

El laboratorio andrológico en la evaluación del factor masculino

María José Munuce, PhD

Reprolab-Biología de la Reproducción, Sanatorio Británico de Rosario.
Laboratorio de Estudios Reproductivos-Cátedra de Bioquímica Clínica-Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas,
Universidad Nacional de Rosario.
Reproducción 2008;23:120-128

En los últimos años se han realizado múltiples esfuerzos para comprender mejor la etiología del factor masculino estudiando la función testicular y el proceso de la espermatogénesis. Sin embargo, a pesar de los importantes avances en el conocimiento básico, la realidad nos muestra que no se producen grandes adelantos en la práctica clínica en cuanto al tratamiento del factor masculino.

Los estudios tradicionales del semen, que incluyen la concentración, motilidad y morfología, son las herramientas más difundidas para evaluar la fertilidad masculina. Estas técnicas deben ser capaces de diagnosticar el estado funcional o las anomalías presentes en los distintos órganos que producen el semen. Sin embargo, estos indicadores no nos pronostican el potencial fértil ya que muchas parejas conciben rápidamente, a pesar de que los estudios seminales resulten anormales y, por el contrario, otras con análisis dentro de la normalidad resultan estériles. Es importante recordar que para que la fertilización sea exitosa deben ocurrir procesos altamente complejos que involucren indefectiblemente la participación de dos individuos.

En los últimos años el desarrollo de técni-

cas de micromanipulación de gametas ha hecho que las perspectivas terapéuticas en el caso de infertilidad masculina se amplíen, mejorándose los resultados en pacientes estériles. Podríamos especular que en la actualidad el éxito desarrollado con la inyección intracitoplasmática (ICSI) haría innecesario el estudio de las causas que originaron la disfunción; sin embargo, la infertilidad masculina es un síntoma y no un diagnóstico, y por lo tanto, tanto el ICSI como la Fertilización *In Vitro* (FIV) representan tratamientos sintomáticos.

Uno de los principales puntos de interés para el profesional que trabaja en esterilidad masculina debería ser la prevención primaria de la condición, cosa imposible de realizar si desconocemos la etiología de la infertilidad, la cual en su mayoría permanece como de causa desconocida

Análisis convencional del semen

El análisis convencional del semen sigue siendo, hasta el momento, la forma de detectar al factor masculino. Sin embargo, la baja reproductibilidad entre laboratorios continúa siendo un problema. La Organización Mundial de la Salud ha resumido en un manual el estudio básico de rutina actualizado y editado en distintas ediciones, siendo la última versión la de 1999. Sumado a esto, la *Nordic Association for Andrology* (NAFA) realizó una minuciosa revisión del manual de la O.M.S., el cual ha sido

Correspondencia: María José Munuce
Reprolab-Biología de la Reproducción, Sanatorio Británico de Rosario
E-mail: reprolab@express.com.ar

publicado como monografía por la *European Society of Human Reproduction and Embryology* en el año 2002.

Recolección de la muestra

Por masturbación, luego de 3 a 5 días de abstinencia sexual en un contenedor estéril. Períodos menores de abstinencia así como mayores pueden alterar el resultado. La muestra debe procesarse en lo posible dentro de la hora de recolección y debe ser mantenida en estufa a 37 °C hasta su evaluación. En el caso de pacientes que por cuestiones religiosas o personales no pudieran recoger la muestra por masturbación, se recomienda el uso de profilácticos especiales sin espermicidas. La evaluación de la motilidad se verá influida por el tiempo transcurrido entre la obtención y el análisis. Es fundamental que el paciente recoja la muestra completa ya que la primera fracción es la más rica en fluido prostático y espermatozoides.

Examen macroscópico inicial

Aspecto

Volumen: la primera fracción es rica en espermatozoides, por lo que si el volumen es < a 1 ml, hay que determinar si no hubo pérdida de muestra. Un volumen disminuído, con azoospermia y pH ácido puede asociarse con ausencia congénita del *vas deferens*, de la vesícula seminal o a eyaculación retrógrada hacia la vejiga. V. ref.: 2 ml a 6 ml.

Coagulación: el semen alcanza el estado semisólido (mal llamado coagulación) inmediatamente luego de la eyaculación, por acción de las enzimas secretadas por las vesículas seminales (tipo proteína-kinasa). La falta de coagulación se asocia con ausencia del *vas deferens* o anomalía en las vesículas seminales (se da con disminución de la fructosa en el plasma seminal).

Licuefacción: en general se produce dentro de los primeros 10 a 20 min, por acción de enzimas proteolíticas (fibrinolisisina, fi-

brinogenasa y aminopeptidasa) de origen prostático. V. ref.: completa a los 60 min.

Viscosidad: distintos factores tales como infecciones del tracto, disfunción prostática, material del contenedor, estado psicológico o pocos días de abstinencia sexual pueden aumentarla. V. ref.: el semen cae de la pipeta gota a gota.

pH: con un pH > 8.0 investigar prostatitis, vesiculitis o epididimitis. Por debajo de 7.2 estos microorganismos pueden haberse tornado crónicos. En muestras azoospermicas y pH < 7.0 puede haber disgenecia del conducto deferente, de las vesículas seminales o del epidídimo. V. ref.: 7.2-7.8.

Evaluación microscópica

Motilidad: en forma microscópica (40 x) se determina el porcentaje de espermatozoides que presentan los 4 patrones característicos de movimiento G0: inmóvil, GI: móvil *in situ*, GII: traslativo y GIII traslativo rectilíneo. V. ref.: 50% o más GII+GIII, 25% GIII.

Sistemas computarizados para el análisis del movimiento (Computed Assisted Sperm Analysis, CASA)

El advenimiento de sistemas CASA ha permitido evaluar la cinética espermática en forma rápida, estandarizada y con exactitud. Estos sistemas combinan la videomicrografía con el análisis digital de la imagen. Una luz estroboscópica ilumina a los espermatozoides en movimiento, los cuales son captados por una cámara de video y su señal de puntos de luz es procesada por tarjeta analógico-digital que nos brinda el análisis cinético de la trayectoria. Como resultado se obtienen no sólo los datos clásicos referentes a concentración y porcentaje de móviles, sino las características cinéticas de la células móviles tales como: VAP (velocidad media), VSL (de trayecto), VCL (curvilínea), ALH (desplazamiento de la cabeza), BCF (batido flagelar), STR (rectitud) y

LIN (linearidad). V. ref.: (pueden variar según el equipo utilizado) VAP: > 35 $\mu\text{m/s}$, VSL: > 25 $\mu\text{m/s}$, VCL: > 45 $\mu\text{m/s}$, ALH: < 7.5 μm , STR: > 70% y LIN > 60%.

Concentración

Toda medición va a estar asociada a un cierto grado de incertidumbre. Las cámaras de conteo más utilizadas son las de Makler (10 nL) y Neubauer (100 nL). Dado que cuanto mayor sea la cantidad de células analizadas mayor será la precisión en la determinación, el uso de la cámara de Makler, la cual no requiere dilución previa, es aconsejable en muestras concentradas, mientras que para muestras muy oligozoospermicas se recomienda el uso de la cámara de Neubauer, haciendo una dilución 1:1, que carga un volumen 10 veces superior a la Makler (100nL). De este modo estamos aumentando el número de espermatozoides evaluados y disminuyendo el error en el conteo. V. ref.: 20x 10⁶ esp/ml o más, 40 x 10⁶ esp. totales por eyaculado.

Elementos celulares: células de la proge- nie, epiteliales, hematíes, leucocitos. Es importante cuantificar la presencia de leucocitos ya que resultan altamente nocivos para el espermatozoide. Se pueden evaluar directamente en la Makler o Neubauer, en el extendido para morfología o realizar tinción diferencial de peroxidasa. V.ref.: < 1 x 10⁶ /ml.

Azoospermias

En el caso de que no se observen espermatozoides en el semen fresco, se recomienda centrifugar la muestra 15 min a 1.000 g y luego examinar el *pellet* evaluando 400 campos a 40x. Con esta sistematización en la evaluación el riesgo de no encontrar espermatozoides es menor al 5%.

Es muy importante que el laboratorio posea experiencia suficiente para poder realizar el diagnóstico diferencial en estas situaciones extremas, ya que la implementación

del ICSI hace posible lograr un embarazo aún cuando sólo se recuperan unos pocos espermatozoides.

- Oligozoospermia severa: 1-5 x 10⁶ esp/ml.
- Oligozoospermia extrema: < 1 x 10⁶ esp/ml.
- Criptozoospermia: no se observan espermatozoides en fresco, y se recuperan algunos en el sedimento post-centrifugación.
- Azoospermia: no se observan espermatozoides ni en fresco ni post-centrifugación.

Vitalidad: cuando el número de espermatozoides inmóviles es > 50% es necesario determinar si existe necrozoospermia. Se determina el porcentaje de espermatozoides que incluyen el colorante supravital Eosina y (muertos) respecto de los que no lo hacen (vivos). V. ref.: 75% vivos o más.

Morfología: distintos estudios utilizando hemizonas humanas muestran que los espermatozoides morfológicamente normales son los que se unen a la zona y penetran los ovocitos. La morfología es muy sensible a cualquier *stress* del microambiente donde se da la espermatogénesis y resulta ser relativamente constante en un individuo.

Los trabajos de Thinus Kruger proponen un criterio más estricto en la evaluación a partir de las medidas observadas en espermatozoides encontrados en moco cervical periovulatorio. La evaluación se realiza midiendo a los espermatozoides con un micrómetro y considerando a los espermatozoides *borderline* como anormales. Esta morfología se denomina "*estricta o de Kruger*". El valor de referencia o *cut-off* resulta de 14% ya que pacientes por debajo de este límite disminuyen sus chances de fertilización *in vitro* de un 88.3 a 49.4%. El grupo teratozoospermico se puede dividir en: 4 a 14% grupo G (buen pronóstico) y <4% grupo P (pobre pronóstico). Anteriormente la morfología era evaluada de un modo menos estricto (llamada de O.M.S.) donde los valores de referencia

resultaban muy superiores a los estrictos (50 % normales) y aún sigue siendo utilizada por muchos laboratorios no especializados. La morfología estricta es un parámetro muy importante en la evaluación del hombre infértil ya que hasta el momento resulta el mejor pronosticador seminal de la capacidad fertilizante del semen. V. ref.: > 14% normales evaluados con micrómetro y objetivo de 100x.

En toda técnica que implique contar espermatozoides (motilidad, viabilidad, morfología) cuanto mayor sea el número evaluado habremos disminuido más el error asociado a la lectura. Lo ideal es evaluar 200 espermatozoides por duplicado.

Cultivo de semen: la presencia de gérmenes puede verse reflejada en un aumento del pH con una disminución de la motilidad y aglutinación. Dentro de los microorganismos más frecuentes se encuentran: neisseria gonorrhoeae staphylococcus aureus, escherichia coli, pseudomona aeruginosa. De los patógenos más asociados a la infertilidad: micoplasma, clamidia, ureaplasma urealyticum, así como agentes virales como el citomegalovirus y el herpes. Debe solicitarse de rutina en programas de reproducción asistida, especialmente si el número de leucocitos es > 1×10^6 leuco/ml. También cuando existen signos o síntomas en las glándulas anexas: cultivo completo con antibiograma, clamidia y micoplasma.

Optativas

Anticuerpos antiespermáticos

Mar test (Mixed agglutination reaction):

Consiste en mezclar semen fresco con partículas de látex cubiertas de IgG o IgA humana. A esta mezcla se le agrega un anti-IgG o anti-IgA humana. La presencia de aglutinados mixtos implica existencia de IgG o IgA sobre el espermatozoide. Solo puede realizarse en muestras con espermatozoides móviles. V. ref.: < 50% de aglutinados mixtos.

Immunobeads:

Consiste en mezclar el semen con partículas de poliacrilamida recubiertas con anticuerpos monoclonales contra IgG, IgA o IgM. Se evalúan los aglutinados mixtos. V. ref.: < 50% de aglutinados mixtos.

Bioquímica del plasma seminal:

Durante la eyaculación los espermatozoides se mezclan con los fluidos provenientes de las distintas glándulas accesorias. Existen marcadores bioquímicos para evaluar la función glandular:

Marcadores de la capacidad secretoria:

Próstata: [Zn⁺⁺] (V. ref.: 2.4 μ mol o más/eyac.), ácido cítrico (V. ref.: 52 μ mol o más/eyac.) y fosfatasa ácida (V. ref.: 200 U o más por eyac.).

Vesículas seminales: fructosa (V. ref.: 13 μ mol o más/eyac.).

Epidídimo: alfa glucosidasa neutra (más sensible que la L-carnitina y glicerofosforilcolina). V. ref.: 20 mU/eyac.

Clasificación del paciente (según O.M.S., 1999 y Kruger, 1986):

Al menos son necesarias 2 muestras coincidentes con 1 a 3 semanas de intervalo.

	Concentración	Motilidad	% Normales
Normozoospermico (N)	> 20×10^6 esp/ml	> 50% II+III o > 25 % III	> 14
Oligozoospermico (O)	< 20×10^6 esp/ml	> 50% II+III o > 25 % III	> 14
Teratozoospermico (T)	> 20×10^6 esp/ml	> 50% II+III o > 25 % III	< 14
Astenozoospermico (A)	> 20×10^6 esp/ml	< 50% II+III	> 14

Cuando más de una variable se ve alterada se obtiene como diagnóstico la combinatoria: OAT, OA, OT, AT

Hipospérmico: volumen < 2 ml.

Azoospérmico: no se observan espermatozoides en el eyaculado ni luego de centrifugación en 400 campos a 40x.

Criptozoospérmico: no se observan espermatozoides en el eyaculado, pero luego de la centrifugación aparecen unos pocos espermatozoides.

Función espermática

En el momento de la eyaculación unos 200 millones de espermatozoides son depositados en el cervix. Estos espermatozoides deben escapar de la influencia estabilizadora del plasma seminal, penetrar el moco cervical y comenzar el ascenso a través de las trompas de Fallopio donde completan el proceso denominado "capacitación", el cual los habilita para fertilizar al ovocito. Una vez que encuentre al ovocito deberá reconocerlo, unirse a la zona pelúcida, liberar el contenido enzimático presente en el acrosoma, penetrar la zona y finalmente fusionarse con la membrana plasmática para incorporarse al citoplasma. Actualmente se dispone de una serie de estudios funcionales que permiten evaluar *in vitro* la mayoría de estos eventos fisiológicos que se dan *in vivo*.

Determinación del contenido de ATP

La energía que impulsa al espermatozoide proviene de la conversión del ATP en ADP + P. Por ello se ha vinculado la determinación de este nucleótido con la capacidad fertilizante del mismo. La técnica para medir la ATP consiste en lisar los espermatozoides con ácido tricloro acético (también inhibe a las ATPasas del plasma seminal). El contenido de ATP se determina por una reacción bioluminiscente de la luciferin-luciferasa.

Se proponen valores medios de ATP en normospérmicos de 0.5 nmol/10⁶ esp vivos.

Hiperactivación

Como consecuencia de la capacitación el espermatozoide desarrolla un tipo de movimiento de poca progresión, alta velocidad y gran desplazamiento lateral de la cabeza denominado "hiperactivación". Se postula que los espermatozoides utilizarían este tipo de desplazamiento para abandonar posibles reservorios en las trompas, ascender al sitio de fertilización y penetrar las envolturas ovocitarias. Este movimiento en forma de "latigazos" que forman una especie de figura de "ocho" es fácil de observar microscópicamente en el hamster, pero resulta muy difícil en el humano. Con la aparición de los sistemas CASA es posible determinar el porcentaje de células que presentan este tipo de movimiento. Se define como espermatozoide hiperactivo aquel que posee una VCL > 100 µm/s, ALH > 7.5 µm y LIN < 65%. Bajo condiciones capacitantes se observa máxima hiperactivación a las 3 hs de incubación (llegándose a un 15 -20% de HA). Se está estudiando la utilidad de este dato como pronóstico de fertilización. V. ref.: < 4-5% de HA en semen basal.

Interacción moco cervical-semen

Los espermatozoides del eyaculado se caracterizan por un movimiento rápido y lineal cuya finalidad es alcanzar el moco cervical (MC). La barrera cervical es el primer desafío que encuentra el espermatozoide en su viaje hacia el sitio de fertilización y se estima que sólo 1 de cada 1000 espermatozoides accede al canal cervical.

El MC resulta de la secreción del epitelio cervical cuya actividad está regulada por los niveles hormonales. El MC es un hidrogel compuesto por una red macromolecular de mucina (componente de alta viscosidad) y electrolitos, compuestos orgánicos y proteínas (componente de baja densidad).

Los espermatozoides penetran el MC guiados por líneas de fuerza y llegan hasta las criptas cervicales donde pueden dete-

nerse y quedar en un estado de latencia hasta que reciban la señal ovocitaria que los estimula a ascender.

Las funciones del MC son:

- a) Favorecer la penetración espermática en momentos cercanos a la ovulación.
- b) Proteger a los espermatozoides de la fagocitosis y del pH vaginal.
- c) Aportar requerimientos energéticos.
- d) Seleccionar poblaciones espermáticas de mejor calidad (filtro).
- e) Posible "reservorio espermático".
- f) Posible sitio de inicio de la capacitación espermática.

La habilidad de los espermatozoides para penetrar el moco es un aspecto de la función espermática a ser evaluado durante el diagnóstico de la pareja estéril.

Evaluación del moco cervical (O.M.S., 1999)

Se ha sistematizado la evaluación del moco, el cual se obtiene con jeringa de tuberculina en fecha ovulatoria. Para este sistema se asigna al moco un SCORE máximo de 15 puntos. V. ref.: todo puntaje > 10 implica un buen moco y < 10 un moco desfavorable.

Se evalúan: volumen, consistencia, formación de hehecho, filancia, celularidad (todas con un puntaje de 0 a 3) y el pH (7 a 8.5).

Pruebas de migración espermática

Test post-coital o de Sims-Hühner

Esta prueba tiene un valor diagnóstico irremplazable en el estudio de la migración espermática y se utiliza como primer paso en el estudio del factor cervical. Su valor pronosticador de embarazo parece ser limitado, así como la correlación que presenta con los datos del semen basal (concentración y motilidad).

El *test* debe realizarse en la fecha ovulatoria con abstinencia sexual de 2 días y 9 a 24 hs. post-coito.

- *Pool* vaginal.

Aquí se deben encontrar espermatozoides inmóviles por la acidez vaginal. Confirma

que el semen se ha depositado en la vagina.

- *Pool* endocervical.
- Se acepta como mínimo normal un promedio de 5 esp. GIII/campo a 400x.

Una buena prueba de S.H implica: buen coito, moco normal para el transporte y conservación del espermatozoide, función estrógena adecuada.

La utilización de sistemas CASA ha mostrado que el porcentaje de células rápidas en el semen basal (VAP > 25 μm/s) brinda el mejor coeficiente de correlación lineal (r = 0.8) con la penetración del MC.

Anticuerpos antiespermáticos en moco cervical

Cuando tanto el moco como el semen resultan normales y la prueba post-coital deficiente o con presencia de *shaking* (movimiento con lateralización de la cabeza) o espermatozoides muertos, debe pensarse en la presencia de inmunoglobulinas en el MC.

Estudios bacteriológicos de moco

Cuando las propiedades reológicas del moco son anormales o se observan muchos leucocitos o las pruebas de interacción *in vivo* e *in vitro* son negativas.

Madurez nuclear

Durante la maduración epididimaria el espermatozoide sufre cambios estructurales y funcionales que lo preparan para ser fertilizante. Se reemplazan las histonas nucleares por protaminas (ricas en cisteínas) formando puentes S=S que estabilizan su cromatina. Tanto el plasma seminal como el Zn⁺⁺ de origen prostático tienden a aumentar la estabilización y prevenir la decondensación temprana. Una vez dentro del ovocito y por acción de grupos tioles del mismo, el espermatozoide sufre la decondensación nuclear.

Anilina ácida azul

Durante la maduración se reemplazan las

histonas ricas en lisina por protaminas. En caso de una maduración nuclear anormal las histonas persisten y se tiñen de azul oscuro con la anilina. En general se observa un empaquetamiento cromatínico anormal en combinación con defectos acrosomales. Algunos estudios muestran una fuerte correlación ($r=0.8$) entre el porcentaje de células con cromatina normal y los porcentajes de fertilización en FIV. V. ref.: >75% células sin teñir en el eyaculado.

Naranja de acridina

Es un indicador del estado del ADN. El naranja de acridina tiene fluorescencia verde cuando se une a un ADN de doble cadena y roja cuando éste es de simple cadena.

Pacientes con más del 24% de doble hebra tienen mejores chances de fertilización *in vitro* (88% vs. 60%). El porcentaje de simple hebra se correlaciona con los espermatozoides anormales.

Integridad de membranas

Dado que la mayoría de los eventos que conducen a la fertilización implican la modificación de las características de las membranas, es importante conocer la funcionalidad de las mismas.

Test hipoosmótico

Evalúa la integridad fisiológica de la membrana ya que se exponen los espermatozoides a una solución hipoosmolar (150 mOsm/l) en la cual se produce un influjo osmótico de agua y como resultado se enrollan las colas. V. ref.: > 60% colas enrolladas.

Reacción acrosomal

El acrosoma contiene numerosas enzimas hidrolíticas (principalmente acrosina y hialuronidasa) necesarias para penetrar las envolturas ovocitarias. La reacción acrosomal (RA) implica la vesiculización de las membranas plasmática y acrosomal externa con

la liberación del contenido acrosomal. Durante la RA el espermatozoide adquiere la capacidad de fusionarse con el oolema.

La RA se dispara *in vivo* probablemente por la unión del espermatozoide a la ZP3.

Lectinas fluorescentes

Son proteínas extraídas de plantas que conjugadas con el isotiocianato de fluoresceína (FITC) se unen con alta afinidad a los residuos de azúcares. Pueden reconocer glicoconjugados de la membrana o de la matriz acrosomal. La más utilizada es la *Pisum sativum* que se une a la matriz acrosomal de espermatozoides permeabilizados. Puede asociarse con la utilización de colorantes supravitales como el Hoechst 33258 o el *test* hipoosmótico para diferenciar la RA fisiológica de la RA por muerte celular.

Inducción de la RA

Dado que el porcentaje de RA espontáneo es muy bajo (5 a 10%) pueden utilizarse distintos agentes o inductores de la misma, los cuales se dividen en:

- Fisiológicos: fluido folicular, componentes del cúmulus, progesterona, la zona pelúcida solubilizada, ZP3 humana recombinante.
- No fisiológicos: ionóforo de Ca^{++} A 23187 induce la RA por ingreso masivo de Ca^{++} .

La habilidad del espermatozoide a responder frente a agentes inductores y sufrir la RA es utilizada como medida indirecta de la capacitación.

Se utiliza un índice denominado ARIC (*Acrosome Reaction to Ionophore Challenge*) que resulta ser el porcentaje de RA inducido por ionóforo menos el basal. V. ref.: ARIC > 15% indica mejores chances de fertilizar, RA basal > 20%: RA prematura se asocia con infertilidad ya que una vez que el espermatozoide ha reaccionado su destino es la muerte.

Interacción espermatozoide-ovocito

La zona pelúcida (ZP) es una matriz acelular de glicoproteínas (ZP1, 2 y 3) que rodea al ovocito y le confiere la especie-especificidad. Para que ocurra la fertilización el espermatozoide debe unirse fuertemente a la zona pelúcida y algunos casos de infertilidad masculina se deben a fallas a este nivel.

Test de unión a ZP

Se utilizan ovocitos inmaduros sobrantes de FIV, los cuales se conservan en solución de salina a 4 °C manteniendo sus propiedades de unión. El ensayo consiste en hacer competir por el ovocito, espermatozoides del paciente y de un control fértil, los que han sido marcados con dos fluorocromos de distinto color (rodamina: rojo y fluoresceína: verde).

Se incuban 3 hs y se cuenta el número de espermatozoides unidos de cada uno: IU: testigo/paciente, evaluado en 5 ovocitos.

Como valor de referencia proponen que: < 50% fertilización *in vitro*: IU 0.16 (promedio) >50% fertilización *in vitro*: IU 0.88 (promedio). Como desventaja existe gran variación entre los ovocitos.

Test de Hemizona (HZA)

Los ovocitos pueden obtenerse con programa de FIV. Como no siempre existe disposición de ovocitos frescos se han desarrollado técnicas para preservarlos en DMSO o solución salina a 4°C. La zonas son cortadas en mitades iguales con la ayuda de un micromanipulador, cada una de las cuales se expone en una gota de 100 µl a una misma concentración (5×10^5 esp móviles/ml) de espermatozoides del paciente y de un control fértil y se incuban 4 hs en 5% CO₂. Los resultados se expresan como un índice de unión HZI: N° de esp U paciente/ N° de esp U control x 100.

El valor de HZI *cut-off* resultó ser del 35% (por debajo del cual las chances de pobre fertilización son del 100%, mientras

que por encima las de fertilización exitosa son del 81%).

Las fallas en la fertilización debidas a defectos en la unión a ZP resultan ser un problema común aún en pacientes con buenas características seminales. En estos casos lo indicado sería la realización de un ICSI. V. ref.: HZI > 35%.

Expresión de sitios de unión para α- D-manosa

Se ha descrito la participación de distintos azúcares de la ZP como mediadores del proceso de fertilización de los cuales la manosa resulta ser un monosacárido crítico para el reconocimiento y penetración de la ZP.

Los espermatozoides capacitados se incuban con BSA-manosa-FITC o biotinilada. Se determina microscópicamente el número de espermatozoides que expresan receptor para el azúcar. Estudios realizados en pacientes con reiterados fracasos en FIV y sin otra causa de esterilidad presentan menor afinidad de unión a la manosa como marcador de su potencial fertilizante. V. ref.: > 20 % de patrón II+III.

Fusión y decondensación nuclear

Como consecuencia de la capacitación y RA el espermatozoide es capaz de fusionarse con el oolema y una vez dentro del citoplasma decondensar su cromatina.

Test de penetración de ovocito de hamster libre de ZP (HOPT)

Consiste en exponer espermatozoides capacitados a ovocitos de hamster libres de la ZP (para quitarles la especie-especificidad). Se evalúa el número de espermatozoides que penetraron y decondensaron en el citoplasma. Las funciones que mide son: capacitación, RA, fusión y decondensación en el ooplasma.

Como valor normal de penetración se considera 10-15%. Su valor clínico es cuestionado en la actualidad y cuando los resul-

tados son positivos tienen cierta correlación con los obtenidos *in vivo*. Su alta complejidad y costos hacen también que sea poco utilizado.

Determinación de radicales libres de O₂

Los espermatozoides humanos son capaces de generar radicales libres de O₂, tales como H₂O₂ y anión superóxido en forma normal, los cuales son contrarrestados por la actividad antioxidante del plasma seminal. La presencia de leucocitos o espermatozoides anormales puede aumentar la concentración de estos radicales y superar la modulación del plasma seminal, la cual se asocia con el daño en la función del espermatozoide. El ataque oxidativo de los lípidos de la membrana plasmática lleva a la peroxidación lipídica con lo cual el espermatozoide pierde la capacidad de movimiento, de RA y de fusión con el ovocito. Cuando los espermatozoides se separan del plasma seminal para ser utilizados en asistencia reproductiva es importante disponer de técnicas de separación exitosas (*Swim up* o *Percoll*) donde los espermatozoides no queden en contacto ni con los leucocitos ni con los espermatozoides anormales, ya que sin el plasma seminal es aún más vulnerable al *stress* oxidativo.

Referencias

- Aitken J.: Free, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fertil.* 1995;7:659-668.
- Andrology Manual: Reproductive Biology Unit Tygerberg- Hospital. Human spermatozoa in assisted reproduction, eds. Acosta A; Swanson RJ; Ackerman S; Kruger T; Van Zyl A y Menkeveld R., chap.4, pag 1990;68-84.
- Benoff S, Cooper G, Hurley I, Napolitano B, Rosenfeld D, Scholl G, y Herschlag A. Human sperm fertilizing potential *in vitro* is correlated with differential expression of head-specific mannose-ligand receptor. *Fertil Steril* 1993;59(4):854-862.
- Burkman LJ. Discrimination between nonhyperactivated and classical hyperactivated motility patterns in human spermatozoa using computerized analysis. *Fertil Steril* 1991;55:363-371.
- Burkman LJ, Coddington CC, Franken DR, Kruger T, Rosenwaks Z, y Hodgen GD. The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil Steril* 1988;49: 688-697.
- Clinical perspectives in the diagnosis and treatment of the defective sperm function: Stewart Irvine Curso pre-congreso de la American Fertility Society 1992.
- Cross N, y Meizel S. Methods for evaluating the acrosomal status. *Biol Reprod* 1989;41:635-641.
- Eliasson R. Basic semen analysis in Current topics in andrology ed. P. Matson. *Paj* 2003;34-80.
- ESHRE Advanced Diagnostic Andrology Techniques. Andrology Special Interest Group-Proceedings of a Consensus Workshop held in Hamburg, Germany in June 1995. *Hum Reprod.* 3, 1996.
- ESHRE Monographs. Manual on basic semen analysis eds. U., Kvist y L., Bjoerndahl, 2002.
- Gotlieb C, Svanborg K, Eneroth P, y Bygdeman M. Adenosine triphosphate in human semen: a study on conditions for bioluminescence assay. *Fertil Steril* 1987; 47(6):992-999.
- Jeyedran R, Van der Ven H, Perez-Pelaez M, Crabo B, y Zaneveld J. Development as an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984;70:219-228.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, Van den Merwe J, y Van Zyl JA, Sperm morphological features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1986;46:1118-1123.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF y Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1988;49: 112-117.
- Kvist U. Sperm nuclear chromatin decondensation ability. *Acta Physiol. Scan Suppl* 1980;486:1-24.
- Liu Y, Lopata A, Johnston W, y Gordon Baker H. A human sperm-zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize *in vitro*. *Fertil Steril* 1988;50(5): 782-788.
- Liu Y, y Gordon Baker H. Test of human sperm function and fertilization *in vitro*. *Fertil Steril* 1992;58(3):465-483.
- Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco. Organización Mundial de la Salud, 1987, 1994, 1999.
- Oehninger, S.: Un update on the laboratory assessment of male fertility. *Human Reprod* 1995;10(1):38-43.
- Schill W, Kohn F, Henkel R, y Haidl G. Biochemical aspects of semen analysis, cap. 41, pag.303-309. *Fertility and Sterility- A current overview. Proceedings of the 15 th World Congress on Fertility and Sterility.* ed. by Hendon, B.; Bringer, J. y Mares, P., 1995.
- Yovich J, Edirisinghe W, y Yovich J. Use of the acrosome reaction to ionophore challenge test in managing patients in an assisted reproduction program: a prospective, double blind, randomized controlled study. *Fertil Steril* 1994; 61(5):902-910.