(ciclico) y bisbenzimidá (2'-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-metil-1 piperazinil 2'5'-bi- 1 H-benzimidazole). Hoechst-33258. de Sigma Chemical

Obtención de leucocitos polimorfonucleares

A partir de sangre periférica 20 ml por voluntario, colectada en tubos vacutainer pretratados con anticoagulante E.D.T.A. La sangre fue transferida a tubos falcon cónicos de 15 ml estériles a los 15 minutos de la toma de muestra y se les adicionaron 1:1 (v/v) de buffer de lisis de NH_4Cl (0.87 M), se dejaron por 30 minutos a 37 °C en constante movimiento, fueron centrifugados por 5 minutos a 600 Xg a temperatura ambiente, el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en 2 ml de buffer de lisis, se realizó un pool de todos los pellets resultantes y la solución total fue sometida a una separación en un monogradiante de ficoll-histopage se centrifugó por 15 minutos 600Xg , al final se recuperó la fracción intermedia (presencia de leucocitos PMN) la cual se transfirió a otro tubo cónico falcon y fue lavada con 10 ml de solución salina (Na Cl 0.9%) y céntrifugada por 2 minutos a 600 Xg . el pellet resultante fue resuspendido en un ml de solución salina (36,37,38), se tomaron 100µl de la solución para determinar la concentración celular (Tinción positiva a peroxidasa 39), 20µl para determinar la viabilidad celular por técnica de tinción vital de cosina (para el estudio fueron incluidas muestras con poblaciones mayores del 80% de viabilidad),10 µl para realizar frotis de daño celular (NBT y Tinción de Wright modificada 40,41,42 ,43) y10 µl para la tinción P.A.P.y determinar la morfología de las poblaciones de PMN. La solución restante se mantuvo a 37 °C para el posterior montaje de los experimentos.

Obtención de espermatozoides

Las muestras fueron colectadas de voluntarios con 3 días de abstinencia sexual, por masturbación en contenedores plásticos estériles. Las muestras se colocaron a 37 °C y su análisis se realizó a los 30 minutos de la toma de muestra.

En la espermatobioscopia directa se cuantificaron parámetros convencionales de viabilidad (Tinción Vital) (44,45), movilidad general , movilidad progresiva rápida, morfología, concentración celular. Se realizaron pruebas especiales como lavado hipoosmótico(HOST)(46,47,48,49),

integridad acrosomal (técnica de FICT para microscopía de fluorescencia 50,51,52 y 53)(figura2 del apéndice) y daño celular inicial. La clasificación de las muestras se realizó de acuerdo con los criterios de la O.M.S de 1992 (15). Se seleccionaron para el estudio muestras con valores normozoospermicos.

Las muestras se colocaron sobre gradientes discontinuos de percoll-isotónico pH 7.3 en medio HamF-10 con osmolaridades de 280-300 mOsm.(gradiente inferior 80% y gradiente superior 40%) y mediante centrifugación a 800Xg por 20 minutos a temperatura ambiente. De la centrifugación se obtuvieron tres fracciones: la parte superior correspondió a plasma seminal, la fracción intermedia a células epiteliales, leucocitos, detritus y células con daños ambas fracciones se descartaron. El pellet final proveniente del gradiente de 80% se resuspendió en 2 ml de medio Ham F-10 y se lavó por centrifugación durante 2 minutos a 800 Xg. El pellet final se resuspendió en 1.0 ml de medio Ham F-10 (54) y se tomaron alícuotas para determinar la concentración espermática, viabilidad, movilidad general, movilidad tipo a (progresivo rápido), HOST (prueba de lavado hipo-osmótico), integridad acrosomal y daño celular.Estos valores se consideraron como iniciales (tiempo 0).

Efecto de poblaciones de leucocitos polimorfo nucleares sin estimulación sobre la funcionalidad espermática.

Se realizaron experimentos con el propósito de establecer los posibles efectos de poblaciones de leucocitos polimorfo nucleares, sin estimulación sobre, la funcionalidad de los espermatozoides. Se evaluaron los siguientes parámetros de funcionalidad: viabilidad, movilidad general, movilidad progresiva rápida, integridad de la membrana espermática e integridad acrosomal en intervalos de 15 minutos, durante 2 horas en incubación a 37°C en ambiente de 95% de aire y 5% de CO₂.

A partir de la solución de PMN y de espermatozoides se procedió al montaje experimental, que consistió en colocar en proporciones 1:1, 2:1, 5:1 ,10:1 y 20:1 (espermatozoides:PMN) por duplicado y se corrieron cuatro tratamientos experimentales como se muestra en la siguiente tabla

Tratamientos Experimentales	Espermatozoides	Leucocitos PMN	Na Cl 0.9%
Control	100 μ l	-	400 μ l
Espermatozoides	100 μ l	100 μ l	300 μ l
Espermatozoides + PMN			

Tabla 1. Montaje experimental, para establecer el posible efecto de poblaciones de leucocitos polimorfo nucleares sin estimulación, sobre la funcionalidad espermática, considerando masa celular (proporciones Espermatozoides : PMN) y el tiempo de incubación. Se dejaron incubar por 2 horas a 37 °C en incubadora de CO₂ 5% y 95% de aire húmedo en movimiento constante. y en intervalos de 15 minutos se procedió a el análisis de la viabilidad, movilidad general, movilidad progresiva rápida, lavado hiposmótico (HOST) e Integridad acrosomal.

Medición de las especies de oxígeno reactivo apartir de leucocitos poli morfo nucleares PMN estimulados.

Dosis-Respuesta

Para establecer la dosis de respuesta mínima de PMA sobre los PMN se montaron en cada uno de los 10 experimentos 4 series con concentraciones constantes de PMN (5.0×10^6 /ml) y se sometieron a 4 diferentes concentraciones de PMA (1.6×10^{-3} M, 1.6×10^{-6} M, 1.6×10^{-9} M y 1.6×10^{-12} M). A todos los tubos se les adicionaron 100 μ l de solución de NBT como marcador de presencia de EOR, se incubaron a 37 °C en movimiento constante, realizándose mediciones por espectrofotometría a 630 nm cada 15 minutos durante 120 minutos y se procedió a determinar la dosis mínima de respuesta.

Curva de calibración.

De la solución de PMN, se formaron en cada uno de los 10 experimentos dos curvas de calibración con sus respectivos duplicados con rangos crecientes en la concentración de PMN que fueron desde 0.500 hasta 8.0×10^6 /ml. A cada uno de los tubos se les adicionaron 100 μ l de solución de NBT (1 mg/ ml).

Una serie se estimuló con una concentración constante de PMA 100µl que correspondió a 1.6×10^{-9} M (Concentración mínima para causar generación de EOR), con su correspondiente serie sin estímulo. El volumen final fue de 500 µl con solución salina NaCl 0.9%; al mismo tiempo fueron incubados a 37 °C en movimiento constante y se procedió a leer cada tubo en intervalos de 15 minutos durante 2 horas en un espectrofotómetro marca Coleman a 630nm, midiendo la transformación del NBT en azul de formazán, las densidades ópticas fueron registradas y graficadas(55,56)

Curva de calibración Peróxido de hidrógeno por espectrofotometría con nitro azul de tetrazolium (NBT).

Para establecer las concentraciones de peróxido de hidrogeno se estableció una curva de calibración partiendo de una solución stock de peróxido de hidrógeno grado reactivo (30 mM). Se prepararon 10 tubos como se muestra en la tabla 2.

Concentración De H ₂ O ₂	NBT	Peróxido de hidrógeno	Agua
Blanco	100 µl	-	900 µl
0.0333 mM	100 µl	900 µl	-
0.3333 mM	100 µl	900 µl	-
3.3333 mM	100 µl	900 µl	-
6.6666 mM	100 µl	900 µl	-
10.000 mM	100 µl	900 µl	-
13.333 mM	100 µl	900 µl	-
16.66 mM	100 µl	900 µl	-
23.33 mM	100 µl	900 µl	-
30.00 mM	100 µl	900 µl	-

Tabla 2. Montaje experimental de curva de calibración para peróxido de hidrógeno. A los 5 minutos de montaje se procedió a leer la transformación del Nitroazul de tetrazolium en granulos de formazán a 630 nm. NBT (1mg/ ml)

Determinación de los efectos de especies de oxígeno reactivo sobre la funcionalidad espermática.

Efecto del tiempo de incubación y proporción de la masa celular.

A partir de la solución de PMN (1.0×10^6 células/ml) de espermatozoides (20×10^6 espermatozoides/ml) se procedió al montaje experimental que consistió en colocar en proporciones 1:1, 2:1, 5:1, 10:1 y 20:1 (espermatozoides:PMN) por duplicado y se realizaron cuatro tratamientos experimentales, como se muestra en la tabla 3.

Tratamientos Experimentales	Espermatozoides	Leucocitos PMN	PMA	Na Cl 0.9%
Control	100 μ l	-	-	400 μ l
Espermatozoides + PMA	100 μ l	-	100 μ l	300 μ l
Espermatozoides + PMN	100 μ l	100 μ l	-	300 μ l
Espermatozoides +PMN+PMA	100 μ l	100 μ l	100 μ l	200 μ l

Tabla 3. Montaje experimental, para establecer el posible efecto de las especies de oxígeno reactivo sobre la funcionalidad espermática, considerando masa celular (proporciones Espermatozoides : PMN) y el tiempo de incubación.

Se dejaron incubar por 2 horas a 37 °C en incubadora de CO₂ 5% y 95% de aire húmedo en movimiento constante, y en intervalos de 15 minutos, se procedió al análisis de la viabilidad, movilidad general, movilidad progresiva rápida, lavado hiposmótico (HOST) , e integridad acrosomal.

Antioxidantes curva dosis-respuesta

Se utilizó vitamina E liposoluble(α -tocoferol) disuelta en etanol y las emulsiones que se formaron se adicionaron al medio Ham F-10 en movimiento constante a 37 °C hasta que se disolvieran completamente. La concentración final de etanol fue menor a 2% en los medios. En 10 experimentos se utilizaron concentraciones que fueron de 0.5% hasta 5.0% (en intervalos de 0.5%) de vitamina E (α -tocoferol), realizandose incubaciones en poblaciones con concentraciones constantes de 5.0×10^6 espermatozoides/ml.

Los resultados de la viabilidad, movilidad general, movilidad progresiva rápida, fueron cuantificados a los 90 minutos de incubación (tabla 3 condiciones experimentales del apéndice).

El trolox fue disuelto directamente en el medio Ham F-10 en concentraciones de 2nM hasta 100 nM (en intervalos de 20 nM) del antioxidante y se procedió a su esterilización por filtración (Filtros millipore 0.22µm). Para establecer la dosis óptima se incubaron poblaciones de concentración constante de espermatozoides 5.0×10^6 /ml.

Los resultados en viabilidad, movilidad general, movilidad progresiva rápida fueron evaluados y graficados a los 90 minutos de incubación (Condiciones experimentales apéndice).

Efecto antioxidante del trolox por espectrofotometría en poblaciones de leucocitos PMN

En poblaciones de leucocitos polimorfonucleares 0.500×10^6 /ml a 5.5×10^6 PMN/ml, en condiciones de activación con el ester de forbol PMA. El montaje experimental con sus duplicados realizados son mostrados en la tabla 4. Los tubos fueron incubados a 37°C en movimiento constante durante 2 horas se realizaron mediciones a 630 nm. En intervalos de 15 minutos de incubación también fueron tomadas alicuotas de 10 µl de cada uno de los tratamientos que fueron colocadas en un portaobjetos para evaluar el cambio en morfología celular de los leucocitos PMN, producto de la estimulación con PMA. Se realizó tinción con NBT y Wright. La evaluación fue realizada a 100X en microscopía de luz.(condiciones experimentales apéndice).

Tratamiento	PMA	Trolox	NBT	PMN	Na Cl 0.9%
Blanco	-	-	100µl	-	900µl
1 PMN 1	-	-	100µl	100µl	800µl
2 PMN 2	-	-	100µl	300µl	600µl
3 PMN 3	-	-	100µl	500µl	400µl
4 PMN 1	100µl	100µl	100µl	100µl	600µl
5 PMN 2	100µl	100µl	100µl	300µl	400µl
6 PMN 3	100µl	100µl	100µl	500µl	200µl
7 PMN 1	100µl	-	100µl	100µl	700µl
8 PMN 2	100µl	-	100µl	300µl	500µl
9 PMN 3	100µl	-	100µl	500µl	300µl

Tabla 4. Montaje experimental para evaluar efecto antioxidante del agente trolox. Midiendo por espectrofotometría a 630 nm, condiciones experimentales. PMA ($1.6 \times 10^{-2} M$). Trolox 40nM, NBT (1mg/ml) PMN 1: 0.500×10^6 PMN/ml. PMN 2: 1.500×10^6 PMN/ml. PMN 3: 2.500×10^6 PMN/ml

Efecto antioxidante del trolox por espectrofotometría en poblaciones de leucocitos PMN Y espermatozoides.

En poblaciones de espermatozoides de concentraciones constantes incubados, con leucocitos polimorfonucleares, guardando las proporciones (20:1, 10:1 y 5:1).

En condiciones experimentales sin activación, con activación mediante el ester de forbol PMA, y con activación y agente trolox. El montaje experimental con sus duplicados realizados son mostrados en la tabla 5. Los tubos fueron incubados a 37°C en movimiento constante durante 2 horas se realizaron mediciones a 630 nm. En intervalos de 15 minutos de incubación.

Tratam	PMN	Espermat.	NBT	Trolox	PMA	Na Cl 0.9%
Blanco	-	-	100 µl	-	-	900 µl
E:(1)PMN	100 µl	100 µl	100 µl	-	-	700 µl
E:(1)PMA	100 µl	100 µl	100 µl	-	100 µl	600 µl
E:(1)PMA +Trolox	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	500 µl
E:(2)PMN	100 µl	100 µl	100 µl	-	-	700 µl
E:(2)PMA	100 µl	100 µl	100 µl	-	100 µl	600 µl
E:(2)PMA +Trolox	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	500 µl
E:(3)PMN	100 µl	100 µl	100 µl	-	-	700 µl
E:(3)PMA	100 µl	100 µl	100 µl	-	100 µl	600 µl
E:(3)PMA +Trolox	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	500 µl
E	-	100 µl	100 µl	-	-	800 µl
E+PMA	-	100 µl	100 µl	-	100 µl	700 µl
E+PMA+T	-	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	600 µl

Tabla 5. Montaje experimental efecto del trolox por espectrofotometría. Donde PMN población de PMN (1) 0.500×10^6 PMN/ml (2) 1.0×10^6 PMN/ml (3) 2.0×10^6 PMN/ml. E: Espermatozoides población constante a 10.0×10^6 células/ml. NBT (1mg/ml). PMA 1.6×10^{-6} M. Trolox 1%

Evaluación del efecto protector de los antioxidantes en la funcionalidad espermática

De la serie experimental realizada para evaluar el efecto de las especies de oxígeno reactivo sobre la funcionalidad espermática, se calculó que el tiempo necesario para causar daño oxidativo en los espermatozoides fue a los 90 minutos de co-incubación y la concentración de PMA como dosis mínima para producir una respuesta fue 1.6×10^{-6} M, en tanto que se establecieron las concentraciones de antioxidantes para α -tocoferol de 1% y para el Trolox de 40 nM.

Tratamiento	Espermatozoides	Polimorfo Nucleares	Nitroazul NBT	PMA Forbol	Trolox	Tocoferol	Sol Salina NaCl
Control 1	100 µl	-	100 µl	-	-	-	300 µl
Control 2	100 µl	-	100 µl	100 µl	-	-	200 µl
Tratam 3	100 µl	100 µl	100 µl	-	-	-	200 µl
Tratam 4	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	-	-	100 µl
Tratam 5	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	-	-
Tratam 6	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	-	100 µl	-
Tratam 7	100 µl	-	100 µl	-	100 µl	-	200 µl
Tratam 8	100 µl	-	100 µl	-	-	100 µl	200 µl

Tabla 6 Montaje experimental donde: la concentración de espermatozoides es de $10.0 \times 10^7/100 \mu\text{l}$, PMN $1.0 \times 10^6/100 \mu\text{l}$, PMA $1.6 \times 10^{-6} \text{ M}$ en $100 \mu\text{l}$, NBT (1mg/ml), Trolox 40 nM, α -tocoferol 1%.

Se procedió a incubar todos los tratamientos a 37°C durante 90 minutos en constante movimiento, antes y después de la incubación se cuantificaron los parámetros de viabilidad, movilidad, movilidad progresiva rápida, HOST, Integridad acrosomal y daño celular.

Prueba de penetración de huevo de hamster.

Las hembras hamster maduras sirias doradas *Cricetus auratus*, se obtuvieron del Bioterio General de la escuela de estudios profesionales Iztacala U.N.A.M a setenta y dos horas previas al estudio, las hembras se prepararon y se les practicaron tomas de muestras vaginales. Los fluidos obtenidos fueron colocados en portaobjetos y se realizaron tinciones de P.A.P para determinar el ciclo estral de cada una, en caso de presentar estadio estro, se les aplicaron de 30 a 40 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG); por vía intraperitoneal. en caso de encontrarse a un día de su ciclo estral se les inyectaron vía intraperitoneal de 30 a 40 UI de (PMS) suero de yegua preñada y gonadotropina coriónica humana de 48 a 72 horas previas al estudio.

La recuperación de los ovocitos se realizó en un período de 18 horas después de la inyección de (hCG). Las hembras se anestesiaron con Enflurano (Ethrane de Abbott) y se procedió a la disección del aparato reproductor, del cual fueron eliminados los excesos de grasa y se realizaron lavados de las tubas con solución salina estéril. Bajo el microscopio de disección, se capturaron los ovocitos provenientes del lavado de las tubas, con una

mieropipeta estéril modificada. Los ovocitos fueron colocados en cajas de fertilización (nunclon) con medio BWW; los ovarios aparte fueron punzionados con una aguja especial estéril y los ovocitos fueron colectados y colocados en las cajas de fertilización, se procedio a la cuenta y separación de los ovocitos para formar los grupos experimentales.(con zona pelucida y sin zona pelúcida).

Los ovocitos destinados a ser desnudados fueron sometidos a un tratamiento enzimático de tripsina 0.1% y hiarulonidasa 0.1% para remover la zona pelúcida y células cúmulo.

Después de cada tratamiento enzimático se realizaron dos lavados con medio BWW pH 7.3

Los ovocitos fueron separados y seleccionados para cada tratamiento. se colocaron en cajas de fertilización preparadas con 300 μ l de medio BWW y con una gota de aceite de parafina estéril, para evitar la desecación del medio y fueron colocados a 37 °C en atmosfera de CO₂ al 5% y 95% de aire (15, 57,58). previo a la siembra de los espermatozoides.

Siembra de espermatozoides

Del montaje experimental (ver tabla 6) se tomaron alicuotas de 5.0 millones de espermatozoides a los 90 minutos de incubación con sus respectivos tratamientos para realizar la siembra de cada caja de fertilización, se dejaron en incubación durante 3 horas a 37 °C en atmosfera de 5% de CO₂, y 95% en aire.

Variante utilizando ionophoro de calcio (A 23187)

El ionophoro de calcio A 23187 se utilizaró para sincronizar a la poblaci3n espermática. Se parti3 de una soluci3n stock de 10 mM en dimetil sulf3xido (DMSO). Tres d3as previos al experimento se diluy3 1 ml de esta soluci3n en 10 ml de medio BWW, y fue almacenada a 4 °C. El d3a del experimento se realiz3 una curva de dosis-respuesta en concentraciones

que fueron desde 1.25 μM y 2.5 μM ($\mu\text{mol/l}$). Debido a que la respuesta al tratamiento con el ionoforo de calcio varia entre las muestras, se sugiere realizar esta prueba para optimizar la respuesta. Los espermatozoides en esta curva dosis-respuesta se incubaron con el ionoforo por 3 horas, después las células fueron lavadas mediante centrifugación a 500Xg por 3 minutos y resuspendidas en medio BWW hasta la obtención de 10 millones de espermatozoides por ml. en la solución de trabajo. Los espermatozoides se sometieron a los diferentes tratamientos (ver tabla 6) y posteriormente se sembraron en los pozos de fertilización, de acuerdo a lo antes mencionado.

Análisis de penetración de los ovocitos de hamster

Transcurridas las tres horas de incubación se procedió a la colecta de los ovocitos de cada uno de los pozos de fertilización, y se lavó cada ovocito con buffer de fosfatos PBS pH 7.3 para eliminar el exceso de espermatozoides. Los ovocitos fueron fijados en solución de carnoy 4 °C y colocados en portaobjetos bajo el microscopio estereoscópico se realizó la tinción utilizando un colorante a base de orceína acética (tinción lacmoide) por 3 minutos y se colocó posteriormente un cubreobjetos de 22mmX 22mm, se coordinaron para su fácil localización en el microscopio de contraste de fases a 10X, 20X y 40 X. se analizaron, y se determinaron los porcentajes de espermatozoides que presentaron descondensación nuclear.

Se realizó una variante de tinción utilizando el colorante para microscopia de fluorescencia Hoestch 33258, para la evaluación más detallada del núcleo espermático.

Los ovocitos después de ser lavados con PBS, se colocaron en condiciones de obscuridad, en el colorante de Hoestch, incubándolos a 37 °C en una cámara húmeda durante 15 minutos, después se eliminó el exceso de colorante y se colocaron en portaobjetos y coordinados para su fácil localización en el microscopio de fluorescencia. Fueron analizados a 25X, 40X 100X de aumento.

Ensayo de activación espermática

Después de incubar a 37 °C durante 90 minutos en condiciones de esterilidad, se tomaron alícuotas de 5 millones de espermatozoides por ml de cada uno de los tratamientos (ver tabla 6). Se realizó un lavado de cada uno de los tubos con 2.0 ml de medio Ham F-10 pH 7.3 centrifugando por 2 minutos a 600Xg. El pellet resultante fue resuspendido en 500µl de medio Ham F-10 suplementado con BSA al 0.05%, las muestras fueron almacenadas a 4 °C para su posterior procesamiento.

El día del experimento, las muestras fueron incubadas por 30 minutos a 37 °C y cada una de ellas fue resuspendida en 10 ml de medio de separación nuclear (NIM, sacarosa 200mM, Mg Cl₂ 2.4 mM, Tris-HCl 10 mM y ácido maleico 5 mM a pH 7.4) se centrifugaron por 10 minutos a 400 Xg y se resuspendieron en 10 ml de NIM, suplementado con lisolecitina al 0.05% y tripsina 1µg/ml. la mezcla fue colocada a temperatura ambiente por 5 minutos y nuevamente fueron centrifugadas a 400 Xg por 10 minutos. El pellet se resuspendió con medio NIM suplementado con BSA al 3% y fue centrifugado a 400 Xg por 10 minutos y nuevamente resuspendido con medio NIM suplentado con BSA al 0.4% y nuevamente centrifugado en las mismas condiciones.

Los espermatozoides fueron finalmente resuspendidos en medio de separación de extracto de ovocito de *Xenopus* (XEIM Tris-HCl 10 mM pH 7.5 Mg Cl₂ 1.5 mM, KCl 100mM y DTT 50 mM), se obtubieron alícuotas de 25 000 espermatozoides por µl y fueron colocados en hielo por 45 minutos.

Antes de realizar la mezcla con los extractos de ovocito de rana las muestras fueron pretratadas con XEIM (DTT), lo que permitió mejorar los eventos de descondensación y

síntesis de DNA debido a la reducción de las protaminas que en los espermatozoides de mamíferos están en *cross-linked* por las uniones de puentes disulfuro.

Los espermatozoides en *Xenopus laevis* contienen protaminas intermedias que son deficientes en cisteína, de tal manera que los extractos de ovocito de rana carecen de los factores reductores que si están presentes en los ovocitos de mamífero y que son necesarias para la reducción de los puentes disulfuro en el espermatozoide humano, por lo que debemos reducir las uniones disulfuro experimentalmente (Observaciones no publicadas, comunicación personal Brown 1998).

*Obtención de los extractos de ovocitos de *Xenopus laevis**

A ranas hembras adultas de la especie *Xenopus laevis* se les administró 500 UI de hormona hGC vía inyección intraperitoneal, por la mañana y tarde del día anterior a los experimentos, con el propósito de inducir ovulación, maduración y desova.

Los ovocitos maduros fueron colectados y se les eliminó la matriz gelatinosa cementante con una solución de cisteína-HCl al 2% pH 7.6. Los ovocitos fueron lavados e incubados por una hora a temperatura ambiente en medio de Barth (Na Cl 88 mM, KCl 1.0 mM, Mg SO₄ 0.83mM, Ca (NO₃)₂ 0.34 mM, Ca Cl₂ 0.41mM, Tris-HCl 7.5mM, Penicilina 10µg/ml y Na (CO₃)₂ 2.4mM pH 7.6). Después de 3 lavados en medio XEIM (eliminando el exceso de buffer), fueron lisados mediante centrifugación a 10000 Xg por 15 minutos a 4 °C.

Como producto de la centrifugación se obtuvieron 3 fracciones: la superior corresponde a la zona de lípidos, la intermedia con los factores de interés y el pellet con los fragmentos de los ovocitos. La fracción intermedia fue recuperada y transferida a otro tubo y fue recentrifugado a 10000 Xg por 15 minutos a 4 °C. Nuevamente la fracción intermedia resultante de la centrifugación fue utilizada como solución Stock (extracto), la cuál fue colocada en hielo hasta su utilización en la prueba de activación espermática. (HSAA)

Prueba de activación espermática

Los espermatozoides permeabilizados de cada uno de los tratamientos por separado se mezclaron con el extracto de los ovocitos de *Xenopus*, en concentraciones de 150 000 espermatozoides por 150 μ l del extracto, se incubaron a 19 °C con extractos con marca de ³H-TTP en concentraciones de 80 μ Ci/ml.

La descondensación de la cromatina, síntesis de DNA y recondensación de la cromatina fueron evaluados. Se realizó el estudio en microscopía de contraste de fases para el análisis de la descondensación y recondensación de la cromatina, se tomaron alícuotas de 5 μ l y se realizaron frotis que fueron posteriormente observadas a los 5, 10 minutos y puntos intermedios hasta 3 horas, seguido de la adición de los extractos de ovocitos de rana a los espermatozoides a los 5, 10 minutos y puntos intermedios, se analizaron los porcentajes de cabezas espermáticas descondensadas.

La síntesis de DNA en el núcleo espermático se evaluó tomando una alícuota de 50 μ l la cuál fue diluida con 50 μ l de buffer de fosfatos (PBS pH 7.3). Se realizó una centrifugación a 400Xg por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue fijado con solución de carnoy a 4 °C. Se realizaron frotis y estas citopreparaciones fueron sumergidas en una emulsión reveladora de núcleos Kodak (NTB-2) a 42 °C, se almacenaron a 4 °C por 2 semanas y transcurrido ese tiempo las citopreparaciones fueron teñidas sin eliminar la emulsión con colorante de Giemsa.

El estudio se realizó en un microscopio Leitz Orthoplan, para analizar la recondensación de la cromatina se montaron citopreparaciones que fueron fijadas como se describió anteriormente, seguido de la tinción de Giemsa sin autoradiografía. Estas citopreparaciones fueron analizadas a 800 X de magnificación utilizando un fotomicroscopio Zeiss III (59, 60).

Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras restantes de los tratamientos (ver tabla 6). fueron levemente centrifugadas a 400 Xg por 2 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante se eliminó y el pellet se sometió a fijación con glutaraldehído al 3% en buffer de cacodilato de sodio 0.1M pH 7.4 durante 2 horas a 4°C, se realizaron posteriormente tres lavados con buffer de cacodilato de sodio 0.2 M a 4°C durante 15 minutos cada uno de ellos.

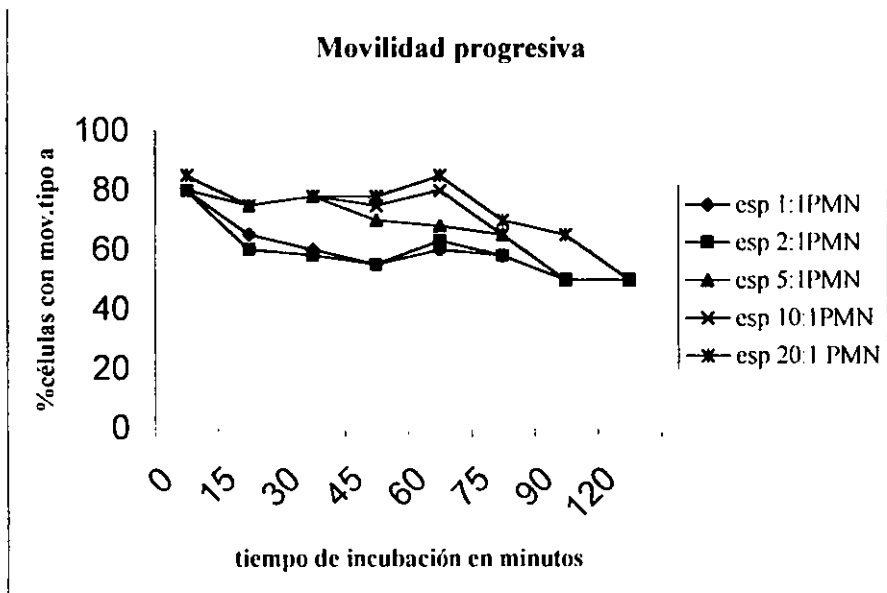
El pellet se sometió a una post-fijación con tetraóxido de osmio al 1% preparado en buffer de cacodilato de sodio 0.1M durante 1 hora a 4°C. Se realizó un lavado posterior con el buffer de cacodilato de sodio 0.2M a 4°C, pasando a una etapa de deshidratación con concentraciones consecutivas y progresivas de etanol de un 10% hasta 100% ,realizando 2 cambios de 15 a 20 minutos en cada concentración, posteriormente se realizaron dos cambios de solvente con óxido de propileno a temperatura ambiente cada uno de 30 minutos, pasando a la infiltración en una matriz con proporciones iguales de resina y óxido de propileno, durante 24 horas a temperatura ambiente. Después se efectuaron dos cambios en resina absoluta durante un período de 6 a 8 horas, para continuar con la etapa de polimerización en placas, donde se etiquetaron las muestras para su identificación a una temperatura 60°C por 36 horas. Se procedió al corte y tallado de la pirámide y la obtención de cortes finos, para la observación en el microscopio electrónico de transmisión. Las observaciones de las preparaciones se realizaron a 1 000X, 5 000X y 10 000X.

Resultados

Efecto de poblaciones de leucocitos PMN sin estimulación sobre la funcionalidad espermática.

Se realizaron 12 experimentos con el propósito de establecer los posibles efectos de poblaciones de leucocitos PMN sin estimulación sobre la funcionalidad de los espermatozoides. Se evaluaron los siguientes parámetros: viabilidad, movilidad general, movilidad progresiva rápida, integridad de la membrana espermática e integridad acrosomal.

Los resultados de la medición de los parámetros de funcionalidad espermática revelaron que en condiciones de incubación de los espermatozoides con diferentes proporciones de leucocitos PMN guardando las proporciones espermatozoides: PMN (2:1, 5:1, 10:1, 20:1) no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos. Sin embargo el análisis de los grupos experimentales en forma individual con respecto al tiempo reveló que en el intervalo 60-90 minutos de incubación existen diferencias estadísticas en los parámetros de movilidad general y movilidad progresiva rápida en todos los tratamientos. (tabla 5 análisis estadísticos)



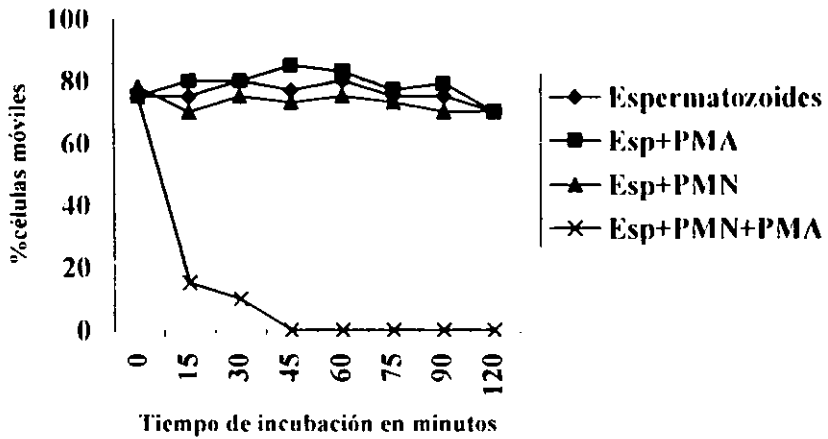
Gráfica 1. Movilidad espermática progresiva rápida de las 4 proporciones celulares estudiadas sin estimulación. Monitoreo en 120 minutos de incubación a 37°C en atmósfera 5 % de CO₂ y 95% de aire. n = 12 experimentos.

Nota: Las condiciones experimentales: curva dosis-respuesta variando las concentraciones de PMA. curva de calibración con diferentes concentraciones de PMN y concentración fija de PMA 1.6×10^{-9} M. Así como la curva dosis respuesta de los antioxidantes Trolox y α -Tocoferol así como el efecto antioxidante del trolox por espectrofometría. Se explican en el apéndice de condiciones experimentales.

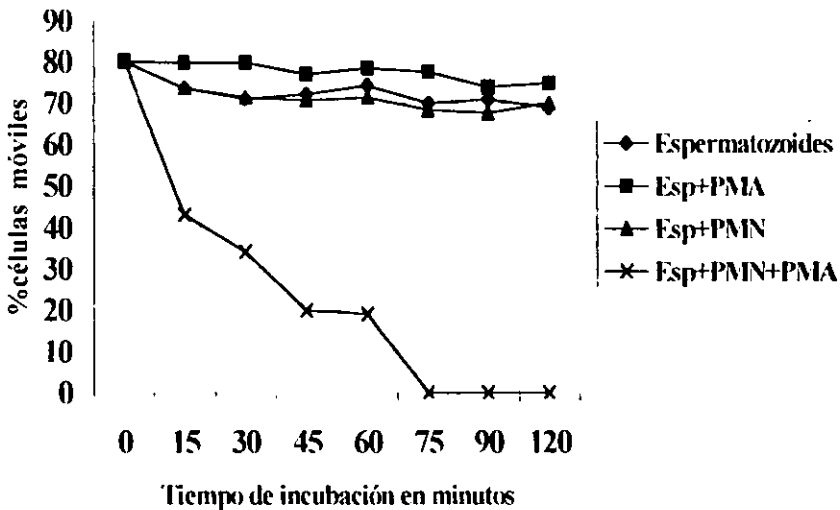
Efecto de las especies de oxígeno reactivo y concentración celular sobre la funcionalidad espermática

Con el propósito de establecer los posibles efectos de las especies de oxígeno reactivo sobre la funcionalidad espermática, se realizaron 17 experimentos variando las concentraciones y proporciones celulares (espermatozoides:PMN), los resultados sugieren un posible efecto de las especies de oxígeno reactivo en todos los parámetros de funcionalidad espermática estudiados, el análisis estadístico registra diferencias significativas entre el tratamiento 4 (Espermatozoides + PMN + PMA) con el resto de los tratamientos, los cuáles sólo presentan diferencias significativas en el parámetro de movilidad progresiva rápida, en específico las diferencias estadísticas se registran en el tratamiento 2 (Espermatozoides + PMA) a partir de las proporciones 5:1, 10:1, y 20:1. Donde se observa una mayor movilidad tipo a. En cuanto al tiempo de incubación en los parámetros de viabilidad, lavado hipo osmótico (HOST) e Integridad acrosomal el comportamiento de los datos sugieren que a partir de los 90 minutos de incubación se presentan cambios estadísticamente significativos en todas las proporciones celulares utilizadas para el tratamiento 4 espermatozoides+PMN+PMA. Con respecto a la movilidad general se registran cambios importantes a partir de 60 minutos de incubación para todas las proporciones. En el caso de la movilidad progresiva rápida a los 30 minutos de incubación existen diferencias estadísticamente significativas y es más evidentes cuando las proporciones celulares son menores es decir 1:1 presenta mayor diferencia estadística que 20:1. El efecto de la proporción (masa celular) se puede observar en todos los parámetros de funcionalidad espermática analizados donde existen diferencias estadísticas principalmente entre las proporciones 1:1 vs 10:1 y 20:1 (tablas 6 hasta 10 análisis estadístico)

Movilidad tipo a



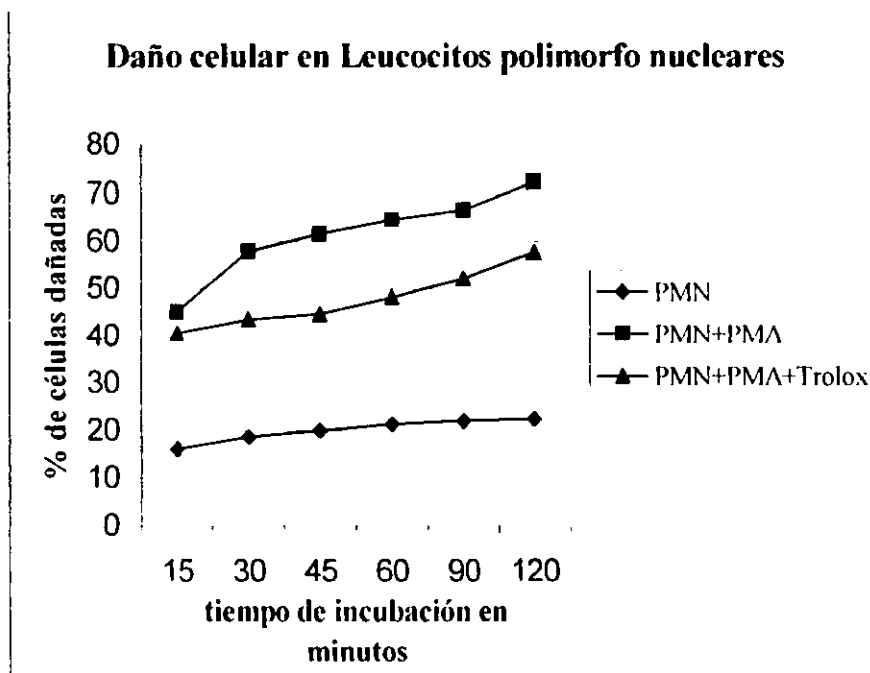
Movilidad tipo a



Gráficas 2 A y 2B. Efecto de las especies de oxígeno reactivo sobre la movilidad progresiva rápida (a) en ambas gráficas se aprecian cambios significativos en el tratamiento espermatozoides+PMN+PMA a lo largo de 120 minutos de incubación. La gráfica a se refiere a proporciones celulares espermatozoides:PMN 1:1 observar el cambio a partir del minuto 45 de incubación. La gráfica b representa las proporciones celulares 10:1. notar el cambio en el tratamiento espermatozoides+PMN+PMA.

Evaluación de daño celular en poblaciones de leucocitos PMN por efecto de la estimulación con PMA y efecto antioxidante del Trolox .

Para establecer el posible daño celular por efecto del PMA y generación de especies de oxígeno reactivo en leucocitos polimorfo nucleares (PMN), las células fueron evaluadas por técnica histoquímica utilizando como criterio de alteración celular, la presencia de gránulos de formazán en su interior así como cambios en la morfología analizada en microscopía de luz 100X. Los resultados indican diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los tratamientos estimulados con PMA y PMA+ Trolox (gráfica 3, figuras 1 y 2). El máximo cambio o daño celular se registra en el periodo de incubación de 15 a 60 minutos en el tratamiento 2 PMN+PMA (Tablas 11.1, 11.2, 11.3 del análisis estadístico)



Gráfica 3. Daño celular en leucocitos polimorfo nucleares, producto de su estimulación con un ester de forbol. Los criterios de daño celular se basaron en los cambios morfológicos y producción de gránulos de formazán presentes en el interior celular

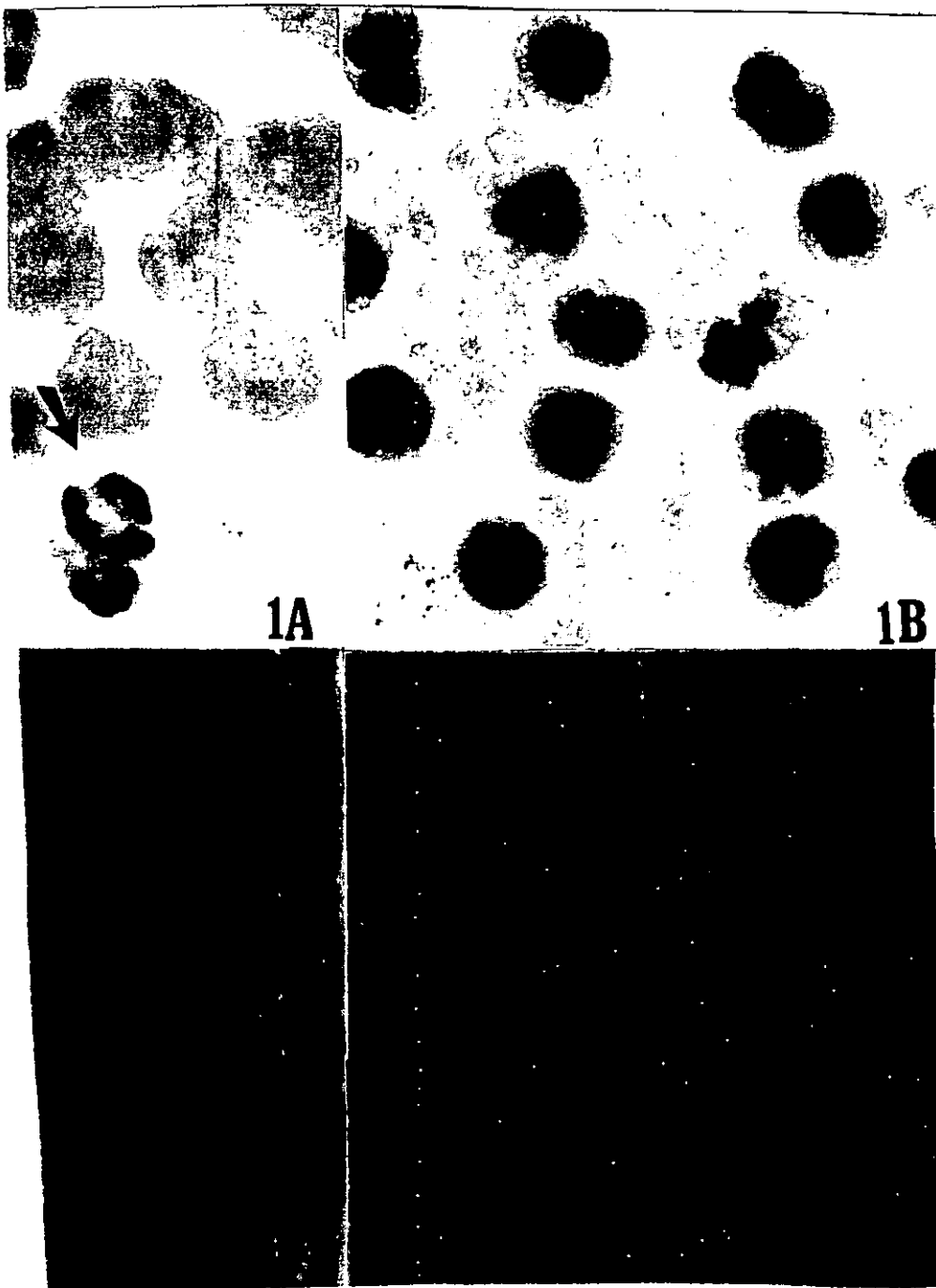


Figura 1. A. Morfología típica de leucocitos PMN en sangre periférica previa a su purificación (tinción Wright microscopia de luz 100X). B. Aspecto típico de leucocito PMN posterior a su purificación (tinción wright microscopia de luz 100X). C. Aspecto de leucocitos PMN (técnica histoquímica con peroxidasa positiva. Microscopia de contraste de fases 40X). D. Cámara de Neubauer conteo de leucocitos PMN (técnica histoquímica peroxidasa positiva microscopia de contraste de fases 16X).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

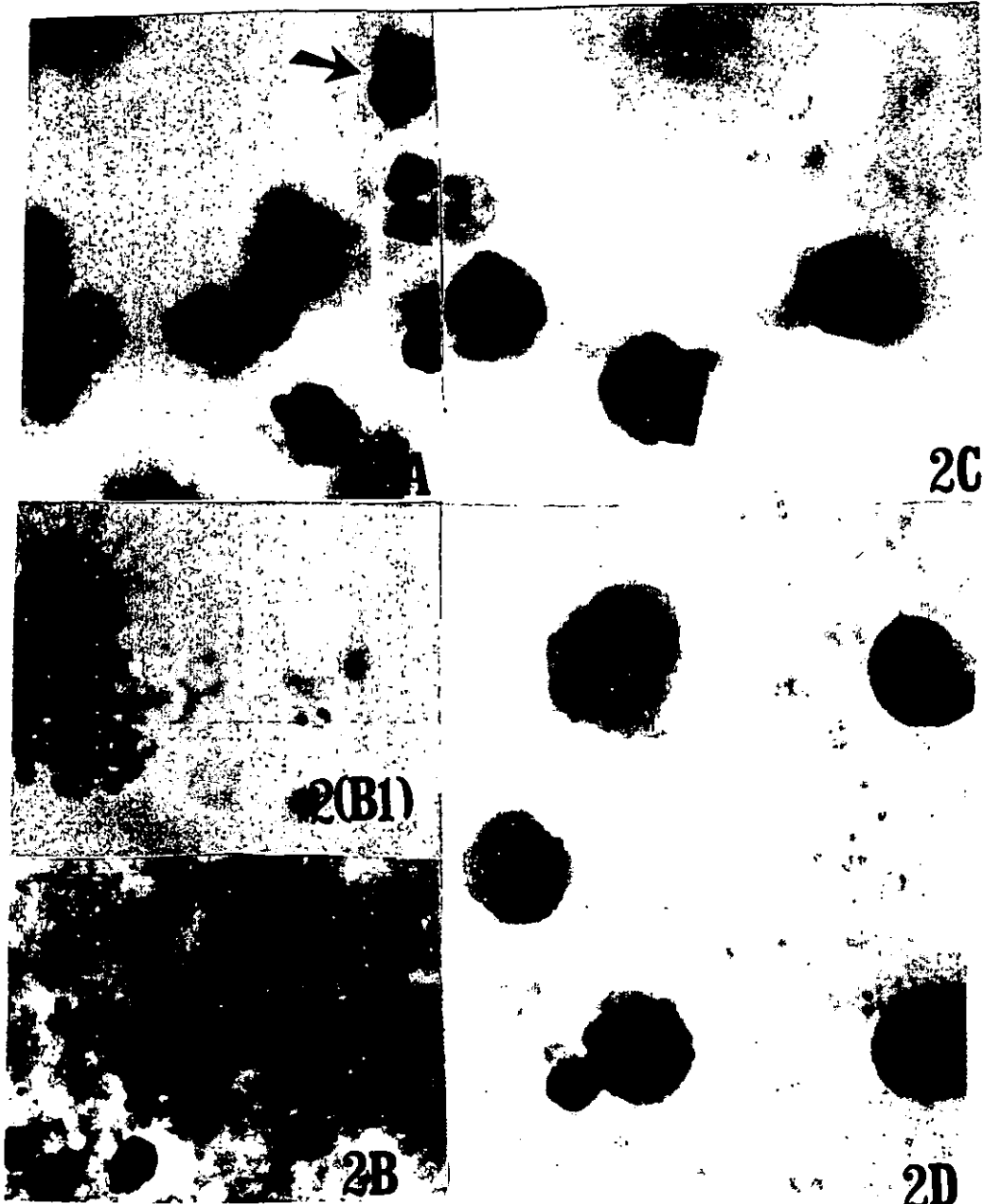
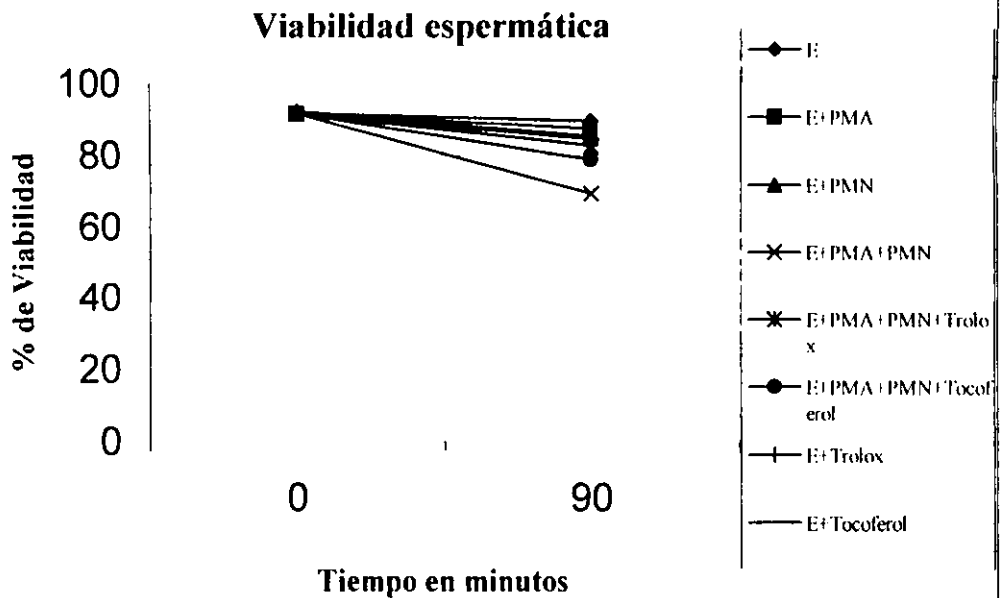


Figura 2. A. Aspecto de los leucocitos PMN sin activación (control). B. Leucocitos PMN activados con PMA, observar la presencia de gránulos de formazán (azul) indican especies de oxígeno reactivo. C. Leucocitos PMN incubados con PMA y trolox, observar la presencia de gránulos de formazán en el interior de las células. D. Leucocitos PMN incubados con un extracto bacteriano en presencia de NBT. Notar la ausencia de los gránulos de formazán, indicativo de la estimulación por extracto bacteriano no genera especies de oxígeno reactivo. En todos los casos las mediciones fueron a los 90 minutos de incubación a 37°C, procesados por técnica histoquímica en presencia de NBT. Wright en microscopía de luz 100X

Evaluación del efecto protector de los antioxidantes α -tocoferol y Trolox en la funcionalidad espermática.

Los resultados de 20 experimentos realizados para establecer el posible efecto protector de dos antioxidantes sugieren que no existen diferencias estadísticamente significativas en el parámetro de viabilidad en los tiempos de incubación 0 y 90 minutos entre los tratamientos evaluados, sin embargo se registra diferencia significativa en el tratamiento 4 (espermatozoides+ PMN+PMA) con respecto a los tiempos de incubación, entre los tiempos 0 y 90 minutos se obtuvo una F calculada de $3.52E-09$ en relación con F de tablas 3.60.

El índice de correlación calculado para los tratamientos 5 (espermatozoides+ PMN+ PMA +trolox) y 6 (espermatozoides+PMN+PMA +tocoferol), fue $r= 0.92185$ en tanto que el índice de correlación calculado para los tratamientos 7 (espermatozoides+ trolox) y 8 (espermatozoides +tocoferol) fue $r = 0.996$, lo que representa que son comparables entre sí. En tanto que los espermatozoides tratados con PMN activados con PMA sin la adición de alguno de los antioxidantes tienen daños significativos en los parámetros de funcionalidad espermática analizados. Cada uno de los parámetros se presentan de manera detallada en las siguientes gráficas y tablas, el análisis estadístico está registrado en las tablas 12.1,12.2 y12.3 del apéndice (análisis estadístico).



Gráfica 4. Viabilidad espermática de las 8 series experimentales probada a los 0 y 90 minutos de incubación a 37°C, en atmósfera 5 % de CO₂ y 95% de aire. Donde: E:espermatozoides 10.0 X 10⁶/ml, PMA: ester de forbol 1.6 x 10⁻⁹M, PMN: leucocitos polimorfo nucleares 1.0 X 10⁶/ml, Trolox 40 nM y Tocoferol 1%.

Figura 3. Viabilidad espermática (células sin tinción) Microscopía de contraste de fases 40X. Las células teñidas (flecha) son consideradas muertas (tinción de eosina).

Tratamientos	Valor de la Pendiente Viabilidad
E	-0.02
E+PMA	-0.04
E+PMN	-0.07
E+PMA+PMN	-0.24
E+PMN+PMA+Trol	-0.1
E+PMN+PMA+Toc	-0.14
E+Trolox	-0.09
E+Tocofér	-0.07

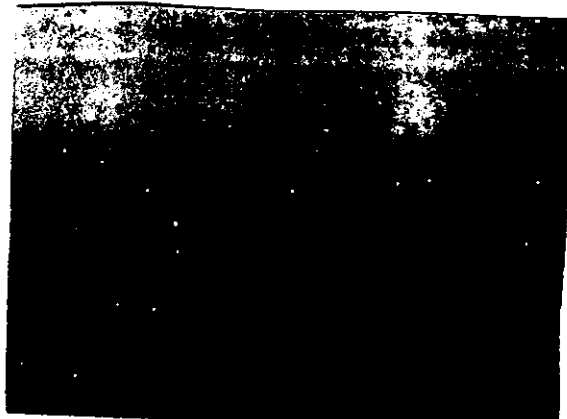
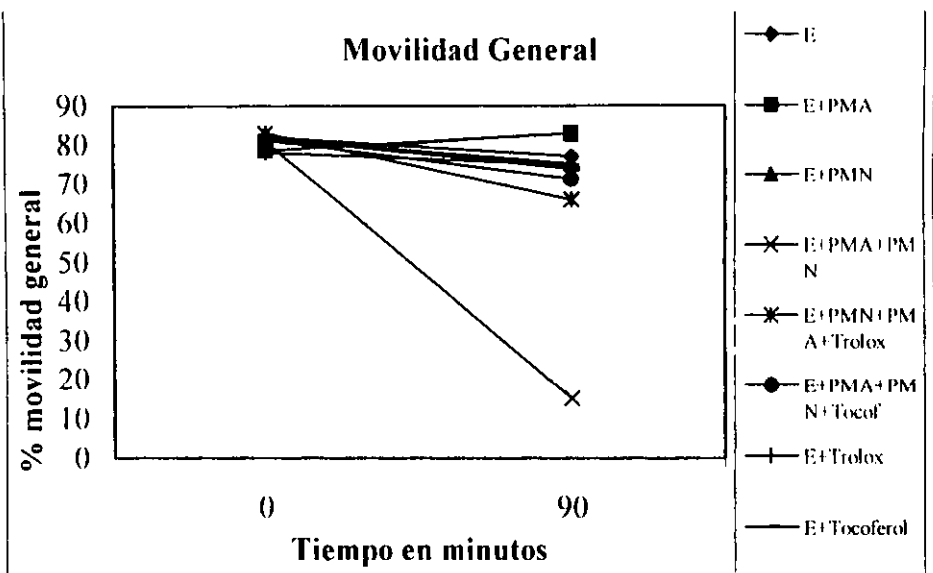
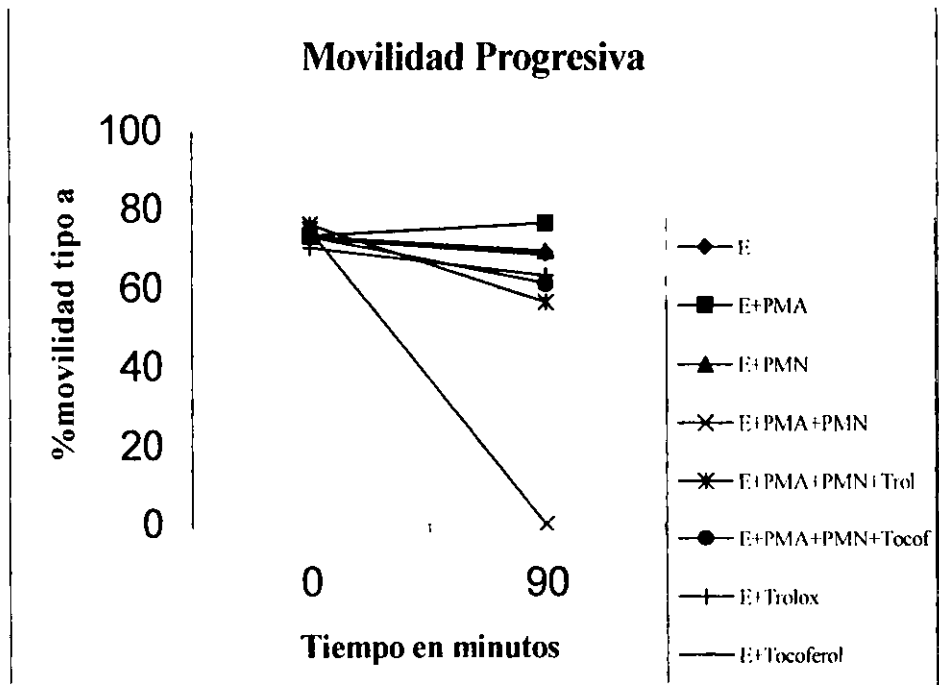


Tabla 1. Valores de las pendientes calculadas, de cada uno de los tratamientos experimentales para viabilidad, los valores en color de rojo representan los extremos negativos y las cifras azules son los extremos positivos



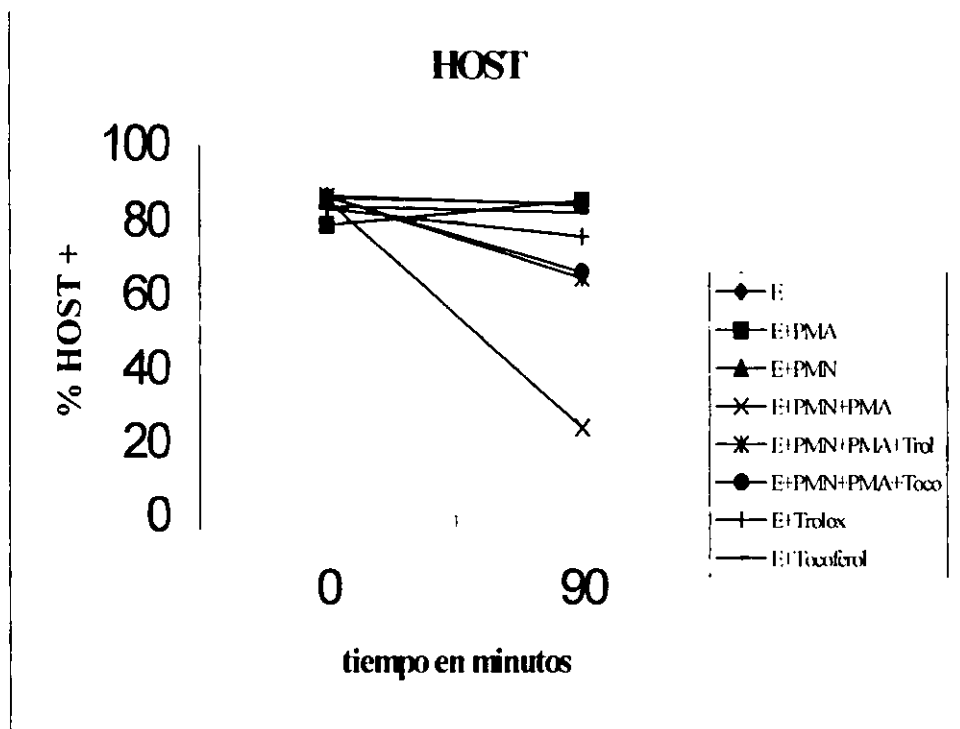
Gráfica 5. Movilidad general espermática de las 8 series experimentales probadas a los 0 y 90 minutos de incubación a 37°C en atmosfera 5 % de CO₂ y 95% de aire. Donde: E:espermatozoides 10.0 X 10⁶/ml. PMA: ester de forbol 1.6 x 10⁻⁹M. PMN: leucocitos polimorfo nucleares 1.0 X 10⁶/ml, Trolox 40 nM y Tocoferol 1%.



Gráfica 6. Movilidad espermática progresiva rápida de las 8 series experimentales probadas a los 0 y 90 minutos de incubación a 37°C en atmosfera 5 % de CO₂ y 95% de aire. Donde: E:espermatozoides 10.0 X 10⁶/ml. PMA: ester de forbol 1.6 x 10⁻⁵M. PMN: leucocitos polimorfo nucleares 1.0 X 10⁶/ml, Trolox 40 nM y Tocoferol 1%.

Tratamientos	Valor de la pendiente Mov. Giral	Valor de la Pendiente Mov. Prog.
E	-0.05	-0.04
E+PMA	0.047	0.035
E+PMN	-0.07	-0.04
E+PMA+PMN	-0.73	-0.82
E+PMN+PMA+Trol	-0.19	-0.21
E+PMN+PMA+Toc	-0.30	-0.13
E+Trolox	-0.22	-0.07
E+Tocoferol	-0.28	-0.05

Tabla 2. Valores de las pendientes calculadas de cada uno de los tratamientos experimentales, para los parámetros de funcionalidad analizados movilidad espermática general y movilidad progresiva rápida. (De acuerdo con los criterios de WHO 1996) Los valores en color de rojo representan los extremos negativos y las cifras azules son los extremos positivos



Gráfica 7. Integridad de membrana espermática de las 8 series experimentales probadas a los 0 y 90 minutos de incubación a 37°C en atmosfera 5 % de CO₂ y 95% de aire. Donde: E:espermatozoides 10.0 X 10⁶/ml, PMA: ester de forbol 1.6 x 10⁻⁹M, PMN: leucocitos polimorfo nucleares 1.0 X 10⁶/ml, Trolox 40 nM y Tocoferol 1%. Valores +

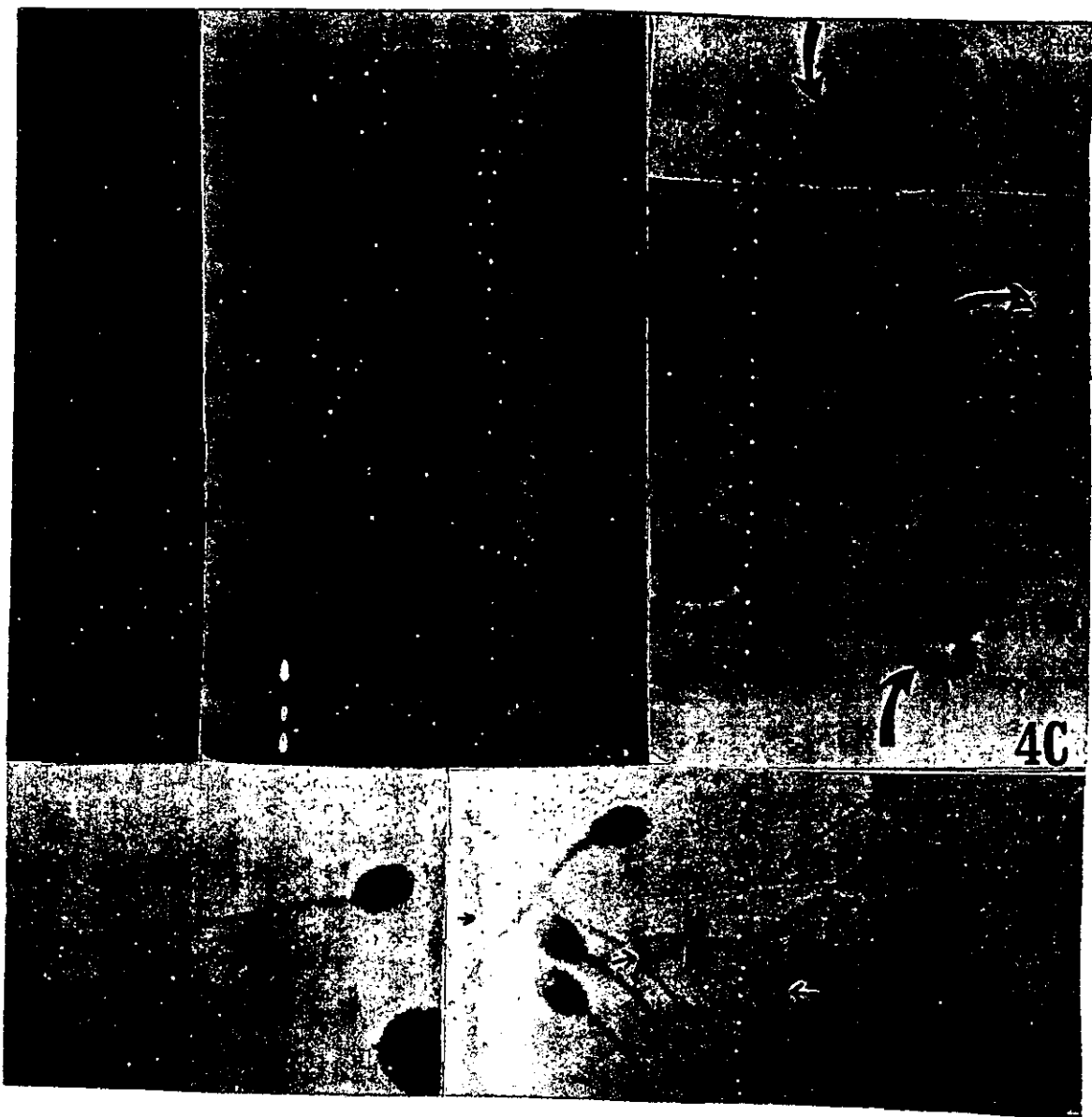
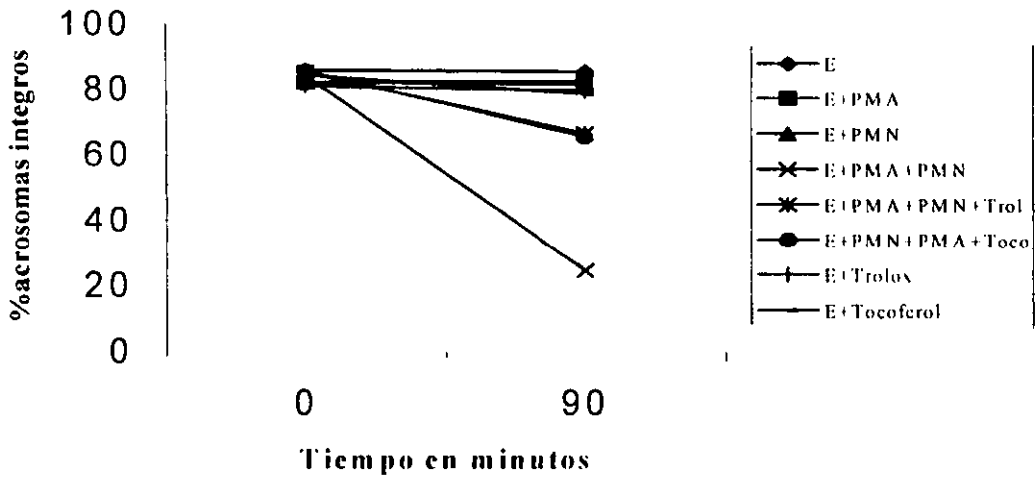


Figura 4. A. Aspecto de los espermatozoides sin activación (control) sometidos a condiciones hipo osmóticas (HIOST),notar las flechas indican células positivas (con integridad de membrana). B. Espermatozoides activados con PMA.(microscopia de contraste de fases 100X) C. Espermatozoides+ PMN sin activación.D Espermatozoides+ PMN activados con PMA E. Espermatozoides + PMN incubados con PMA y trolox. En todos los casos las mediciones fueron a los 90 minutos de incubación a 37°C, técnica P.A.P en microscopia de luz 100X.

Integridad Acrosomal



Gráfica 8. Integridad de membrana acrosomal espermática de las 8 series experimentales probadas a los 0 y 90 minutos de incubación a 37°C, en atmosfera 5 % de CO₂ y 95% de aire. Donde: E:espermatozoides 10.0 X 10⁶/ml. PMA: ester de forbol 1.6 x 10⁻⁹M. PMN: leucocitos polimorfo nucleares 1.0 X 10⁶/ml. Trolox 40 nM y Tocoferol 1%. Valores con integridad positiva.

Figura 5. Aspecto del grupo control evaluando los Parámetros de Integridad acrosomal e integridad de Membrana espermática, notar la región del flagelo (HOST +) y región acrosomal fluorescente. Acrosoma integro, técnica de fluorescencia 100X.

Tratamientos	Valor de la pendiente HOST	Valor de la pendiente Int. Acros.
E	-0.02	-0.005
E+PMA	0.07	0.001
E+PMN	-0.02	-0.011
E+PMA+PMN	-0.68	-0.662
E+PMN+PMA+Troxol	-0.24	-0.208
E+PMN+PMA+Toc	-0.22	-0.225
E+Troxol	-0.08	-0.019
E+Tocoferol	-0.02	-0.065

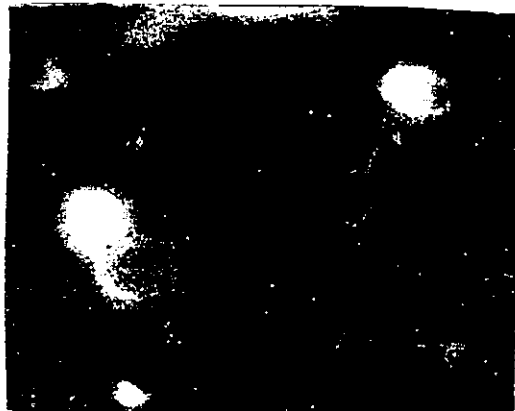


Tabla 3. Valores de las pendientes calculadas de cada uno de los tratamientos experimentales para los parámetros, integridad de las membranas espermáticas y acrosomal, en función del tiempo. Los valores en color de rojo representan los extremos negativos y las cifras azules son los extremos positivos

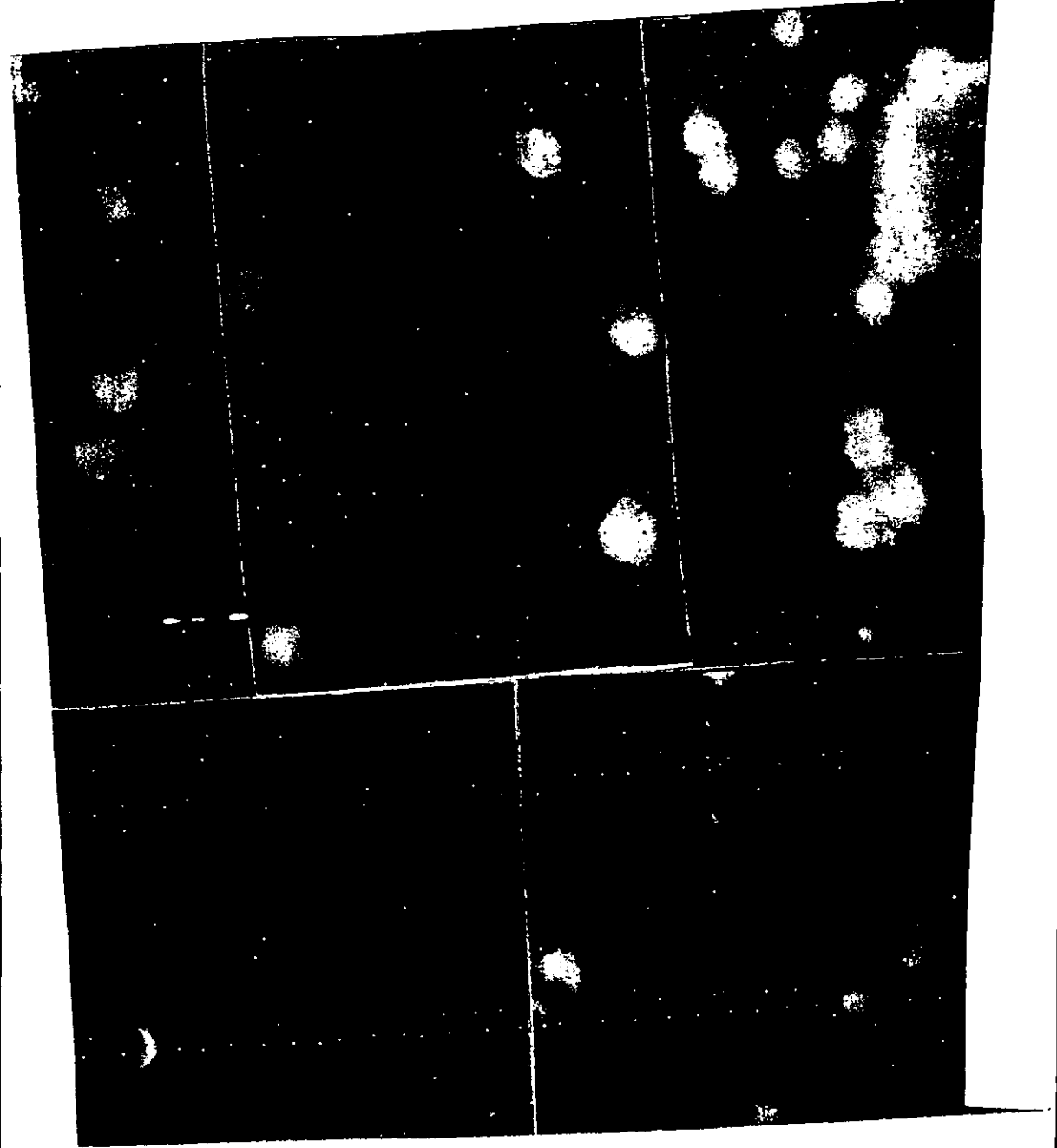
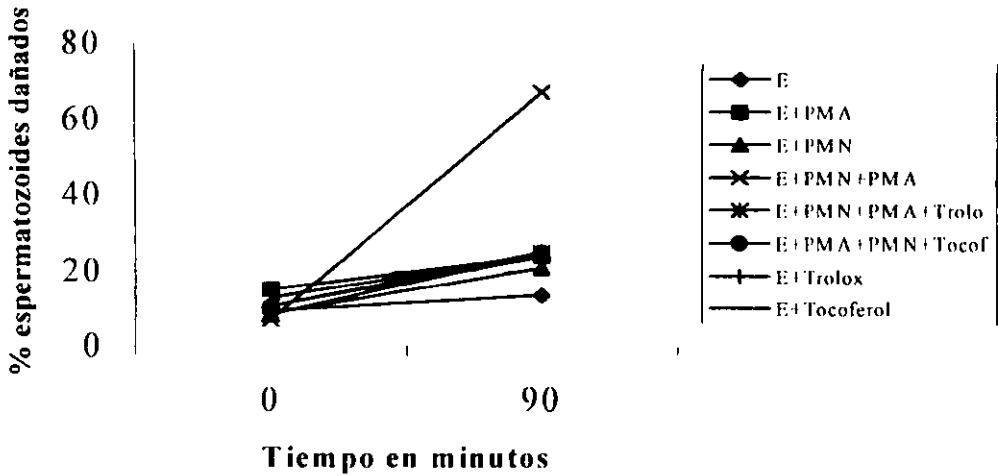


Figura 6. Evaluación de la integridad acrosomal. A. Aspecto de los espermatozoides sin activación (control), notar la región distal de la cabeza zona fluorescente (con integridad de membrana acrosomal positiva). B. Espermatozoides activados con PMA. C. Espermatozoides+PMN sin activación. D. Espermatozoides+PMN activados con PMA. E. Espermatozoides + PMN incubados con PMA y trolox. En todos los casos las mediciones fueron a los 90 minutos de incubación a 37°C, Técnica fluorescente FICT en microscopía 100X.

Daño celular



Gráfica 9. Células espermáticas con presencia +a la tinción de EOR. de las 8 series experimentales probadas a los 0 y 90 minutos de incubación a 37°C en atmosfera 5 % de CO₂ y 95% de aire. Donde: E:espermatozoides 10.0 X 10⁶/ml, PMA: ester de forbol 1.6 x 10⁻⁹M, PMN: leucocitos polimorfo nucleares 1.0 X 10⁶/ml, Trolox 40 nM y Tocoferol 1%. Valores con daño celular.

Tratamientos	Valor de la pendiente Daño cel.
E	0.45
E+PMA	0.1
E+PMN	0.13
E+PMA+PMN	0.66
E+PMN+PMA+Trolox	0.18
E+PMN+PMA+Tocof	0.16
E+Trolox	0.15
E+Tocoferol	0.13

Tabla 4. Valores de las pendientes calculadas de cada uno de los tratamientos experimentales para daño celular. Los valores en color de rojo representan los extremos negativos y las cifras azules son los extremos positivos.

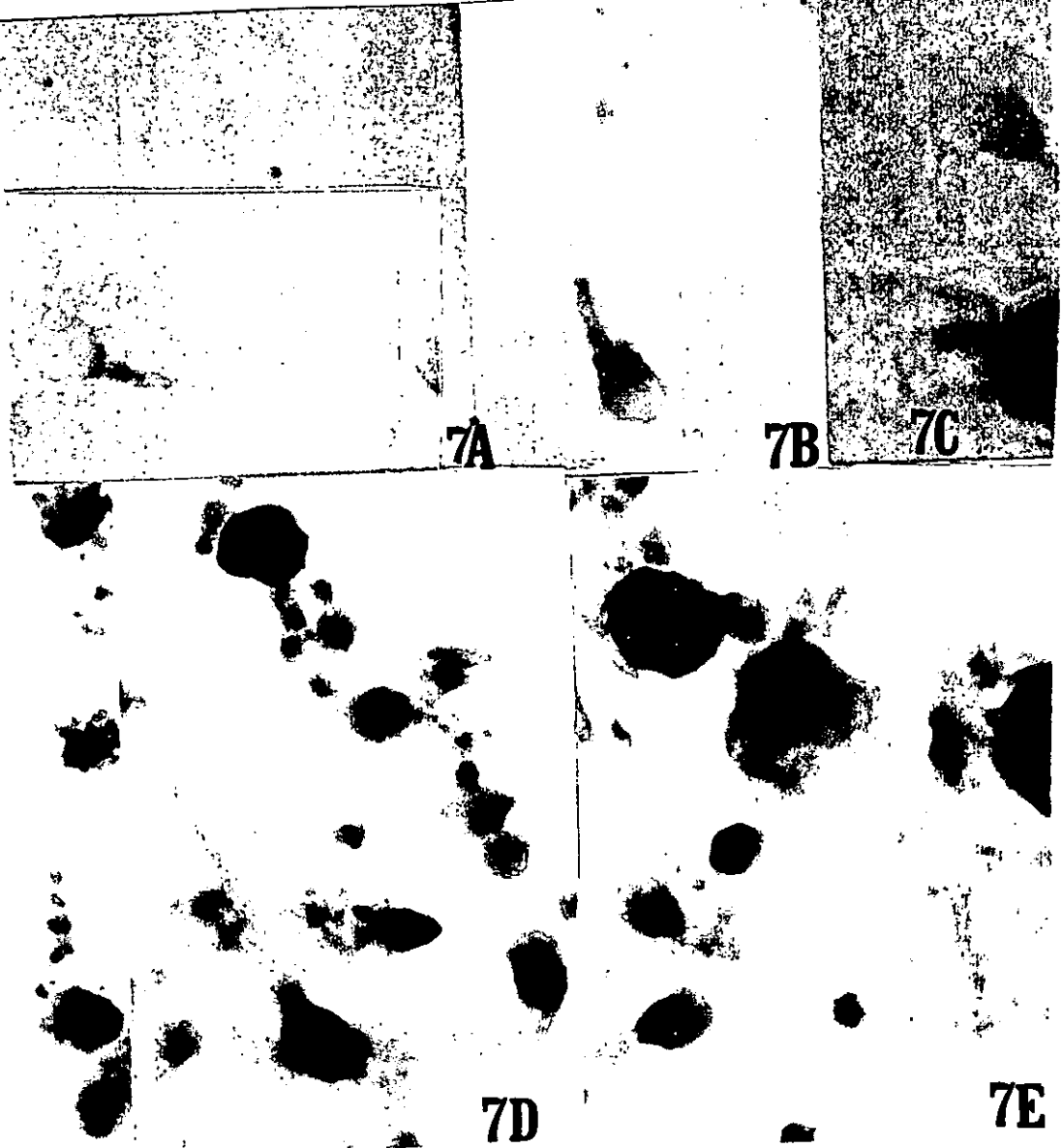


Figura 7. A Espermatozoides sin activación (control), observar la ausencia de los gránulos de formazán indicativo de la presencia de las especies de oxígeno reactivo en la región de la cabeza, pero son apreciables en la región de la pieza media. B. Espermatozoides+ PMA con tinción + a EOR en el interior de la cabeza. C. Espermatozoides+ PMN ausencia de gránulos de formazán en el interior de la cabeza espermática con presencia en pieza media. D. Espermatozoides+ PMN+PMA, notar espermatozoides con tinción + a EOR en el interior de la cabeza (+). E. Espermatozoides+ PMN+PMA+ Trolox, tinción + a EOR en el interior de espermatozoides.(+) y en otras células sólo presentan tinción + en pieza media (-) comparable con el grupo control. En todos los casos las mediciones fueron a los 90 minutos de incubación a 37 C, procesados por técnica histoquímica en presencia de NBT. Wright en microscopía de luz 100X.

Parámetro	Viabilidad	Mov. general	Mov. Tipo a	HOST	Int. Acros.
Mov. General	0.948				
Mov. Tipo a	0.898	0.912			
HOST	0.942	0.924	0.959		
Integridad acrosomal	0.945	0.924	0.949	0.983*	
Daño celular	-0.934	-0.979	-0.979	-0.939	-0.954

Tabla 5. Índices de correlación entre los parámetros de funcionalidad espermática analizados. (*) nos señala el valor máximo de correlación entre dos parámetros.

Prueba de penetración del huevo de Hamster (SPA)

Con el fin de determinar las posibles alteraciones causadas por las especies de oxígeno reactivo sobre los patrones de penetración y descondensación nuclear espermática.

Se realizaron 20 experimentos en los cuáles se establecieron 8 tratamientos experimentales, los cuáles son presentados en la tabla 6.

El número total de ovocitos utilizados a lo largo de los experimentos fue 1146, repartidos en 8 grupos experimentales; 122 en cada uno y 180 en los controles es decir 60 para cada uno de ellos. El valor máximo de ovocitos penetrados fue 119, descondensadas 117 y el porcentaje máximo fue 95.90% correspondiente al grupo control en tanto que los valores mínimos corresponden al tratamiento 4 Espermatozoides + PMN+PMA. Cuyos valores de penetración, descondensación y porcentaje fue de 0.

El análisis estadístico aplicado, demuestra que existen diferencias estadísticas entre todos los tratamientos (Valor de F calculado de 9.0 vs F de tablas 7.82). El análisis estadístico pareado de los tratamientos sugiere que no existen diferencias significativas entre los tratamientos 1. Espermatozoides, 2. Espermatozoides + PMA, 3.

Espermatozoides + PMN (F calculado 6.125 vs t de tablas 7.82).
 5. Espermatozoides+PMN+PMA+ Trolox y 6. Espermatozoides + PMN + PMA + Tocoferol. No registran diferencias estadísticas (F calculado 5.75 vs t de tablas 7.82). Las mismas tendencias son observadas entre los tratamientos 7. Espermatozoides+ Trolox y 8. Espermatozoides + Tocoferol (F calculado 6.00 vs t de tablas 7.82). En tanto que el tratamiento 4 espermatozoides+PMN+PMA muestra diferencias estadísticas con todos los tratamientos.

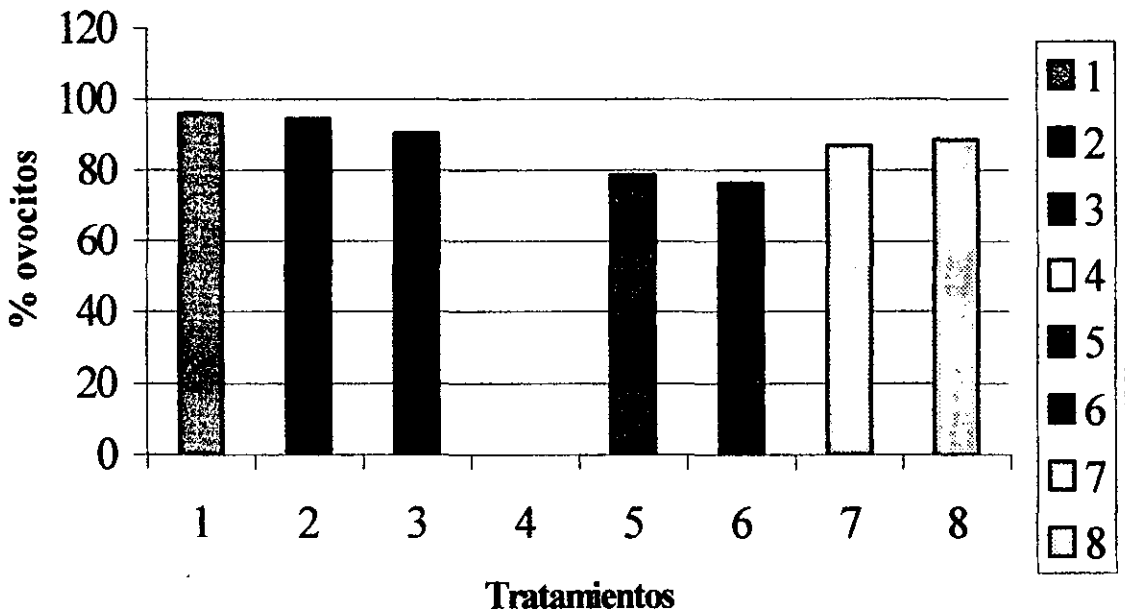
Tratamiento	Ovocitos	Ovocitos Penetrados	Ovocitos Descondensado	% Desconden
Con zp/sin E	60	0	0	0
Con zp/con E	60	0	0	0
Sin zp/sin E	60	0	0	0
Control E *	122	119	117	95.90%
E+ PMA *	122	120	115	94.26%
E+ PMN *	122	117	110	90.16%
E+PMN+PMA*	122	0	0	0
E+PMN+PMA +Trolox *	122	104	96	78.69%
E+PMN+PMA + Tocoferol *	122	100	93	76.23%
E+ Trolox *	122	118	106	86.88%
E+ Tocoferol	122	119	108	88.52 %

Tabla 6. Resultados de 20 experimentos realizados para establecer la penetración y descodensación espermiática, de 8 tratamientos. Las 3 primeras filas corresponden a los controles ovocitos con zona pelucida sin espermatozoides (Con zp/sin), ovocitos con zona pelucida con espermatozoides (control I).(Con zp/con E). Ovocitos sin zona pelucida sin espermatozoides (Sin zp/ sin E) donde: E son espermatozoides y la concentración celular es de $10.0 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$, PMN $1.0 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$

PMA 1.6×10^{-9} M en $100 \mu\text{l}$, Trolox 40 nM, α -tocoferol 1%.

Nota: *Todas las mediciones se realizaron a las 3 horas de incubación con ovocitos sin zona pelucida a 37°C en atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de aire.

% Descondensación espermática



Gráfica 10. Porcentajes de ovocitos que presentaron células espermáticas descondensadas en su interior en $n=20$ experimentos con 966 ovocitos utilizados. Donde 1. Espermatozoides 2. Espermatozoides + PMA 3. Espermatozoides + PMN 4. Espermatozoides + PMN + PMA 5. Espermatozoides + PMN + PMA + Trolox 6. Espermatozoides + PMN + PMA + Tocoferol. 7. Espermatozoides + Trolox 8. Espermatozoides + Tocoferol.

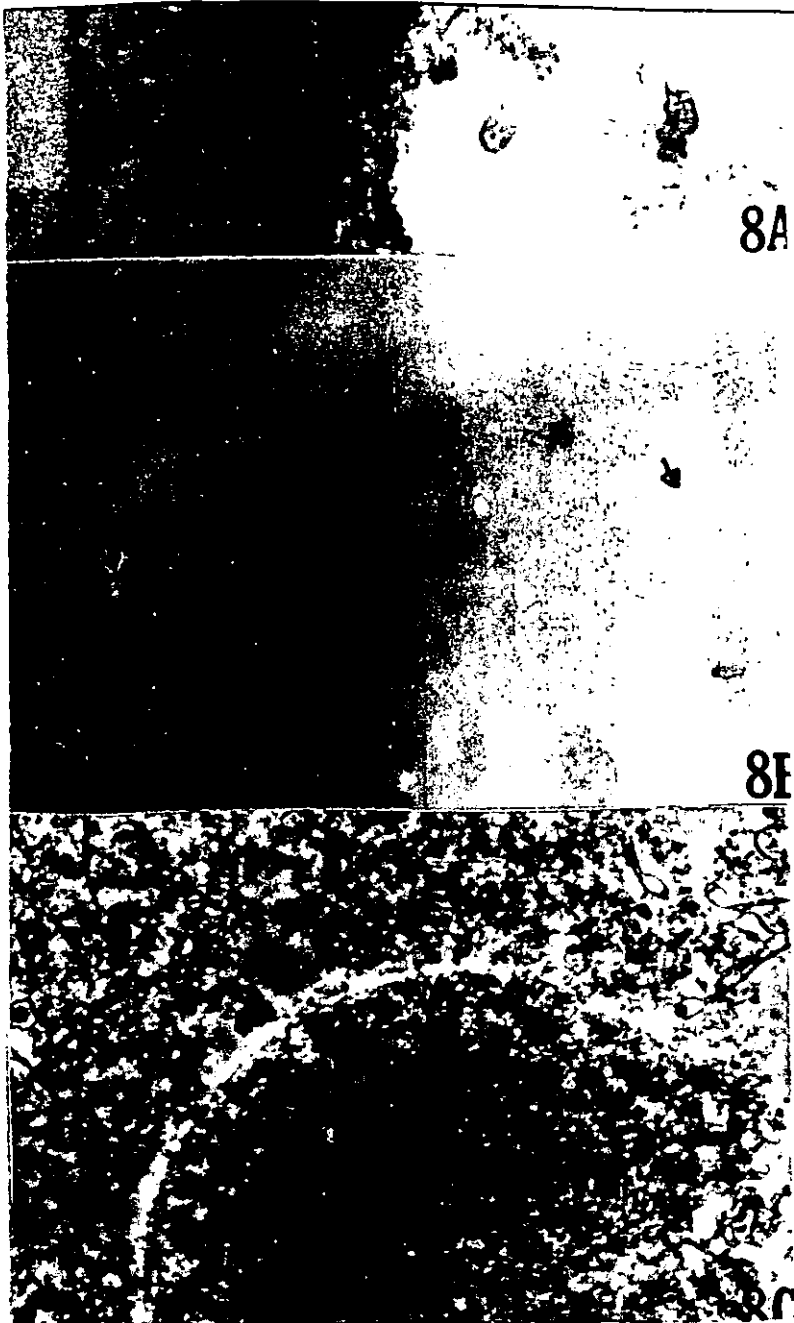


Figura 8. Aspecto de los ovocitos de hamster sin zona pelúcida, penetrados por espermatozoides (control) a las 3 horas de incubación a 37°C en atmósfera del 95% de aire y 5% de CO₂, evaluado en las diferentes técnicas de tinción y microscopía.

- A. Ovocito de Hamster montado para tinción de orceína acética y microscopía de luz en 100X.
- B. Ovocito de hamster montado para tinción hoestch 33285 y microscopía de fluorescencia a 40X.
- C. Ovocito de hamster montado para tinción lacmoide (derivado de tinción orceína acética) y microscopía de contraste de fases 40X.

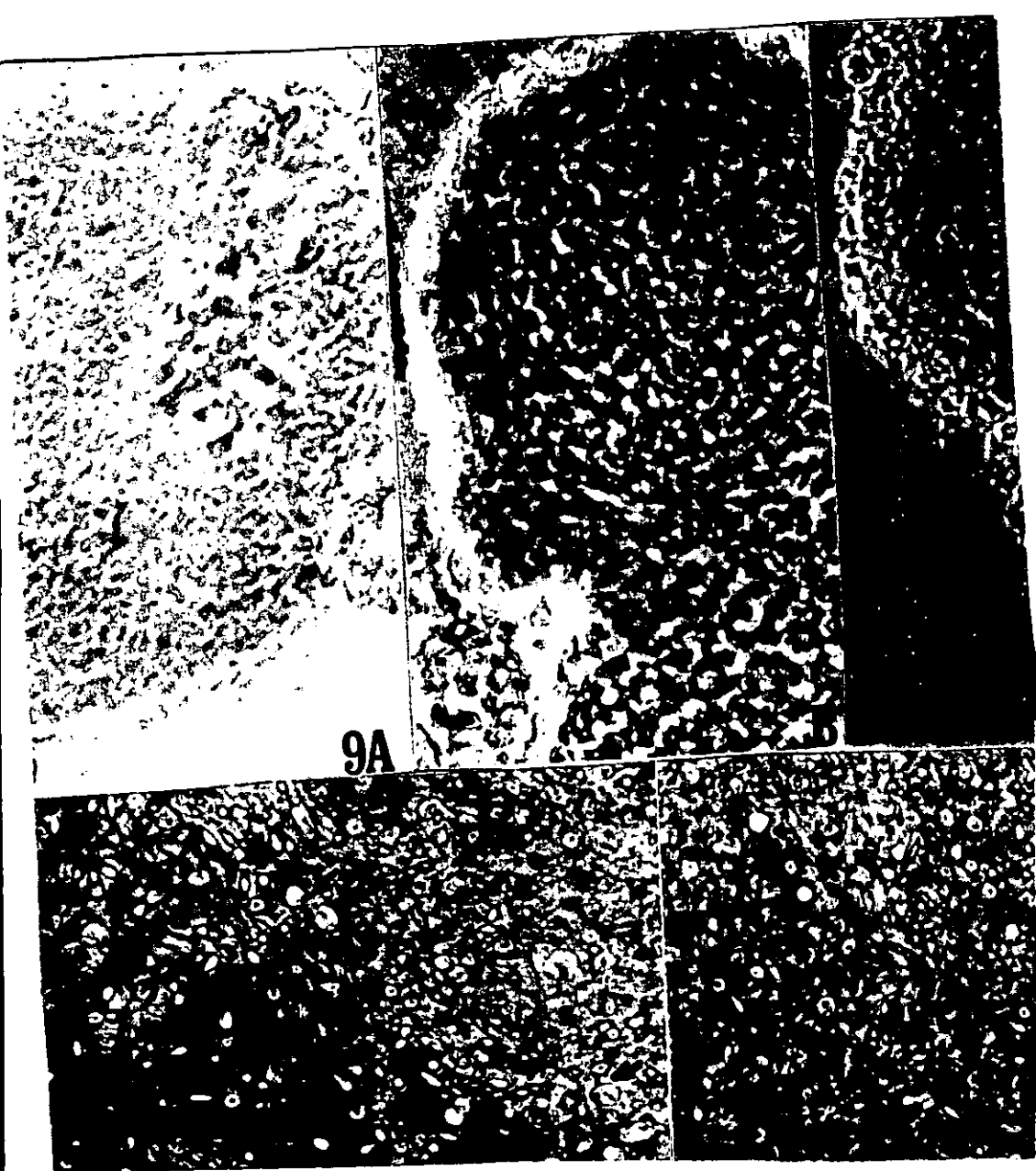


Figura 9.1. Ovocitos de hamster obtenidos de los tratamientos estudiados, el montaje fue a las 3 horas de incubación a 37°C, en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Técnica de tinción lacmoide para microscopía de contraste de fases a 40X. A. Ovocito con zona pelúcida sin espermatozoides. B. Ovocito con zona pelúcida con espermatozoides, notar la presencia de los espermatozoides del grupo control en las afueras de la zona pelúcida. C. Ovocito sin zona pelúcida sin espermatozoides. D. Ovocito sin zona pelúcida con espermatozoides notar en el interior células que presentan inicios de descondensación nuclear. E. Ovocito sin zona pelúcida con espermatozoides tratamiento 2 (espermatozoides + PMA) notar en su interior células espermáticas con descondensación nuclear.



Figura 9.2. Ovocitos de hamster de los tratamientos estudiados el montaje fue a las 3 horas de incubación a 37°C, en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Técnica de tinción lacmoide para microscopia de contraste de fases a 40X F. Ovocito sin zona pelúcida con espermatozoides tratamiento 3(espermatozoides +PMN) presencia de espermatozoides con descondensación nuclear. G. Ovocito sin zona pelúcida con espermatozoides tratamiento 4 (espermatozoides PMN+ PMA), no hay espermatozoides en el interior del ovocito comparable con el control de ovocitos sin zona pelúcida sin espermatozoides H. Ovocito sin zona pelúcida con espermatozoides tratamiento 5 (espermatozoides +PMN+PMA+trolax) presencia de espermatozoides con descondensación nuclear. I Ovocito sin zona pelúcida con espermatozoides tratamiento 6 (Espermatozoides +PMN+ PMA+ tocoferol), presencia de espermatozoides con descondensación nuclear.



Figura 9.3. Fotografía de la prueba de penetración de ovocito de hamster realizada para el tratamiento 1 control, el montaje fue a las 3 horas de incubación a 37°C, en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Técnica de tinción lacmoide para microscopía de contraste de fases a 40X y magnificada a 500X en un scanner. Notar la presencia de espermatozoides con núcleo des condensado (flecha negra) así como* presencia de espermatozoides sin descondensación .

Ensayo de activación espermática.

En 10 experimentos realizados para establecer el efecto de los radicales de oxígeno reactivo así como de los antioxidantes Trolox y Tocoferol sobre la activación espermática que incluye los eventos de des condensación de la cromatina, formación de pro núcleos, síntesis de DNA. Prueba realizada para cada uno de los 8 tratamientos estudiados. Los resultados se presentan en la tabla 7.

Tratamiento	%Descondensación nuclear 15 minutos	Citopreparación es. 15 minutos Tinción completa	Citopreparación es 15 minutos Parcialmente Teñidos	Síntesis de DNA % de marca incorporada
E	70 %	47	65	78.0 %
E +PMA	200 %	93	2	62.5 %
E + PMN	69 %	92	94	95.0 %
E + PMN+PMA	200 %	117	1	43.0 %
E+PMN+PMA + Trolox	200 %	52	48 * pronúcleos recondensados	68.0 %
E+ PMN+PMA + Tocoferol	200 %	99	3	70.0%
E+ Trolox	70 %	98	2	75.0%
E + Tocoferol	70 %	100	1	75.0%

Tabla 7. Resultados obtenidos de la prueba de activación espermática para evaluar descondensación nuclear, tomado a los 15 minutos de incubación con el extracto. El valor representado está en % relativo y se consideró en función del grupo control. La columna de citopreparaciones establece la formación de pro núcleos (tinción completa) y teñidos parcialmente; la síntesis de DNA se establece en el porcentaje de marca incorporada. Donde: E:espermatozoides $10.0 \times 10^6/\text{ml}$. PMA: ester de forbol $1.6 \times 10^{-9}\text{M}$. PMN: leucocitos polimorfo nucleares $1.0 \times 10^6/\text{ml}$, Trolox 40 nM y Tocoferol 1%. El valor en rojo representa la cifra mas baja en incorporación de marca. Nota: todas las muestras fueron colectadas y preparadas a las 3 horas de incubación con ovocitos sin zona pelucida a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire.

Respuesta normal a la activación espermática

La respuesta normal de los eventos de activación espermática se observa en los tratamientos Espermatozoides (control 1), Espermatozoides + PMN (tratamiento 3), Espermatozoides + Trolox (Tratamiento 7) y Espermatozoides + Tocoferol (Tratamiento 8), el 100% de descondensación nuclear completa se registra a los 20 minutos de incubación con el extracto en todos los tratamientos, la representación de un núcleo espermático típico totalmente descondensado se muestra en la figura 10B.

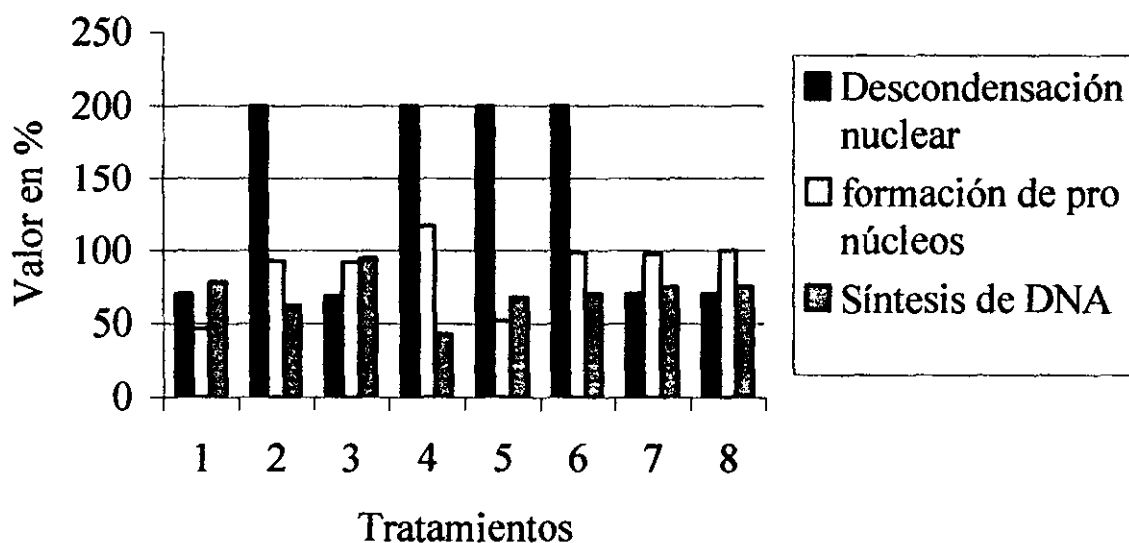
A las 2 horas de incubación con el extracto, el núcleo comienza a recondensar su cromatina, notar en la figura 10C la disminución del tamaño del núcleo espermático, en comparación con el núcleo presente en la figura 10B, la marca de estos núcleos indican que se encuentran en proceso de síntesis de DNA. Típicamente más del 95% de los controles presentan marca seguidas 2 horas de incubación con el extracto que contiene timidina tritiada, y más del 95% de los núcleos están completamente recondensados a las 3 horas de incubación. Ejemplos de núcleos recondensados se muestran en las figuras 10D y 10E.

En los casos de los tratamientos 2. Espermatozoides +PMA ,4 Espermatozoides +PMN+PMA, tratamiento 5. Espermatozoides + PMN+PMA + Trolox y tratamiento 6 Espermatozoides + PMN+PMA+ Tocoferol. Se observaron núcleos totalmente descondensados con valores del 200% con respecto de control, a los 15 minutos de incubación con el extracto de ovocito de rana.

En lo referente a la formación de pronúcleos los tratamientos 2 (espermatozoides+PMA) y 4 (espermatozoides+PMN+PMA) presentan similitud con los valores normales; en el caso del tratamiento 4 (espermatozoides+PMN+PMA) se observa morfología nuclear muy alterada, los pronúcleos presentan patrones de tinción más oscuros en relación con el control (espermatozoides), En tanto que el tratamiento 5 (espermatozoides+PMA+PMN+trolox) presenta una respuesta de pro núcleos con morfología alargada y ligeramente teñidos.

En cuanto a la síntesis de DNA, el tratamiento 2 (espermatozoides+PMA) tiene disminuida la actividad de síntesis con respecto al grupo control (espermatozoides), en tanto que el tratamiento 4 (espermatozoides+PMN+PMA) tiene los valores más bajos de síntesis, y el tratamiento 5 (espermatozoides+PMN+PMA+Trolox), tiene un valor máximo de 68 %,es de suma importancia señalar que dentro de los primeros 15 minutos presenta cabezas re condensadas y ya no sintetiza más su DNA. (tabla 7, gráfica 11)

Activación espermática



Gráfica 11. Comparación visual de los tratamientos experimentales, en la prueba de activación espermática que básicamente consta de 3 eventos: la descondensación nuclear, la formación de pro núcleos y síntesis de DNA. Donde : 1. Espermatozoides 2. Espermatozoides +PMA 3. Espermatozoides +PMN, 4. Espermatozoides PMN+PMA 5. Espermatozoides +PMN +PMA +Trolox 6. Espermatozoides +PMN+PMA+Tocoferol. 7 Espermatozoides +Trolox 8. Espermatozoides + Tocoferol. Siendo las condiciones experimentales: espermatozoides $10.0 \times 10^6/\text{ml}$. PMA: ester de forbol $1.6 \times 10^{-9}\text{M}$. PMN: leucocitos polimorfo nucleares $1.0 \times 10^6/\text{ml}$, Trolox 40 nM y Tocoferol 1%.

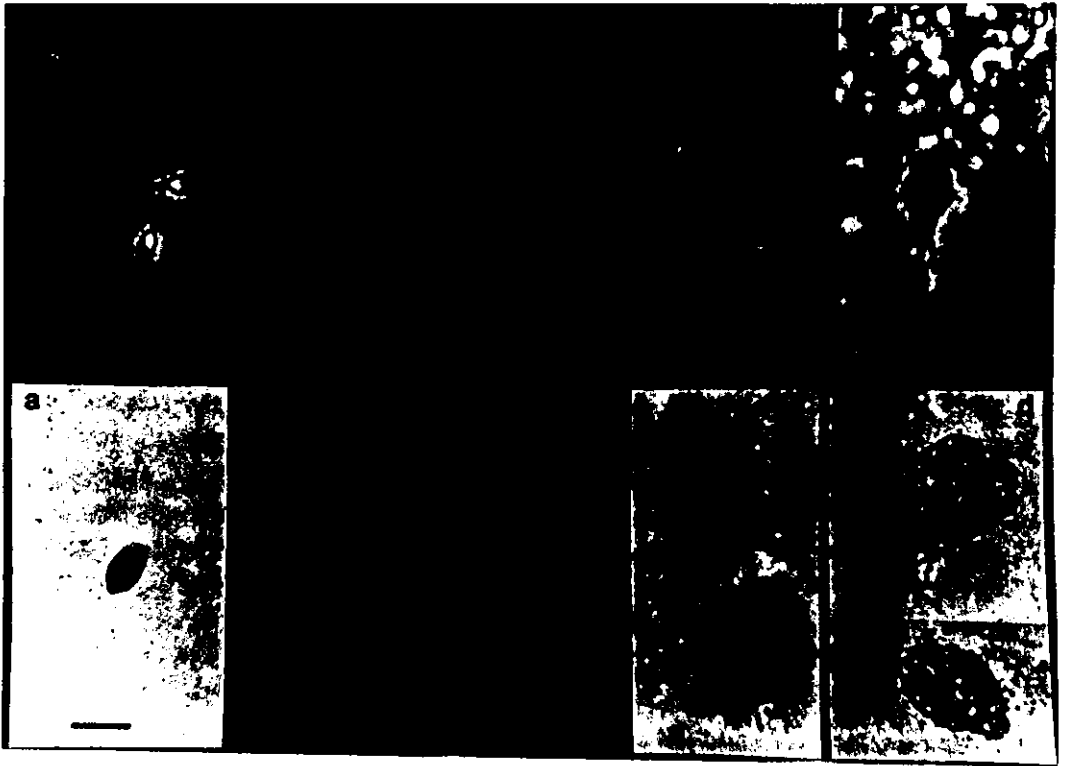


Figura 10 Respuesta normal de espermatozoides humanos permeabilizados e incubados con los extractos de huevo de rana. Las representaciones 10A-10 D técnica montada para microscopía de contraste de fases y 10a-10d montadas para microscopía de luz técnica de Giemsa-tinción nuclear. Aa. Tiempo 0 de incubación, B b. A los 15 minutos de incubación, C c a las 2 horas y D d a las 3 horas de incubación. B-D y b-d fueron fotografiados a 800X de aumento en tanto que Aa. 40X (cortesía Dr. David B. Brown depto. Human Biol. Chem and Genetics. University of Texas Medical Branch)

Microscopía electrónica de transmisión

Se analizaron 235 células en el microscopio de transmisión a 10 000X de magnificación con el propósito de observar posibles cambios ultra estructurales por efecto de las especies de oxígeno reactivo.

Los resultados del grupo control Tratamiento 1 (Espermatozoides), muestra que 200 células analizadas presentan morfología e integridad de membrana espermática normal. Lo que representa un 85.106% para corte longitudinal. En el caso del análisis en corte transversal se analizaron 53 piezas medias con 50 formas normales sin inclusiones de formazán lo que representa un 94.33% de formas normales para pieza media. (Figura 11a).

El análisis de 235 células en el microscopio de transmisión a 10 000X de magnificación para el tratamiento 4 (Espermatozoides + PMN + PMA) reveló que 235 células observadas en corte longitudinal presentan serias alteraciones en su integridad de la membrana es decir 0% tiene integridad membranar normal. El análisis en corte transversal realizado en 53 piezas medias 100% presentan inclusiones de formazán en su interior. Figura 11b.

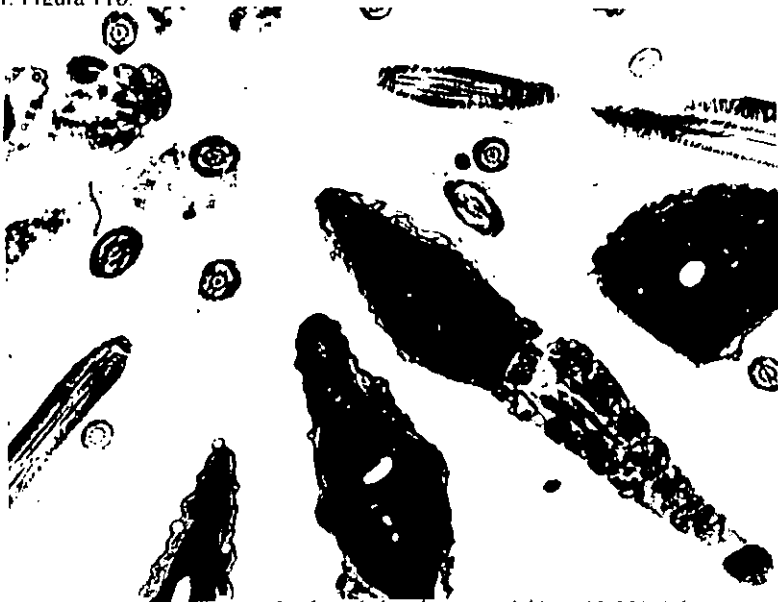


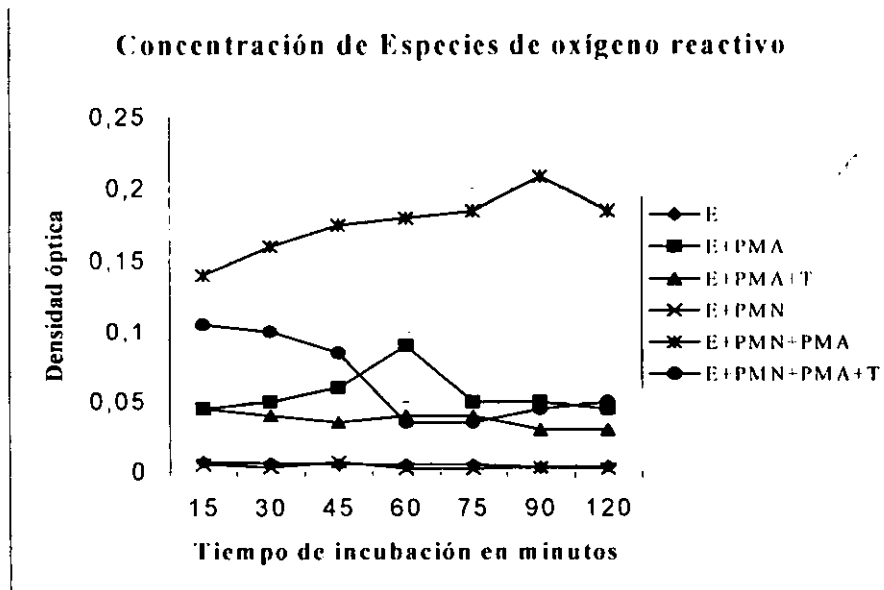
Figura 11 a. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión a 10 000X de magnificación..(control) Corte logitudinal, presencia de morfología normal con membrana espermática íntegra, la región de la pieza media bien definidas las mitocondrias y estructuras flagelares. En corte transversal observar el arreglo del flagelo 9+2 típico sin presencia de inclusiones de formazán (cortesía Bioquim. Lourdes Palma. Depto de Biol. Celular Facultad de Medicina U.N.A.M)



Figura 11b. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión a 10 000X de magnificación, tratamiento 4 (espermatozoides + PMN + PMA) en corte longitudinal, notar en la región de la membrana espermática alteraciones severas, en determinadas regiones queda completamente destruida, también es evidente la presencia de gránulos de formazán incluidos en el interior de la célula. Para el corte transversal notar en la región de la pieza media gran acumulación de gránulos de formazán. (cortesía Bioquim. Lourdes Palma, Depto de Biol. Celular Facultad de Medicina U.N.A.M).

Efecto antioxidante del trolox por espectrofotometría en poblaciones de leucocitos PMN y espermatozoides.

La determinación de la concentración de las especies de oxígeno reactivo, se realizó utilizando nitro azul de tetrazolium que en presencia de radicales libres se transforma en formazán, este cambio se detecta por espectrofotometría a 630 nm, para conocer los cambios en la producción de especies de oxígeno reactivo se registró la generación de radicales libres por cambios en densidad óptica en intervalos de 15 minutos durante 2 horas de incubación a 37° en movimiento constante.(gráfica 12)



Gráfica 12. Determinación espectrofotométrica para la generación de EOR. Donde PMN 1.0×10^6 PMN/ml E: Espermatozoides población constante a 10.0×10^6 células/ml. PMA: 1.6×10^{-9} M. T: Trolox 40 nM proporción celular Espermatozoides 10:1 PMN.

Determinación de la concentración de peróxido de hidrógeno

Para establecer las concentraciones de las especies de oxígeno reactivo en las muestras cuyas proporciones fueron 10:1 (Espermatozoides: PMN). Los valores de las densidades ópticas registradas a partir de las condiciones experimentales, fueron interpolados en la curva de calibración de valores conocidos de peróxido de hidrógeno (tabla 6 del apéndice condiciones experimentales) las concentraciones aproximadas se muestran en la tabla 8.

Condición experimental	Densidad óptica (valor medio) a los 90 minutos	Cálculo aproximado de la concentración de peróxido en mM
Espermatozoides	0.003	0.03333
Espermatozoides + PMA	0.045	1.83333
Espermatozoides + PMA + Trolox	0.035	1.83333
Espermatozoides + Poli morfo nucleares. (10:1)	0.003	0.03333
Espermatozoides + Poli morfo nucleares + PMA	0.208	6.66666
Espermatozoides + Poli morfo nucleares + PMA + Trolox.	0.045	1.83333

Tabla 8. Presentación de las concentraciones aproximadas de peróxido de hidrogeno presentes en las muestras problema a los 90 minutos de incubación. Las densidades ópticas fueron registradas e interpoladas en una curva de calibración con valores conocidos de peróxido de hidrogeno. Donde 1. Espermatozoides (control). 2. Espermatozoides + PMA. 3. Espermatozoides + PMA + Trolox. 4. Espermatozoides + PMN 5. Espermatozoides + PMN + PMA 6. Espermatozoides + PMN + PMA + Trolox.

Discusión

Convencionalmente se ha aceptado que el valor límite normal de leucocitos presentes en el semen humano es menor a un millón de células con tinción positiva a peroxidasa por mililitro de muestra (14,15). Sin embargo el significado clínico de la concentración de leucocitos en el semen humano permanece en discusión. Algunos autores relacionan a la leucospermia con una baja calidad de células espermáticas.(61,62,63,64,68).

Otros autores han sugerido en sus investigaciones que la concentración de leucocitos en el semen es independiente a la condición funcional de los espermatozoides de la muestra (33,65,66,69).

De acuerdo con los resultados de la serie experimental, para evaluar el efecto de las poblaciones de leucocitos polimorfo nucleares sin activar, sobre la funcionalidad de los espermatozoides, indican que no existieron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de funcionalidad espermática estudiados (viabilidad, movilidad general, movilidad progresiva rápida, prueba de integridad de la membrana plasmática e integridad de la membrana acrosomal) entre el grupo control (espermatozoides con medio Ham F-10) y espermatozoides incubados con leucocitos polimorfo nucleares sin activación en las diferentes proporciones celulares estudiadas (2:1, 5:1, 10:1, 20:1).

Éstos resultados concuerdan con lo reportado por Aitken (67), que utiliza como control negativo en su estudio a poblaciones de leucocitos polimorfo nucleares sin activación. Los espermatozoides que somete a incubación con estas poblaciones de leucocitos polimorfo nucleares, no presentaron cambios significativos en los parámetros de viabilidad y patrones de movilidad.

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, a los 90 minutos de incubación las movilidades general y progresiva rápida registran cambios significativos, tanto en los grupos control como en las poblaciones con leucocitos polimorfo nucleares sin activación, se sugiere que esto podría resultar del metabolismo celular que produce cambios en el micro ambiente como el pH, concentración de ionóforos, disminución de nutrientes celulares (28), así como un descenso en los niveles de ATP que tiene suma importancia en la movilidad flagelar espermática (70, 71,72,73). Durante el tiempo de incubación se van generando productos del metabolismo natural de las células que pueden influir en el comportamiento celular (movilidad). Estos resultados también concuerdan con los reportados por Aitken (67) que en sus poblaciones espermáticas

expuestas a leucocitos polimorfo nucleares sin estimulación registran reacciones variables en el parámetro de movilidad después de 2 horas de incubación.

Por otro lado estudios realizados por Sedgwick (74), en poblaciones de leucocitos polimorfo nucleares en condiciones de incubación sin ningún estímulo externo se elevan los niveles de AMPc pero no lo suficiente para generar especies de oxígeno reactivo, respuesta que se induce mediante diversos mecanismos de estimulación.

La posible relación entre la presencia de especies de oxígeno reactivo con la calidad del semen humano y el papel que desempeña en la infertilidad masculina, se ha investigado, se ha sugerido que poblaciones de espermatozoides con morfología anormal esta fuertemente asociada con una movilidad defectuosa y funcionalidad disminuida(13,25,27,75).

Los resultados presentados por Aitken y Clarkson (27) sugieren que la producción de especies de oxígeno reactivo es principalmente generada por espermatozoides defectuosos que son responsables de la disminución de la función de los espermatozoides normales. Los resultados presentados por Plante y De Lamirande (76), demuestran que la generación de especies de oxígeno reactivo producido por espermatozoides con alteraciones severas, no es suficiente para causar daños en los espermatozoides sanos. Sin embargo estos autores señalan que espermatozoides sanos en presencia de leucocitos polimorfo nucleares activados producen hasta 1000 veces más especies de oxígeno reactivo y que esta producción tiene un efecto negativo principalmente en la movilidad espermática.

Los resultados de la evaluación realizada de los efectos de las especies de oxígeno reactivo generadas a partir de diferentes poblaciones de leucocitos polimorfo nucleares activadas con el ester de forbol (12 miristato-13 acetato de forbol PMA), concuerdan con lo establecido por Plante.

De acuerdo con nuestras observaciones es claro el efecto deletéreo de las especies de oxígeno reactivo sobre todos los parámetros de funcionalidad espermática evaluados. Nuestras mediciones para el tratamiento 4 (espermatozoides + PMN + PMA), registran cambios significativos a partir de los 30 minutos de incubación en los parámetros de movilidad progresiva rápida en todas las proporciones estudiadas. En el parámetro de movilidad general se presentaron diferencias significativas a partir de los 30 minutos de incubación con las proporciones 1:1 y a los 60 minutos para todas las demás proporciones.

La respuesta obtenida en el lavado hipo osmótico sugiere que a los 30 minutos de incubación se presentaron cambios significativos en las proporciones 1:1,2:1 y a partir del minuto 90 en el resto de las proporciones estudiadas.

Los resultados obtenidos para la viabilidad y la integridad acrosomal fueron similares y es a partir del minuto 75 cuando se observaron cambios significativos para la proporción 1:1 y a partir de 90 minutos de incubación para el resto de las proporciones.

Los resultados presentados nos sugieren que las proporciones celulares (espermatozoides:PMN), representa un aspecto importante a considerar ya que entre menor es la proporción celular mayor es el efecto de las especies de oxígeno reactivo sobre la funcionalidad espermática.

Por otro lado se ha propuesto que poblaciones con menor concentración celular son mas susceptibles a sufrir daño oxidativo en comparación con poblaciones con concentraciones espermáticas normozoopérmicas(81,83,84,85,146).

Las especies de oxígeno reactivo generadas en el exterior de la célula espermática cruzan la membrana por diversos mecanismos, en el caso del anión superóxido lo hace vía canales iónicos, el radical hidroxilo penetra directamente por permeabilidad de la bicapa en sitios donde hay biomoléculas sin carga, el peróxido de hidrógeno por su carácter neutro y tamaño pequeño pasa por permeabilidad. Estos radicales en el interior celular atacan a las biomoléculas que componen la membrana (181). La fluidez de la membrana espermática depende de la integridad de los fosfolípidos así como de los ácidos grasos poli insaturados que la constituyen (28,77,201). Cuando estos lípidos sufren ataques oxidativos se genera lipoperoxidación que altera sus estructuras básicas y puede traducirse en una rigidez membranar. También se pueden inhibir funciones tales como la permeabilidad selectiva considerando, los sistemas limitados de defensa antioxidante propio de las células altamente especializadas, se consideran más susceptibles a presentar daño por estrés oxidativo(13,78,79,80,198).

La movilidad espermática es un parámetro de funcionalidad que depende principalmente de la permeabilidad selectiva de la membrana, y que se ha estudiado ampliamente en condiciones de exposición de especies de oxígeno reactivo. En todos los casos se reportan cambios significativos en función del tiempo(81,82).

De acuerdo con nuestros resultados sugerimos que el daño peroxidativo esta en función del tiempo de incubación y que conforme va aumentando el tiempo de exposición de los espermatozoides a las especies de oxígeno reactivo se van perdiendo las funciones espermáticas. Según nuestras observaciones, la secuencia de pérdida pudiera ser

movilidad progresiva, movilidad general, permeabilidad de la membrana espermática, integridad de la membrana acrosomal y finalmente la viabilidad. La correlación entre los parámetros de reacción acrosomal y movilidad espermática presentada por algunos autores (83,86,87,89) sugieren que primero existe un efecto negativo en la movilidad y posteriormente una alteración en reacción acrosomal. Otras investigaciones sugieren que las especies de oxígeno disparan una reacción acrosomal prematura en los espermatozoides (87, 146). En tanto que Ford (83), demuestra que hasta un 40% de la población espermática sometida a estrés oxidativo, sufren la temprana reacción acrosomal en relación con los controles.

De esta forma se establece que las especies de oxígeno reactivo tienen un efecto deletéreo sobre la funcionalidad espermática, y que la fuente de producción principal de estas especies son los leucocitos polimorfo nucleares presentes en el semen humano (88), y que a su vez deben estar bajo algún estímulo químico y/o bacteriano (89,90,91). Para establecer la condición de estimulación sobre los leucocitos polimorfo nucleares en el modelo experimental utilizamos 12 miristato 13 acetato de forbol (PMA) el cuál mimetiza muchos de los efectos de la IL-1, mediante la activación de la proteína cinasa C (PKC), lo cuál desencadena una serie de eventos importantes dentro de la célula (90,92,93,96,102,106,115,116,117,118,119). La permeabilidad de la membrana se incrementa sufre una despolarización inmediata (97,98,103), los niveles de fosfatidil colina se elevan y aumenta la actividad de la enzima fosfolipasa D.

Como parte del metabolismo del ácido araquidónico, se ha descrito la movilización de fosfolípidos y recambio de fosfatidil inositol así como la activación de la enzima β -glucuronidasa (106,107,111,113).

Otros eventos asociados son la movilización del citoplasma a la membrana celular de substratos susceptibles a ser fosforilados así como de aminoácidos neutros que contribuyen a la transformación celular como son isoleucina, leucina, valina. (115,120). Estos cambios culminan con la producción de especies de oxígeno reactivo: peróxido de hidrógeno, anión superóxido, óxido nítrico, hipoclorito y radical hidroxilo, siendo este último de mayor importancia ya que es el más deletéreo por su alta afinidad a los ácidos grasos poli insaturados presentes en la membrana plasmática (94,95,97,99,100,101,102,104,105,108,110,111,113,114).

En presencia de iones ferrosos se estimula tanto la producción de especies de oxígeno reactivo como la actividad de fagocitosis (105). Las observaciones realizadas en leucocitos Polimorfo nucleares revela que entre los 60 y 90 minutos de incubación con

PMA a 37°C, se genera la mayor cantidad de especies de oxígeno reactivo, por medición del cambio de NBT en producto final formazán (112,114). Este resultado concuerda con lo reportado por Kowalski (33) que utiliza un modelo de estimulación similar.

El cambio en la morfología es evidente durante el tiempo de incubación, tal como se muestra en las figuras 2 A-E de los resultados. En las figuras se aprecian cambios en los núcleos concluyendo en degranulación y en algunos casos en agregación celular y aumento de la población celular con daño.

Los cambios morfológicos observados en los leucocitos polimorfo nucleares de nuestro estudio concuerdan con descripciones de investigaciones previas donde se establecen cambios en el volumen celular, presencia de vacuolas autofágicas, cambios en la uniformidad de la cromatina así como descompactación, alteraciones de la membrana nuclear degranulación y agregación celular, la cual es independiente de la formación de las especies de oxígeno reactivo. (95,97,106,110,114,121).

De acuerdo con la tabla 7 de la sección del apéndice(condiciones experimentales), en el intervalo de 60 a 90 minutos de incubación, se registra una máxima generación de especies de oxígeno reactivo, siendo los picos máximos correspondientes a los tratamientos que incluyen polimorfo nucleares estimulados con PMA y es directamente proporcional la concentración de polimorfo nucleares y la generación de especies de oxígeno reactivo. De esta forma se sugiere que la producción de especies de oxígeno reactivo proviene principalmente de las poblaciones de leucocitos Polimorfo nucleares estimulados (tabla 8 y gráfica 12 resultados), con lo que coincidimos con las apreciaciones realizadas por Plante, Hsu, Hipler (76,87,88).

Se ha demostrado ampliamente el efecto negativo de las especies de oxígeno reactivo sobre la funcionalidad celular y principalmente en las células altamente especializadas la alteración celular es más evidente(198, 200, 201). Para contrarrestar el efecto de las especies de oxígeno reactivo se ha propuesto la utilización tanto in vivo como in vitro de una gran variedad de agentes denominados antioxidantes que tienen una función protectora mediante diferentes mecanismos de acción. La vitamina E (alfa-tocoferol) es un antioxidante con mecanismo de acción **chain- breaking**. Este compuesto entra a la célula y se incorpora a la membrana plasmática y se considera específico para inhibir la peroxidación lipídica. Diversas investigaciones realizadas en otros sistemas han probado que es el antioxidante alfa-tocoferol, es más eficiente para disminuir la acción tóxica ejercida por el radical hidroxilo.(196,197, 199, 202, 210, 215).

Otros grupos de antioxidantes que han sido estudiados son los carotenos que han probado ser específicos para inactivar al singulete de oxígeno(197,199), los thioles que presentan actividad antioxidante intracelular (202), el ascorbato cuya acción es extracelular (197, 199,210), el ácido urico cuyo mecanismo de acción es extra celular (210), la Vitamina C como complemento de acción de la vitamina E (201),los sistemas enzimáticos glutathion peroxidasa y catalasa cuya acción es citosólica preferentemente(196, 210), y compuestos sintéticos derivados de agentes antioxidantes naturales, tal es el caso del Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilroman-2ácido carboxílico) derivado del alfa-tocoferol, que a diferencia de la vitamina E, es soluble en agua.

Los resultados obtenidos en diversos modelos de investigación para establecer la actividad del trolox, lo proponen como un compuesto con un alto nivel de eficiencia antioxidante ante una gran variedad de radicales libres en condiciones tanto in vivo como in vitro y bajo diferentes factores físicos, tales como variaciones de temperatura (205; 206, 213, 214, 216, 217),también se ha propuesto que disminuye la toxicidad producto del metanol, y de la acción de radiaciones UV.(212, 213,216,217).

Los resultados de la medición espectrofotométrica de especies de oxígeno reactivo generadas en leucocitos polimorfo nucleares activados con PMA y el posible efecto del agente trolox nos confirma que el mecanismo de acción del antioxidante es extracelular ya que las pendientes calculadas a partir de las mediciones a lo largo de 120 minutos muestran que entre el grupo control y PMN+PMA+ Trolox no existen diferencias significativas (gráfica 3 tabla 5 sección condiciones experimentales, apéndice) en relación con el tratamiento de PMN+PMA que presenta diferencias significativas con respecto a los dos tratamientos. En tanto que el daño celular en los leucocitos polimorfo nucleares revela que existen cambios morfológicos producto de la activación de las células, ya que en las células estimuladas con PMA y PMA+ Trolox, (tabla 11.2 análisis estadístico apéndice, y figura 2 de resultados) no existen diferencias estadísticas significativas pero ambas son distintas al tratamiento control. Por otro lado el máximo daño celular según nuestros datos se registra a los 60 minutos de incubación (tabla 11.3 análisis estadístico apéndice).(33).

La serie experimental realizada para establecer el posible efecto protector de dos antioxidantes con diferentes mecanismos de acción el alfa-tocoferol (vitamina E) en el interior de la célula y trolox con acción extra celular, reveló que los parámetros de funcionalidad espermática estudiados (viabilidad, movilidad general, movilidad

progresiva rápida, integridad de la membrana plasmática e integridad de la membrana acrosomal) presentan índices de correlación cercanos a 1 (tabla 5 de resultados).

De acuerdo con los resultados obtenidos para la viabilidad espermática (tabla 12.1 de análisis estadístico, tabla 1 y gráfica 4 de resultados) no existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes calculadas de los tratamientos (1 a 3 y 5 a 8). El tratamiento 4 correspondiente a espermatozoides + PMN+PMA, presentó una pendiente estadísticamente diferente y señala un claro efecto de las especies de oxígeno reactivo sobre la viabilidad espermática (140,144,146).

La tendencia de los resultados obtenidos para movilidad general (tabla 12.1 de análisis estadísticos, apéndice y tabla 2, gráfica 5 de resultados) movilidad tipo a progresiva rápida (tabla 12.2 del análisis estadístico apéndice, y tabla 2 gráfica 6 de resultados), integridad de la membrana plasmática (tabla 12.2 de análisis estadístico y tabla 3 gráfica 7, figura 4) e integridad de la membrana acrosomal (tablas 12.3 de análisis estadístico y tabla 3 gráfica 8, figura 6 de resultados), sugiere que hay tres patrones de respuesta.

El primero corresponde al tratamiento 1 espermatozoides, tratamiento 3 (espermatozoides + PMN), tratamiento 5 (espermatozoides + PMN+PMA + Trolox) tratamiento 6 (espermatozoides + PMN+PMA + tocoferol) tratamiento 7 (espermatozoides + trolox) tratamiento 8 (espermatozoides + tocoferol).

En los tratamientos con antioxidantes los índices de correlación entre ambos antioxidantes es cercano a 1, de acuerdo con esto el trolox y el tocoferol son comparables en su acción antioxidante. Los resultados presentados indican un claro efecto protector de los antioxidantes contra las especies de oxígeno reactivo, producto de los metabolitos de los leucocitos estimulados, logrando mantener los niveles de los parámetros de funcionalidad estudiados cercanos a los valores control.

El tocoferol se ha utilizado ampliamente en estudios in vitro para determinar su mecanismo de acción en células espermáticas, demostrando que tiene un efecto antioxidante muy eficiente principalmente sobre el radical hidroxilo. Se ha descrito que espermatozoides sometidos a niveles elevados de especies de oxígeno reactivo en presencia de alfa-tocoferol presentan bajos títulos de peroxidación lipídica en sus membranas, no hay efecto del antioxidante sobre la morfología de los organelos, mejorando la integridad de las membranas acrosomal y plasmática y la movilidad no se altera. (56, 62, 86, 156, 162, 170, 171, 176, 181, 189,217).

El segundo grupo corresponde al tratamiento 2 Espermatozoides + PMA el patrón de respuesta sugiere que hay un posible efecto del PMA sobre los parámetros de

movilidad general, movilidad progresiva e integridad de la membrana plasmática. En estos parámetros se presentaron pendientes positivas, es decir mejoraron las repuestas con respecto al control. El PMA es un activador específico de la proteína cinasa C, el espermatozoide humano posee esta proteína y se localiza en el segmento ecuatorial y en la cola, participa en la regulación del movimiento flagelar durante los procesos de capacitación espermática aumentando la movilidad celular (169).

El PMA actúa sobre las Proteínas cinasa C espermáticas generando cambios en la permeabilidad de la membrana incrementando los flujos de iones calcio y aumentando los niveles de AMPc (22). La Proteína cinasa C al ser estimulada modifica sus dominios promoviendo la fosforilación de tirosinas cinasas activando la vía de ciclooxigenasa generando radicales superóxido, la respuesta funcional del espermatozoide se refleja en el aumento de la movilidad hasta hiper activación, capacitación espermática(33, 134,156,173),el incremento en la reacción acrosomal tanto por efecto en los aumentos de AMPc como en el efecto estimulante de los radicales libres exógenos a bajas concentraciones, debido a su acción inhibitoria sobre una enzima fosfodiesterasa y cambios en la fosfatidil colina de la membrana acrosomal(146,164, 168).

La tercera respuesta correspondió al tratamiento 4 espermatozoides + PMN +PMA. En esta condición experimental, todos los parámetros estudiados se vieron severamente afectados, y es claro el efecto deletéreo de las especies de oxígeno reactivo sobre la funcionalidad espermática, causando inmovilidad celular, pérdida de la funcionalidad celular (144,146,153,166,167,172).

El efecto de las especies de oxígeno reactivo sobre la morfología espermática, así como la acción antioxidante del trolox y tocoferol se evaluó por pruebas histoquímicas utilizando el NBT como marcador específico de la presencia de especies de oxígeno reactivo por la inclusión de gránulos de formazán (color azul) en la célula (76).

La prueba estadística reveló que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos (1 espermatozoides, 2 espermatozoides+ PMA, 3 espermatozoides+PMN y 5 espermatozoides+PMA+PMN+Trolox, 6 espermatozoides+PMN+PMA+tocoferol 7 espermatozoides+ Trolox y 8 espermatozoides+ tocoferol) donde solo se presentaron leves inclusiones de formazán en la pieza media que se considera como parte de la actividad mitocondrial normal. Estos resultados refuerzan la efectividad de los antioxidantes, desde el punto de vista morfológico. El tratamiento 4 espermatozoides+ PMN+ PMA tiene una respuesta estadísticamente significativa en comparación con los otros tratamientos (tabla 12.3 de análisis estadístico y tabla 4

gráfica 9, figura 7 de resultados), las células de este tratamiento presentaron inclusión de gránulos de formazán principalmente en pieza media y en el núcleo donde la cromatina presenta respuesta positiva. En un estudio previamente realizado se describe que existe una gran afinidad de las especies de oxígeno reactivo por la región de la pieza media y axonemas. En pacientes que exhiben altos niveles de radicales hidroxilo la histoquímica utilizando NBT revela que existe una gran inclusión de formazán en sus células espermáticas con citoplasma residual, y defectos de pieza media. (154).

De acuerdo con estos resultados la microscopía electrónica de transmisión confirma mediante observaciones a 10 000 X de aumento, un efecto deletéreo de los radicales libres sobre la morfología espermática, principalmente en la membrana plasmática.

La figura 11b muestra células del tratamiento 4 espermatozoides+PMN+PMA donde en corte longitudinal se aprecian las condiciones de la membrana plasmática con severas alteraciones, el porcentaje de integridad membranal fue de 0%. En corte transversal se aprecian altos contenidos de gránulos de formazán en la región de la pieza media, siendo positivo para especies de oxígeno reactivo. En tanto que la figura 11a se aprecian células de control en corte longitudinal se observan sus membranas íntegras. Se registró un 85.106% con buena integridad membranal y en corte transversal se aprecian las piezas medias sin inclusión alguna de gránulos de formazán, 94.33% de las células analizadas sin alteración.

En los resultados obtenidos en la prueba de penetración del huevo de hamster (tabla 6 gráfica 10 figuras 8 y 9.1, 9.2, 9.3 de resultados) se registraron sólo 2 condiciones con penetración positiva (tratamientos 1-3 y 5-8) con descondensación nuclear en todos los tratamientos y sin penetración o penetración negativa para el tratamiento 4(espermatozoides+ PMN+PMA).

De acuerdo con los resultados de penetración positiva en los tratamientos donde los espermatozoides son sometidos a estrés oxidativo y se utilizó alfa-tocoferol y Trolox, podemos sugerir un efecto protector de los agentes antioxidantes. Estudios previos señalan que la utilización de antioxidantes en el medio de cultivo mejoran las respuestas de penetración en condiciones altamente oxidativos (158,164) y que a bajas concentraciones (0.05 -0.1 mM) los radicales libres no afectan este parámetro (146). Los resultados entre los tratamientos con penetración positiva presentan diferencias estadísticas entre sí, registrándose tres tendencias en los porcentajes de descondensación, sin embargo cabe señalar que los porcentajes de penetración y descondensación para los tratamientos se encuentran dentro de los valores estimados de

penetración o descondensación espermática calculadas para poblaciones de sujetos normozoospermicos con fertilidad probada (tabla 12 del apéndice). De acuerdo con nuestros resultados en el tratamiento 4 (espermatozoides+PMN+PMA) el porcentaje de penetración fue cero, lo que sugiere un efecto deletéreo de las especies de oxígeno reactivo sobre la penetración del huevo de hamster, lo cuál concuerda con estudios previos que utilizan este mismo modelo.

Las especies de oxígeno reactivo en elevadas concentraciones (a partir de 0.2 mM) han mostrado tener un efecto negativo sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides (135,136,138,140,146,166,179,180).

Los resultados del tratamiento 4 (Espermatozoides+PMN+PMA), sugieren que la penetración y descondensación negativa en los espermatozoides pudiera ser producto del efecto de las especies de oxígeno reactivo sobre la integridad de la membrana, disminuyendo la movilidad progresiva así como de los demás parámetros de funcionalidad asociados con esta condición como ya se ha discutido previamente.

Poco se conoce de los efectos de los radicales libres sobre la integridad del núcleo espermático, por lo que incluimos la prueba de activación espermática, (HSAA). Esta prueba tiene por objetivo establecer los eventos de activación espermática que incluye descondensación de la cromatina, formación de pronúcleos, síntesis de DNA, y recondensación de la cromatina.

Los espermatozoides inmóviles de todos los tratamientos fueron sometidos a un proceso de permeabilización de su membrana con lisolectina, y se les puso en contacto con extractos de huevo de rana no fertilizados y detenidos en la 2 a metafase de meiosis; los extractos en esta fase contienen los factores necesarios incluyendo la nucleoplasmina que es requerida en descondensación así como elementos necesarios en el intercambio protamina-histona (descondensación de la cromatina) ciclinas y ciclinas dependientes de cinasas, que dirigen el ciclo celular, así como elementos necesarios para la formación de pro núcleos, síntesis de DNA y recondensación de la cromatina. Los resultados obtenidos de la prueba han probado tener hasta un 95% de confiabilidad.(59,60, 218,219).

La prueba de activación espermática aplicada a los tratamientos nos reveló un comportamiento típico en todos los eventos de activación en células normales de sujetos control con fertilidad probada para el tratamiento 3. (tabla 7, figura 10 gráfica 11 de resultados).

En todos los tratamientos se presentó activación espermática, en el evento de descondensación se presentaron valores de hasta 200% con mayor actividad con respecto al control, en los tratamientos donde las células están en contacto con el PMA (tratamientos 2 espermatozoides+PMA, 4 espermatozoides+PMA+PMN, 5 espermatozoides+PMN+PMA+Trolox, y 6 espermatozoides+PMN+PMA+tocoferol), esto puede ser efecto del PMA sobre la permeabilidad de la membrana aumentando el flujo de los factores de descondensación.

En el caso del tratamiento 4 (espermatozoides+PMA+PMA) sugerimos también, que el efecto de las especies de oxígeno reactivo al alterar la integridad de la membrana permite el libre paso de los factores de descondensación (efecto deletéreo de especies de oxígeno reactivo en la membrana observado por microscopía electrónica figura 11b). En la formación de pronúcleos se observa también un efecto del PMA en los tratamientos 2 espermatozoides+PMA, 4 espermatozoides+PMA+PMN (además presentó grumos densos en su cromatina) y 6 espermatozoides+PMN+PMA+Tocoferol. En el tratamiento 5 espermatozoides+PMN+PMA+Trolox se presentó una formación de pronúcleos acelerado. Los valores de síntesis revelaron en todos los casos actividad siendo menor en el tratamiento 4 espermatozoides+PMN+PMA. Estos resultados preliminares sugieren que los espermatozoides bajo condiciones altamente oxidativas son capaces de formar pronúcleos, lo cual está en conformidad con lo publicado por Aitken (122) que mediante técnica de ICSI presenta evidencias que los espermatozoides bajo condiciones de daño por oxidación son capaces de formar pronúcleos normales en los ovocitos. Sin embargo estos resultados no son contundentes ya que algunos autores señalan que los radicales libres tienen un efecto deletéreo sobre el DNA principalmente en fragmentación (124,125,126 y 128).

Según nuestros datos existe un efecto de las especies de oxígeno reactivo sobre la cromatina (morfología) lo cual concuerda con Aitken y López (125, 128) estos autores señalan el posible efecto de los radicales libres sobre la cromatina.

Los resultados para activación espermática sugieren la realización de más experimentos para establecer claramente los efectos de las especies de oxígeno reactivo ya que en este caso tuvimos un claro efecto del PMA, en la activación espermática.

Por último para establecer las concentraciones de peróxido de hidrógeno para establecer los rangos de efecto deletéreo y límites normales partimos de una curva de calibración con valores conocidos de peróxido de hidrógeno e interpolamos las densidades ópticas promedio y calculamos las concentraciones y observamos que a concentraciones de

6.66 mM se presentaron alteraciones severas en los parámetros de funcionalidad dependientes de la integridad de la membrana. Sin embargo para los casos donde se observó un efecto estimulador en las movilidades progresiva rápida y general, HOST e Integridad acrosomal las concentraciones calculadas son del orden de 1.8 mM, 10 veces más que las registradas para este efecto por otros autores (146).

Este efecto lo atribuimos principalmente a que la sensibilidad del método espectrofotométrico NBT a azul de formazán a concentraciones muy bajas no es tan específico. Lo cuál concuerda con lo expresado por Kowalski (33).

Conclusiones

Las especies de oxígeno reactivo generados a partir de poblaciones de leucocitos polimorfo nucleares activados tienen un efecto deletéreo sobre los parámetros de funcionalidad espermática, que dependen de la integridad de la membrana plasmática. Siendo los parámetros más afectados la movilidad progresiva y la movilidad general estos parámetros influyen directamente sobre la prueba de penetración de huevo de hamster(SPA).

Existe un efecto en las concentraciones celulares y las proporciones espermatozoides:PMN; entre menor es la proporción entre ambos tipos celulares mayor es el efecto deletéreo de las especies de oxígeno reactivo (EOR) así como: entre menor volumen celular exista hay también mayor efecto de EOR, sobre la funcionalidad espermática..

Los resultados mostrados sugieren que los antioxidantes alfa-tocoferol y trolox tienen un efecto protector para contrarrestar el efecto de las especies de oxígeno reactivo ya que mantienen la función celular en presencia de EOR en niveles normales y que a su vez ambos antioxidantes son comparables entre sí.

Las condiciones experimentales en el modelo utilizado aparentemente no hay efecto deletéreo de las especies de oxígeno reactivo que indique la posible inhibición de la activación nuclear espermática.

BIBLIOGRAFIA

1. Rowe P, Comhaire H, Hargreave T. (1993). WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. Cambridge University Press.
2. Di Paola GR, Procaccini JC.: Enfoque de la pareja estéril En: Avances en reproducción Humana. Asch R, Y Acosta A.A (eds). Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1990.
3. Menning BE: The emotional need of infertile couples. Fertil Steril 1980;34:313.
4. Sharlip ID. Clinical Andrology. En General Urology, Smith DR (ed). Lange Medical Pub. Los Altos C.A E.U.A 1984.pp 608.
5. Macleod J: Human male infertility. Obstet Gynecol Surv. 1971;26:325.
6. Alvarez González E. (1997). Andrología. Teoría y práctica. Ediciones Diaz de Santos. Madrid. Cap 8 y 9.
7. Berger R, Alexander R, Monda E. Chlamydia Trachomatis as cause of acute idiopathic epididymitis. N. Engl.J. Med. 1987;298:301.
8. Fowler J.E, Kessler R. Genital tract infection in infertily male. (eds) Lipshultz y Howards S.S Churchill Livingstone. Nueva York. 1993: 283-295.
9. Ball T. Inflammations Epididymitis. (Ed) Kaufman JJ. J. W.B Saunders Philadelphia. 1986: 429-432.
10. Alexander N, Ackerman S. Immunology in Human Spermatozoia in Assisted Reperoduction. (Eds) Acosta Anibal, Swanson J, Ackerman S, Williams & Wilkins. Baltimore Maryland USA 1990:208-222.
11. Witkin SS. Mechanisms of active suppression of the immune response to spermatozoa. An J. Reprod. Immunol. Microbiol. 17:61.1988.
12. Chavarria O. Bases Bioestructurales del espermatozoide humano infértil. Tesis de Doctorado por la Universidad de Tlaxcala. División de estudios de posgrado centro de investigación en reproducción animal. CINVESTAV-UAT. 1995.
13. Aitken R.J, Clarkson J.S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. Biol.reprod. 40:183.1989.
14. Kung AW, Ho P.C, Wang C. Seminal leucocytes subpopulations and sperm function in fertile and infertile chinese men. Int.J. of Androl. 16:189-194. 1993.
15. World Health Organization. WHO laboratory manual for examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Third edition. Cambridge University Press. U.S.A 1992.

16. Kovalsky N, De Lamirande E, Gagnon C. Determination of neutrophil concentration in semen by measurement of superoxide radical formation. *Fertil and Steril* 56 (5):946-953. 1991.
17. Mazzoli AB, Barrera C. Papel de la respuesta inmune en la esterilidad masculina. *Medicina* 49:232. 1989
18. Shekarriz M, Sharma R K. Positive myeloperoxidase staining (Hindtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species formation in semen. *J. Assist.Reprod.Genet.* 12(2):70-74. 1995.
19. Purvis K, Christiansen E. Infection in the male reproductive tract. Impact, diagnosis and treatment in relation to male infertility. *Int. J. Of Androl.* 16:1-13. 1993.
20. Jones R, Mann T & Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil and Steril.* 31:531-537. 1979
21. Huberman A. Biología de los radicales libres. En *Bioquímica*. Díaz Zagoya Hicks. segunda edición edit. Interamericana. 715-721. 1995
22. Griveau J, Renard P, Lannou. An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int. J of Androl.* 17:300-307. 1994.
23. Lamirande E, Leduc B, Iwasaki A. Increased reactive oxygen species formation in semen of patients with spinal cord injury. *Fertil & Steril.* 63(3):637-642. 1995
24. Nauta R, J Oxygen derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. *Sur Gyn Obstet.* 171:120-125. 1990.
25. Iwasaki A. & Gagnon. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patient. *Fertil & Steril.* 57(2):409-416. 1992.
26. Aitken J.R, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J.Reprod. fertil.* 81:459-469. 1987.
27. Aitken JR, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J. Androl.* 9:367-376. 1988
28. Langlais J. & Roberts K. D. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Research.* 20:185-201. 1985.
29. Aitken JR, Harkiss D. & Buckingham. Relationships between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J. of Reprod. and fertil.* 98:257-265 1993 b.

30. Aitken JR, Irving D.S, Wu. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am.J.of Obstet. And Ginecol.* 164:542-551. 1991.
31. Ross L, ArtzJ. Partitioning and antioxidant of the water soluble antioxidant, Trolox between the aqueous and lipid phase of phosphatidylcholine membranes. C_{14} tracer and product studies. *Biochimica et Biophysica acta.* 1237:77-85. 1995.
32. Tai-wing Wu, Kwork-Pui. Unconjugated Bilirubin inhibits the oxidation of human low density lipoprotein better than trolox. *Life science.* 54(25):477-481. 1994.
33. Hopia Anu, Shu Wen Huang. Effect of α -Tocopherol and trolox on the decomposition of methyl linoleate hydroperoxides. *Lipids* 31(4):357-365. 1996
34. JosepJ, Denisova N, Villalobos-Molina. Age differences in sensivity to H_2O_2 or NO induced reduction in K^+ evoked dopamina released from superfused striatal slice reversal by PMN or trolox. *Free radical Biol&Med.* 20(6): 821-830. 1995.
35. Murray, R. *Bioquímica de Harper*. 22ª edición. Editorial. El manual moderno Estructura y función de las vitaminas liposolubles. 571-579. 1993
36. Arakaki D.T Sparkes R.S. Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. *Cytogenetic* 2:57-60. 1963.
37. Morimoto K, Wolf S. Cell cycle kinetics in human lymphocyte cultures. *Nature* 288(5791):604-606. 1980.
38. Kaczmarek I, Calabretta B, Barsega R. Expression of cell cycle-dependent genes in phytohemagglutinin stimulated human lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 82: 5375-5379. 1985
39. Sadayuki B, Cologne JB. X-Ray Induction of micronuclei in Human Lymphocyte Subpopulations differentiated by Immunoperoxidasa staining. *Radiation Research* 131:60-65. 1992.
40. Freeman R, KingB. Technique for the performance of the nitroblue tetrazolium (NBT) test. *J.Clin.Pathol.* 25:912. 1972
41. Rothwell D.J, Dumas BT. The effect of heparin and EDTA an the NBT test. *J.Lab Clin Med.* 85:950. 1975
42. Stuart J, Simpson JS. Dehydrogenase enzyme cytochemistry of unfixed leucocytes. *J.Clin Pathol* 23:517. 1970
43. Grush OC, Mauer A.M Neutrophil function and NBT dye redaction. *Lancet* 2:383. 1969.
44. Eliasson R. Supravital staining of human spermatozoa. *Fertil & Steril.* 28:1257. 1977

45. Eliasson R. Analysis of semen. In the testis. Ed. H. Burger & D de Ketsler. New York. Raven press. Pp 381-399. 1981.
46. Jeyendran RSH, Van der Veen HH, Pérez Pelacz M, Grabo BG and Zaneveld LDJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationships to other semen characteristics. *J of Reprod. and Fertil.* 70:219-228. 1984
47. Van der Veen, Jeyendran RSH, Al Hasani S. Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypo-osmotic swelling test) and in vitro fertilitation. *J. Of Androl.* 7:190-196. 1987.
48. Chan P, Tredway D, Pang S. Assessment of sperm for cryopreservation using the hypoosmotic viability test. *Fertil & Steril.* 58:841-844. 1992.
49. Lomeo M, Giambersio M. "Water test" a simple method to assess sperm membrane integrity. *Int. J. Of Androl.* 14:278-282. 1991
50. Talbot P, Chacon RS. A new technique for rapidly scoring acrosome reactions of human sperm. *J. Cell Biol.* 83:2089 1979.
51. Talbot P, Chacon R S. A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 215:201. 1988.
52. Talbot P, Dudenhausen E. Factors affecting triple staining of human sperm. *Stain Technol.* 56:307. 1981.
53. Harrison R, Vickers E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 88:343-352. 1990.
54. Tirado E. Efecto sobre la integridad de la membrana espermática durante la separación de los espermatozoides del semen humano utilizando gradientes discontinuos de percoll. Tesis de especialidad. Fac. Química U.N.A.M 1995.
55. Kovalski, N, De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species by human neutrophils inhibit sperm motility; protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertil & Steril.* 58(4):809-816. 1992.
56. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48(6):835-850. 1996

57. Aitken RJ, Sutton M, Warner P, Richardson DW. Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 73:441. 1985.
58. Chan S, Tucker M. Comparative study on the use of human follicular fluid or egg yolk to enhance the performance of human sperm in the zona-free hamster oocyte penetration assay. *Int.J of Androl.* 15:32-42. 1992.
59. Brown DB, Hayes E, Uchida T and Nagamani M. Some cases of human male infertility are explained by abnormal in vitro human sperm activation. *Fertil & Steril* 64:612-622. 1995
60. Sawyer D.E, Brown DB. The use of an in vitro Sperm Activation Assay to detect Chemically-induced Damage of human sperm nuclei. *Reprod.Toxicol.* 9:351-357. 1995
61. Berger RE, Karp LE, Williamson R, Kochler J, Moore D. The relationships of pyospermia and seminal fluid bacteriology to sperm function as reflected in the sperm penetration assay. *Fertil Steril.* 37:557-564. 1982.
62. Wolf H, Politch J.A, Martinez A. Leukocytospermia is associated with poor semen quality. *Fertil Steril* 53: 528-536. 1990
63. Aitken J, Buckingham D, Brindle J. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocyte in washed sperm preparation and seminal plasma. *Hum Reprod.* 10:2061-2071. 1995.
64. AitkenRJ, West K Buckingham D. Leukocyte infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress and sperm function. *J Androl* 15:343-352. 1994
65. Tomlinson MJ, Barrat. CLT, Cooke ID. Prospective study of leukocytes subpoblations in semen suggests that they are not a cause of male infertility. *Fertil Steril* 60:1069-1075. 1993.
66. Kessopoulou E, Tomlinson MJ, Barrat CLT, Bolton AE, Cooke ID. Origin of reactive oxygen species in human semen spermatozoa or leukocytes? *J. Reprod Fertil* 94:463-470. 1992.
67. Aitken RJ, Brindle J, Gordon H, Irvine SD. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. *Fertil Steril* 65(2):411-419. 1996.
68. Henkel R, Schill WB. Sperm separation in patients with urogenital infection. *Andrologia* 30 suppl. 1:91-98. 1998.
69. Ochsendorf FR. Infection and reactive oxygen species. *Andrologia* 30 suppl. 1:81-86. 1998.

70. De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.* 2(1): 48-54. 1997.
71. Griveau JF, Le Lannou D. Influence of oxygen tension on reactive oxygen species production and human sperm function. *Int. J. Androl.* 20(4):195-200. 1997.
72. Froman D.P. sperm motility a quantitative trait of the domestic fowl. *Biol of reprod.* 58 (2):379-384. 1998.
73. Gottlieb C, Svanborg K, Bygdeman M. Adenosine triphosphate (ATP) in human spermatozoa. *Andrologia* 23:421-425. 1991.
74. Sedgwick J.B, berube ML, Zuner BR. Stimulus-dependent inhibition of superoxide generation by prostaglandins. *Clin Immunol Immunopathol* 34(2):205-215. 1985.
75. Rao B, Soufir JC, Martin M, David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res.* 24:127-134. 1994.
76. Plante M, De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species released by activated by neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril.* 62(2):387-393. 1994.
77. Ceroli S. Relationships between spermatozoa an lipid composition and fertility dening aging of chickens. *Biol Reprod.* 57(5):976-980. 1997.
78. De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J. Androl.* 13:368-378. 1992.
79. De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of motility. *J. Androl.* 13:379-386. 1992.
80. Alvarez JC, Storey BT. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.* 23:77-90. 1989.
81. Shekarriz M, Thomas AJ, Agarward A. Effects of the time and sperm concentration on reactive oxygen species formation in human semen. *Arch. Androl.* 34(2):69-75. 1995.
82. Shekarriz M, Thomas AJ, Agarward. Incidence and level of seminal reative oxygen species in normal men. *Urology* 45(1):103-107. 1995.
83. Ford W.C, Whittington K, Williams AC. Reactive oxygen species in human sperm suspensions production by leukocytes and the generation of NADPH to protect sperm against their effects. *Int. J. Androl.* 20 suppl.3:44-49. 1997.

84. Henkel R, Ichikawa T, Sánchez R, Miska W. Differentiation of ejaculates showing reactive oxygen species production by spermatozoa or leucocytes. *Andrologia* 29(6):295-301. 1998.
85. Zalata A, Hafez T, Conhaire F. Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Human Reprod.* 10(6):1444-1451. 1995.
86. Hsu PC, Liu M, Hsu CC, Chen L. Effect of vitamin E and C on reactive oxygen species-related lead toxicology in rat sperm. *Toxicology* 128(3):169-179. 1998.
87. Hsu PC, Hsu CC, Liu M. Lead-induced spermatozoa function and metabolism. *J. Toxicol Environ. health.* 55(5):45-67. 1998.
88. Hipler UC, Schreiber G, Wollinnard D. Reactive oxygen species in human semen. Investigations and measurements. *Arch. Androl.* 40(1):67-78. 1998.
89. Felder J, Eillerman-Eriksen S. Effects of cytokines on sperm motility and ionophore-stimulated acrosome reaction. *Arch Androl.* 35(3):173-185. 1995.
90. Jeffrey P, Thomas F, Nilanjana M. Cytokines stimulate lipid membrane peroxidation of human sperm. *Fertil Steril.* 62(1):186-188. 1994.
91. Hellstrom WJ.G, Bell M, Wang R, Sikka S. Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability and lipid peroxidation. *Fertil Steril.* 61(6):1117-1122. 1994.
92. Jackson CA, Jones T, Eccle NG. Induction of cell death by stimulation of protein kinase C. In human epithelial cell expressing a mutant ras oncogene: a potential therapeutic target. *Br. J. Cancer.* 78(5): 641-651. 1998.
93. Trubiani O, Rapino M, Pieri C. Phorbol ester synergize the dimethyl sulfoxide dependent programmed cell death through diacylglycerol increment. *Cancer Detect Prev.* 22(5):463-469. 1998.
94. Curi TC, Miyasaka CK, Palanon AC. Percentage of phagocytosis production of O_2^- , H_2O_2 and NO and antioxidants enzyme activities of rat neutrophils in culture. *Cell Biochem* 16(1):43-49. 1998.
95. Smith ME, Vander Maesen K, Somera FP, Sobel RA. Effects of phorbol myristate acetate (PMA) on functions of macrophages and microglia in vitro. *Neurochem. Res.* 23(3):427-434. 1998.
96. Nishio E, Watanabe Y. Nitric oxide donor-induced apoptosis in smooth muscle cell is modulated by protein kinase C and protein kinase A. *Eur. J. Pharmacol.* 27(339 :2-3):245-251. 1997.
97. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sando A. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12 myristate 13 acetate of phorbol (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J leuko Biol.* 59(2):229-240. 1997.

98. Pedruzzi E, Hakim J, Ground JP, Perianin A. Analysis of choline and phosphoril choline content in human neutrophils stimulated by f-met-leu-phe and phorbol myristate acetate: contribution of phospholipase D and C. *Cell signal* 10(7):481-489. 1998.
99. Toro F, Conesa A, Garcia A. Increased peroxide production by polymorphonuclear cell of chronic hepatitis C, virus-infected patients. *Clin Immunol. Immunopathol.* 88(2):169-175. 1998.
100. Albrecht C, Coepfert E, Schempp H, Elstner E. Modulation of the production of reactive oxygen species by pre-activated neutrophils by aminoadamantane derivatives. *Biochem Pharmacol.* 56(1):141-152. 1998.
101. Moseley R, Waddington RJ, Einberg G. Degradation of glycosa amino glycanos by radical oxygen species derived from stimulated polymorpho nuclear leukocytes. *Biochem. Biophys acta* 1362(2-3):221-231. 1997.
102. Bruce IN, Mc Nally SA, Rea IM, Bell AL. Age-related change in non-receptor dependet generation of reactive oxygen species from phagocytes of healthy adults. *Mech Ageing Dev.* 94(1-3):135-144. 1997.
103. Rudkowski R, Ziegler J.B, Graham GG. Gold complexes and activation of human polymorphonuclear leukocytes, dissociation of changes in membrane potential and oxidative burst. *Biochem. Pharmacol* 44(6):1091-1098. 1992.
104. Arnhold J, Hammerschmidt S, Arnold K. Role of functional groups of human plasma and luminol in scavenging of NaOCl and neutrophil-derived hypochlorous acid. *Biochim Biophys acta.* 1097(2):145-151. 1991.
105. Miura T, Ogiso T. Lipid peroxidation of the erythrocyte membrane caused by stimulated polymorphonuclear, leukocytes in the presence of ferritin. *Chem Pharm Bull* 39(6):1507-1509. 1991.
106. Peters SP, Cerasoli F, Albertinek H. "Autoregulation" of human neutrophil activation in vitro: regulation of phorbol myristate acetate-induced neutrophil activation by cell density. *J leuko Biol.* 47(5):457-477. 1990.
107. O'Flaherty JT, Redman JF, Jacobson DP. Mechanism involved in the bidirectional effects of protein kinase C. Activators on neutrophils responses to leucotriene B4. *J immunol.* 144(5):1909-1913. 1990.
108. Masuda M, Komiyama Y, Murakam T, Murata K, Hasui M. Difference in changes of membrana fluidity of PMN leukocytes stimulated with phorbol myristate acetate and formyl methionyl leucyl phenyalanine: role of excited oxygen species. *J.leuko Biol.* 47(2):105-110. 1990.
109. Lamche HR, Silberstein PT, Knabe AC, Thomas DD, Jacobs HS, Hammerschmidt DE. Steroids decreased granulocyte membranc fluidity while

phorbol ester increase membrane fluidity. Studies using electron paramagnetic resonance. *Inflammation* 14(1):61-70. 1990.

110. Smith RJ, Justen JM, Sam LM. Function and stimulus specific effects of phorbol 12 myristate 13 acetate on human polymorphonuclear neutrophils: autoregulatory role for protein kinase C in signal transduction. *Inflammation* 12(6):597-564. 1988.
111. Yamamoto M, Okimasu E, Terada S, Utsumi K. Mechanism of polymorphonuclear leukocyte activation by myristate. Involvement of calcium ion and protein kinase C. *Cell Struct Funct*. 12(4):357-367. 1987.
112. Okamura K, Yonemoto Y, Migashiwaii H, Yajima A. Quantitative NBT reduction test with or without stimulation of peripheral polymorphonuclear cell from pregnant women. *Tohoku J. Exp.Med.* 151(1):89-95. 1987.
113. Within JC, Cohen HJ. Dissociation between aggregation and superoxide production in human granulocyte. *J Immunol*. 134(2):1206-1211. 1985.
114. Fennel KO, Gramer HR, Gabler WL, Brown AC, Bullock WW. Activated rat neutrophils a sequential quantitative assay for aggregation and NBT reduction. *Inflammation* 8(3):287-300. 1984.
115. Hadden J, Coffey C. Early biochemical events in T-lymphocyte activation by mitogens program of immunopharmacology and medical microbiology and immunology University of South Florida college of medicine. Tampa Florida 33612. 273-376.
116. Royer H, Reinheiz E. T-lymphocytes: ontogeny function and relevance to clinical disorders. *The new Engl. J. Of med.* (29):1136-1142. 1987.
117. Ortaldo JR, Longo D. Human Natural lymphocyte effector cell: Definition Analysis of activity and clinical effectiveness. *J of Nat. Cancer Int.* 80(13):999-1010. 1988
118. Paul W. Development and function of lymphocytes *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. 2 edition. Edited by JJ.Gallin IM, Goldstein and R. Snyderman. Raven Press.Ltd. New york. Chapter 37. pp775-790. 1992.
119. Goodman JW. The complexity of structures involved in T-cell activation. *Ann Rev Immunol* 1:465-498. 1983.
120. Glassy M, Furlong C. Neutral amino acid transport during the cell cycle of cultured Human lymphocyte. *J of cell physiol.* 107: 69-74. 1981.
121. Thomas C, Wiel G, Newburger P, Haugland R. Measurement of super oxide released in the phagocytosis of immune complex-stimulated human neutrophils. *J of Immunol Method.* 130:223-233. 1990.

122. Aitken R.J, Twigg JP, Irvine DS. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleous formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 13(7): 1864-1871.1998.
123. Saez F, Motta C, Boucher D, Grizard G, Antioxidant capacity of proteasomes in human semen. *Mol. Hum. Reprod.* 4(1): 667-672.1998.
124. Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analisis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa lipid peroxidation DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Human Reprod.* 13(6): 1429-1436. 1998.
125. Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation protective significance of seminal plasma. *Mol Hum. Reprod.* 4(5): 439-445.1998.
126. Hughes CM, Lewis S E, Mc Kelieg-Martin VJ, Thompson W. The effect of antioxidants supplementation on human sperm DNA integrity. *Hum. Reprod.* 13(5): 1240-1247.1998.
127. Zini A, Abithol J, Girardi, SK, Schilsinger D, Goldstein M, Schfegel PM. Germ cell apoptosis and endothelial nitric oxide synthase (eNOs) expression following ischemia-perfusion injury to testis. *Arch Androl.* 41 (1): 57-65.1998.
128. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, casper RF. Reactive oxygen species potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reprod.* 13(4): 896-900.1998.
129. Mahmoud AM, Geslevich J, Kint J, Depuyot C, Huy sse L, Zalata A, Comhaire. Seminal plasma α -glucosidase activity and male infertility. *Hum. Reprod.* 13(3): 591-595.1998.
130. Markey CM, Rudolph DB, Labus JC, Hinton BT. Oxidative stress differentially regulates the expression of gamma-glutamyl transpeptidase mRNAs in the initial segment of the rat epididymis. *J. Androl.* 19(1): 92-99.1998.
131. Irvine DS. Glutathione aa treatment for male infertility. *Rev. Reprod.* 1(1)6-12.1996.
132. Olson GE, Acrosome Biogenesis in the Hamster: ultra structurally distinct matrix region are assembled from a common precursor polypeptide. *Biol Reprod.* 58 (2): 361-370.1997.

133. Daniel W. Subcellular localization of the regulatory sub units of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 57(6): 1517-1523. 1997.
134. Ujioka T. Interleukin 8 as an essential factor in the human chorionic gonadotrophin-induced rabbit ovulatory process interleukin 8 induces neutrophil accumulation and activation in ovulation. *Biol. Reprod.* 58(2): 526-530. 1998.
135. Hammersstedt RH. A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertile males. *Biol. Reprod.* 58 (3): 686-669. 1998.
136. Marc GLM. Protein Kinase C inhibitor may modulate human sperm-oocyte interaction. *Biol. Reprod.* 58(3): 670-677. 1998.
137. Huet -Hudson Y. Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol. Reprod.* 58(3): 875-879. 1998.
138. Harvey M, Florman D. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm a tale of two channels. *Biol. Reprod.* 59(1): 12-16. 1998.
139. Kirkland JL. Phorbol ester inhibition of oestrogen-induced uterine deoxyribonucleic acid synthesis. *Biol. Reprod.* 58(3): 778-785. 1998.
140. Sirard M. Binding of a Bovine oviductal fluid catalase to mammalian spermatozoa. *Biol. Reprod.* 58(3): 743-753. 1998.
141. Panfili E. Distribution and possible role of phospholipid hydroperoxidase glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 57(6): 1502-1508. 1998.
142. Zeulke K. Glutathion oxidation is associated with altered microtubules function and disrupted fertilization mature hamster oocytes. *Biol. Reprod.* 57(6): 1413-1419. 1997.
143. Gibori G. Differential regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in rat. Induction of manganese superoxide dismutase messenger ribonucleic acid by inflammatory cytokines. *Biol. Reprod.* 59(1): 208-215. 1998.
144. De Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a Balancing act between be beneficial and detrimental effects. *Human Reprod. suppl.* 1:15-21. 1995.

145. Shekarriz M, Dewire DH, Thomas AJ, Agarwal A. A method of human semen centrifugation to minimize the iotrogenic sperm injury by reactive oxygen species. *Eur.Urol.* 28(1): 31-35.1995.
146. Oehninger S, Blackmore P, Mahony M, Hodgen G. Effects of peroxide on human spermatozoa. *J.Assist.Reprod.Genetic.* 12(1): 41-47.1995.
147. Thiele JJ, Friesleben HJ, Fuchs J, Ochsendorf FR. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma determination and interrelationships with chemiluminiscence in washed semen. *Human Reprod.* 10(1): 110-115.1995.
148. De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and reproduction. *Adv. Exp.Med.Biol.* 366: 185-197.1994.
149. Aitken RJ, Krwsz C, Buckingham D. Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspension. *Mol.Reprod.Dev.* 39(3): 268-279.1994.
150. Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin RR. Effect of sperm washing on levels of reactive oxygen species in semen. *Arch.Androl.*33(3): 157-162.1994.
151. Rajasekaran M, Hellstrom W, Sparks RL, Sikka SC. Sperm Damaging effects of electric current: possible role of free radicals. *Reprod.Toxicol.* 8(5): 427-432.1994.
152. Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin RR. Levels of reactive oxygen species before and after sperm preparation: comparison of swin up and I4 filtration. *Arch.Androl.*32(3): 169-174.1994.
153. Aitken RJ, Buckingham D, Hakiss D. Use of xantine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J.Reprod.Fertil* 97(2): 441-450.1993.
154. Aitken RJ, Gomez E, Buckingham D, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasmic space, oxidative stress and sperm function. *J.Androl.* 17(3): 276-287.1996.
155. Mc Kinney K, Lewis SE, Thompson W. The effects of pentoxifyline on the generation of reactive oxygen species and lipids peroxidation in human spermatozoa. *Andrologia* 28 (1): 15-20.1996.
156. Oeda T, Henkel R, Ohmori H, Schill WB. Scavinging effect of N-acetyl-L-cysteine against reactive oxygen species in human semen: a possible therapeutic modulity for male factor infertility?. *Andrologia* 29(3): 125-131.1997.

157. Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox B, Irvine S. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by flavoprotein inhibitors diphenylene iodum and quinaerine. *Mol.Reprod. Dev.*47(4): 468-482.1997.
158. Blondin P, Coenen K, Sirard MA. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl.*18(4): 454-460.1997.
159. Zini A, Schlegel PM. Identification and characterization of antioxidant enzyme mRNAs in the rat epididymis. *Int.J. androl.* 20(2): 86-91.1997.
160. Gavella M, Lipovac V. Effect of pentoxifylline on experimentally induced lipid peroxidation in human spermatozoa. *Int. J Androl.* 17: 308-313.1994.
161. Vogelpoel FR, Vankooij RJ, Tevelde ER, Verhoef J. Influence of polymorphonuclear granulocytes on the zona free hamster oocyte assay. *Hum Reprod.* 6(8): 1104-1107.1991.
162. Hartmann M. Acrosome reaction and fertility. *Int.J Androl* 18 suppl.2: 53-55.1995.
163. Kinger S, Rajalakshmi M. Assesment of the vitality and acrosomal status of human spermatozoa using fluorescent probes. *Int. J.Androl.* 18suppl. 1:12-18.1995.
164. Dimitriadou F, Rizos D, Mantzavinus T, Arvaniti K, Voutsina K, Prapa A, Kanakas N. The effect of pentoxifylline on sperm motility oocyte fertilization embryo quality and pregnancy outcome in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 63(4): 880-886.1995.
165. Gabriel L, Franken D, Van der Morst G, Kruger T. Fluorescein isothiocyanate conjugate-wheat germ agglutinin staining of human spermatozoa and fertilization in vitro. *Fertil Steril.* 63 (4): 894-901.1995.
166. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: Physiology and pathology. *Int.J.Androl.* 20(2): 61-69.1997.
167. Storey BT. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol.Hum.Reprod.* 3(3): 203-213.1997.
168. Zhang H, Zheng RL. Promotion of human sperm capacitation by superoxide anion. *Free Radic. Res.* 24(4): 261-268.1996.

169. Griveau JF, Renard P, Le Lannou D. Super oxide anion production by human spermatozoa as a part of the ionophore-induced acrosome reaction process. *Int. J. Androl.* 18(2): 67-74.1995.
170. Geva E, Bartoov B, Zabludovsky KJ, Lessing B. the effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril.* 66(3): 430-434.1996.
171. Jozwik M, Kuszynsky W, Szamatowicz M. Non enzymatic antioxidant activity of human seminal plasma. *Fertil Steril.* 68(1): 154-157.1997.
172. Weinberg JB, Doty E, Bonaventura J, Haney A. Nitric oxide inhibition of human sperm motility. *Fertil Steril* 64(2): 408-413.1995.
173. Hemero MB, Cebal E, Boquet M. Effect of nitric oxide on mouse sperm hyperactivation. *Acta Physiol.Pharmacol.Latinoam.* 44(3): 65-69.1994.
174. Wang A. Generation of reactive oxygen species by leukocytes and sperm following exposure to urogenital tract infection. *Arch. Androl.* 1997.
175. De Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as part of an oxidative process. *Free.Rad.Biol. Med* 14:157-166.1993.
176. Griveau JF, Le Lannou D. Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. *Int. J. Androl.* 17: 225-231.1994.
177. Gavella M, Lipovac V, Marotti T. Effect of pentoxifylline on superoxide anion production by human sperm. *Int.J.Androl.* 14: 320-327.1991.
178. Aitken RJ, Buckingham D. Enhanced detection of reactive oxygen species produced by human spermatozoa with 7-dimethyl amino-naphthalin-1,2-dicarboxylic acid hydrazide. *Int.J. Androl.* 15: 211-219.1992.
179. Blackwell J, Zaneveld L. Effect of abstinence on sperm acrosin, hypoosmotic swelling and other semen variables. *Fertil Steril.* 58 (4): 798-808.1992.
180. Chan SY, Tucker M. Comparative study on the use of human follicular fluid or egg yolk medium to enhance the performance of human sperm in the zona-free hamster oocyte penetration assay. *Int. J. Androl.* 15: 32-42.1992.
181. Hesla JS, Miyasaki T, Dasko L, Wallach E, Dharmarajan A. Superoxide dismutase activity, lipid peroxide production and corpus luteum steroidogenesis during natural luteolysis and regression induced by oestradiol deprivation of the ovary in pseudopregnant rabbits. *J Reprod.Fertil.* 95: 915-924.1992.

182. Kuribayashi Y, Gagnon C. Effect of catalase and thioredoxin addition to sperm incubation medium before in vitro fertilization on sperm capacity to support embryo development. *Fertil Steril*. 66(6): 1012-1017. 1996.
183. De Lamirande E, Gagnon C. Quantitative assesment of the serum-induced stimulation of human sperm motility. *Int.J.Androl*. 14:11-22. 1991
184. Scommegna A, Ye S, Prins G. Bromocryptine reverses the inhibitory effect of macrophages on human sperm motility. *Fertil Steril*. 61(2): 331-335. 1994.
185. Krauz C, Mills C, Rogers S, Tan S, Aitken RJ. Stimulation of oxidant generation by human sperm suspensions using phorbol esters and formil peptides: relationships with motility and fertilization in vitro. *Fertil Steril*. 62(3): 599-605. 1994.
186. Ramey J, Starke M, Gibbons W, Archer D. The influence of pentoxifylline (trental) on the antifertility effect of intrauterine device in rat. *Fertil. Steril*. 62(1): 181-185. 1994.
187. Nakano M, Sugioka K, Naito I, Takokoshi S, Niki E. Novel and potent biological antioxidants on membrane phospholipid peroxidation: 2-hydroxy estrone and 2-hydroxy estradiol. *Biochem.Biophys Res Comm*. 142(3): 919-924. 1987.
188. Hesla J, Preutthipan S, Maguire M, Chang T, Wallach E, Dharmarajan A. Nitric oxide modulates human chorionic gonadotropin-induced ovulation in the rabbit. *Fertil Steril*. 67(3): 548-552. 1997.
189. Lewis S, Sterling S, Young I, Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 67(1): 142-147. 1997.
190. Smith R, Madariaga M, Bustos E. Reappraisal of the hypo-osmotic swelling test to improve assessment of seminal fertility status. *Int. J. Androl*. 15: 5-13. 1992.
191. Töpfer Petersen E, Cèchova D, Henschen A, Steinberg M, Friess E, Zucker A. Cell Biology of acrosomal protein. *Biol. Reprod*. 5: 111-121. 1992.
192. Salzberg Z, Lewin M, Shalgi R. Loss of acid phosphatase from rat spermatozoa as a method for assessing the acrosome reaction. *Andrologia* 24: 155-159. 1992.
193. Stojanoff A, Bourne H, Andrews G, Hynes RV. Phospholipid composition of isolated guinea pig sperm outer acrosomal membrane and plasma membrane during capacitation in vitro. *Gamete Res*. 21: 297-311. 1988.

194. Hernández O, Roa A, Cruz J, Mijica A. Sperm protein (sp50) binds to acrosome and plasma membranes in a Ca²⁺-dependent manner: possible role in acrosome reaction. *Mol.Reprod. Dev.*43: 366-375.1996.
195. Esterbauer H. Lipids peroxidation and cancer. *J. Biol.Chem* 255:6253-6261.1982.
196. Van Kuijk F, Sevaniar A. A new role for phospholipase A₂: Protection of membranes from lipid peroxidation damage. *TIBS* 12: 31-34.1987.
197. Ames B, Shigenaga M, Hagen T. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 7915-7922.1993.
198. Kienzl E, Puchinger I, Jelliger K, Stalcheberg, H, Varmuzat K. Studies of phospholipid composition in Alzheimer's disease brain. *Neurodegeneration* 2: 101-109.1993.
199. D Varma S. Scientific basis for medical therapy of cataracts by antioxidants. *Am.J Clin Nutr.*53: 335S-345S.1991.
200. Vilar C, Guzmán A, Hicks J. Participation of oxygen-free radicals in the oxidation-reduction of proteins. *Arch. Med. Res.* 27(1): 1-6.1996.
201. Niki E, Yamamoto Y, Komuro E, Sato K. Membrane damage due to lipid oxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 201S-205S.1991
202. Di Mascio P, Murphy M, Sies H. Antioxidants defense systems:role of carotenoids, tocopherols and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 194S-200S.1991.
203. Zhang H, Agardh C, Agargh E. Increased catalase levels and hypoxanthine-enhanced nitroblue tetrazolium staining in rat retina after ischemia followed by recirculation. *Curr. Eyes. Res.* 16: 47-54.1994.
204. Chen Q, Galleano M, Lederbaum A. Cytotoxicity and apoptosis produced by arachidonic acid in Hep G2 cell over expressing human cytochrome p-450E1. *Alcohol Clin. Exp. Resp.* 22(4): 782-784.1998.
205. Tubaro F, Ghiselli I, Rapuzzi P, Maionno M, Ursini F. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *Free Radic.Biol.med.* 24 (7-8): 1228-1234.1998.
206. Walker M, Vergly C, Lecour S, Abadie C, Maupoil V, Rochette L. Vitamin E analogues reduce the incidence of ventricular fibrillations and scavenge free radicals. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 12(2): 164-172.1998.

207. Copin JC, Li Y, Reola L, Chan PM. Trolox and 6,7-ainitroquinoxaline-2,3-dione prevent necrosis but not apoptosis in cultured neurons subjected to oxygen deprivation. *Brain Res.* 784 (1-2): 25-36. 1998.
208. Tarin JJ, Ten J, Vendrell FJ, Cano A. Dithiotreitol prevents age-associated decrease in oocyte.conceptus viability. *In vitro. Hum Reprod.* 13(2): 381-386. 1998.
209. Bergmann AR, Ramos P, Esterbauer, Winkhofer R. RRR-alpha-tocopherol can be substituted by trolox in determination of kinetic parameters of LDL oxidability by cooper. *J. Lipid. Res.* 38(12): 2580-2588. 1997.
210. Winston GW, Regoli F, Douglas AJ. A rapid gas chromatographic assay for determining oxy radical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radic.Biol.Med.* 24(3): 480-493. 1998.
211. Skrzydlewska E, Farbiszewski R. Trolox -derivate antioxidants protects against methanol induced damage. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 11(5): 460-465. 1997.
212. Sathon K, Kadofuku T, Sakagami H. Effect of trolox a synthetic analog of alpha tocopherol on citotoxicity induced by U.V radiation and antioxidants. *Anticancer Res* 17(4 a):2459-2463. 1997.
213. Mc Arulty JF, Huang XQ. The efficacy of antioxidants administred during low temperature storage of warm ischemic kidney tissue slice. *Cryobiology.* 34(4): 406-415. 1997.
214. Nunez D, Sánchez Ferer A, García Carmona F. A kinetic sutdy of one electron oxidation of trolox C by the hydroperoxidase. Activity of lypogenise. *Biochem Biophysic.Acta.* 1335 (1-2) : 127-134. 1997
215. Brezezinka- Slebodzinka E, Slebodzinski AB, Pietras B, Weczorek G. Antioxidants effects of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma.. *Biol. Trace Elem Res.* 47 (1-3) : 69-74. 1995.
216. Giulivic C, Cárdenas E. Inhibition of protein radical reactions of ferrylmyoglobin by the water-soluble analog of vitamin E, Trolox C. *Arch. Biochem. Biophys.* 303 (1): 152-158. 1993.
217. Giulivic C, Romero FJ, Cárdenas E. The interaction of trolox C. A water soluble vitamin E analog with ferryl myoglobin: reduction of the oxoferryl moiety. *Arch Biochem Biophys.* 299 (2):302-312. 1992.
218. Brown D, Nagamani M. Use of *Xenopus laevis* forg egg extrac in diagnosis human male unexplaines infertility. *The yale J Biol.Med.* 65:29-38. 1992.
219. Sawyer D, Brown D. An animal model for assessing effect of toxicants on sperm nuclear activation. *Fund and applied toxicol.* 30:120 a. 1996.

APENDICE

Valores de referencia para análisis de semen humano.

Volumen	2.0 ml
PH	7.2 - 8.0
Concentración espermática	20 X 10 ⁶ espermatozoides/ ml o más
Concentración espermática total	40 X 10 ⁶ espermatozoides por Eyaculado o más.
Motilidad	50% o más con movilidad progresiva (categorías "a" y "b") o 25% o más. Con movilidad progresiva rápida (categoría "a") dentro de los 60 minutos
Morfología	30% o más con formas normales
Viabilidad	75% o más células vivas
Leucocitos	mucho menos de 1.0 X 10 ⁶ / ml
Inmunobead test	menos de 20 % espermatozoides con Partículas adherentes
MAR test	menos de 10% espermatozoides con Partículas adherentes.

* WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.

Clasificación de las variantes del semen humano.

La descripción de las variantes del semen humano con sus alteraciones se presentan la tabla 1.

Clasificación	Características
Normozoospermia	Eyaculado normal como se define en la hoja anterior.
Oligozoospermia	Concentración espermática menor a 20×10^6 ml.
Astenozoospermia	Menos de 50% espermatozoides con movilidad progresiva (categorías "a" y "b") O menor de 25% espermatozoides con movimiento progresivo con categoría "a"
Teratozoospermia	Menor del 30% de formas con morfología normal.
Oligoastenozoospermia	Alteraciones significativas en las tres variables (combinación de dos parámetros pueden ser considerados).
Azoospermia	Sin espermatozoides en el eyaculado
Aspermia	Sin eyaculado

Tabla 1. Clasificación del semen humano de acuerdo a las características de viabilidad, movilidad progresiva y morfología espermática. criterios de la O.M.S

* WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.

* Eliasson R. Hellinga F. Lübecke F. (1970). Empfehlungen zur Nomenklatur in der Andrologie. Andrologia. 2 : 1257.

Prueba de lavado hipo osmótico para espermatozoides

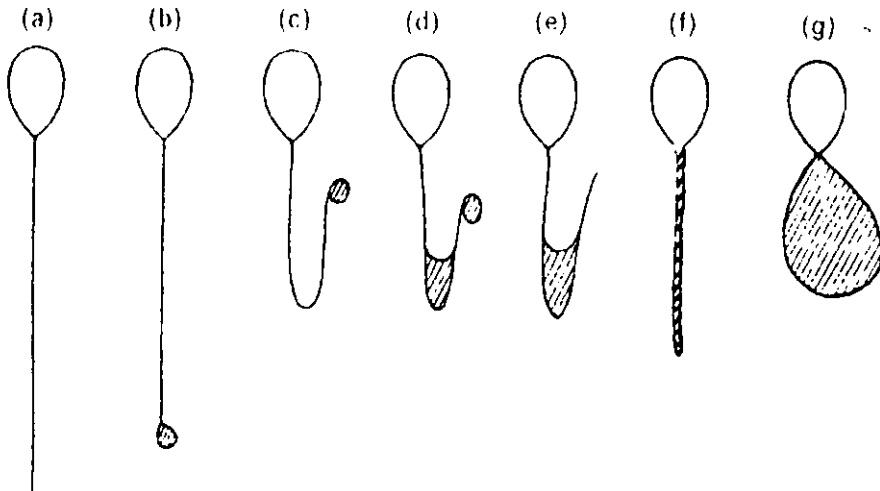


Figura 1. Representación de los cambios morfológicos típicos en los espermatozoides humanos sometidos a estrés hipo-osmótico. (a) sin cambio con alteración en su integridad membranar HOST -, (b-g) varios tipos de reacción a nivel de la cola la cuál muestra hinchamiento indicativo de integridad de membrana HOST +.

* WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.

* Jeyendran R.S Van der H.H & Zaneveld I. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationships to other semen characteristics. *Journal of reproduction and fertility* 70: 219-28.

Integridad acrosomal

El acrosoma proviene de la transformación del aparato de Golgi y de los lisosomas de las células somáticas. Contiene las enzimas requeridas para penetrar al ovocito por degradación de la zona pelúcida. Una evaluación es mediante la utilización de lectinas conjugadas con fluoresceína, las lectinas tienen una alta afinidad por residuos glicosídicos específicos, en la composición de la membrana acrosomal se han cuantificado numerosas glicoproteínas y glicolípidos que forman parte de sistemas receptores celulares.

El control negativo son espermatozoides con integridad acrosomal íntegra. Que después de ser incubados por 30 minutos a 37°C, en una solución de AMPc, en medio Ham F-10. posterior a este procedimiento se observan hasta un 98% de las células carentes de zona acrosomal.

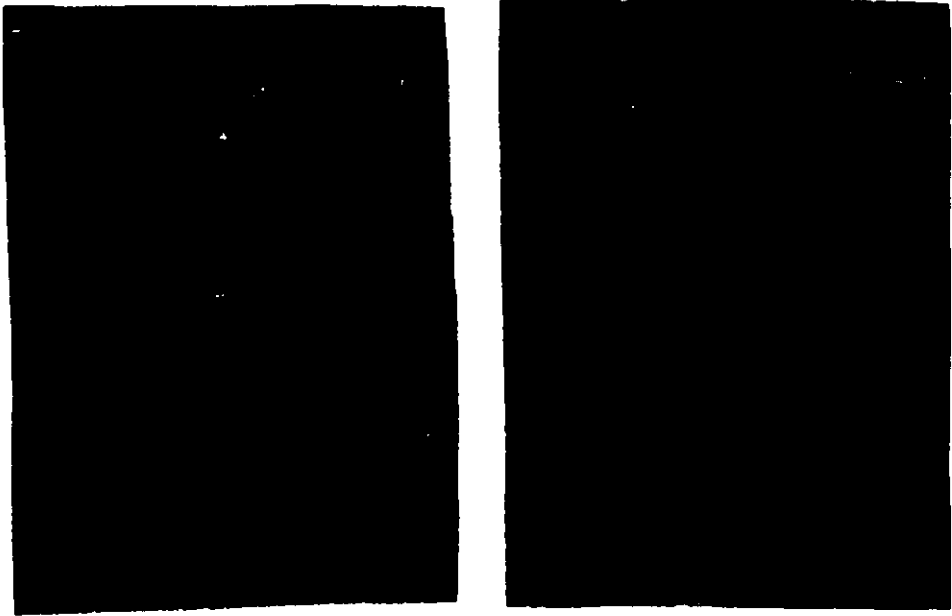


Figura 2. Evaluación de integridad de la membrana acrosomal la figura 2 A. Muestra células con integridad positiva (notar la región acrosomal con mayor intensidad de fluorescencia), 2B muestra células sometidas a tratamiento con AMPc notar la ausencia apical de la fluorescencia. Microscopía de fluorescencia 100X.

*Talbot P. Chacon R. (1981). A new procedure for rapidly scoring acrosome reactions of human sperm. Gamete Res 3:211

*CrossNL. Overstreet J (1986). Two simple methods for detecting acrosoma reacted human sperm. Gamete Res 15: 213.

Criterios para evaluación de la morfología espermática

Cabeza

Forma
Acrosoma

Oval, borde regular
debe cubrir $\approx 1/3$ de la Superficie.

Dimensiones normales

Largo
Ancho

3-5 μm
2-3 μm

Ancho de la cabeza

entre $1/2$ y $2/3$ del largo

Forma oval sin anomalías
Gruesas

Normal

Cuello

Implantación Abaxial

Pieza media

Delgada
 $1/3$ de ancho de la cabeza
Aprox. 7-8 μm de largo
Recta
Gota $< 1/2$ del tamaño de la cabeza

Cola

Delgada, sin enrollar borde regular
45 μm de largo

* WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.

(Prueba de penetración del huevo de hamster) SPA

En el presente apartado se presentan aspectos generales de la prueba de penetración de Huevo de hamster. Como son medios de cultivo, aspecto de los ovocitos inmaduros y Maduros. Valores de referencia.

Componente (reactivo grado analítico)	Cantidad
Na Cl	5.540 g/l
K Cl	0.356 g/l
Ca Cl ₂ · 2 H ₂ O	0.250 g/l
KH ₂ PO ₄	0.162 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.294 g/l
Rojo de fenol	1.0 ml/l

Tabla 2. Componentes de la solución stock del medio BWB con un pH 7.3 y osmolaridad de 280-310 mOsm. Utilizada en la prueba de penetración de huevo de hamster.

Valores de referencia de la prueba de SPA

Grupo	Clasificación	Cantidad espermática Inicial (X10 ⁶ /ml)	Tiempo de pre incubación (horas)	Movilidad espermatica momento de la siembra	Valor de penetración %
1	Fértiles	129.71 +/- 39.43	3.62 +/- 0.51	67.94 +/- 10.16	61.24 +/- 21.08
2	Voluntarios Pacientes con problemas de infertilidad	95.80 +/- 41.39	4.47 +/- 0.86	67.22 +/- 11.11	31.85 +/- 27.12

Tabla 3. Análisis de la función espermática a 2 diferentes estados de fertilidad. Valores Medios +/- Sdx. tomada de Peters J. Menezes J. Hinduja I. (1986). Sperm penetration Assay in the assessment of male infertility. Int. J. Of Androl suppl 6.

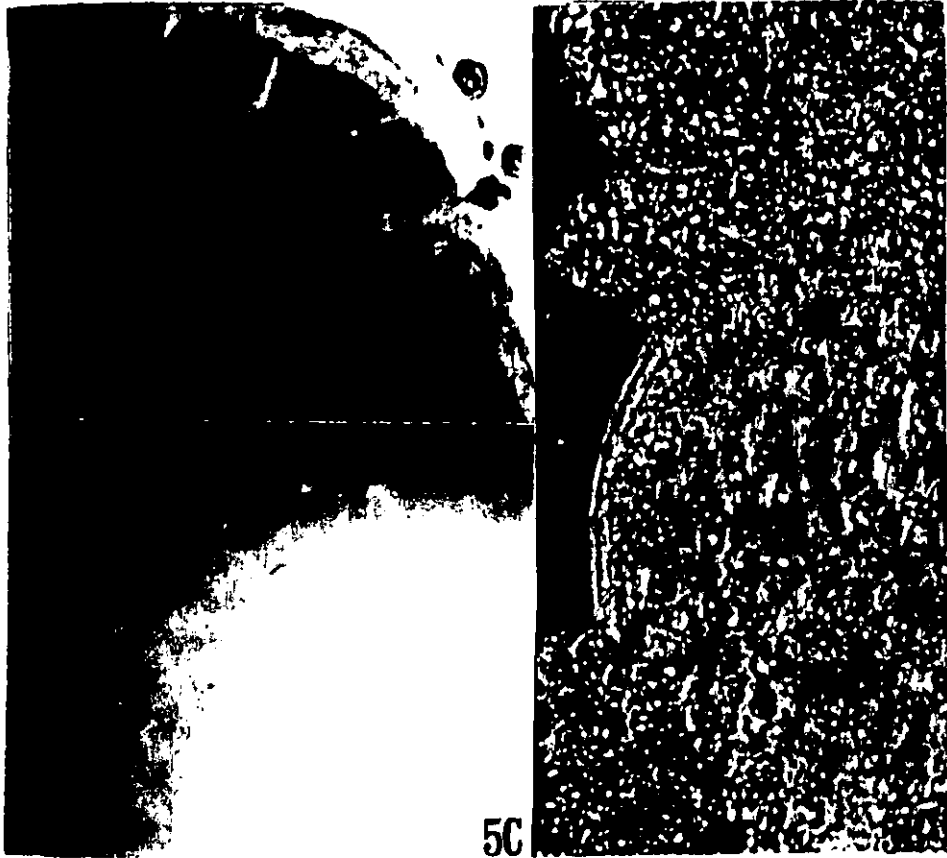


Figura 3 A. Aspecto de ovocito de hamster maduro. Microscopía de luz 100X.
Figura 3 B. Aspecto de ovocito de hamster inmaduro presencia de células vesciculares
Figura 3 C. Ovocito de hamster en presencia de células de la granulosa. Microscopía de
contraste de fases 4

Clasificación del ciclo estral en la hembra hamster siria dorada Cricetus auratus

Identificación del ciclo Pro estro Identificada por Vagina manchada	Duración en horas 3	Células epiteliales Células escamosas, larga no nucleadas tinción rosa con eosina.	Leucocitos Ausentes	Modelo de conducta Los animales no son sexualmente receptivos.
Estro	12	Disminución de las células no nucleadas. Aparecen células nucleadas, así como células columnares o elongadas	Ausentes	Animales receptivos a actividad sexual A lo largo del periodo.
Descarga vaginal post-ovulatoria	Fin del estro	Masas de células nucleadas ovoides o elongadas, algunas no nucleadas	Ausentes	
Metaestro	4	Células nucleadas ovoides presentes inicialmente	Algunos comienzan a aparecer	La respuesta al apareamiento comienza a desaparecer.
Diestro	75+	Grandes cantidades de células no teñibles en números reducidos	Abundantes	Los animales no muestran conducta de apareamiento

Tabla 4. Características principales del ciclo estral de la hamster golden (Hafez, E.S. Reproduction and Breeding techniques for laboratory animals. Lea & Febíger. Philadelphia 1970)

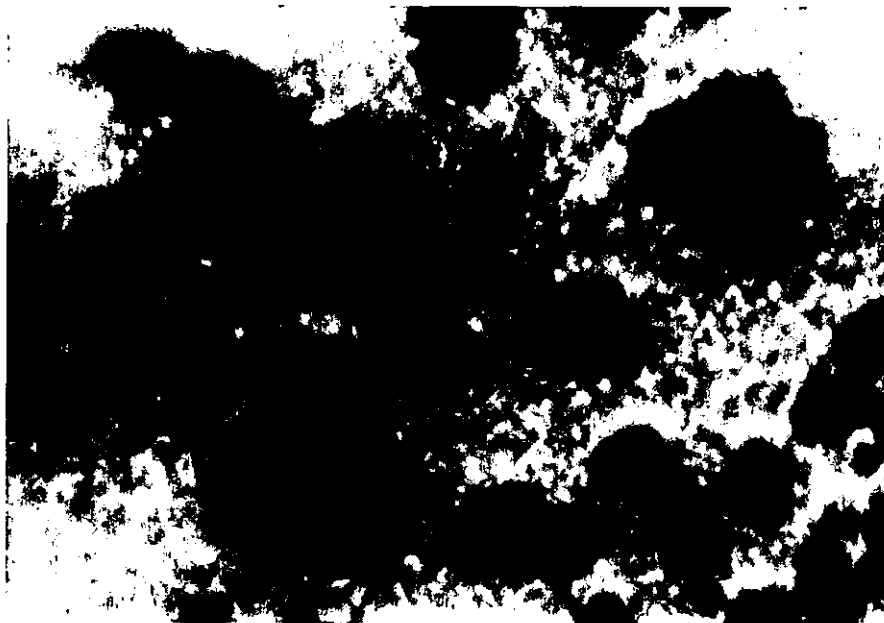
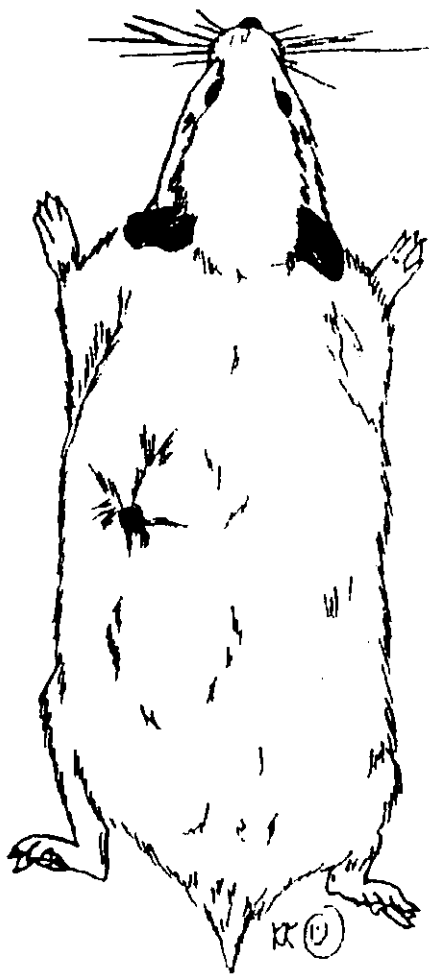
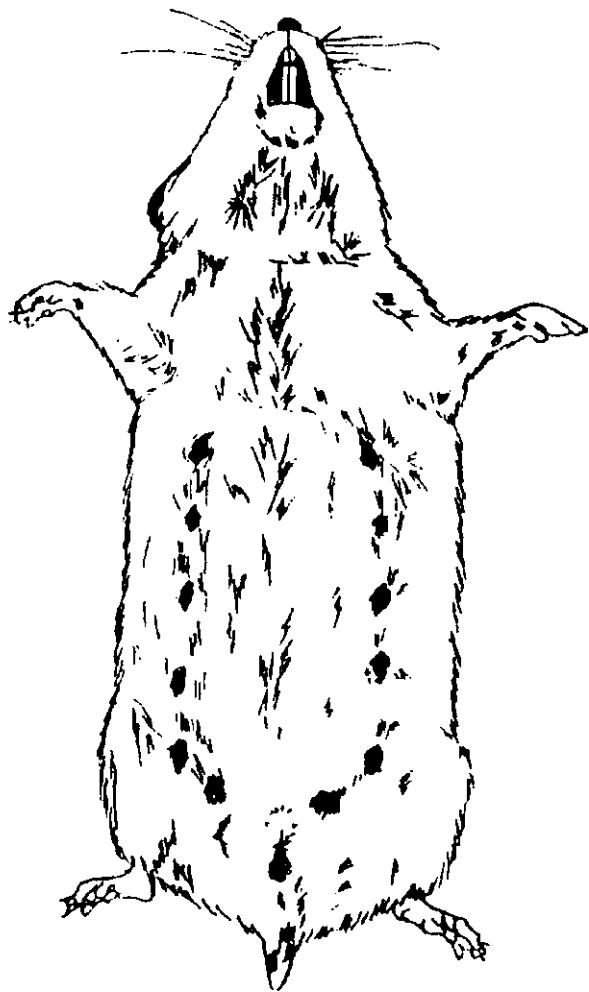


Figura 4. Citología vaginal de una hembra hamster en estadio, Diestro donde se aprecian claramente la elevada concentración de leucocitos, característicos del estadio. Lavado vaginal con solución salina y técnica de tinción P.A.P a microscopia de luz 100X.



♀
dorsal



♀
ventral

Figura 5. Representación de una hembra adulta hamster siria dorada 5 a. en posición dorsal y 5 b. en posición ventral forma en la cuál se realiza la cirugía para la extracción del aparato reproductor para la obtención de ovocitos.



Figura 6. Manejo del animal para examinación de la descarga vaginal para estimar el estado del ciclo estral. De la hembra hamster dorada siria. a) La hamster es transferida a un bote limpio para inicio del manejo. b) inicio del procedimiento la hembra es inutilizada para morder. c) es colocada en posición ineversa para examinar el orificio vaginal. El cuerpo es apoyado con la palma de la mano. d) una variante de la posición inversa sujetando la región posterior de la hembra con 3 dedos incluyendo a la cola. e) Perineum en el día 1 después del estro. f) Perineum en el cuál se muestran una pequeña mancha en la corteza de una hamster aciclica. g) Perineum y descarga post-ovulatoria día 2. h) presencia del tapón de copulación parcialmente extruído por una presión gentil. i) Tapón de copulación completamente extruído de la vagina.

Reacción del Nitro azul de tetrazolium con las especies de oxígeno reactivo.

No estimulados-----> Sin formación de
Depositos de formazan

Neutrófilos normales ----->
+ NBT

Estimulados -----> Presencia de depositos de
Formazán.

NBT + EOR -----> Azul de Formazán
(Amarillo pálido) (Azú-violetaceo evaluado a 630 nm)

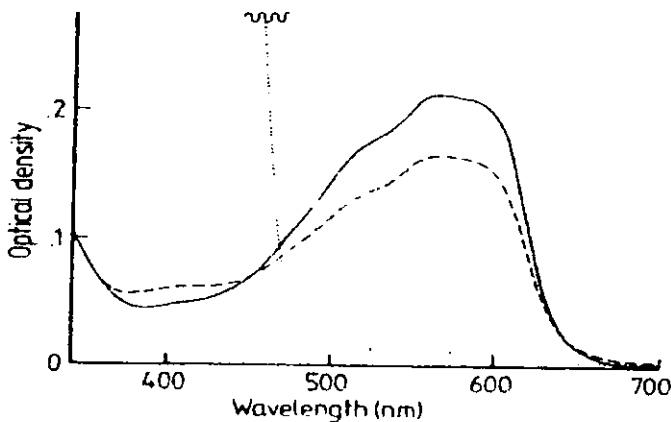


Figura 7. Ejemplo de un espectro de Absorción del NBT y Formazán utilizando NBT 1mg/ml (----). Y formazan (____) disuelto en una solución de 1/1 BSS e isopropanol. En el caso de la mezcla de formazan se uso una mezcla (1/1) de BSS e isopropanol con ácido clorídrico (0.04N) que fue utilizado como solvente (.....).en este caso la absorción óptima es a los 550 nm, para nuestras condiciones experimentales fue a los 630 nm, gráfica tomada de Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. J of Immun Method. 89:271-277.1986.

Análisis Estadístico

Análisis estadístico

Los resultados de las biometrías practicadas a los voluntarios, para la obtención de leucocitos polimorfo nucleares se presentan en la tabla 1

Parámetro Sanguíneo	Media	Varianza	Sdx	SE	C.V %	Valor de referencia
WBC	7.230	1.193	1.092	0.244	15.105	7.5
LYM	1.911	0.089	0.298	0.067	15.581	1.8
RA	5.050	1.064	1.031	0.231	20.423	5.0
RBC	4.804	0.0000	0.017	0.004	0.347	4.8
HGB	14.580	0.343	0.585	0.131	4.015	15
HCT	42.940	2.640	1.625	0.363	3.784	40
MCV	90.600	6.990	2.644	0.591	2.918	90
HCH	31.005	1.389	1.179	0.264	3.801	31
CHL	33.825	2.842	1.686	0.377	4.984	33
PLT	312.5	909.947	30.165	6.745	9.653	315

Tabla 1 Estadística descriptiva de n = 50 de los valores de biometría hemática de los voluntarios en la presente tabla sólo fueron incluidas las voluntarias ya que representaron el 85% del total de las muestras donde WBC:leucocitos monocitos LYM: linfocitos, RA: eritrocitos RBC:leucocitos eosinófilos HGB hemoglobina HCT: hematocrito MCV:volumen celular medio.HCH elementos figurados de la sangre humana. PLT: plaquetas

WBC: 7.0 K/uL

LYM: 1.4 19.8 %L

RA: 5.6 80.2 %G

RBC: 4.81 M/uL

HGB: 13.8 g/dL

HCT: 41.4 %

MCV: 86. fL

MCH: 28.7 pg

MCHC: 33.3 g/dL

PLT: 342. K/uL

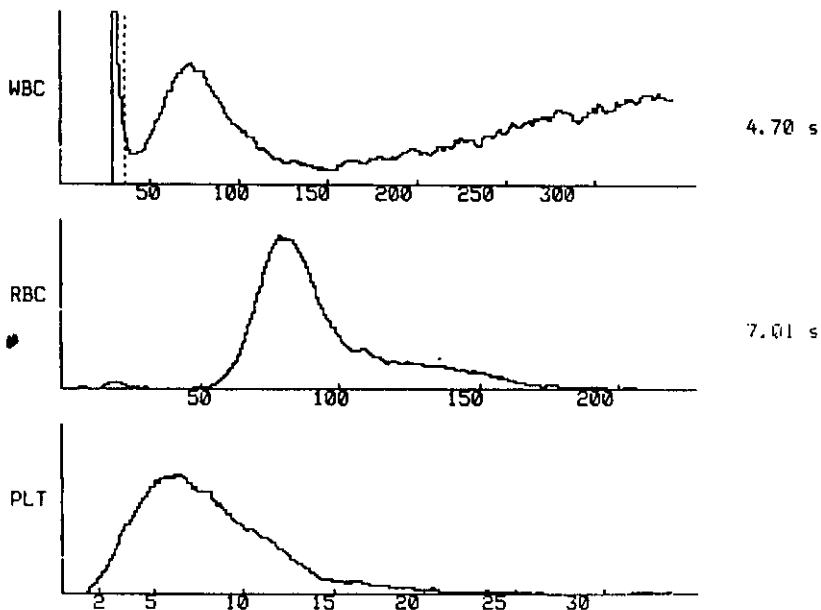


Figura 1. Hoja de resultados obtenidos por medición automatizada de la biometría hemática de un voluntario sano

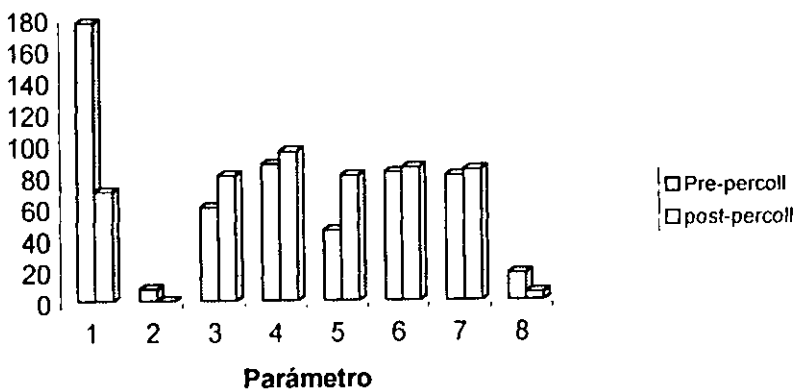
Análisis del semen

El análisis de las muestras de los voluntarios normozoospermicos con fertilidad probada participantes en el estudio se presentan en la tabla 2.

Parámetro	Valores previos a ser seleccionados por gradientes de percoll	Valores posteriores a ser seleccionados por gradientes de percoll.
Volumen del semen (ml)	2.0 +/- 0.9	-
Concentración espermática En millones por ml	176.9 +/- 92.6	70.0 +/- 15.0
Concentración espermática Millones por eyaculado	307.5 +/- 187.9	-
Célula inmaduras Millones por ml	8.0 +/- 4.7	0.05 +/- 0.025
Movilidad espermática Progresiva rápida %	60.0 +/- 7.5	80.0 +/- 5.0
Viabilidad (%)	87.5 +/- 3.8	95.0 +/- 3.0
Morfología normal (%)	45.0 +/- 6.3	80 +/- 3.6
Valor de HOST (%)	82.0 +/- 10.6	85.0 +/- 5.0
Integridad de la membrana Acrosomal (%)	80.0 +/- 10.8	83.5 +/- 3.0
Daño celular (% con daño)	17.5 +/- 5.9	5.0 +/- 3.9

Tabla 2. Representación de los valores medios con su respectiva desviación estandar de los parámetros convencionales y de funcionalidad analizados en las espermatobioscopias de n = 85 muestras, previo a los montajes experimentales.

Análisis de semen humano



Gráfica 1. Valores medios de los parámetros convencionales y de funcionalidad espermática antes y después de ser separados por gradientes discontinuos de percoll. Donde: 1.cuenta espermática /ml. 2 presencia de células inmaduras.3 movilidad progresiva rápida. 4.viabilidad espermática.5. morfología normal. 6 HOST. 7.Integridad acrosomal.8 daño celular espermático.

Efecto de poblaciones de leucocitos polimorfo nucleares sin estimulación sobre la funcionalidad espermática.

El propósito de esta serie experimental fue establecer los posibles efectos de poblaciones de leucocitos polimorfo nucleares sin estimulación sobre la funcionalidad de los espermatozoides.

Los resultados obtenidos de la medición de los parámetros: viabilidad, movilidad general, movilidad progresiva rápida, integridad de la membrana e integridad acrosomal de 12 experimentos no presentan distribución normal por lo que los datos fueron estandarizados mediante la aplicación de logaritmo en base 10. Las pruebas estadísticas utilizadas en esta serie fueron ANOVA y Prueba t de student ambas pruebas con una probabilidad de $\alpha = 0.05\%$. (programa Statquik 1998)

Tratamiento	Viabilidad	Mov. gral	Mov. tipo a	HOST	Integ. Acros.
Control	4.50	6.83	6.20	2.22	3.09
PMN + Espermatozoides	3.24	6.82	2.34	1.6	1.05
Valor de F. De tablas	4.67	7.35	6.25	2.24	3.15

Tabla 3. Valores de F calculados registrados a partir de la prueba de ANOVA con un $\alpha = 0.05\%$, entre las diferentes concentraciones y proporciones de PMN sin activar y espermatozoides incubados 2:1 Experimentos 1, 2, 3 y 9, 5:1 experimentos 5, 6 y 7 10:1 experimentos 8, 11, y 12, 20:1 experimento 4. En todos los casos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las proporciones utilizadas y los parámetros.

Tratamiento	Viabilidad	Mov. Gral	Mov. tipo a	HOST	Integ. Acros.
Control					
Vs PMN	0.77	0.92	0.10	0.93	0.99
Tiempo 0min					
Control					
Vs PMN	0.72	1.33	1.09	0.95	1.26
90 minutos					
Valor de					
Tablas	1.71	1.71	1.71	1.71	1.71

Tabla 4. Valores de t con un $\alpha = 0.05\%$ para establecer diferencias significativas entre el grupo control y el tratamiento (incubación con PMN sin activar) en el tiempo 0 y 90, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en los minutos de incubación analizados, en los parámetros de funcionalidad considerados en el estudio

Tratamiento	Viabilidad	Mov. Gral	Mov. Tipo a	HOST	Integ. Acros
Control	0.53	3.31*	2.22*	1.40	1.20
0 a 90 min					
Espermatozoides + PMN	1.04	3.74*	2.60*	1.11	1.00
0 a 90 min					
T de tablas	1.71	1.71	1.71	1.71	1.71

Tabla 5. Valores estadísticos de t con un $\alpha = 0.05\%$, para establecer el posible efecto de tiempo de incubación de 0 a 90 minutos. Por separado fueron analizados el grupo control en el tiempo 0 hasta 90 minutos y espermatozoides + PMN en el tiempo 0 hasta los 90 minutos de incubación. Se registraron diferencias estadísticas en ambas condiciones en los parámetros de movilidad general y movilidad tipo a (progresiva rápida). (*)denota significancia estadística.

Efecto de las especies de oxígeno reactivo sobre la funcionalidad espermática

El objetivo de esta serie experimental fue establecer los posibles efectos de las especies de oxígeno reactivo y el efecto de la proporción celular sobre la funcionalidad espermática. A partir de la incubación de diferentes concentraciones espermáticas así como de poblaciones de leucocitos polimorfo nucleares estimulados con un ester de forbol.

Los resultados de la medición de los parámetros viabilidad, movilidad general, movilidad progresiva rápida, integridad de la membrana e integridad acrosomal de 17 experimentos no presentan distribución normal por lo que los datos fueron estandarizados mediante la aplicación de logaritmo en base 10. Las pruebas estadísticas

utilizadas en esta serie fueron ANOVA y Prueba t de student ambas pruebas con una probabilidad de $\alpha=0.05\%$. (programa Statquik 1998)

Propor- Ción. Celular	Tratam 1 Media	Tratam 1 Sdx +/-	Tratam. 2 Media	Tratam. 2 Sdx +/-	Tratam 3 Media	Tratam. 3 Sdx +/-	Tratam 4 Media	Tratam 4 Sdx +/-
1:1 E:PMN	92.86	2.67	93.50	3.10	85.00	2.88	29.43	8.10
2:1 E:PMN	84.14	3.86	87.50	4.62	78.75	3.63	30.00	4.86
5:1 E:PMN	84.54	3.40	86.54	2.89	81.19	3.10	32.00	4.26
10:1 E:PMN	84.09	3.30	89.65	2.49	83.94	3.12	42.21	7.80
20:1 E:PMN	85.47	4.23	84.79	5.99	84.54	4.61	46.71	8.40

Tabla 6.1 Valores de estadística descriptiva (media y desviación estándar Sdx), para el parámetro de Viabilidad, en las diferentes proporciones utilizadas donde: tratamiento 1 es el control Espermatozoides en medio Ham F-10, Tratamiento 2. Espermatozoides con PMA, Tratamiento 3 Espermatozoides con PMN y Tratamiento 4. Espermatozoides con PMN y estimulados con PMA.

Propor- Ción celular	Tratamie ntos 1 vs 2	Tratamie ntos. 1 vs 3	Tratamie ntos 1 vs 4	Tratamie ntos 2 vs 3	Tratamie ntos 2 vs 4	Tratamie ntos 3 vs 4	Valor de F. de tablas.
1:1	7.85	7.15	63.42*	8.00	56.33*	55.57*	21.67
2:1	5.39	4.78	53.94*	6.92	48.23*	50.25*	21.67
5:1	4.83	3.35	52.54*	4.58	49.18*	52.15*	21.67
10:1	0.98	0.14	41.87*	1.00	41.52*	41.72*	21.67
20:1	0.94	0.93	38.75*	1.60	39.15*	37.82*	21.67

Tabla 6.2 Valores obtenidos a partir de la prueba(ANOVA $\alpha=0.05\%$) : para establecer el posible efecto de las células estimuladas con ester de forbol (PMA), así como efecto de los leucocitos polimorfo nucleares activados sobre la viabilidad espermática, en las diferentes proporciones celulares estudiadas. Tratamiento 1. Espermatozoides
Tratamiento 2. Espermatozoides +PMA Tratamiento 3. Espermatozoides +PMN y
Tratamiento 4. Espermatozoides +PMN+PMA.

Los valores registrados(*) representan diferencias estadísticamente significativas (F calculada Vs F de tablas).

Tiempo	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	120 min	Valor F
1:1	1.66	6.66	8.33	17.63*	19.0*	19.0*	14.26
2:1	4.00	11.24	11.83	13.91	15.50*	18.5*	14.26
5:1	7.23	10.39	13.19	13.90	13.86*	16.8*	14.26
10:1	5.39	9.03	13.70	11.63	21.2*	24.6*	14.26
20:1	0.95	1.50	0.50	10.66	16.91*	22.9*	14.26

Tabla 6.3 Efecto del tiempo de incubación sobre la viabilidad espermática para el tratamiento 4 Espermatozoides+PMN+PMA. (ANOVA $\alpha=0.05$) Los valores registrados (*) representan diferencias estadísticamente significativas (F calculada vs F de tablas) Valores registrados a partir de la medición inicial a los 15 minutos de incubación.

Proporción	1:1	2:1	5:1	10:1	Valor de F.
2:1	4.79*				
5:1	4.68*	1.60			
10:1	4.36*	5.77*	4.16*		
20:1	3.98*	7.93*	6.32*	2.16	3.89

Tabla 6.4 Efecto de la proporción celular sobre la viabilidad espermática para el tratamiento 4 Espermatozoides+PMN+PMA (ANOVA $\alpha=0.05\%$). Los valores Registrados (*) representan diferencias estadísticamente significativas. (F calculada vs F de tablas).

Propor. Celular	Tratam. 1	Tratam. 1	Tratam. 2	Tratam. 2	Tratam. 3	Tratam. 3	Tratam. 4	Tratam. 4
E:PMN	Media	Sdx +/-	Media	Sdx +/-	Media	Sdx +/-	Media	Sdx +/-
1:1	81.18	9.11	85.07	7.10	76.54	9.94	25.05	9.78
2:1	76.46	1.36	81.17	7.71	76.96	1.25	23.93	5.97
5:1	81.70	4.36	84.75	6.29	80.78	7.28	26.42	6.31
10:1	78.80	8.68	82.75	8.92	75.78	9.57	25.53	4.65
20:1	82.86	2.40	82.67	2.24	80.22	2.42	28.29	6.55

Tabla 7.1 valores de estadística descriptiva (media y desviación estándar), para el parámetro de Movilidad general. Para cada una de las diferentes proporciones celulares utilizadas y donde tratamiento 1 control Espermatozoides en medio Ham10. Tratamiento 2. Espermatozoides con PMA. Tratamiento 3 Espermatozoides con PMN y Tratamiento 4. Espermatozoides con PMN y estimulados con PMA.

Propor- ción celular	Tratamie ntos 1 vs 2	Tratamie ntos. 1 vs 3	Tratamie ntos 1 vs 4	Tratamie ntos 2 vs 3	Tratamie ntos 2 vs 4	Tratamie ntos 3 vs 4	Valor de F. de tablas.
1:1	3.21	5.32	22.05*	8.53	23.05*	25.05*	14.81
2:1	4.70	0.50	53.12*	4.20	57.83*	53.62*	14.81
5:1	3.05	0.92	65.28*	3.97	68.33*	64.33*	14.81
10:1	0.73	4.27	63.05*	3.27	64.05*	58.57*	14.81
20:1	0.18	2.63	64.57*	2.44	64.38*	61.93*	14.81

Tabla 7.2 Valores registrados a partir de la prueba (ANOVA $\alpha=0.05\%$), para establecer el posible efecto de las células estimuladas con ester de forbol (PMA), así como efecto de los leucocitos polimorfo nucleares activados sobre la movilidad general espermática en las diferentes proporciones celulares estudiadas. Tratamiento 1. Espermatozoides Tratamiento 2. Espermatozoides +PMA Tratamiento 3. Espermatozoides +PMN y Tratamiento 4. Espermatozoides+PMN+PMA

Los valores registrados(*) representan diferencias estadísticamente significativas (F calculada Vs F de tablas)

Tiempo	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	120 min	Valor F
1:1	3.08*	2.33*	3.33*	1.0	0.33	0.33	1.18
2:1	3.68	4.31	6.5*	10.43*	13.81*	16.25*	4.78
5:1	2.17	3.12	5.70*	9.07*	9.65*	9.80*	4.78
10:1	0.73	4.27	5.20*	8.54*	8.95*	12.80*	4.78
20:1	1.21	4.67*	10.92*	12.67*	18.92*	18.17*	4.52

Tabla 7.3 Efecto del tiempo de incubación sobre la movilidad general espermática para el tratamiento 4 Espermatozoides+PMN+PMA. (ANOVA $\alpha=0.05$), los valores registrados (*) representan diferencias estadísticamente significativas (F calculada vs F de tablas) Valores registrados a partir de la medición inicial a los 15 minutos de incubación.

Proporción	1:1	2:1	5:1	10:1	Valor de F.
2:1	2.33*				
5:1	1.45*	3.78*			
10:1	1.35*	1.08	2.70*		
20:1	1.31*	3.88*	9.75*	2.80*	1.29

Tabla 7.4 Efecto de la proporción celular sobre la movilidad general espermática para el tratamiento 4 Espermatozoides+PMN+PMA (ANOVA $\alpha=0.05\%$). Los valores Registrados(*) representan diferencias estadísticamente significativas. (F calculada vs F de tablas).

Propor. Celular	Tratam. 1	Tratam. 1	Tratam. 2	Tratam. 2	Tratam. 3	Tratam. 3	Tratam. 4	Tratam. 4
E:PMN	Media	Sdx +/-	Media	Sdx +/-	Media	Sdx +/-	Media	Sdx +/-
1:1	76.0	1.30	78.43	1.70	71.57	7.82	10.72	2.36
2:1	73.5	1.28	76.23	1.03	70.29	8.32	20.22	2.12
5:1	70.21	1.20	74.50	1.04	69.71	9.53	26.29	2.08
10:1	71.57	7.38	77.11	7.46	70.03	7.50	28.37	5.22
20:1	76.57	2.15	78.16	2.25	72.43	3.30	35.72	2.36

Tabla 8.1 Valores de estadística descriptiva (media y desviación estándar), para el parámetro de Movilidad progresiva rápida (tipo a), para cada una de las diferentes proporciones celulares utilizadas y donde tratamiento 1 es el control Espermatozoides sin estímulo y sin PMN. Tratamiento 2. Espermatozoides con PMA. Tratamiento 3 Espermatozoides con PMN y Tratamiento 4. Espermatozoides con PMN y estimulados con PMA

Propor-Ción celular	Tratamie ntos 1 vs 2	Tratamie ntos. 1 vs 3	Tratamie ntos 1 vs 4	Tratamie ntos 2 vs 3	Tratamie ntos 2 vs 4	Tratamie ntos 3 vs 4	Valor de F. de tablas.
1:1	2.42	4.42	72.42*	6.857	74.85*	67.99*	12.42
2:1	3.52	4.38	81.75*	6.28	87.32*	72.85*	12.42
5:1	14.28*	0.50	67.28*	14.78*	71.57*	66.78*	12.42
10:1	15.54*	1.00	61.19*	16.74*	66.74*	59.99*	12.42
20:1	14.14*	1.14	72.99*	15.73*	74.59*	68.85*	12.42

Tabla 8.2 Valores registrados a partir de la prueba(ANOVA $\alpha=0.05\%$), para establecer el posible efecto de las células estimuladas con ester de forbol (PMA), así como efecto de los leucocitos polimorfo nucleares activados sobre la movilidad progresiva rápida espermática en las diferentes proporciones celulares estudiadas. Tratamiento 1. Espermatozoides sin activación. Tratamiento 2. Espermatozoides +PMA Tratamiento 3. Espermatozoides +PMN y Tratamiento 4. Espermatozoides+PMN+PM. Los valores registrados (*)representan diferencias estadísticamente significativas (F calculada Vs F de tablas)

Tiempo	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	120 min	Valor F
1:1	18.50*	21.50*	19.30*	18.50*	19.50*	23.00*	3.26
2:1	15.20*	18.50*	17.40*	15.20*	11.50*	13.20*	3.26
5:1	5.24*	5.68*	7.43*	6.68*	7.62*	8.68*	3.26
10:1	3.62*	5.50*	7.14*	6.24*	4.09*	7.04*	3.26
20:1	3.25*	4.24*	6.24*	5.71*	3.24*	6.24*	3.20

Tabla 8.3 Efecto del tiempo de incubación sobre la movilidad tipo progresiva rápida para el tratamiento 4 Espermatozoides+PMN+PMA. (ANOVA $\alpha=0.05$) Los valores registrados (*)representan diferencias estadísticamente significativas (F calculada vs F de tablas) Valores registrados a partir de la medición inicial a los 15 minutos de incubación.

Proporción	1:1	2:1	5:1	10:1	Valor de F
2:1	2.86				
5:1	4.0	1.63			
10:1	8.17*	5.30*	3.67		
20:1	5.0*	4.90*	3.54	2.21	4.01

Tabla 8.4 Efecto de la proporción celular sobre la movilidad progresiva rápida para el tratamiento 4 Espermatozoides+PMN+PMA (ANOVA $\alpha=0.05\%$). Los valores Registrados (*) representan diferencias estadísticamente significativas. (F calculada vs F de tablas).

Propor Ción. Celular	Tratam 1 Media	Tratam 1 Sdx+/-	Tratam. 2 Media	Tratam 2 Sdx+/-	Tratam 3 Media	Tratam 3 Sdx+/-	Tratam 4 Media	Tratam. 4 Sdx+/-
1:1 E:PMN	81.86	9.11	83.14	1.14	79.57	9.96	16.0	3.81
2:1 E:PMN	77.93	4.35	79.43	9.20	76.54	6.32	23.0	3.46
5:1 E:PMN	81.94	1.31	81.34	6.67	79.11	6.67	27.31	3.90
10:1 E:PMN	79.83	4.64	79.63	2.06	76.40	8.75	35.25	4.17
20:1 E:PMN	83.29	9.68	81.14	7.51	83.57	5.28	28.0	1.98

Tabla 9.1 Valores de estadística descriptiva (media y desviación estándar Sdx), para el parámetro de HOST. En las diferentes proporciones utilizadas y donde tratamiento 1 es el control Espermatozoides sin estímulo y sin PMN. Tratamiento 2. Espermatozoides con PMA. Tratamiento 3 Espermatozoides con PMN y Tratamiento 4. Espermatozoides con PMN y estimulados con PMA

Propor- ción celular	Tratamie ntos 1 vs 2	Tratamie ntos. 1 vs 3	Tratamie ntos 1 vs 4	Tratamie ntos 2 vs 3	Tratamie ntos 2 vs 4	Tratamie ntos 3 vs 4	Valor de F. de tablas.
1:1	1.28	2.25	65.85*	3.57	67.14*	63.57*	16.01
2:1	1.50	1.39	54.92*	2.89	56.42*	53.57*	16.01
5:1	0.60	2.82	54.63*	2.22	54.03*	51.80*	16.01
10:1	0.19	3.42	44.57*	3.22	44.37*	47.14*	16.01
20:1	1.85	0.28	55.28*	2.14	53.42*	53.57*	16.01

Tabla 9.2 Valores registrados a partir de la prueba(ANOVA $\alpha = 0.05\%$), para establecer el posible efecto de las células estimuladas con ester de forbol (PMA), así como efecto de los leucocitos polimorfo nucleares activados sobre HOST + en las diferentes proporciones celulares estudiadas. Tratamiento 1. Espermatozoides sin activación. Tratamiento 2. Espermatozoides +PMA Tratamiento 3. Espermatozoides +PMN y Tratamiento 4. Espermatozoides+PMN+PMA

Los valores registrados (*) representan diferencias estadísticamente significativas (F calculada Vs F de tablas)

Tiempo	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	120 min	Valor F
1:1	2.0	2.75	5.5*	4.75*	9.0*	10.0*	3.21
2:1	3.75*	6.93*	8.5*	8.18*	8.6*	8.8*	3.21
5:1	2.39	6.64*	7.16*	9.39*	10.95*	10.49*	3.21
10:1	1.20	0.95	2.90	3.0	7.30*	8.35*	3.21
20:1	1.0	2.5	2.5	3.20	6.0*	5.0*	3.21

Tabla 9.3 Efecto del tiempo de incubación sobre HOST + para el tratamiento 4 Espermatozoides+PMN+PMA. (ANOVA $\alpha = 0.05$), los valores registrados (*) representan diferencias estadísticamente significativas (F calculada vs F de talas) Valores registrados a partir de la medición inicial a los 15 minutos de incubación.

Proporción	1:1	2:1	5:1	10:1	Valor de F.
2:1	0.91				
5:1	2.28	2.30			
10:1	2.63*	3.55*	0.35		
20:1	3.85*	4.77*	1.57	1.22	2.38

Tabla 9.4 Efecto de la proporción celular sobre HOST+ espermática para el tratamiento 4 Espermatozoides+PMN+PMA (ANOVA $\alpha = 0.05\%$). Los valores Registrados (*) representan diferencias estadísticamente significativas. (F calculada vs F de tablas).

Propor- Ción Celular	Tratam 1 Media	Tratam 1 Sdx +/-	Tratam. 2 Media	Tratam 2 Sdx +/-	Tratam 3 Media	Tratam 3 Sdx +/-	Tratam 4 Media	Tratam. 4 Sdx +/-
1:1 E:PMN	80.57	1.13	79.14	1.13	75.43	1.64	20.14	2.29
2:1 E:PMN	80.64	6.31	78.79	1.17	74.71	1.00	23.11	1.46
5:1 E:PMN	80.09	9.37	78.51	7.74	73.43	9.94	27.03	3.83
10:1 E:PMN	79.46	7.92	79.09	4.61	74.09	9.71	39.66	6.49
20:1 E:PMN	80.86	9.11	78.71	6.80	73.57	0.82	49.14	7.34

Tabla 10.1 Valores de estadística descriptiva (media y desviación estándar Sdx), para el parámetro de Integridad Acrosomal. En las diferentes proporciones utilizadas y donde tratamiento 1 control Espermatozoides sin estímulo y sin PMN. Tratamiento 2. Espermatozoides con PMA. Tratamiento 3 Espermatozoides con PMN y Tratamiento 4. Espermatozoides con PMN y estimulados con PMA.

Propor- Ción celular	Tratamie ntos 1 vs 2	Tratamie ntos. 1 vs 3	Tratamie ntos 1 vs 4	Tratamie ntos 2 vs 3	Tratamie ntos 2 vs 4	Tratamie ntos 3 vs 4	Valor de F. de tablas.
1:1	1.42	5.14	60.42*	3.71	59.0*	55.28*	14.29
2:1	1.85	5.92	57.53*	4.07	55.67*	51.60*	14.29
5:1	1.57	6.65	53.05*	5.08	51.48*	46.40*	14.29
10:1	0.37	5.37	39.8*	5.0	39.42*	34.92*	14.29
20:1	2.14	7.28	31.71*	5.14	29.57*	24.42*	14.29

Tabla 10.2 Valores registrados a partir de la prueba (ANOVA $\alpha = 0.05\%$) para establecer el posible efecto de las células estimuladas con ester de forbol (PMA), así como efecto de los leucocitos polimorfo nucleares activados sobre la Integridad Acrosomal en las diferentes proporciones celulares estudiadas. Tratamiento 1. Espermatozoides sin activación. Tratamiento 2. Espermatozoides +PMA Tratamiento 3. Espermatozoides +PMN y Tratamiento 4. Espermatozoides+PMN+PMA
Los valores registrados (*) representan diferencias estadísticamente significativas (F calculada Vs F de tablas).

Tiempo	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	120 min	Valor F
1:1	1.07	0.25	2.75	0.25	5.25*	4.75*	2.83
2:1	2.68	2.37	2.12	2.18	5.65*	5.12*	2.83
5:1	2.56	2.80	2.56	8.05*	9.85*	11.85*	2.83
10:1	2.60	2.79	2.90	2.80	13.70*	16.0*	2.83
20:1	2.53	2.51	2.49	2.75	17.20*	14.5*	2.83

Tabla 10.3 Efecto del tiempo de incubación sobre la Integridad Acrosomal para el tratamiento 4 Espermatozoides+PMN+PMA. (ANOVA $\alpha=0.05$) Los valores registrados (*) representan diferencias estadísticamente significativas (F calculada vs F de tablas) Valores registrados a partir de la medición inicial a los 15 minutos de incubación.

Proporción	1:1	2:1	5:1	10:1	Valor de F.
2:1	0.49				
5:1	0.94	0.45			
10:1	4.25*	3.76	3.30		
20:1	6.00*	5.50*	5.05*	1.74	3.78

Tabla 10.4 Efecto de la proporción celular sobre la Integridad Acrosomal espermática para el tratamiento 4 Espermatozoides+PMN+PMA (ANOVA $\alpha=0.05\%$). Los valores Registrados en (*) representan diferencias estadísticamente significativas. (F calculada vs F de tablas).

Evaluación de daño celular en poblaciones de leucocitos PMN por efecto de la estimulación con PMA y efecto antioxidante del Trolox .

El objetivo principal de esta serie experimental consistió en evaluar el posible daño celular en poblaciones de leucocitos PMN mediante técnica histoquímica con nitro azul de tetrazolium para microscopía de luz a 100X de aumento. Debido a que son mediciones cuyas variables son del tipo discreto, los resultados de los 10 experimentos realizados fueron analizados con pruebas no paramétricas Kruskal - Wallis (F) y prueba t con niveles de confianza del $\alpha=0.05\%$.

(programa estadístico statquik 1998)

Tratamiento	Control PMN (1)		PMN+PMA (2)		PMN+PMA+Trolox(3)	
Tiempo	Media	Sdx +/-	Media	Sdx +/-	Media	Sdx +/-
15 minutos	16.0	1.6	45.0	2.4	40.6	3.76
30 minutos	18.6	2.04	57.8	12.58	43.4	5.4
45 minutos	19.9	2.85	61.53	11.02	44.53	4.56
60 minutos	21.33	3.4	64.55	10.0	48.15	6.36
90 minutos	21.95	3.38	66.60	9.00	52.12	9.10
120 min	22.44	2.70	72.32	2.38	57.72	9.41

Tabla 11.1 Valores medios y de desviación estándar (Sdx), de cada uno de los Tratamientos para establecer el posible daño celular por efecto de la estimulación y tiempo de incubación, el criterio fue cambios en la morfología de los leucocitos polimorfo nucleares.

Tratamientos	1 contra 2	1 contra 3	2 contra 3
Valor t calculado	2.84E-05*	1.99E-05*	0.0008
Valor de tablas ($\alpha=0.05\%$)	1.94	1.94	1.94

Tabla 11.2 Resultados de la prueba estadística aplicada (t no paramétrica) con un intervalo de confianza del 95%, para establecer el posible efecto del tratamiento en la morfología celular. En donde 1 (control PMN en medio HamF-10) 2 (PMN+ estimulado con PMA) 3 (PMN+PMA+Trolox). Los valores (*) denotan significancia estadística con respecto al valor de Tablas.

Intervalo de tiempo de incubación en minutos	Valores de t calculados para PMN (1) Control	Valores de t calculados para PMN+PMA (2)	Valores de t calculados para PMN+PMA+Trolox
De 15 a 30	0.05	4.24 E-05*	0.10
De 15 a 45	0.07	5.54 E-05*	0.14
De 15 a 60	0.004	8.29 E-06*	0.003
De 15 a 90	0.01	1.88 E-05*	0.0006
De 15 a 120	0.02	0.0002	0.0007
Valor F tablas ($\alpha=0.05\%$)	1.85	1.85	1.85

Tabla 11.3 Resultados de la prueba estadística aplicada (Kruskal- Wallis Prueba de F para datos con distribución no paramétrica $\alpha=0.05\%$), para determinar el efecto del tiempo de incubación sobre el daño celular. (*) significancia estadística con respecto al valor de tablas F.

Evaluación del efecto protector de los antioxidantes α -tocoferol y Trolox en la funcionalidad espermática.

El propósito de esta serie experimental consistió en establecer el posible efecto protector de dos antioxidantes sobre la funcionalidad espermática ante la presencia de especies de oxígeno reactivo.

Los resultados de la medición de los parámetros viabilidad, movilidad general, movilidad progresiva rápida, integridad de la membrana, daño celular e integridad acrosomal de 20 experimentos, no presentan distribución normal por lo que los datos fueron estandarizados mediante la aplicación de logaritmo en base 10. Las pruebas estadísticas utilizadas en esta serie fueron ANOVA y Prueba t de student ambas pruebas con una probabilidad de $\alpha = 0.05\%$. (programa Statquik 1998)

Parámetro	Viabilidad				Movilidad General			
	0 minutos		90 minutos		0 minutos		90 minutos	
Tratam	Media	Sdx +/-	Media	Sdx +/-	Media	Sdx +/-	Media	Sdx +/-
E	91.5	4.43	89.40	4.5	81.90	4.69	76.90	5.40
E+PMA	91.5	4.43	87.35	3.08	78.50	3.01	82.75	2.84
E+PMN	92.15	4.38	85.25	6.21	81.65	5.51	74.95	5.40
E+PMA +PMN	91.50*	0.99*	69.3*	2.10*	80.85*	4.38*	15.10*	2.46*
E+PMN +PMA+ Trolox	91.5	4.431	82.5	3.220	82.9	3.97	65.7	1.78
E+PMN +PMA+ Tocofer	91.5	4.451	78.85	1.954	81.25	2.78	71.20	2.44
E+Trol	91.5	4.48	82.75	3.17	77.95	3.42	74.7	3.14
E+Toco	91.5	4.43	84.35	3.57	81.70	4.20	73.65	4.40

Tabla 12.1 Valores medios y de desviación estándar de los parámetros de viabilidad y movilidad general de cada uno de tratamientos. En n= 20 experimentos realizados mediciones a los 0 minutos y 90 de incubación a 37°C los valores (*) representan el tratamiento 4 que presenta los valores de cambio máximo. Donde E. Espermatozoides 10.0×10^6 espermatozoides por ml., PMN. Leucocitos polimorfonucleares 1.0×10^6 células por ml. PMA ester de forbol 1.6×10^{-9} M. Trolox 40 nM, Tocoferol 1.0% (ver tabla 6 de material y métodos)

Parámetro Tiempo	Movilidad Progresiva rápida				Test hipo osmótico			
	0 minutos		90 minutos		0 minutos		90 minutos	
	Media	Sdx +/-	Media	Sdx +/-	Media	Sdx +/-	Media	Sdx +/-
E	72.9	4.14	69.05	4.57	86.5	3.05	84.0	4.66
E+PMA	73.15	2.15	76.35	3.43	78.85	5.80	85.3	3.96
E+PMN	73.0	5.28	69.45	4.48	86.10	3.95	84.40	4.91
E+PMA + PMN	74.70*	4.53*	0*	0*	86.55*	3.74*	23.95*	4.51*
E+PMA +PMN+ Trolox	75.95	3.34	56.55	3.95	86.35	2.85	64.35	2.62
E+PMA +PMN+ Trolox +Tocofer	73.0	2.75	61.35	4.90	86.25	3.37	66.03	1.89
E+Trol	70.2	3.33	63.20	2.77	83.0	3.75	75.65	2.32
E+Toco	72.65	5.80	68.40	4.56	83.6	3.54	82.25	5.31

Tabla 12.2 Valores medios y de desviación estándar de los parámetros de movilidad progresiva rápida y prueba hipo osmótica (HOST) de cada uno de tratamientos. En n= 20 experimentos realizadas mediciones a los 0 minutos y 90 de incubación a 37°C. Donde E. Espermatozoides 10.0×10^6 espermatozoides por ml., PMN. Leucocitos polimorfonucleares 1.0×10^6 células por ml. PMA ester de forbol 1.6×10^{-9} M. Trolox 40 nM, Tocoferol 1.0% (ver tabla 6 de material y métodos)

Parámetro Tiempo	Integridad acrosomal				Daño celular			
	0 minutos		90 minutos		0 minutos		90 minutos	
	Media	Sdx +/-	Media	Sdx +/-	Media	Sdx +/-	Media	Sdx +/-
E	85.5	3.38	85.0	4.34	9.25	2.04	13.30	1.86
E+PMA	81.9	4.53	82.0	4.18	15.0	2.84	24.00	2.24
E+PMN	82.0	5.10	81.05	5.48	8.55	2.37	20.70	6.18
E+PMA + PMN	84.10*	3.41*	24.45*	3.59*	7.06*	2.20*	67.0*	1.89*
E+PMA +PMN+ Trolox	84.95	2.81	66.15	2.34	8.20	3.31	24.65	2.27
E+PMA +PMN+ Trolox +Tocofer	85.4	2.45	65.15	2.00	10.40	1.72	24.90	2.17
E+Trol	80.9	6.15	79.15	5.25	10.55	3.87	23.70	2.15
E+Toco	84.05	3.84	78.15	3.74	12.65	3.58	24.45	2.18

Tabla 12.3 Valores medios y de desviación estándar de los parámetros de integridad acrosomal y daño celular de cada uno de tratamientos. En n= 20 experimentos realizadas mediciones a los 0 minutos y 90 de incubación a 37°C. Donde E. Espermatozoides 10.0×10^6 espermatozoides por ml. PMN. Leucocitos polimorfo nucleares 1.0×10^6 células por ml. PMA ester de forbol 1.6×10^{-9} M. Trolox 40 nM, Tocoferol 1.0%(ver tabla 6 de material y métodos)

Evaluación del efecto protector de los antioxidantes α -tocoferol y Trolox en la funcionalidad espermática.

Los resultados de 20 experimentos realizados para establecer el posible efecto protector de dos antioxidantes se presentan en la tabla 13.

El análisis estadístico aplicado fue análisis de varianza en la pendientes calculadas con una $\alpha = 0.05\%$ (programa estadístico utilizado statquik 1998).

Parámetro	Valor de P calculado	Valor de P de tablas
Viabilidad	4.55E-10	1.16
Movilidad general	2.83E-06	1.16
Movilidad progresiva rápida	6.53E-06	1.16
HOST	3.59E-06	1.16
Integridad acrosomal	2.00E-06	1.16
Daño celular	9.02E-06	1.16

Tabla 13. Resultados de la prueba estadística aplicada a los valores de las pendientes que presentaron significancia estadística en el tratamiento 4 espermatozoides+PMN+PMA (ANOVA para datos con distribución paramétrica $\alpha=0.05\%$), para determinar el efecto las especies de oxígeno reactivo sobre los parámetros de funcionalidad espermática.

Condiciones experimentales

Resultados

(cálculo de las condiciones óptimas de experimentación)

Obtención de la curva dosis-respuesta de 12 miristato 13 acetato de forbol PMA

Los valores medios así como los cálculos de las pendientes registrados por cambios en la densidad óptica por la generación de especies de oxígeno reactivo evaluada por la presencia de Formazán producto de la estimulación en poblaciones de leucocitos polimorfo nucleares con concentraciones constantes de 5.0×10^6 células por ml. Variando las concentraciones del ester de forbol PMA (12 miristato 13 acetato de forbol). Los valores de las pendientes no registraron diferencias estadísticas entre las concentraciones 1.6×10^{-11} M, 1.6×10^{-6} M y 1.6×10^{-9} M en tanto existieron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la concentración 1.6×10^{-12} M. Tabla 1.

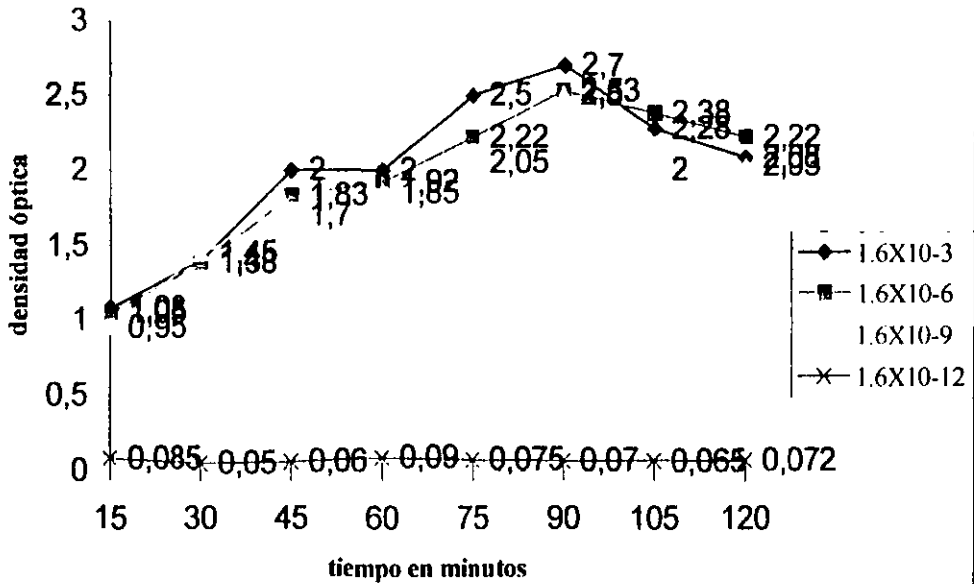
Concentración de PMA	Valores Medios	SD	Sdx	Valores de r
PMA 1.6×10^{-11} M	2.00	5.38	1.90	0.94
PMA 1.6×10^{-6} M	1.94	5.09	1.80	0.97
PMA 1.6×10^{-9} M	1.81	4.63	1.63	0.99
PMA 1.6×10^{-12} M	7.08	1.29	4.57	-0.1

	Suma de Cuadrados	DF	MS	Valor de F
ROW	3.91	7.0	5.58	7.51*
Columna	8.96	3.0	2.99	4.02
Residual	1.56	2.1	7.43	* Valor de F
Total	1.44	3.10		7.50

Test de Scheffe's	
1) 1.6×10^{-11} M	2) 0.02 1.6×10^{-6} M
	3) 0.11 1.6×10^{-9} M
	4) 8.97* 1.6×10^{-12} M
* Diferencia significativa si es mayor a =	0.18

Tabla 1. Prueba estadística aplicada a las 4 condiciones experimentales donde las concentraciones de PMA fueron probadas. Se aplicaron las pruebas estadísticas de ANOVA con un $\alpha = 0.05\%$ registrándose diferencias estadísticamente significativas. Y al aplicar la prueba de Scheffe's se estableció la diferencia estadística entre la concentración 1.6×10^{-12} M y el resto de las concentraciones. De tal forma queda validado que la dosis mínima de estimulación es 1.6×10^{-9} M.

Curva Dosis-respuesta



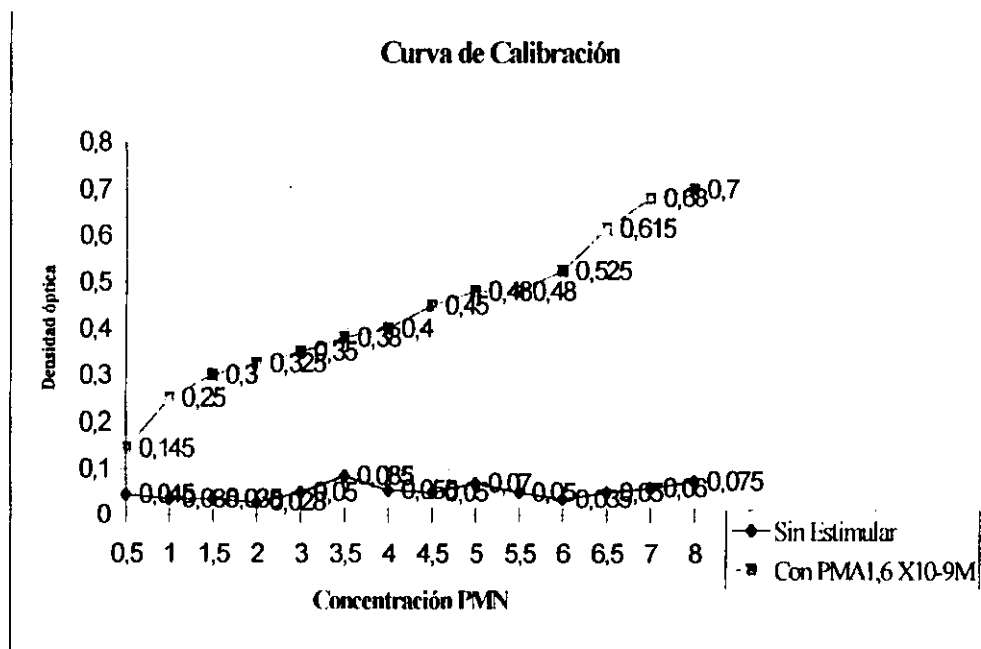
Gráfica 1. Determinación de la dosis mínima del ester de forbol 12 miristato 13 acetato de forbol (PMA). No existieron diferencias estadísticamente significativas entre las series $1.6 \times 10^{-3} \text{ M}$, $1.6 \times 10^{-6} \text{ M}$, $1.6 \times 10^{-9} \text{ M}$ al estimular poblaciones de leucocitos polimorfo nucleares en concentraciones constantes de 5.0×10^6 células / ml por lo que la concentración de PMA ($1.6 \times 10^{-9} \text{ M}$) fue la utilizada en el estudio. Medición por espectrofotometría a 630 nm. Donde la respuesta máxima se registró a los 90 minutos de incubación.

Curva de Calibración

En lo referente a la curva de calibración para establecer el rango de concentración de leucocitos versus respuesta a la estimulación con PMA ($1.6 \times 10^{-9} \text{ M}$). A partir de poblaciones variables de leucocitos PMN (0.5 a 8.0×10^6 células/ml) una serie sin estimular y otra serie estimulada con PMA $1.6 \times 10^{-9} \text{ M}$. Se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones. Tanto en sus valores medios como en la comparación entre las pendientes. A los 90 minutos de incubación (prueba de t de student para datos pareados). Valor de t calculada 8.87 en comparación con el valor de tablas 1.70 (tabla 2)

Grupo	Valores Medios	Varianza	SD	Sdx	C.V %	Valor de r
Sin PMA	0.05	0.00	0.01	0.004	31.86	-0.99
Con PMA	0.43	0.02	0.16	0.04	36.97	0.99

Tabla 2. Valor de t calculada 8.87 Vs valor de t de 1.70 con un $\alpha = 0.05\%$ de significancia por lo tanto existe diferencia estadísticamente significativa entre ambas series (gráfica2)



Gráfica 2. Curva de calibración en donde se presentaron dos condiciones experimentales : Poblaciones de leucocitos polimorfo nucleares con variaciones en su concentraciones. Una serie sin estimulación y la otra serie con estimulación con PMA ($1.6 \times 10^{-9}M$) medición espectrofotométrica (630 nm) realizada a los 90 minutos de incubación a $37^{\circ}C$ en movimiento constante.

Antioxidantes

Curva dosis-respuesta

Curva dosis-respuesta α -Tocoferol (Vitamina E)

Los resultados obtenidos en 10 experimentos para la selección de dosis óptima de antioxidante α -Tocoferol se presentan en la tabla 3. Donde se aprecian cambios estadísticamente significativos (ANOVA $\alpha=0.05\%$) producto de las comparaciones entre el grupo control (0.0% de antioxidante) y las concentraciones 3.0% a 5.0% del antioxidante en los parámetros de viabilidad celular, movilidad general, movilidad progresiva rápida (tipo a) evaluados en las poblaciones de concentración constante de 5.0×10^6 espermatozoides/ml. a los 90 minutos de incubación a 37°C .

Concentración De antioxidante		Viabilidad			Movilidad General			Movilidad tipo a		
%Ant	media	Sdx	F	Media	Sdx	F	Media	Sdx	F	
0.0%	90.1	4.53		75.0	6.15		65.0	5.88		
0.5%	87.8	5.33	1.39	76.3	5.17	1.00	66.50	4.01	1.035	
1.0%	89.2	8.0	0.56	75.3	8.30	1.52	65.10	5.66	1.84	
1.5%	85.3	7.5	0.89	70.2	7.42	0.95	66.50	5.84	1.50	
2.0%	88.3	7.31	0.21	65.0	9.54	1.83	64.70	8.95	1.40	
2.5%	75.3	5.81	0.58	68.2	5.85	0.85	60.15	3.85	1.85	
3.0%	41.20	7.71	61.20 *	35.02	4.42	26.1 *	32.20	1.10	27.3*	
3.5%	40.0	6.5	62.63 *	33.01	4.31	25.1 *	20.50	5.44	25.2*	
4.0%	26.0	8.71	47.15 *	15.01	4.87	14.8 *	10.0	6.31	24.3*	
4.5%	25.0	5.17	61.70 *	10.5	3.12	15.3 *	5.023	4.85	22.9*	
5.0%	26.0	7.51	64.14*	10.01	5.18	14.3 *	3.156	4.50	22.5*	
F tabl.			13.6**			13.6**			13.6**	

Tabla 3. Resultados obtenidos en 10 experimentos. Evaluando las diferentes dosis de antioxidante α -Tocoferol. Se muestran los valores medios y desviación estándar (Sdx) para cada una de las concentraciones utilizadas así como de los tres parámetros de funcionalidad espermática utilizados. Los valores (*) denotan diferencias estadísticamente significativas con respecto al valor de F de tablas (**). Comparando cada una de las concentraciones versus el control 0.0%

Curva dosis-respuesta del antioxidante Trolox

Los resultados obtenidos a partir de 10 experimentos para establecer la dosis óptima de actividad antioxidante del agente Trolox se presentan en la tabla 4. En la cuál se registraron cambios estadísticamente significativos (ANOVA $\alpha=0.05\%$) producto de las comparaciones entre el grupo control (0.0 nM de antioxidante) y las concentraciones 60 nM a 100 nM del antioxidante en los parámetros de funcionalidad espermática analizados: viabilidad celular, movilidad general, movilidad progresiva rápida (tipo a) evaluados en poblaciones de concentración constante de 5.0×10^6 espermatozoides/ml, a los 90 minutos de incubación a 37°C. También se registraron cambios significativos en el valor de pH de los medios al incorporar el antioxidante.

Conc. De trolox		Viabilidad			Movilidad general			Movilidad tipo a			PH
T.nM	Media	Sdx	F	Media	Sdx	F	media	Sdx	F		
0.0	90.5	3.51		75.5	5.12		68.0	5.06		7.3	
2.0	89.8	8.27	1.40	73.0	9.54	1.69	66.7	6.64	0.45	7.3	
20.0	88.4	8.19	1.78	71.3	7.60	1.08	67.1	6.40	0.96	7.3	
40.0	88.1	1.56	3.26	74.0	8.56	2.64	67.6	1.04	0.59	7.3	
60.0	66.6	7.48	42.3*	46.6	7.48	38.5*	23.5	1.13	58.8*	6.5	
80.0	47.5	1.14	40.9*	34.5	1.04	36.8*	20.0	9.93	59.2*	6.5	
100.0	15.5	2.51	40.6*	5.0	6.52	39.5*	5.0	8.51	59.7*	6.5	
Ftab.			18.6&			18.6&			18.6&		

Tabla 4. Resultados obtenidos en 10 experimentos. Evaluando las diferentes dosis de antioxidante Trolox. Se muestran los valores medios y desviación estándar (Sdx) para cada una de las concentraciones utilizadas así como de los tres parámetros de funcionalidad espermática utilizados y el registro de pH inicial en el medio de cultivo. Los valores (*) denotan diferencias estadísticamente significativas con respecto al valor de F de tablas (&) comparando el control (0.0 nM) versus las diferentes concentraciones.

Efecto del antioxidante trolox

Comportamiento antioxidante del agente trolox (evaluación espectrofotométrica)

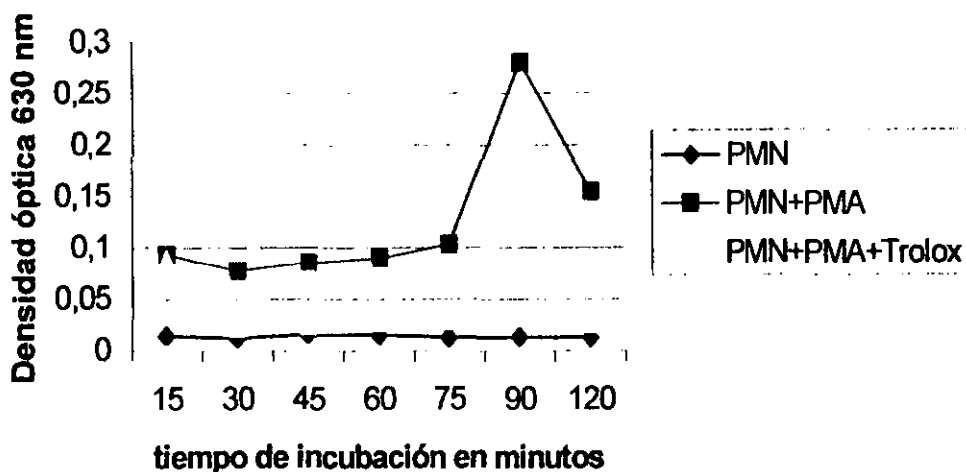
Los resultados de 10 experimentos realizados en poblaciones de leucocitos polimorfo nucleares con concentración de 0.500×10^6 /ml , en condiciones de activación con el ester de forbol PMA, utilizando como dosis óptima de antioxidante Trolox 40 nM ,se presentan en la gráfica 3

El análisis estadístico presentado en la tabla 5. Sugiere que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control, el grupo estimulado con el PMA + Trolox en relación con el grupo estimulado sin antioxidante. Tanto por efecto de tratamiento y tiempo de incubación. Cabe señalar los cambios registrados en los tratamientos a lo largo del período de incubación. (gráfica 3) a los 15 minutos se aprecia que no existen diferencias entre el grupo estimulado con PMA y el grupo estimulado con PMA + Trolox. Y siendo ambas diferentes con respecto al control. A los 30 minutos de incubación se invierten el grupo sin activación no presenta diferencias con respecto al grupo estimulado con PMA + Trolox. Y ambos son estadísticamente diferentes con respecto al grupo estimulado con PMA. En tanto que a los 90 minutos se observa un cambio significativo del grupo estimulado y sin antioxidante. (ANOVA $\alpha = 0.05\%$).

Tratamientos	1 contra 2	1 contra 3	2 contra 3
Valor F calculado	15.45E-06 *	0.037	14.58E+06*
Valor F de Tablas	14.54**	14.54**	14.54**

Tabla 5. Valores obtenidos a partir de la prueba estadística ANOVA con un $\alpha = 0.05\%$ En 10 experimentos revelaron diferencias estadísticas entre los grupos control (1) PMN sin estimulación vs PMN+PMA (2). Así como grupo 2 PMN+PMA vs PMN + PMA + Trolox (3) estableciendo diferencias por el tratamiento con PMA, el valor * denota valores estadísticamente significativos en F calculada comparando con F de tablas (**)

Efecto de antioxidante del trolox.



Gráfica 3. Efecto antioxidante del agente Trolox en una población de 5.0×10^6 PMN/ml. donde el control consistió en leucocitos PMN sin activación el tratamiento 2 PMN+PMA y el tratamiento 3 PMN+PMA+Trolox. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron a 630 nm, en intervalos de 15 minutos hasta 120 minutos de incubación a 37°C.

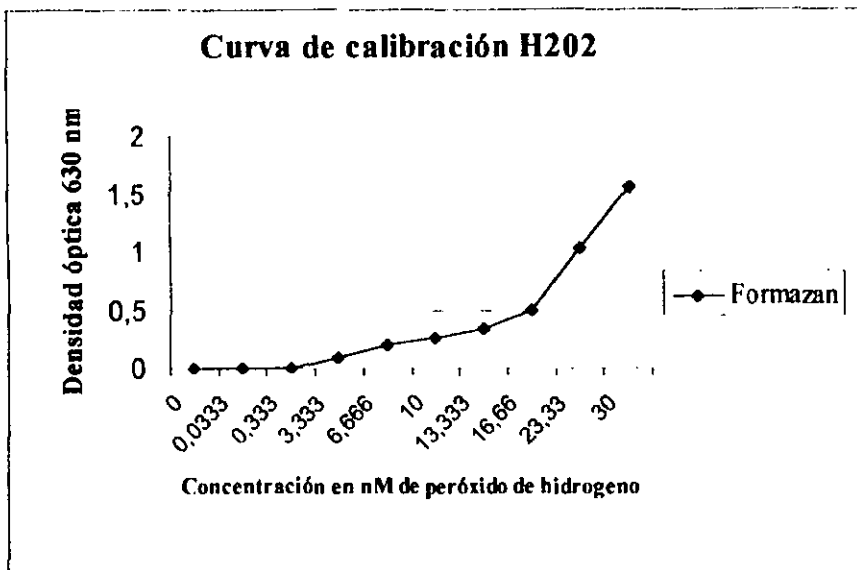
Curva de calibración Peróxido de hidrógeno por espectrofotometría con nitro azul de tetrazolium (NBT)

El montaje de la curva de calibración se realizó en 10 experimentos en donde se conoce la concentración de peróxido de hidrogeno expresado en valores mM.

En la tabla 6 se representa la estadística descriptiva y el cálculo de la pendiente. La curva resultado de este montaje se representa en la gráfica 4.

Concentración H ₂ O ₂ mM	Valores medios(D.O)	Sdx +/-
0.0	0.00	0.000
0.03	0.003	0.006
0.33	0.004	0.009
3.33	0.086	0.020
6.66	0.207	0.059
10.00	0.262	0.078
13.33	0.345	0.102
16.66	0.494	0.059
23.33	1.035	0.063
30.00	1.553	0.089

Tabla 6. Representación de los valores medios y desviación estándar de las densidades ópticas para n=10 experimentos pendiente y = mx+b donde el valor de la pendiente es m=0.047



Gráfica 4. Representación de la curva de calibración para conocer las densidades ópticas producto de la reacción entre el nitro azul de tetrazolium + peróxido de hidrógeno y la presencia de formazán. Reacción medida a 630 nm y a los 5 minutos de iniciada la reacción.

Tratam.	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	120 min
E+1PMN	0.005	0.002	0.003	0.004	0.003	0.005	0.003
E+1PMN + PMA	0.080	0.010	0.120	0.125	0.125	0.155	0.130
E+1PMN +PMA+T	0.006	0.080	0.040	0.030	0.035	0.040	0.035
E+2PMN	0.005	0.003	0.007	0.002	0.002	0.003	0.002
E+2PMN +PMA	0.140	0.160	0.175	0.180	0.185	0.208	0.180
E+2PMN +PMA+T	0.105	0.100	0.085	0.035	0.035	0.045	0.050
E+3PMN	0.003	0.005	0.006	0.007	0.003	0.003	0.006
E+3PMN +PMA	0.120	0.140	0.175	0.225	0.289	0.307	0.283
E+3PMN +PMA+T	0.130	0.100	0.080	0.075	0.080	0.086	0.060
E	0.007	0.006	0.005	0.005	0.005	0.003	0.004
E+PMA	0.045	0.050	0.060	0.090	0.050	0.045	0.060
E+PMA+ T	0.045	0.040	0.035	0.040	0.040	0.030	0.040

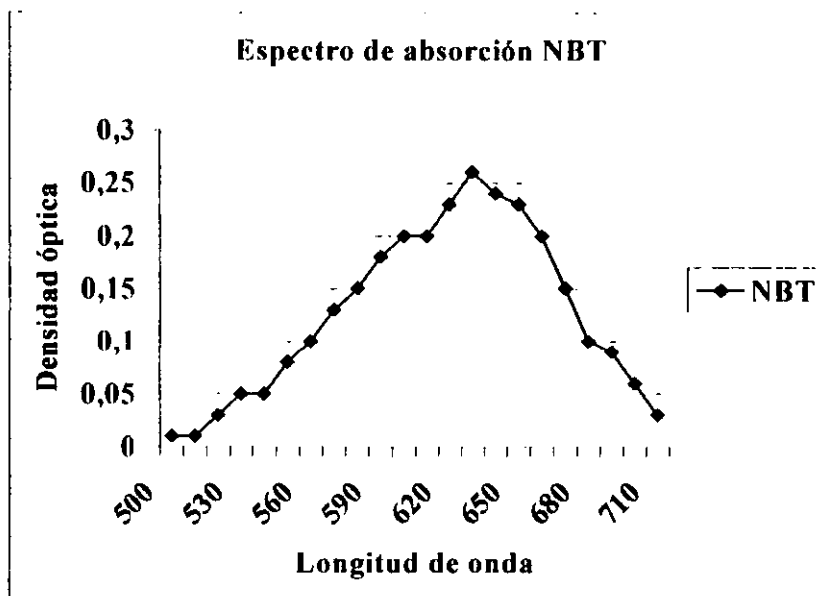
Tabla 7. Representación de los valores medios de Densidad óptica producto de la medición realizada cada 15 minutos durante 2 horas a 630 nm en n=10 experimentos. Determinando la presencia de EOR. Evaluando también el posible efecto antioxidante del trolox por espectrofotometría midiendo formación de producto Formazán. Donde PMN población de PMN (1) $0.500 \times 10^6 \pm 0.125$ PMN/ml (2) $1.0 \times 10^6 \pm 0.575$ PMN/ml (3) $2.0 \times 10^6 \pm 0.625$ PMN/ml. E: Espermatozoides población constante a 10.0×10^6 células/ml ± 1.256 . NBT (1mg/ml). PMA 1.6×10^{-9} M. T: Trolox 1%. Los valores en azul representan las densidades ópticas que fueron interpolados en la tabla 9 y gráfica 7 (apéndice) para establecer su concentración de peróxido. (Ver tabla En sección de resultados)

Tratamiento	60 minutos		90 minutos	
	Densidad óptica	Concen. mM	Densidad óptica	Concent. mM
E	0.005	0.0333	0.003	0.033
E +PMA	0.090	0.333	0.045	0.333
E+PMN 1	0.004	0.0333	0.005	0.0333
E+PMN1+PMA	0.125	3.333	0.155	3.333
E+PMN2	0.002	0.0333	0.003	0.0333
E+PMN2+PMA	0.180	6.666	0.208	6.666
E+PMN3	0.007	0.0333	0.003	0.0333
E+PMN3+PMA	0.225	10.0	0.307	13.333

Tabla 8. Cálculo de la concentración de peróxido en mM. Partiendo de los valores medios de Densidad óptica producto de la medición realizada a los 60 y 90 minutos 630 nm en n=10 experimentos. Determinando la presencia de EOR, por espectrofotometría midiendo formación de producto Formazán e interpolando en la tabla 9 del apéndice para valores conocidos de peróxido de hidrógeno. Donde PMN población de PMN (1) $0.500 \times 10^6 \pm 0.125$ PMN/ml (2) $1.0 \times 10^6 \pm 0.575$ PMN/ml (3) $2.0 \times 10^6 \pm 0.625$ PMN/ml. E: Espermatozoides población constante a 10.0×10^6 células/ml ± 1.256 . NBT (1mg/ml). PMA 1.6×10^{-9} M.

Espectro de Absorción NBT

En la siguiente gráfica se presenta el espectro de absorción, para determinar la longitud de onda óptima para la medición espectrofotométrica, del NBT. utilizando una solución de NBT 1mg/ml.



Gráfica 5. Espectro de absorción del NBT. Utilizando una solución de NBT 1mg/ml