



LA MORFOLOGIA ESPERMATICA Y SU IMPORTANCIA COMO DIAGNOSTICO DE CAPACIDAD FERTILIZANTE

Desarrollo de un nuevo método de valoración por Video-Imágenes y su aplicación clínica

Dres. Brugo Olmedo, S.^(1,2,3); Calamera, J. C.⁽²⁾; González, O.⁽²⁾; Deparci, A.⁽²⁾; Verdinelli, J.⁽²⁾; Casal, J. M.⁽²⁾; Ale, R.⁽²⁾; Urrutia, F.⁽²⁾; Grippo, L.⁽²⁾; Lic. Nodar, F.⁽¹⁾

I. INTRODUCCION

1. El espermatozoide en los procesos de fertilización

- 1.1. Migración espermática
- 1.2. Capacitación
- 1.3. Reacción acrosómica
- 1.4. Interacción espermatozoide-zona pelúcida
- 1.5. Fusión espermatozoide-ovocito

II. CARACTERISTICAS DE LA MORFOLOGIA ESPERMATICA, CONCEPTOS CLASICOS Y NUEVO CRITERIO DE CLASIFICACION

2. Determinación de la morfología espermática

- 2.1. Aspectos biológicos de la morfología y su correlación con la clínica
- 2.2. Descripción de las características morfológicas
- 2.3. Técnicas de determinación objetiva de la morfología

III. DESARROLLO DE UN METODO MANUAL "SIMPLE" Y OBJETIVO DE DETERMINACION DE LA MORFOLOGIA

3. Introducción

- 3.1. Estudio del semen
- 3.2. Equipo utilizado
- 3.3. Diseño experimental
- 3.4. Resultados
- 3.5. Análisis estadístico

IV. APLICACION PRACTICA DEL METODO OBJETIVO PROPUESTO

4. Características

- 4.1. Criterios de selección
- 4.2. Material y métodos
 - 4.2.1. Obtención y preparación del semen para inseminación
 - 4.2.2. Estimulación de la ovulación
 - 4.2.3. Técnicas de inseminación
 - 4.2.4. Análisis estadístico

V. RESULTADOS

5. Según el diseño experimental establecido

- 5.1. Según la indicación
- 5.2. Según la concentración de espermatozoides en el *swim-up*

VI. DISCUSION

VII. CONCLUSIONES

VIII. AGRADECIMIENTOS

IX. BIBLIOGRAFIA

Trabajo ganador del Premio Senior Schering Argentina S.A.

(1) CEGyR: Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción

(2) LER: Laboratorio de Estudios en Reproducción

(3) Servicio de Urología. Hospital Francés

Acceptado para su publicación en noviembre de 1994

I. INTRODUCCION

1. El espermatozoide en los procesos de fertilización

Fue recién después de la segunda mitad del siglo XX cuando se dejó de responsabilizar exclusivamente a la mujer como única causante de la infertilidad conyugal.

Desde entonces comenzó a crecer gradualmente el concepto de "infertilidad masculina" y la posible contribución del hombre en los problemas de esterilidad matrimonial.

Hoy sabemos que para alcanzar su objetivo, el espermatozoide debe abandonar el plasma seminal, atravesar el moco cervical, llegar al sitio de fertilización y penetrar las capas que circundan al ovocito, fusionándose con el mismo. En su ruta, la gameta debe sufrir capacitación y reacción acrosómica, así como generar un segmento ecuatorial fusigénico.

1.1. Migración espermática

Luego de la relación sexual, el espermatozoide migra rápidamente hacia el moco cervical, pudiéndose observar gametas móviles a los 90 segundos de la eyaculación (*Sobrero y MacLeod*, 1962).

El pasaje por el moco cervical dependerá de la movilidad de las gametas masculinas y de las propiedades fisicoquímicas del moco y de la compatibilidad entre ambos (*Mortimer*, 1978).

Desde su entrada en el canal, un gran número de espermatozoides son retenidos en las criptas cervicales que actuarían como reservorio. A continuación las células espermáticas son liberadas a diferentes tiempos para que puedan continuar su camino hacia el sitio de fertilización (*Overstreet*, 1983).

Se ha sugerido que la migración ulterior dependerá primordialmente de la movilidad intrínseca de las gametas (*Mortimer y Templeton*, 1982).

El moco cervical actúa también como un filtro biológico, y sólo puede ser penetrado durante un período muy breve cercano a la puesta ovular (*Fredricsson y Bjork*, 1977). Es allí donde las gametas permanecerán protegidas por lo menos hasta 48 horas después de la inseminación (*Hanson y Overstreet*, 1981).

Los conocimientos que tenemos con relación a la migración espermática por el útero son muy limitados.

Las gametas pueden hallarse en la cavidad uterina 24 horas después de la relación sexual (*Rubinstein y col.*, 1951), pero no por mucho más tiempo, aun cuando se observen abundantes espermatozoides en el moco cervical (*Moyer y col.*, 1970).

Esto puede deberse a la destrucción o bien a la remoción de espermatozoides que comienza a producirse después de las 24 horas. La migración por el útero es consecuencia de la movilidad espermática y también de la contracción del miometrio. Es conocido el hecho de

que los espermatozoides cuando llegan al sitio de fertilización no se detienen, por el contrario, progresan fuera del infundíbulo oviductal hacia la cavidad peritoneal.

Con respecto a la unión útero-tubaria se le ha asignado la función de un segundo filtro de selección, que limitaría la migración de las gametas por las trompas.

Por medio de inseminaciones intra-uterinas, se ha demostrado claramente que a pesar de que se observa una alta concentración de espermatozoides en el útero, la entrada hacia las trompas se mantiene en forma constante (*Harper*, 1988).

Sabemos también que en animales, se necesitan movimientos espermáticos vigorosos para poder pasar por la unión útero-tubaria (*Overstreet*, 1983).

Luego de 5 minutos de depositar los espermatozoides en la vagina, pueden observarse gametas a nivel de las trompas (*Settlage y col.*, 1973). En este sector la migración consiste en una combinación de factores tales como la movilidad propia del espermatozoide, el efecto del fluido y la actividad muscular de las trompas (*Blake y col.*, 1983).

Muy pocos espermatozoides migran rápidamente a la región ampular. La mayoría de los mismos permanece en las proximidades del istmo antes de iniciar su recorrido hacia el sitio de fertilización.

Se ha estimado que el volumen de la secreción tubaria de la mitad del ciclo es de 20 a 40 μ l, y que la concentración de espermatozoides en la trompa está comprendida entre 5.000 a 50.000 (*Harpe*, 1988). Durante el transporte por el tracto reproductor femenino las gametas sufren algunos cambios que son pre-requisito para la fertilización.

1.2. Capacitación

Con el objeto de adquirir capacidad para fertilizar al ovocito, el espermatozoide humano debe sufrir un proceso denominado capacitación (*Austin*, 1951 y *Chang*, 1951).

Durante este período, se producen cambios fisiológicos, con una secuencia determinada que finalmente desembocan en un ingreso de calcio iónico (Ca^{++}) a la célula, que es requerido para poner en marcha la reacción acrosómica.

Dentro de los cambios mencionados se incluyen además transformaciones características de la membrana plasmática. No obstante, a los cambios ya citados que se producen en la superficie espermática, debemos agregar las modificaciones en el modelo de movilidad celular y los cambios en el estado de las enzimas acrosómicas.

Todo esto da como resultado un fenómeno de hiperactivación de la movilidad espermática (*Burkman*, 1984). Este último fenómeno fue descrito como un aumento de la movilidad con un desplazamiento del flagelo espermático que realizará un recorrido más amplio y tortuoso (*Yanagimachi*, 1981). En realidad varias observaciones han indicado una tendencia a aumentar la velo-

cidad de las células y/o del movimiento lateral de la cabeza.

Probablemente este mecanismo favorezca la migración por el istmo hacia el sector ampular (Cummins, 1982) y puede además mejorar la chance de contacto entre el espermatozoide y el ovocito dentro de la ampolla (Katz y col., 1978). Se ha calculado que como resultado de la hiperactivación se produce un aumento en el poder hidrodinámico del espermatozoide de hasta 20 veces (Johnson y col., 1981).

En mamíferos, los espermatozoides pueden capacitarse *in vitro* (Yanagimachi y Chang, 1963); comprobándose que en humanos el tiempo requerido para este mecanismo es de 6 horas (Austin, 1974).

Se han descrito además varios factores que afectan la capacitación, como por ejemplo: la temperatura, las variaciones individuales, la fuente de la que provienen las gametas (eyaculadas o epididimarias), la presencia de *cumulus oophorus* y la composición del medio (Yanagimachi, 1988).

1.3. Reacción acrosómica

Luego que se ha efectuado la capacitación, el espermatozoide sufre una serie de cambios exocitóticos denominados "reacción acrosómica".

Este evento parece involucrar el punto de fusión entre la membrana acrosómica externa y el plasmalema subyacente, con la formación de vesículas y la subsiguiente apertura de poros por donde escapa el contenido acrosómico (Soupart y Strong, 1974).

Es posible que los componentes del *cumulus* sean los responsables de la iniciación de los primeros estadios de la reacción acrosómica y que estos componentes asociados con la zona pelúcida actúen sinérgicamente con las moléculas de la zona para completar la reacción (Cherr y col., 1986).

Por lo menos 2 funciones biológicas han sido atribuidas a la reacción acrosómica: la exposición o liberación de enzimas hidrolíticas durante el proceso de vesiculización, y los cambios de la estructura de la región ecuatorial del plasmalema que permiten la fusión del espermatozoide con la membrana ovocitaria (Ahuja, 1985).

Se conoce poco respecto al tiempo de duración de la reacción acrosómica y su relación con la migración espermática. No obstante, la capacitación es un prerrequisito para que la reacción se produzca.

La velocidad de producción de la reacción depende de la especie estudiada, así como de las condiciones del espermatozoide y del ambiente en que se realiza.

El tiempo apropiado es importante, si por ejemplo la gameta sufre reacción acrosómica antes del encuentro con el ovocito, su capacidad de penetrar la zona puede perderse antes que deje de moverse.

El lugar en que se produce la reacción está aún sujeto a discusión, ya que se han observado diferencias entre las especies estudiadas. En humanos por ejemplo, se han

comprobado espermatozoides intactos y con acrosoma reaccionado que pueden unirse a la zona (Singer y col., 1985).

Es probable que la acrosina tenga un papel destacado en la reacción acrosómica humana y existen experimentos que sugieren que la función de la enzima se realiza con la intervención del sistema adenilato ciclasa (De Jonge y col., 1989).

El fracaso de la unión con la zona pelúcida sugiere que hay factores que interactúan específicamente sobre la membrana plasmática con los sitios de unión específicos de la zona. Es probable que se necesite que la reacción se realice sobre la superficie de la zona pelúcida para asegurar que la acrosina no sea inactivada prematuramente por el ambiente tubario.

Dado que el contenido del acrosoma se pierde como resultado de esta reacción, se ha sugerido que la acrosina involucrada en la penetración estaría unida a la membrana acrosómica interna.

1.4. Interacción espermatozoide-zona pelúcida

La interacción del espermatozoide con la zona pelúcida se realiza en dos fases: 1ª la de adhesión y 2ª la de unión. Esta última es, en realidad, la adhesión irreversible entre las dos gametas.

En condiciones naturales, la especificidad de especie de las interacciones son bien conocidas. No obstante esto, ciertas experiencias realizadas *in vitro* han revelado la posibilidad de uniones de tipo heterólogo en hamsters, ratones y conejos, pero no en humanos (Swenson y Dunbar, 1982).

Por el contrario, la penetración de espermatozoides a través de la zona pelúcida es un fenómeno específico de especies, con excepción de ciertas entidades biológicas estrechamente relacionadas entre sí (Yanagimachi, 1981).

Se sabe hoy que las células pueden controlar sus interacciones con otras células por medio de enzimas de superficie, denominadas ectoenzimas, que reconocen a sustratos extracelulares o a elementos que se encuentran sobre la superficie de células vecinas. Los sitios de unión pueden funcionar como lectinas (Bleil y Wasserman, 1980).

Hay además evidencias que sugieren que el fracaso en la unión espermatozoide-zona puede ser debido a la presencia de anticuerpos anti-espermatozoides (Bronson y col., 1982). Luego de la unión firme de la gameta masculina a la zona, comienza la penetración propiamente dicha. Este mecanismo envuelve fenómenos mecánicos de una particular actividad enzimática.

El espermatozoide deberá ejercer una fuerte presión al mismo tiempo que hacer jugar las enzimas acrosómicas para preparar el terreno para el pasaje de la gameta (Yanagimachi, 1988).

1.5. Fusión espermatozoide-ovocito

Luego del pasaje por la zona pelúcida, la cabeza espermática cruza el espacio perivitelino y se funde con la membrana plasmática del ovocito, incorporándose al ooplasma.

El movimiento espermático y la actividad flagelar cesan durante la fusión (Yanagimachi, 1981). Da la impresión de que el movimiento espermático no está involucrado en este último proceso.

Luego la membrana espermática de la región post-acrosómica se funde con la membrana del ovocito (Piko y Tyler, 1964). Esta fusión es sólo posible después que el espermatozoide ha sufrido reacción acrosómica. Durante este período final de la fertilización, el núcleo espermático se hincha y a través de la decondensación de la cromatina se transforma en el pronúcleo masculino. Este proceso dependerá también de las propiedades del ooplasma.

Los pronúcleos masculino y femenino, completamente desarrollados se moverán hacia el centro del ovocito, mientras que sus membranas nucleares se desintegran.

Los cromosomas de ambos pronúcleos se entremezclan para formar una disposición en metafase para la primera división mitótica (clivaje) (Longo, 1973).

Esta unión de los cromosomas puede considerarse como el final del proceso de fertilización y el comienzo del desarrollo embrionario.

II. CARACTERISTICAS DE LA MORFOLOGIA ESPERMATICA, CONCEPTOS CLASICOS Y NUEVO CRITERIO DE CLASIFICACION

2. Determinación de la morfología espermática

El estudio de la morfología espermática es una de las determinaciones seminales más controvertidas y que requiere mayor experiencia, no sólo en la realización del estudio, sino en la elección del sistema de expresión de los resultados.

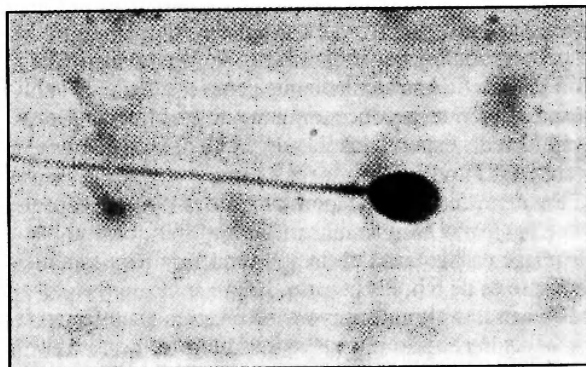
La controversia radica en que todavía no hay criterios claros para definir a un espermatozoide "normal" (Fig. 1).

La consecuencia de todo esto es que con frecuencia los resultados obtenidos en diferentes laboratorios no son comparables entre sí y más aún, los valores hallados dentro de un mismo laboratorio tampoco lo son (Ellison, 1971).

El semen humano contiene normalmente un cierto número de gametas anormales. Estas anomalías pueden comprender en algunos casos sólo a determinados componentes de la célula y en otros a toda ella, con modificaciones de la cabeza, pieza intermedia o cola, así como del tamaño y forma en general (Calamera, 1992).

Recientemente se ha puesto énfasis en la evaluación morfológica del semen como una ayuda diagnóstica y esto se ve corroborado con la profusa información bibliográfica que existe sobre el tema.

Forma normal Normal form



Cabeza oval: Long. cabeza: 5 a 6 μm - Diámetro: 2,5 a 3,5 μm - Acrosoma: 40 a 70% - Pieza y cola sin defectos.

Oval head: Head length: 5 to 6 μm - Diameter: 2.5 to 3.5 μm - Acrosome: 40% a 70% - No midpiece or tail defects.

Figura 1

2.1. Aspectos biológicos de la morfología y su correlación con la clínica

Se ha informado que en el hombre y en algunos animales, la forma y el tamaño de la cabeza del espermatozoide no se modifica apreciablemente desde el momento en que es liberado del epitelio germinal hasta la aparición de las células en el eyaculado (MacLeod, 1970).

Las anomalías espermáticas se han asociado con la infertilidad y en algunos trabajos se ha indicado que las malformaciones de las gametas podrían ser de características funcionales (Overstreet, 1981).

El fenotipo morfológico del espermatozoide está determinado genéticamente en condiciones y circunstancias normales (Wyrobek y Bruce, 1978). Luego, desde el punto de vista fisiológico, los componentes celulares del eyaculado representan cuali y cuantitativamente al epitelio germinal. Se ha demostrado que la citología seminal en humanos es un exponente real de las características morfológicas del epitelio germinal y además un indicador de los cambios producidos en dicho epitelio (MacLeod, 1964).

De lo expuesto surge que la morfología espermática es un parámetro muy sensible; luego, cualquier "stress testicular" así como condiciones fisiológicas anormales, o influencias ambientales producidas por ciertas ocupaciones y otros factores, como por ejemplo la frecuencia en las eyaculaciones, se ven reflejadas por una reducción de las formas normales (Sas y Szollosi, 1979).

Algunos defectos se originan por factores locales a nivel de espermatogonias o espermátocitos primarios, debido principalmente a funciones bioquímicas anormales de las células de Leydig, de la lámina propia o de las

células de Sertoli. Este tipo de anomalías se manifiestan especialmente en el acrosoma y son siempre irreversibles.

Otras causas pueden deberse a factores ambientales o al dicho "stress" y se observa en los estadios primarios de la espermatogénesis actuando primordialmente sobre las células de Sertoli. Este tipo de acción se manifiesta por una elongación simple que puede ser reversible o aún por una más severa que es irreversible (Hofmann y Haider, 1985).

El estudio de la relación entre movilidad y morfología, se remonta a 1981 en que se describen los primeros hallazgos video micrográficos. A través de estos estudios se comprobó que espermatozoides morfológicamente anormales frecuentemente son inmóviles o con una movilidad muy lenta.

El estudio detallado del golpe flagelar y su relación con la medición de la cabeza de las gametas reveló que los espermatozoides anormales tienen una forma de golpe flagelar similar a la de las células normales. Esto podría sugerir que el aporte contráctil de la cola espermática estaría anatómicamente conservado y que los mecanismos que controlan la geometría de la propagación de la onda flagelar estarían también intactos.

Estos mismos estudios demostraron que las formas "taperings" tienen una hidrodinamia superior a la de las formas normales, mientras que otras como las amorfas presentan una conformación hidrodinámica inferior.

El hecho de que ambas clases celulares nadan más lentamente que las formas ovales normales ha demostrado que el efecto hidrodinámico contribuye sólo en forma mínima en la capacidad de desplazamiento de las gametas anormales. Como hemos mencionado anteriormente, el moco cervical realiza una selección de espermatozoides y el mecanismo por el cual esto se produce no está aún perfectamente aclarado.

Una posibilidad que se deduce de las experiencias realizadas, sería que el moco cervical elimina las formas morfológicamente anormales por un fenómeno de filtración (Mortimer, 1978).

El criterio estricto para medir o clasificar morfológicamente a los espermatozoides fue descripto originalmente por un grupo de reproductólogos de la Universidad de Stellenbosch, en Sudáfrica, en el año 1986 (Kruger, 1986).

Esta idea fue redefinida en varios estudios cooperativos que se realizaron en el Jones Institute for Reproductive Medicine, dependiente de la Universidad de Virginia, en Norfolk, U.S.A.

En estos trabajos donde tuvimos oportunidad de colaborar, y en otros, se demostró la tremenda utilidad, confiabilidad y reproductibilidad de este método.

Hasta estos estudios, la utilidad de la clasificación morfológica espermática en la clínica andrológica estaba en duda, sobre todo en lo que se refiere a su correlación con la capacidad fertilizante de un semen dado.

El papel de la morfología espermática fue cuestionado como predictor de la capacidad de penetración en el test de Hamster (Aitken y col., 1982) o en el potencial de fertilización en los programas de Fertilización *in vitro* (Hirsch y col., 1986), debido a la dificultad en comparar las características morfológicas de las gametas masculinas utilizando criterios de diagnóstico diferentes y muchas veces arbitrarios.

El desarrollo de técnicas de reproducción de baja y alta complejidad ha permitido un mejor manejo del matrimonio infértil y ha contribuido a un mejor conocimiento de los principios fisiológicos básicos, como por ejemplo la inducción de la ovulación y la infertilidad masculina (Acosta y col., 1986); es así que técnicas como la fertilización *in vitro* permitieron conocer más íntimamente los mecanismos de fertilización normales y los alterados. De esta manera surgió la necesidad de tener la capacidad de "predecir" el comportamiento de un semen a través del estudio de los espermatozoides.

El primer trabajo publicado en esta área, donde se estudió a los espermatozoides con un criterio morfológico más estricto y se correlacionaron estos hallazgos con el porcentaje de fertilización de ovocitos *in vitro* se efectuó en la Universidad de Stellenbosch, Sudáfrica. Allí se demostró, en un estudio prospectivo sobre 129 pacientes que hicieron 190 ciclos de fertilización *in vitro*, que los sémenes con menos del 14 % de formas espermáticas normales, tenían un porcentaje de fertilización de ovocitos sensiblemente menor que aquellos con más del 14 % de espermatozoides normales. En el primer grupo de pacientes no se consiguió ningún embarazo (Kruger y col., 1986).

En un estudio similar que efectuamos en el Jones Institute observamos que, utilizando el 14 % como límite de normalidad, obtuvimos 49,4 % de fertilización en el grupo de pacientes con morfología por debajo de 14 % y 88,3 % en el grupo que tenía más de 14 % de morfología espermática normal ($p < 0,0001$) (Kruger y col., 1987).

En un trabajo posterior, en el año 1988, Oehninger y col. publicaron un estudio retrospectivo en 52 parejas en los cuales falló la fertilización. En una evaluación inicial, el 40,4 % de fracasos en la fertilización no pudo ser explicado y se diagnosticó 40,3 % de casos con anomalías espermáticas que no pudieron correlacionarse con el evento de la falla de la fertilización. Luego de re-diagnosticar la morfología espermática con el nuevo criterio, se pudo predecir un fracaso de fertilización en el 74,9 % de los casos.

A su vez se observó una severa disminución en la fertilización cuando los niveles morfológicos utilizando criterios estrictos son menores al 4 %. Es interesante destacar que se estableció al mismo tiempo el denominado índice morfológico que surge de sumar las formas normales y las ligeramente amorfas con un valor mínimo del 30 %. La ventaja en la utilización de criterios estrictos en el estudio de la morfología espermática fue la

de permitir reproductibilidad en los resultados entre pacientes y también entre técnicos (Kruger y col., 1987 b).

Es posible entonces clasificar a los pacientes en dos grupos (con menos de 14 % y con más de 14 % de formas normales) cualquiera sea la etiología de su patología seminal, lo que permite aconsejar al andrólogo la conducta a seguir tanto en estudios clínicos como en el caso de realizar prácticas de reproducción asistida de baja o alta complejidad.

Además, estos estudios permitieron realizar una subdivisión del grupo de menos de 14 % de formas morfológicamente normales: el de pobre pronóstico con menos del 4 % y el de buen pronóstico con valores entre 5 y 14 % de formas normales (Kruger y col., 1987).

2.2. Descripción de las características morfológicas

Recorriendo la literatura se observan numerosos sistemas de clasificación de morfología espermática. La O.M.S. estableció los criterios que se han expuesto en los sucesivos manuales que se han realizado desde los años setenta (O.M.S., 1992), y que fueron extraídos de numerosos trabajos en el transcurso de los años. Este sistema contempla las variaciones celulares necesarias para un correcto diagnóstico morfológico del espermatozoide, distinguiéndose como defectos estructurales de la cabeza a los siguientes: grandes, pequeños, acéfalos, *round cells*, *taperings*, bicéfalos y amorfos (Figs. 2, 3, 4 y 5).

El primer detalle a tener en cuenta cuando se estudia una muestra, es la estructura de los espermatozoides normales. Bajo condiciones estables la morfología de las células germinales en el hombre es marcadamente constante, con formas de cabeza oval de 4 a 5,5 µm de largo, de 2,5 a 3,5 µm de ancho, con un acrosoma que ocupa entre el 40 % y el 70 % de la cabeza, con una relación largo/ancho de 1,5 a 1,75 y sin defectos de pieza intermedia o cola.

Los espermatozoides con cabeza de longitud menor se agrupan entre los pequeños, y los de más de 6 µm serán incluidos entre los megaloespermias. Los *taperings* son un tipo especial de anomalía consistente en un adelgazamiento y alargamiento de la cabeza del espermatozoide. La elongación se efectúa más allá de la espermátide Sb2, donde el proceso de adelgazamiento se produce normalmente.

A su vez los amorfos son muy sencillos de diferenciar, dado que presentan anomalías muy marcadas del tamaño y de la forma de los componentes celulares, así como las células duplicadas, con más de una cabeza, núcleo o cola. Ciertos tipos de malformaciones como la falta de cabeza o las *round cells* son relativamente fáciles de diagnosticar.

La exfoliación prematura de las espermátides se produce predominantemente entre los niveles Sb1 y Sb2. Pero debe decirse también que pueden encontrarse agrupadas con un citoplasma común. Se acepta como normal entre 0,5 a 3 % de espermátides en el eyaculado. Tanto

en las espermátides mononucleares como en las multinucleares, los núcleos están localizados preferentemente junto al borde celular como si el núcleo se dirigiera hacia afuera por efecto de presiones internas.

Los defectos más frecuentes de la cola espermática son: el flagelo enrollado, doble, corto o ausente.

Las células piriformes de acuerdo con la opinión de algunos investigadores pueden ser contadas dentro de las amorfas o de los *taperings*.

Es posible reconocer en el hombre, aún en los de fertilidad conocida, la existencia de formas anormales. En su último manual la O.M.S. da como normal a aquellas muestras con más de 30 % de formas morfológicamente normales.

Es poco frecuente encontrar teratozoospermias puras, ya que normalmente están acompañadas de alteraciones en el recuento y movilidad espermáticas. Se ha observado que el stress testicular expresado por un aumento de las formas *taperings* y de células inmaduras se observan de manera destacable en el varicocele. Pero también se ha observado en dicha patología un aumento de las formas bicéfalas (MacLeod, 1970).

El efecto de ciertas drogas y la acción de la radiación sobre la morfología espermática fueron también extensamente estudiados. Durante la acción depresiva de las testosterona, se observó una tendencia a aumentar el número de células amorfas del eyaculado. No se observaron *taperings* pero a pesar de ello, se detectaron formas inmaduras en un nivel particularmente alto.

El uso de antiandrógenos como el acetato de ciproterona en dosis bajas de 100 mg por día, no sólo produce una disminución del número de espermatozoides, sino un aumento de las formas *taperings*. Dosis superiores a la mencionada producen un efecto mucho más marcado en el recuento y calidad de los espermatozoides.

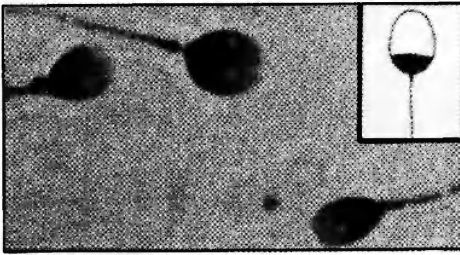
La ingestión de citrato de clomifeno a razón de 200 mg diarios durante algunos meses produjo tendencia a la bicefalia y al incremento de las formas *taperings*, no observándose aumento de las formas inmaduras.

Los rayos X en dosis inferiores a 300 r no producen signos de daño a la espermatogénesis, pero en dosis altas, los efectos son reflejados en la citología seminal con aumento de *taperings* y amorfos.

Se han descrito a nivel ultra-estructural, anomalías del acrosoma y de la orientación del flagelo, fenómenos que se han interpretado como manifestaciones de una espermatogénesis defectuosa.

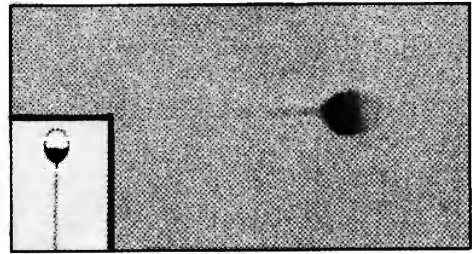
Obteniendo muestras de moco de la parte alta del canal cervical, se ha podido observar una apreciable población espermática con características morfológicas normales, que ha servido como referencia para estudios más precisos (Menkveld, 1987). Basados en estos estudios, se definió como espermatozoide "normal" a aquel que tiene una cabeza oval de contornos suaves con un acrosoma que ocupa del 40 % al 70 % de la cabeza, de 5 a 6 µm de largo y con 2,5 a 3,5 µm de ancho, sin anomalías de la nuca, pieza intermedia o cola y con una gota

Cabeza oval grande
Large oval head



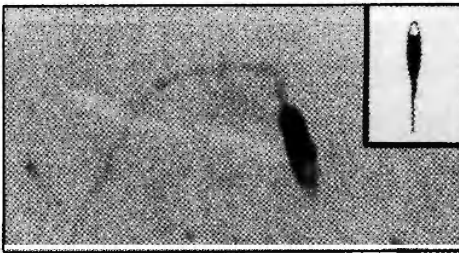
Cabeza oval: Long. cabeza: 6,5 μ m - Diámetro: 4 μ m - Acrosoma: 50 % - Pieza y cola sin defectos.
Oval head: Head length: 6.5 μ m - Diameter: 4 μ m - Acrosome: 50 % - No midpiece or tail defects.

Cabeza oval pequeña
Small oval head



Cabeza oval: Long. cabeza: 4 μ m - Diámetro: 3 μ m - Acrosoma: 40 % - Pieza y cola sin defectos.
Oval head: Head length: 4 μ m - Diameter: 3 μ m - Acrosome: 40 % - No midpiece or tail defects.

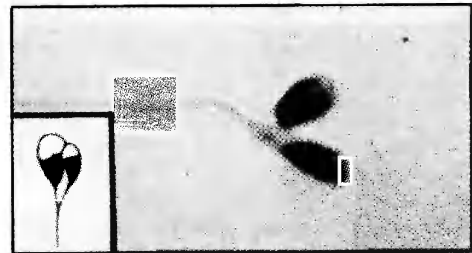
Tapering
Tapering head



Cabeza alargada: Long. cabeza: 7 μ m - Diámetro: 2 μ m - Acrosoma: 30 % - Pieza y cola sin defectos.

“Cigar” shape: Head length: 7 μ m - Diameter: 2 μ m - Acrosome: 30 % - No midpiece or tail defects.

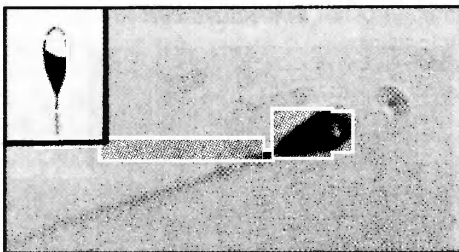
Cabeza duplicada
Double head



Cabeza duplicada: Long. cabezas: 4,5 y 4 μ m - Diámetros: 2,5 y 2 μ m - Acrosomas: 30 % y 30 % - Pieza doble y cola normal.

Duplicate head: Heads length: 4.5 and 4 μ m - Diameters: 2.5 and 2 μ m - Acrosome: 30 % and 30 % - Double midpiece and normal tail.

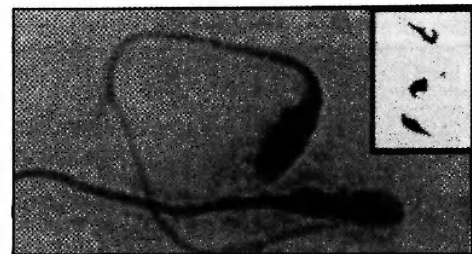
Piriforme
Pyriform



Cabeza ligeramente alargada: Long. cabeza: 6 μ m - Diámetro: 2,5 μ m - Acrosoma: 30 % - Pieza y cola sin defectos.

Slightly amorphous head: Head length: 6 μ m - Diameter: 2.5 μ m - Acrosome: 30 % - No midpiece or tail defects.

Amorfo
Amorphous head

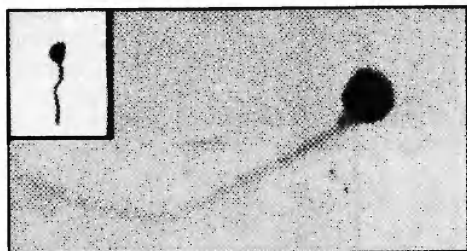


Cabeza irregular: Long. cabeza: 7,5 μ m - Diámetro: 2 μ m - Acrosoma: 10 % - Pieza y cola: defectos.

Irregular head: Head length: 7.5 μ m - Diameter: 2 μ m - Acrosome: 10 % - Midpiece or tail: defects.

Figura 2

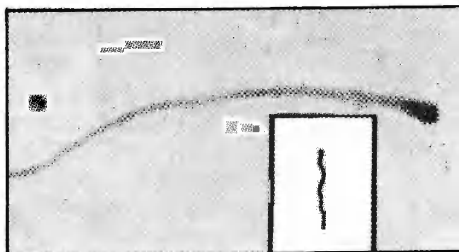
Round
Round head



Cabeza esférica: Long. cabeza: 3 µm - Diámetro: 3 µm - Acrosoma: 0% - Pieza y cola sin defectos.

Round head: Head length: 3µm - Diameter: 3 µm - Acrosome: 0% - No midpiece or tail defects.

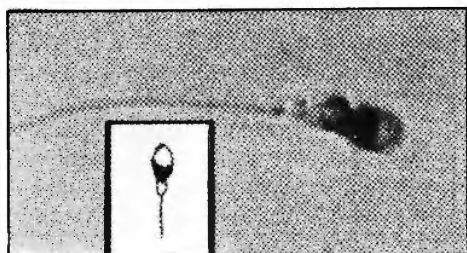
Acéfalo
Pin head



Cabeza, no posee: Long. cabeza: — - Diámetro: — - Acrosoma: — - Pieza y cola sin defectos.

Without head: Head length: — - Diameter: — - Acrosome: — - No midpiece or tail defects.

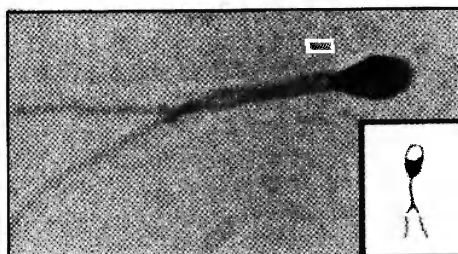
Defecto de pieza intermedia
Midpiece defect



Cabeza oval: Long. cabeza: 4,5 µm - Diámetro: 3 µm - Acrosoma: 50% - Pieza con defecto, cola normal.

Oval head: Head length: 4.5 µm - Diameter: 3 µm - Acrosome: 50% - Midpiece defect and normal tail.

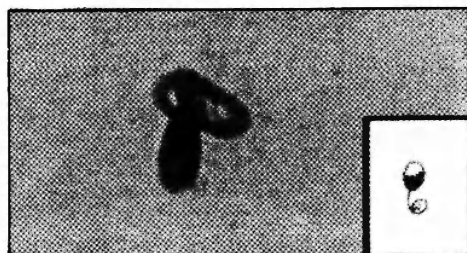
Defecto de cola
Tail defect



Cabeza oval: Long. cabeza: 5 µm - Diámetro: 3,5 µm - Acrosoma: 20% - Cola doble.

Oval head: Head length: 5 µm - Diameter: 3.5 µm - Acrosome: 20% - Double tail.

Defecto de cola
Tail defect



Cabeza oval: Long. cabeza: 6 µm - Diámetro: 2,5 µm - Acrosoma: 25% - Cola enrollada.

Oval head: Head length: 6µm - Diameter: 2.5 µm - Acrosome: 25% - Coiled tail.

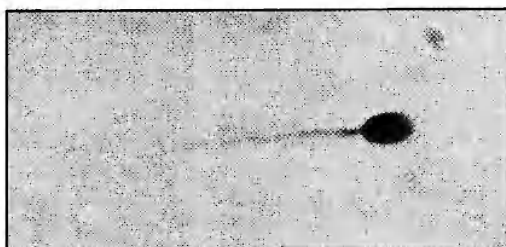
Forma inmadura
Immature cell



Espermátide
Spermatid

Figura 3

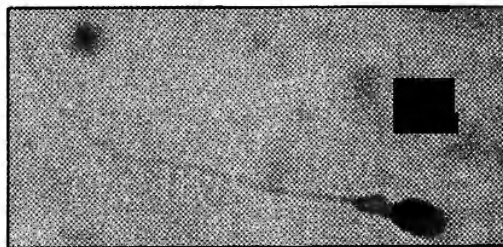
Ligeramente amorfo
Slightly amorphous



Cabeza ligeramente amorfa: Long. cabeza: 5 μm - Diámetro: 2,5 μm - Acrosoma: 35 % - Pieza y cola sin defectos.

Slightly amorphous head: Head length: 5 μm - Diameter: 2.5 μm - Acrosome: 35 % - No midpiece and tail defects.

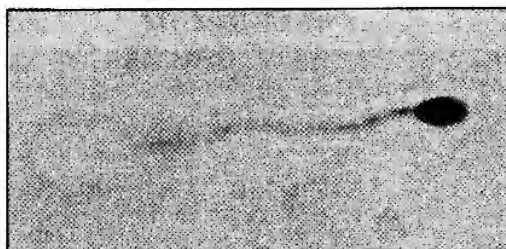
Ligeramente amorfo
Slightly amorphous



Cabeza oval: Long. cabeza: 5 μm - Diámetro: 3 μm - Acrosoma: 50 % - Pieza con defectos.

Oval head: Head length: 5 μm - Diameter: 3 μm - Acrosome: 50 % - Midpiece defects.

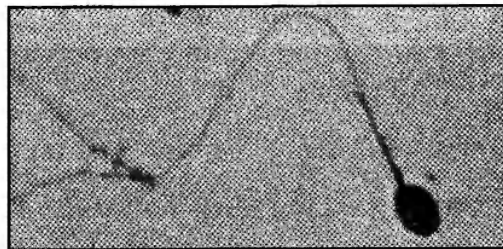
Forma amorfa severa
Amorphous severe



Cabeza ligeramente amorfa: Long. cabeza: 4,5 μm - Diámetro: 3 μm - Acrosoma: 10 % - Pieza y cola sin defectos.

Slightly amorphous head: Head length: 4.5 μm - Diameter: 3 μm - Acrosome: 10 % - No midpiece and tail defects.

Forma amorfa severa
Amorphous severe



Cabeza ligeramente amorfa: Long. cabeza: 5 μm - Diámetro: 2,5 μm - Acrosoma: 20 % - Pieza y cola sin defectos.

Slightly amorphous head: Head length: 5 μm - Diameter: 2.5 μm - Acrosome: 20 % - No midpiece and tail defects.

Figura 4

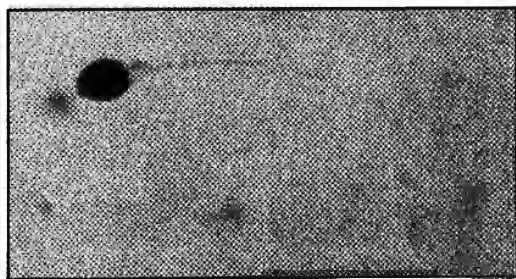
quinoplásmica que no sobrepase la mitad de la cabeza. Estos parámetros se utilizaron para desarrollar el método de clasificación espermática con criterio estricto (Kruiger y col., 1986) (Fig. 1). Como puede verse estas cifras difieren en la longitud celular a las propuestas por la O.M.S. (1992) (Tabla 1).

Debemos reconocer que fue con el advenimiento del sistema de clasificación con criterio estricto, que se ha puesto más atención en las anomalías del acrosoma, así como en la elongación y formas ligeramente amorfas. Estas últimas son especialmente importantes para realizar una mejor estimación del potencial de fertilización de un varón y establecer de esa manera un sistema de "predicción" de la capacidad fecundante más preciso en el caso de usar métodos tales como Fertilización *in vitro* (FIV), Inseminación Artificial Intrauterina (IAH-IU) o Transferencia Intratubaria de Gametas (GIFT).

	O.M.S.	Criterios estrictos
Cabeza	Oval	Oval
Acrosoma	40-70 %	40-70 %
Long. cabeza	4-5,5 μm	5-6 μm
Anch. cabeza	2,5-3,5 μm	2,5-3,5 μm
Pieza interm.	7-8 μm	7-8 μm
Delgada, recta y de líneas regulares, alineadas con el eje longitudinal de la cabeza		
Cola	45 μm	45 μm
Gota quinopl.	No mayor de la mitad de la cabeza espermática	

Tabla 1

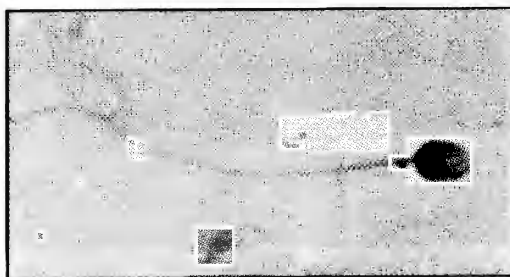
Forma amorfa severa
Amorphous severe



Cabeza ligeramente amorfa: Long. cabeza: 5 μm - Diámetro: 3 μm - Sin acrosoma - Pieza y cola sin defectos.

Slightly amorphous head: Head length: 5 μm - Diameter: 3 μm - Without acrosome - No midpiece and tail defects.

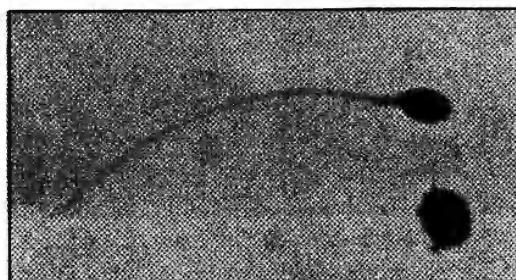
Forma amorfa severa
Amorphous severe



Cabeza ligeramente amorfa: Long. cabeza: 5 μm - Diámetro: 3,5 μm - Acrosoma: 80% - Pieza y cola sin defectos.

Slightly amorphous head: Head length: 5 μm - Diameter: 3.5 μm - Acrosome: 80% - No midpiece and tail defects.

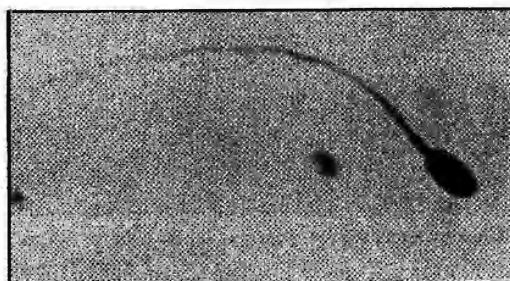
Forma amorfa severa
Amorphous severe



Cabeza ligeramente amorfa: Long. cabeza: 5 μm - Diámetro: 2,5 μm - Acrosoma: 10% - Pieza y cola sin defectos.

Slightly amorphous head: Head length: 5 μm - Diameter: 2.5 μm - Acrosome: 10% - No midpiece and tail defects.

Forma amorfa severa
Amorphous severe



Cabeza ligeramente amorfa: Long. cabeza: 5 μm - Diámetro: 2,5 μm - Acrosoma: 20% - Pieza y cola sin defectos.

Slightly amorphous head: Head length: 5 μm - Diameter: 2.5 μm - Acrosome: 20% - No midpiece and tail defects.

Figura 5

2.3. Técnicas de determinación objetiva de la morfología

Las imperfecciones en la evaluación de la morfología espermática, sumada a la dificultad en estandarizar el método, o implementar y controlar las mediciones manuales, han incentivado el desarrollo de métodos objetivos automáticos de análisis.

Han sido desarrollados un buen número de instrumentos semi-automáticos que individualmente fueron puestos a punto en diferentes laboratorios.

Uno de estos primeros intentos utilizó una tabla digitalizada unida a una microcomputadora. Las imágenes de los espermatozoides fotografiados se proyectaban sobre la tabla, donde por medio de una técnica manual

se calculaba el largo, el ancho y el área de las gametas (Schmassmann y col., 1979).

En un intento similar, se utilizó también esta metodología para estudiar 2 sistemas semiautomáticos donde se comparaban preparados obtenidos en fresco y muestras coloreadas y posteriormente montadas.

En estos estudios se observaron diferencias significativas entre los 2 tipos de preparados (Schmassmann y col., 1982) y además se comprobó que la relación ancho/largo es el mejor parámetro individual para distinguir los diferentes grupos celulares (Katz y col., 1986).

Para estudiar espermatozoides normales también fue utilizado un sistema que localiza y digitaliza automática-

mente imágenes por medio de videomicrografía. La relación entre los parámetros morfológicos, así como su variabilidad y su tendencia central, fueron presentados como un punto de partida para definir objetivamente la normalidad espermática (*Jagoë y col., 1986*).

Otro sistema que empleó digitalización automática de imágenes fue utilizado en combinación con una técnica estadística especial, por medio de este método se identificaban los parámetros de medida que mejor definían los tipos morfológicos. Fueron suficientes 4 parámetros que son el largo, el ancho, el área y el perímetro para diferenciar las formas normales con una precisión del 95 % (*Moruzzi y col., 1988*).

La posibilidad de un método objetivo y automático se conoce desde hace por lo menos 10 años. No obstante, solamente 2 instrumentos han sido presentados comercialmente (*Morphologizer de la Cryo Resources, New York y el Cell Form Human de la Motion Analysis Corp. Santa Rosa, Ca.*).

Otros sistemas computarizados como el *Cell Morph* (Universidad de California) y el *Fertech* de reciente aparición (*Kruger y col., 1993*) fueron comparados con los sistemas comerciales anteriormente mencionados.

Estos instrumentos localizan al espermatozoide en el campo microscópico, analizan y diferencian la cabeza espermática de otros tipos celulares y detritus y analizan la morfometría de la cabeza.

No existen por el momento aparatos comerciales que en forma automática puedan analizar la pieza intermedia y el flagelo.

Esta enumeración de los métodos objetivos, tanto los semiautomáticos y los morfométricos de análisis, han permitido una mejor estimación de las medidas de las gametas y también la variabilidad que sufren éstas como consecuencia de las diferentes preparaciones y condiciones clínicas.

No obstante, hay publicaciones donde se informa que no han encontrado ventajas al utilizar un sistema automatizado en comparación con medidas manuales pero controladas (*Wang y col., 1991*).

Es necesario intensificar los estudios, ya que nuestros conocimientos revelan las dificultades con que tropezamos para estandarizar los resultados con vistas a hacerlos comparables y precisos para poder convalidar el aporte de los instrumentos automatizados.

La gran utilidad de un sistema automático de morfometría espermática es la medición objetiva de la cabeza. Dicha medida facilita la introducción de mejores técnicas de clasificación usando modelos estadísticos que permiten una definición *ad hoc* del tipo celular.

Con ulteriores avances en el reconocimiento espermático y en la clasificación de los algoritmos, resultará también en un mejoramiento del análisis morfológico con vistas a su aplicabilidad en clínica e investigación.

III. DETERMINACION DE UN METODO MANUAL "SIMPLE" Y OBJETIVO DE DETERMINACION DE LA MORFOLOGIA

3. Introducción

Los espermatozoides muestran en general una morfología heterogénea y la literatura a este respecto es extensa.

Depende para su evaluación del tipo de análisis morfológico escogido, del método de coloración usado, de la interpretación de los resultados y por último de la sofisticación técnica disponible (*David y col., 1975*).

Mas aún, se ha demostrado que los espermatozoides morfológicamente normales nadan más rápido y más recto, además de exhibir mayor frecuencia de golpe flagelar que las gametas anormales (*Katz y col., 1982*). Estos autores desarrollaron un método objetivo de clasificación que se basó en los valores métricos propuestos por la O.M.S. en su momento.

Este sistema utilizaba tecnología por video imágenes juntamente con una lámina de acetato calibrada para un diagnóstico más sencillo.

A pesar de ser un método muy interesante y económico no fue ampliamente adoptado en los laboratorios de andrología, quizás por no existir en ese momento controles de calidad para la estandarización.

Sin lugar a dudas los laboratorios dedicados a esta especialidad deben usar tecnología de avanzada sin hacerla depender de su valor económico, con el objeto de proporcionar una ayuda diagnóstica eficaz. Al decir esto nos referimos a los métodos objetivos y automatizados que hemos descripto ya en este capítulo.

El costo de estos equipos ronda los 40.000 dólares, hecho que impide a muchos laboratorios intentar su compra y utilización.

Por esta razón, una de las propuestas de este trabajo es presentar un sistema nuevo de medición usando una modificación del método propuesto por *Katz y col., (1982)*, como una opción objetiva, "simple" y económica de estudio de morfología espermática.

Es importante destacar que repitiendo las características técnicas y metodológicas que a continuación detallaremos, cualquier laboratorio interesado en el tema puede implementar su propio equipo ahorrando el tiempo necesario para estandarizar el mismo, y de esta forma, se difundirá este sistema de clasificación espermática tan útil en la clínica andrológica, para su empleo en forma sistemática en todo espermograma.

3.1. Estudio del semen

Las muestras de semen fueron obtenidas por masturbación o usando un recolector seminal apropiado (*Calamera, 1978*) y estudiadas dentro de la hora de obtención luego de tres días de abstinencia sexual.

Los estudios de rutina que componen un espermograma se realizaron luego de la licuefacción de las muestras. Estos estudios incluyeron entre otros, la determinación objetiva de la concentración, movilidad, velocidad y linealidad de las gametas por medio de un *Cell Soft (Computer assisted semen analysis) (Cryo Resources New York USA)* (Foto 1).

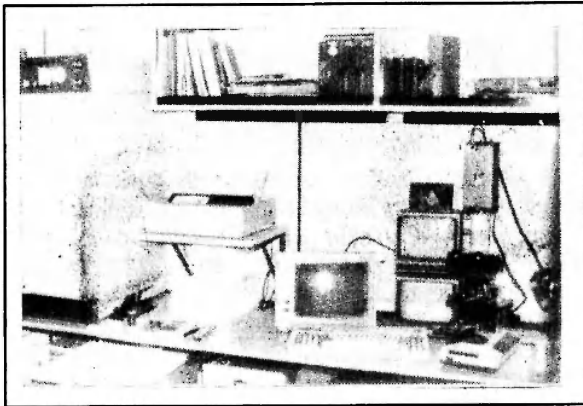


Foto 1

Los extendidos para los estudios morfológicos fueron realizados sobre portaobjetos limpios y desengrasados. Una gota de 5 µl de la muestra fue depositada sobre un extremo del portaobjeto y luego extendida cuidadosamente.

El objeto de esto es evitar acúmulos de espermatozoides y que las gametas puedan ser visualizadas separadamente (entre 3 y 5 por campo microscópico) modificando el tamaño de la gota de semen o bien el ángulo y velocidad en la realización del extendido.

Los preparados se dejaron secar a temperatura ambiente y luego se los fijó 10 minutos en metanol. El método de coloración fue en todos los casos la técnica de Papanicolau (O.M.S., 1992). A través de esta coloración, las cabezas de los espermatozoides se tiñen de azul pálido en la región acrosómica y de azul oscuro en la región post acrosómica. La pieza intermedia a su vez muestra una tonalidad rosada y la cola también se tiñe de azul.

Se estudiaron 200 espermatozoides en cada preparado utilizando una magnificación de 1.000 x. La morfología fue evaluada por 3 observadores diferentes usando el criterio propuesto por la O. M.S. (1992) o los criterios estrictos desarrollados por *Kruger y col.* (1988) (Figs. 2, 3, 4 y 5).

3.2. Equipo utilizado

El instrumental utilizado está formado por un microscopio Bausch y Lomb Galen II, equipado con una cámara monocromo CC LDH 0250/10 Philips; un ocular 6x montado en un tubo "observador" de 12,5 cm de

largo. El tubo conecta la cámara con el microscopio. El equipo se completa con un objetivo 100 x para campo brillante y un monitor tipo LDH 2134/10 Philips (Foto 2).

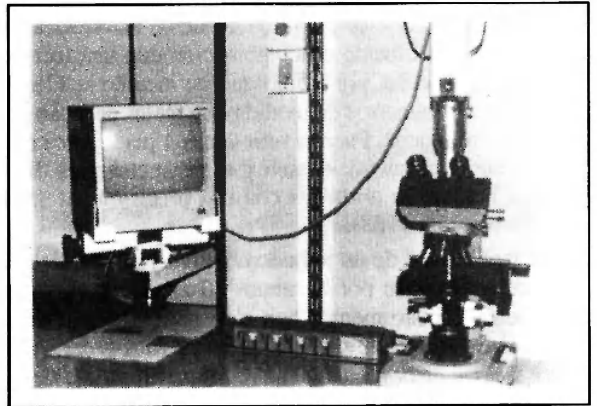


Foto 2

Las medidas realizadas sobre las cabezas de los espermatozoides fueron: longitud, ancho y porcentaje de acrosoma. Como consecuencia del estudio individual de las cabezas y colas, los espermatozoides fueron clasificados como normales de acuerdo con la propuesta de la O.M.S. o bien aplicando los criterios estrictos. Los valores de ambos sistemas fueron informados detalladamente en el capítulo 2.

3.3. Diseño experimental

Con el objeto de familiarizarse con el equipo, se realizaron un cierto número de determinaciones y una vez que los operadores se hallaban convenientemente entrenados, se mantuvieron las condiciones experimentales durante el transcurso del trabajo.

■ Experimento 1 (calibración del equipo):

Para la calibración y estandarización del equipo, los 3 observadores estudiaron cada uno 252 cabezas de espermatozoides; determinando la longitud y el ancho de las mismas en el microscopio. Para esto se utilizó un ocular 10 x con escala graduada en micrones.

Al mismo tiempo los espermatozoides fueron medidos en el monitor en centímetros y ambos valores relacionados entre sí. Los resultados de estas mediciones permitieron la calibración de la lámina de acetato. Para ello se confeccionaron dos diseños, uno con las medidas de la O.M.S. y el otro por el método de criterios estrictos (Gráficos 1 y 2).

En la figura 6 se pueden observar 2 áreas de medición:

A: área para la medida de la cabeza de los espermatozoides.

B: área para determinar el porcentaje del acrosoma.

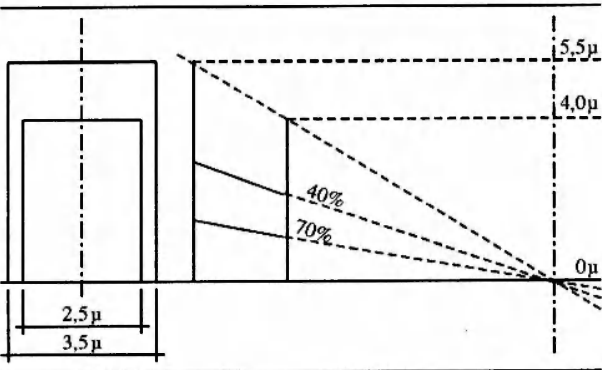


Gráfico 1

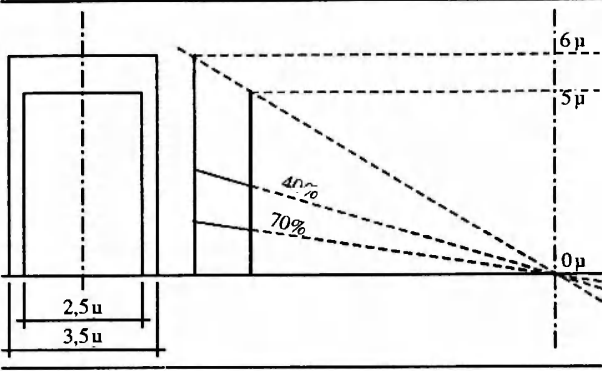


Gráfico 2

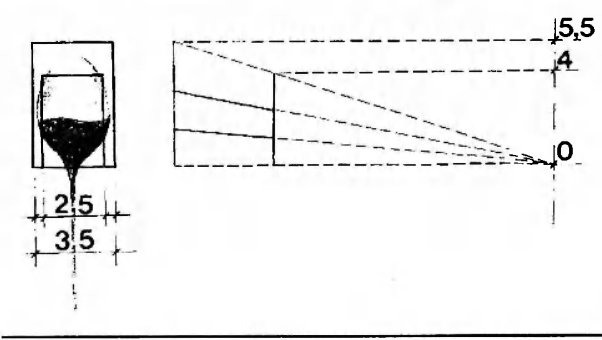


Figura 6a

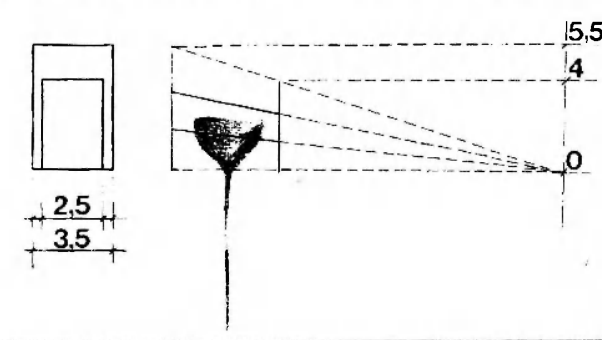


Figura 6b

■ **Experimento 2:**

A continuación cada uno de los 3 observadores estudiaron 10 preparados de sémenes normales y patológicos, contando 200 gametas en cada una (Foto 3). Para ello se utilizó la lámina de acetato de celulosa calibrada previamente. La aplicación de este sistema exige que las formas "borderline" sean consideradas anormales.



Foto 3 a

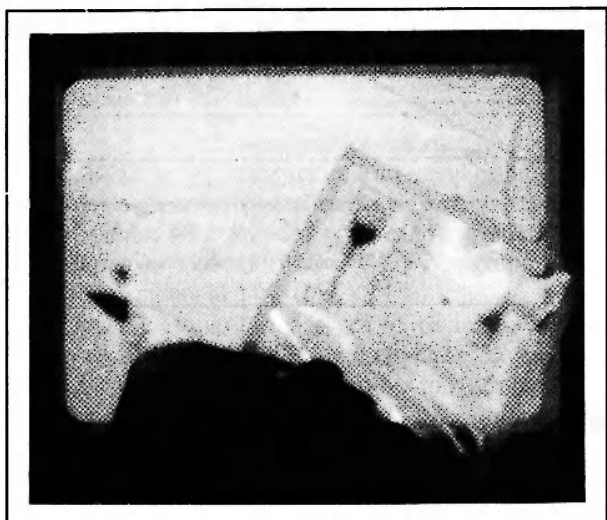


Foto 3 b

3.4. Resultados

■ **Experimento 1:**

Como consecuencia de la calibración del equipo se obtuvieron los valores que se observan en la Tabla 2 y en el Gráfico 3.

Medidas de las cabezas espermáticas					
Microscopio			Monitor		
Longitud	Ancho	L/A	Longitud	Ancho	L/A
μ	μ		cm	cm	
$4,85 \pm 0,05$	$2,90 \pm 0,03$	$1,67 \pm 0,02$	$1,99 \pm 0,02$	$1,19 \pm 0,01$	$1,67 \pm 0,03$

n = 252

Regresión: Constante: 0,238816; error estándar de Y est.: 0,044455; R cuadrado: 0,961002; grados de libertad: 6; coeficiente de x: 0,359 y el error estándar del coeficiente: 0,030.

Tabla 2

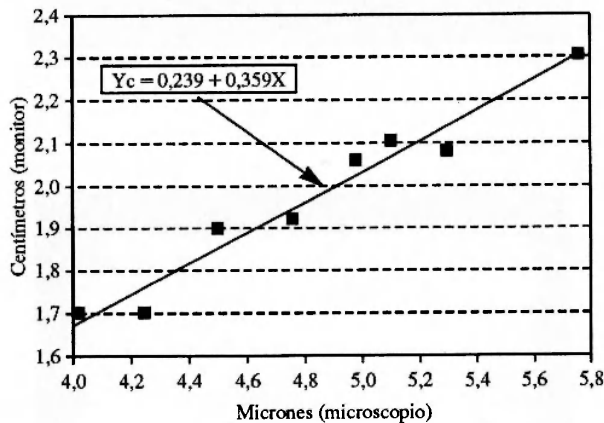


Gráfico 3

■ Experimento 2:

Los resultados obtenidos en el experimento 2, pueden observarse en la tabla 3. Demuestra que el error de los operadores no invalida la medición porque la relación que existe de la varianza entre los grupos a la varianza dentro de los grupos no es estadísticamente significativa.

3.5. Análisis estadístico

La relación entre el porcentaje de espermatozoides con morfología normal y anormal fue realizado usando un sistema ANOVA balanceado con efecto al azar.

	O.M.S.			Criterios estrictos		
	Oper 1	Oper 2	Oper 3	Oper 1	Oper 2	Oper 3
A	264,70	175,30	227,70	26,20	22,80	21,50
B	9	9	9	9	9	9
C	16,27	13,24	15,09	5,12	4,77	4,64
D	0,43	0,33	0,38	0,56	0,57	0,52
E	1.058,80	701,20	910,80	104,80	91,20	86,00
F	222,57	—	—	23,50	—	—
G	20,93	—	—	1,73	—	—

$F = \frac{\text{varianza dentro del grupo}}{\text{varianza entre los grupos}} = 0,09$
 $F = \frac{\text{varianza dentro del grupo}}{\text{varianza entre los grupos}} = 0,07$

A: Varianza. B: Grados de libertad. C: Desvío estándar. D: Coeficiente de variación. E: Suma de los desvíos al cuadrado. F: Varianza dentro del grupo. G: Varianza entre los grupos.

Tabla 3

IV. APLICACION PRACTICA DEL METODO OBJETIVO PROPUESTO

4. Características

Actualmente muchos centros han adoptado rutinariamente el estudio de la morfología espermática de acuerdo con los criterios estrictos, especialmente en aquellos pacientes que serán sometidos a algún método de reproducción asistida de alta complejidad (FIV, GIFT, etc.).

En nuestro centro se ha tomado la decisión de realizarlo también en aquellos casos en los cuales se aplicará una técnica de baja complejidad, especialmente cuando el espermograma presenta algún tipo de alteración.

Dado que recorriendo la literatura se observa con frecuencia la comparación de la morfología espermática con los índices de fertilización y embarazo en pacientes sometidos a FIV, el propósito del presente trabajo fue determinar si el estudio de la morfología con criterios estrictos puede ser útil para predecir los resultados de inseminación artificial homóloga intrauterina (IAH-IU), utilizando como elemento diagnóstico una medición objetiva y manual del espermatozoide (ver capítulo III).

4.1. Criterios de selección

Para ingresar en este estudio se requirió matrimonios con esterilidad de más de un año de evolución con pruebas post-coitales reiteradamente anormales.

Se efectuó en todos los casos la evaluación de la espermomigración *in vitro* (Kremer, 1965) y si el resultado

era negativo, estudios bioquímicos del moco cervical (Nicholson y Calamera, 1982) y bacteriología, incluyendo *Chlamydia*s y micoplasmas.

Fue condición necesaria la presencia de al menos una trompa permeable comprobada por histerosalpingografía y/o laparoscopia. En todos los casos se realizó una evaluación andrológica completa previa y se intentó corregir la anormalidad seminal o por lo menos mejorar la calidad de los espermatozoides. La etiología de los factores masculinos fue diversa y todos los pacientes fueron medicados previamente e incluso intervenidos quirúrgicamente en los casos de existencia de varicocele. Algunos pacientes no mejoraron su semen y otros sí lo hicieron alcanzando niveles de semen aceptables como para intentar una inseminación artificial intrauterina.

No se excluyeron del protocolo a aquellas pacientes con factores asociados de subfertilidad en tratamiento, tales como: fase lútea inadecuada, anovulación, endometriosis o hiperprolactinemia.

Se sugirió la realización de 6 ciclos de tratamiento, incluyendo en los resultados a todos los matrimonios, inclusive a aquellos que hicieron un solo intento.

4.2. Material y métodos

El estudio se efectuó sobre 100 matrimonios que completaron 388 ciclos de tratamiento, 71 presentaban esterilidad primaria y 29 secundaria. La duración promedio de la esterilidad fue de 48,5 +/- 4 meses y la edad promedio de la población femenina fue de 32,1 +/- 2 años y el de la masculina de 34,2 +/- 3 años. Las indicaciones de IAH-IU se dividieron en: masculinas 29 casos, femeninas 15 casos y mixtas 56 casos.

4.2.1. Obtención y preparación del semen para inseminación

Las muestras de semen se obtuvieron y estudiaron de acuerdo con lo expresado en 3.1.

Se procesaron según el método del *swim-up*, por doble lavado y centrifugación (Mc Dowell, 1983). En forma breve: el semen se lavó con 2 volúmenes de Ham's F 10 suplementado con suero humano al 7,5%. A continuación se realizó un segundo lavado con Ham's F 10 fresco. Sobre el pellet de espermatozoides se colocó 1 ml de Ham's F 10 y se incubó durante 1 hora y 30 minutos en estufa gaseada (5% de dióxido de carbono) a 37°C y con humedad a saturación. Luego de la incubación se retiró con cuidado la capa superior de Ham que contenía los espermatozoides más móviles y más lineales que fueron los que se utilizaron en la inseminación.

4.2.2. Estimulación de la ovulación

La estimulación de la ovulación en 305 ciclos se realizó con Citrato de Clomifeno 100 mg/día desde el día 3 al 7, asociado a 150 UI/día de hMG los días 2, 4, 6, 8, y 10; el día 11 se aplicó 10.000 UI de hCG.

A su vez en 83 ciclos, se usó hMG en dosis de 150 UI/día a partir del día 3 al 5 hasta alcanzar criterios de madurez folicular y en ese momento se indicó 10.000 UI de hCG. En ambos casos se suplementó la fase lútea con progesterona. En todos los ciclos se efectuó monitoreo de la ovulación por medio de una ecografía vaginal previa y otra posterior a la IAH-IU para confirmar la puesta ovular.

4.2.3. Técnica de inseminación

Se llevó a cabo una inseminación intrauterina por ciclo entre las 38 y 42 horas de la administración del hCG. La inseminación se realizó en forma ambulatoria en el consultorio, previa colocación de un espéculo bivalvo e hisopado cervical con algodón estéril. Se utilizó una cánula de Frydman a través de la cual se inyectó 0,5 ml del preparado (*swim-up*) con los espermatozoides en forma lenta a 0,5 cm del fondo uterino, dejando a la paciente en reposo no menos de 5 minutos. Al mismo tiempo se le solicitó que en las dos horas siguientes restringieran su actividad.

4.2.4. Análisis estadístico

Para la evaluación de los resultados se utilizó el test de "t" Student y el Chi-cuadrado.

V. RESULTADOS

5. Según el diseño experimental establecido

Se estudiaron 100 matrimonios estériles que completaron 388 ciclos de tratamiento. En base al estudio de la morfología espermática realizada con criterios estrictos, se dividieron en 2 grandes grupos: grupo I con morfología mayor al 14% (MK > 14%) y el grupo II con morfología menor al 14% (MK < 14%).

El grupo I estuvo formado por 65 pacientes con una media de MK del 17,6 ± 7% y con valores de *swim-up* de 24,1 ± 13,8 por 10 espermatozoides móviles por ml.

El grupo II estuvo formado por 35 pacientes con MK promedio de 8,8 ± 3,7% con un valor medio de *swim-up* de 17,1 ± 16,6 x 10 esp. mov./ml.

En el grupo I se realizaron un promedio de 3,78 ciclos por paciente y en el grupo II 4,05 ciclos con rango de 1 a 7 ciclos.

La edad promedio entre los pacientes del grupo I fue de 33,7 ± 3 años y los del grupo II de 31,4 ± 4 años, (I vs. II = no significativo).

Se lograron en total 23 embarazos, que correspondieron a 22 en el grupo I y sólo 1 en el grupo II. La tasa global de embarazos por paciente fue del 23% para toda la población estudiada. En el caso del grupo I fue del 33,8% y del 2,85% para el grupo II (I vs. II p < 0,05).

La tasa global de embarazos por ciclo en el total de la población fue del 5,93 %. En el caso del grupo I fue del

8,94 % y del 0,7 % para el grupo II (I vs. II $p < 0,05$) (Tabla 4).

Comparación entre ambos grupos

	Grupo I (MK > 14 %)	Grupo II (MK < 14 %)
Valor promedio morfología [■]	17,6 ± 3 %	8,8 ± 3,6 %
Valor promedio <i>swim-up</i> ^{■ ■}	24,1 ± 23,8 × 10 ⁶ × cc	17,1 ± 9,9 × 10 ⁶ × cc
Edad femenina promedio [■]	33,7 ± 3 años	31,4 ± 4 años
Ciclos por paciente ^{■ ■}	3,78	4,05
Embarazos por paciente [■]	22/65 (33,8)	1/35 (2,85)
Embarazos por ciclo [■]	22/246 (8,94 %)	2/42 (0,70 %)

■ I vs. II: $p < 0,05$ ■ ■ I vs. II: ns

Tabla 4

En el grupo I la tasa acumulativa de embarazos al cabo de 6 ciclos fue del 53,5 % (Tabla 5) y en el grupo II no se estimó por haber un solo embarazo.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de espermatozoides en el *swim-up* de ambos grupos ni tampoco en la edad de las pacientes.

Tasa acumulativa de embarazos (grupo I)

Ciclo acum.	Prop. no emb.	E/Pac.	E/Ciclo	Tasa embarazos
1	1,00	2/65	3,07 %	3,07 %
2	0,97	3/60	5,00 %	7,92 %
3	0,92	12/51	23,52 %	29,55 %
4	0,71	2/31	6,45 %	34,12 %
5	0,66	1/17	5,88 %	38,00 %
6	0,62	2/8	25,00 %	53,50 %

Tabla 5

5.1. Según las indicaciones

La tasa global de embarazos por paciente fue para las indicaciones masculinas del 13,8 %, para las femeninas del 60 % y para las mixtas del 17,8 %.

Entre las indicaciones masculinas (n = 29) la tasa total de embarazos por paciente en el grupo I fue del 25 % y no hubo embarazos en el grupo II (Tabla 6).

Con respecto a las indicaciones femeninas (n = 15) no hubo pacientes en el grupo II y la tasa total de embarazos por paciente fue del 60 % (Tabla 7).

Con indicaciones mixtas (n = 56) se alcanzó una tasa total de embarazo por paciente del 26,5 % en el grupo I y del 4,5 % en el grupo II (Tabla 8).

5.2. Según la concentración espermática del *swim-up*

Los ciclos fueron divididos de acuerdo con la concentración de gametas en el *swim-up* en 4 grupos (Tabla 9) y estos a su vez en subgrupos de acuerdo con la morfología espermática.

No se observaron embarazos en los ciclos con *swim-up* menor a 1,5 × 10⁶ esp. mov./ml.

Se obtuvieron 3 embarazos en 103 ciclos en el grupo de 1,5 a 5 × 10⁶ esp. mov./ml (2,91 % embarazo/ciclo) todos ellos en el grupo I (4,68 % embarazo/ciclo).

Resultados en indicaciones masculinas

	Grupo I			Grupo II			Grupos I + II		
	Pac.	Emb.	E/P	Pac.	Emb.	E/P	Pac.	Emb.	E/P
Olz.	3	1	33,3 %	2	0	—	5	1	20,0 %
Atz.	8	2	25,0 %	4	0	—	12	2	16,6 %
Oaz.	3	1	33,3 %	3	0	—	6	1	16,6 %
Hip.	2	0	—	2	0	—	4	0	—
Inm.	—	—	—	2	0	—	2	0	—
Total	16	4	25,0 %	13	0	—	29	4	13,8 %

Olz.: Oligozoozpermia. **Atz.:** Astenozoospermia. **Oaz.:** Oligoastenozoospermia. **Hip.:** Hipospermia. **Inm.:** Inmunológico.

Tabla 6

Resultados en indicaciones femeninas

	Grupo I			Grupo II			Grupos I + II		
	Pac.	Emb.	E/P	Pac.	Emb.	E/P	Pac.	Emb.	E/P
F. cer.	15	9	60 %	—	—	—	15	9	60 %
Total	15	9	60 %	—	—	—	15	9	60 %

Tabla 7

Resultados en indicaciones mixtas

	Grupo I			Grupo II			Grupos I + II		
	Pac.	Emb.	E/P	Pac.	Emb.	E/P	Pac.	Emb.	E/P
F.C. + Az	16	5	31,2 %	10	1	10,0 %	26	6	23,3 %
F.C. + Oaz.	10	1	10,0 %	6	0	—	16	1	6,2 %
F.C. + Hipos.	2	1	50,0 %	2	0	—	6	2	33,3 %
F.C. + Inmu.	2	0	—	2	0	—	4	0	—
Fact. Coit.	4	2	50,0 %	2	0	—	6	2	33,3 %
Total	34	9	26,5 %	22	1	4,5 %	56	10	17,8 %

Tabla 8

Resultados según la concentración del swim-up

	Nº de ciclos			Embarazos			Emb./Ciclo (%)		
	GI	GII	Glob.	GI	GII	Glob.	GI	GII	Glob.
1	34	27	61	—	—	—	—	—	—
2	64	39	103	3	—	3	4,68	—	2,91
3	48	22	70	6	—	6	12,50	—	8,57
4	100	54	154	13	1	14	13,00	1,85	9,09
Total	246	142	388	22	1	23	8,94	0,70	5,92

1: 0,1 a $1,5 \times 10^6$ espermatozoides móviles. 2: 1,5 a $5,0 \times 10^6$ espermatozoides móviles. 3: 5,0 a 10×10^6 espermatozoides móviles. 4: $> 10 \times 10^6$ espermatozoides móviles.

Tabla 9

En el grupo con 5 a 10×10^6 esp. mov./ml, la tasa global fue de 8,6 % de embarazos por ciclo, lográndose todos los embarazos también en el grupo I (12,5 % embarazo/ciclo).

Finalmente en el grupo con más de 10×10^6 esp. mov./ml, se obtuvieron 14 embarazos (9,09 % embarazo/ciclo), 13 en el grupo I (13 % embarazo/ciclo) y 1 en el grupo II (1,85 % embarazo/ciclo).

VI. DISCUSION

Los espermatozoides humanos a diferencia de lo que ocurre en otros mamíferos, muestran una movilidad y morfología heterogénea (Bedford y col., 1973).

No obstante, en hombres y probablemente en otras especies también, da la impresión de que la forma y el tamaño de la cabeza espermática no se modifican en grado apreciable desde el momento que el espermatozoide es liberado del epitelio germinal y aparece en el eyaculado.

La morfología espermática ha pasado a ser un parámetro muy importante como predictor de la capacidad fertilizante de un espermatozoide, hecho demostrado por nosotros y otros autores en numerosos trabajos publicados, tanto utilizando ovocitos humanos, de hamster y pruebas como el test de hemizona.

Autores como Mahadevan y Trouson (1984) indicaron que el porcentaje de formas anormales estaba relacionado significativamente con los niveles de fertilización.

Por otra parte se ha demostrado que el factor masculino juega un importante papel en el proceso de fertilización, donde un 73,7 % de los hombres infértiles pueden tener una movilidad y contaje espermáticos normales y presentan no obstante esto, características morfológicas anormales (Rogers y col., 1983).

También fue observada esta relación en un grupo de pacientes sometidos a FIV con diagnóstico de esterilidad sin causa aparente (Aitken y col., 1982).

Todos estos estudios han demostrado que existe una correlación excelente entre el porcentaje de espermatozoides con características normales y los índices de embarazo.

Por su simplicidad y economía el criterio estricto ha sido también propuesto como un método de evaluación de la capacidad fecundante en reemplazo de otros más costosos como el test de penetración en ovocitos de hamster (Calamera y col., 1989)

Por otro lado hemos probado que esta técnica de clasificación morfológica con criterio estricto es también predictora en los casos de inseminación artificial intrauterina.

Por todo ello consideramos que en la andrología de hoy, la medición del porcentaje de espermatozoides normales y anormales se ha vuelto crucial.

Es esencial la necesidad de contar con un instrumento y una técnica que colaboren para lograr que esta medición sea lo más exacta posible, reproducible y económica.

De allí lo interesante y novedoso de este aporte; no solamente como arma para la investigación básica sino como herramienta fundamental para el andrólogo clínico. Esto ayudaría a lograr un diagnóstico más correcto, así como evaluar el resultado de los tratamientos médicos y/o quirúrgicos efectuados en sus pacientes y para conseguir un mejor criterio en la elección de la técnica de reproducción asistida que deba usar, en el caso de ser necesaria (Dehninger y col., 1988).

La evaluación de las características morfológicas de los espermatozoides normales es subjetiva y dificultosa de comparar entre los laboratorios distribuidos por el mundo y esas diferencias son conocidas desde hace mu-

cho tiempo. Es por ese motivo que la O.M.S. fue desarrollando a través de los años diversos manuales donde se describieron diferentes tipos de clasificación subjetiva que aún hoy no han podido ser estandarizados.

Uno de los problemas principales al realizar una clasificación morfológica es la gran discrepancia en el diagnóstico que se observa entre diferentes operadores y aún cuando el mismo operador repite un estudio.

¿Cómo evitar esto? El método que hemos desarrollado en este trabajo tiene el propósito de realizar de manera simple y objetiva una técnica altamente reproducible.

Con la ayuda de este sistema, el coeficiente de variación entre los observadores fue del 9 % para el método de la O.M.S. y del 7 % para los criterios estrictos.

Con respecto al método de coloración se ha demostrado que las muestras teñidas por la técnica de Papanicolau o por el método Diff-Quik, poseen igual calidad permitiendo evaluar el estado morfológico del espermatozoide en detalle (*Enginsu y col.*, 1991) (*Kruger y col.*, 1987).

Elegimos la coloración de Papanicolau, simplemente porque su uso está aceptado ampliamente, dando buenas coloraciones no sólo de los espermatozoides sino también de otras células como las precursoras provenientes del epitelio germinal o los glóbulos blancos.

Es conocido el hecho de que no todos los grupos usan la misma técnica de evaluación o el mismo método de coloración, luego los resultados expresados en el presente trabajo sólo podrán ser comparados con aquellos que utilicen la misma metodología.

Las diferencias observadas al emplear el método subjetivo de estudios morfológicos ha dado un mayor estímulo a las investigaciones en la búsqueda de un método objetivo y automático de diagnóstico.

Si bien la posibilidad de realización de esta metodología data de los años 80, solamente un par de instrumentos han sido comercializados. El problema en este caso es el alto costo de este instrumental, que es inaccesible a muchos laboratorios.

Sin ninguna duda estos métodos automatizados son una promesa que permitirá al laboratorio andrológico trabajar en reproducción asistida o en infertilidad masculina con gran precisión.

La metodología para el estudio de la morfología espermática que exponemos en este trabajo podría ser una variante muy útil y poco costosa, que permitiría resolver las diferencias que existen entre laboratorios y aún entre técnicos, por su facilidad en clasificar apropiadamente los tipos celulares utilizando los lineamientos de la O.M.S. o el de criterios estrictos según las necesidades de la clínica.

En este estudio, al comparar la normalidad morfológica de acuerdo con la O.M.S. versus los criterios estrictos, tuvimos discrepancias en un 18 % de los casos. En todos ellos los criterios de la O.M.S. indicaban normalidad, no así los criterios estrictos. En este último grupo

no hubo embarazos. Si la morfología no fuera tenida en cuenta, estos pacientes podrían haber sido considerados normales o con una esterilidad sin causa aparente.

La evaluación de los porcentajes de embarazos en este estudio indican que en el grupo con $MK < 14\%$ se observó sólo un embarazo con una morfología normal del 11 %, lo que hace pensar en la posibilidad de que exista un subgrupo de mejor pronóstico, tal como ocurre con los pacientes de FIV.

Es necesario también tener en cuenta que la IAH-IU es un procedimiento ampliamente difundido, que no requiere de gran complejidad tecnológica, de un costo accesible y con resultados satisfactorios cuando se pone en práctica con un grupo seleccionado de pacientes. Existe un importante grupo de pacientes en Andrología para los cuales no existe un tratamiento medicamentoso o quirúrgico eficaz y se debe recurrir a la inseminación (IAH-IU) como única alternativa.

Nuestro objetivo fue correlacionar el estudio de la morfología espermática con criterios estrictos con los niveles de embarazo logrados a través del uso de la IAH-IU con el objeto de determinar su utilidad práctica.

Esto permite determinar mejor el grupo de pacientes que obtendrían beneficios reales con esta técnica.

El nivel global de embarazos en este trabajo es similar a lo informado previamente (*Ruhlmann y col.*, 1988) y por otros autores (*Allen y col.*, 1985) (*Yavetz y col.*, 1990) (*Horbay y col.*, 1991), quienes haciendo una revisión de la literatura agrupan un número importante de series con valores del 14 % al 31 % de embarazos.

Por ello creemos que así como la morfología basada en criterios estrictos se realiza en forma rutinaria en pacientes de FIV, debería también hacerse en aquellos en los cuales la indicación es una IAH-IU.

También puede ser útil en pacientes con esterilidad sin causa aparente, ya que se ha visto que un número determinado de pacientes con aparente factor masculino normal, tienen alterada su morfología (*Rogers y col.*, 1983).

Con respecto a la concentración espermática en el *swim-up* no se observaron embarazos cuando ésta fue inferior a $1,5 \times 10^6$ esp. mov./ml y con cifras de hasta 5×10^6 esp. mov./ml los resultados fueron pobres.

En los grupos de 5 a 10×10^6 esp. mov./ml y mayor de 10×10^6 esp. mov./ml se observaron los mejores resultados y es aquí donde podemos realizar un aporte importante eliminando de los grupos de IAH-IU a los pacientes con morfología $< 14\%$ debido a los pobres resultados que hemos mostrado.

VII. CONCLUSIONES

1) Un correcto diagnóstico de la morfología seminal es útil como predictor de la capacidad fertilizante de un espermatozoide en la fertilización *in vitro*, pero también es de suma utilidad para el andrólogo clínico.

2) La evaluación de la morfología espermática se realiza generalmente en forma subjetiva, este proceso dificulta notablemente la comparación de los resultados entre laboratorios e intralaboratorio.

3) Los métodos objetivos automatizados de morfología espermática, son una promesa que permitirán al laboratorio andrológico trabajar con más precisión y reproductibilidad.

4) El método objetivo y manual propuesto en este trabajo es una herramienta alternativa muy útil, simple de realizar y de bajo costo, que presenta una precisión del 93 %.

5) Por otra parte, la IAH-IU es un procedimiento ampliamente difundido que no requiere de gran complejidad tecnológica, de costo accesible y con resultados satisfactorios cuando se pone en práctica en un adecuado grupo de pacientes.

6) De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se observó una buena correlación entre el estudio de la morfología espermática objetiva con criterios estrictos y los niveles de embarazo logrados a través del uso de la IAH-IU.

7) Por ello creemos que así como la morfología basada en criterios estrictos se realiza en forma rutinaria en pacientes en fertilización *in vitro*, debería hacerse también en aquellas en las cuales la indicación es una IAH-IU.

VIII. AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la *Dra. María del Carmen Quirós*, al *Sr. Claudio Botti*, al *Sr. Patricio Zunini*, a la *Lic. Florencia Nodar* y a la *Sra. Cristina Ruiz*, el apoyo e inestimable ayuda recibidos para la realización del presente trabajo.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Acosta, A. A.; Chillik, C. F.; Brugo, S.; Ackerman, S.; Swanson, R. J.; Pleban, P.; Yuan, J. y Hague, D.: In vitro fertilization and the male factor. *Urol.*, 28:1-5, 1986.
2. Acosta, A. A.; Oehninger, S.; Morshedi, M.; Swanson, R. J.; Scott, R. e Irianni, F.: Assisted reproduction in the diagnosis and treatment of the male factor. *Obstet. Gynecol. Sum.*, 44:1-18, 1988.
3. Ahuja, A.: Carbohydrate determinations involved in mammalian fertilization. *Am. J. Anat.*, 174:207-223, 1985.
4. Aitken, R. J.; Best, F. S. M.; Richardson, D. W.; Djahanbakhch, O.; Mortimer, D.; Temperton, A. A. y Lees, M. M.: An analysis of sperm function in cases of unexplained infertility: conventional criteria, movement characteristics and fertilizing capacity. *Fertil. Steril.*, 38:212-217, 1982.
5. Allen, N.; Herbert, C.; Maxon, W.; Rogers, J.; Diamond, N. y Wentz, A.: Intrauterine insemination. A critical review. *Fertil. Steril.*, 44:569-572, 1985.
6. Austin, C. R.: Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res.*, B4:581-589, 1951.
7. Austin, C. R.: Membrane fusion events in fertilization. *J. Reprod. Fertil.*, 44:155-166, 1974.
8. Bedford, J. M.; Bent, M. J. y Calvin, H.: Variation in the structural character and stability of the nucleolar chromatin in morphologically normal human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 33:19-39, 1973.
9. Blake, J. R.; Vaun, P. G. y Winet, H.: A model of ovum transport. *J. Theor. Biol.*, 102:145-166, 1983.
10. Bleil, J. D. y Wassermann, P. M.: Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in the mouse egg zona pellucida possessing receptor activity for sperm. *Cell*, 20:873-881, 1980.
11. Bronson, R. A.; Cooper, G. W. y Rosenfeld, D. L.: Sperm specific isoantibodies and autoantibodies inhibit the binding of human zona pellucida. *Fertil. Steril.*, 38:724-729, 1982.
12. Burkman, L. J.: Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligozoospermic populations. *Arch. Androl.*, 13:153-165, 1984.
13. Calamera, J. C.: Spermatozoa motility and fructolysis. Comparative study of samples obtained by masturbation and with plastic collector. *Andrologia*, 10:169-172, 1978.
14. Calamera, J. C.; Brugo, S.; Quirós, M. C. y Nicholson, R. F.: Morfología seminal anormal, relación con ATP, la acrosina espermática y el test de penetración en ovocito de Hamster. *Ginecol. Reprod.*, 1:185-189, 1989.
15. Calamera, J. C.: En: Introducción al estudio del espermatozoide. Ed. Héctor Macchi. Buenos Aires, 1992.
16. Chan, M. C.: Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tube. *Nature*, 168:697-698, 1951.
17. Cherr, G. N.; Lambert, H.; Meizel, S. y Katz, D. F.: In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: Completion on the zona pellucida and induction by homologous solubilized zona pellucida. *Dev. Biol.*, 114:119-123, 1986.
18. De Jonge, C. J.; Mack, S. R. y Zaneveld, L. J. D.: Synchronous assay for human sperm capacitation and the acrosome reaction. *J. Androl.*, 10:232-236, 1989.
19. David, G.; Bisson, J. P.; Czyglik, F.; Jovannet, P. y Gernignon, C.: Anomalies morphologiques du spermatozoide humain: proposition pour un système de classification. *J. Gynaecol. Obstet. Biol. Reprod.*, 4 (suppl. 1):17-43, 1975.
20. Eliasson, R.: Standards for investigation of human semen. *Andrologia*, 3:49-51, 1971.
21. Enginsu, M. E.; Dumoulin, J. C. M.; Pieters, M. H. E. C.; Bras, M.; Vers, J. L. H. y Geraedts, J. P. M.: 1991.
22. Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quick staining: correlation of morphology with fertilization in vitro. *Human Reprod.*, 6:854-858.
23. Fredricsson, B. y Bjork, G.: Morphology of post coital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance. *Fertil. Steril.*, 28:841-845, 1977.
24. Freund, M.: Performance and interpretation of the semen analysis. En: Management of the infertile couple. Ed. M. Roland. Springfield 11. Charles C. Thomas, p. 48, 1968.
25. Harper, M. J. K.: Gamete and Zygote transport in: The Physiology of reproduction. Eds. E. Knobil and J. Neill. Raven Press. New York, p. 103-134, 1988.

26. Hanson, F. W. y Overstreet, J. W.: The interaction of human spermatozoa with cervical mucus in vivo. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 140:173-178, 1981.
27. Hinting, A.; Comhaire, F.; Vermeulen, L.; Dhont, M.; Vermeulen, A. y Vandekerckhove, D: Value of sperm characteristics and the result of in vitro fertilization predicting the outcome of GIFT. *Int. J. Androl.*, 13:59-66, 1990.
28. Hirsch, A.; Gibbons, W. E.; Lipshultz, L. I.; Rossavik, K. K.; Young, R. L.; Dodson, M. G. y Findley, W. E.: In vitro fertilization in couples with male factor infertility. *Fertil. Steril.*, 45:659-662, 1986.
29. Hofmann, N. y Haider, S. G.: New ergebnisse morphologischer diagnostik der spermatogenesestörungen. *Gynakologie*, 18:70-75, 1985.
30. Horbay, G. L.; Cowell, C. A. y Casper, R. L.: Multiple follicular recruitment and intrauterine insemination outcomes compared by age and diagnosis. *Human Reprod.*, 947:6-11, 1991.
31. Jagoe, J. P.; Washbrok, N. P. y Hudson E. A.: Morphology of spermatozoa using semiautomatic image analysis. *J. Clin. Pathol.*, 39:1347-1352, 1986.
32. Johnson, L. L.; Katz, D. F. y Overstreet, J. W.: The movement characteristics of rabbit spermatozoa before and after activation. *Gamete Res.*, 4:275-282.
33. Katz, D. F.; Yanagimachi, R. y Dresdner, R. D.: Movement characteristics and power output of guinea pig and hamster spermatozoa in relation to activation. *J. Reprod. Fertil.*, 52:167-172, 1978.
34. Katz, D. F.; Overstreet, J. W.; Samuels, S. J.; Niswander, P. W.; Bloom, T. D. y Lewis, E. L.: Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *J. Androl.*, 7:203-210, 1986.
35. Katz, D. F.; Diel, L. y Overstreet, J. W.: Differences in the movement of morphologically normal and abnormal human seminal spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 26:566-570, 1982.
36. Kremer, J.: A simple sperm penetration test. *Int. J. Fertil.*, 10:209-211, 1965.
37. Kruger, T. F.; Menkveld, R.; Stander, F. S. H.; Lombard, C. J.; Van der Merwe, J. P.; Van Zyl, J. A. y Smith, K.: Sperm morphology as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 46:118-1122, 1986.
38. Kruger, T. F.; Acosta, A. A.; Simmons, K. F.; Swanson, J. R.; Matta, J. F.; Veek, L. L.; Morshedi, M. y Brugo, S.: A new method of evaluating sperm morphology with predictive value for IVF. *Urol.*, 30:48-251, 1987.
39. Kruger, T. F.; Acosta, A. A.; Simmons, K. F.; Swanson, J. R.; Matta, J. F. y Oehninger, S.: Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 49:112-115, 1988.
40. Kruger, T. F.; Ackerman, S. B.; Simmons, K. F.; Swanson, J. R.; Brugo, S. y Acosta, A. A.: A quick reliable staining technique for sperm morphology. *Arch Androl.*, 18:275-277, 1987b.
41. Kruger, T. F.; Dutoit, T. C.; Franken, D. R.; Acosta, A. A.; Oehninger, S.; Menkveld, R. y Lombard, C. J.: A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is a efficient as technician reading. *Fertil. Steril.*, 59:202-209, 1993.
42. Longo, F. J.: Fertilization: A comparative ultrastructural review. *Biol. Reprod.*, 9:149-215, 1973.
43. MacLeod, J.: The significance of deviations in human sperm morphology. In *The Human Testis*. Eds. Rosenberg, E.; and Paulsen, A. C. Plenum Press. New York, p. 481, 1970.
44. MacLeod, J.: Human seminal cytology as a sensitive indicator of the germinal epithelium. *Int. Androl.*, 9:281-285, 1964.
45. Mahadevan, M. y Trounson, A. D.: The influence of seminal characteristics on the succes rate of human in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 42:400-408, 1984.
46. Menkveld, R.: Onderzoek na omgewingsinuloede op spermatogenese en smenparameters (Phd Proefskrif) Universiteit van Stellenbosch, 1987.
47. McDowell, J. S.: Preparation of semen for in vitro fertilization. *Infertility*, 6:149-152, 1983.
48. Mortimer, D.: Selectivity of sperm transport in the female genital tract. En: *Spermatozoa antibodies and infertility*. Eds. Cohen, J.; Hendry, W. F. Blackwell Scientific publications, London, p. 37-53, 1978.
49. Mortimer, D. y Templeton, A. A.: Sperm transport in the human female reproductive tract in the relation to semen analysis characteristics and time of ovulation. *J. Reprod. Fertil.*, 64:401-408, 1982.
50. Moruzzi, J. F.; Wyrobek, A. J.; Mayall, B. H. y Gledhill, B. L.: Quantization and classification of human sperm morphology by computer-assisted image analysis. *Fertil. Steril.*, 50:142-152, 1988.
51. Moyer, D. L.; Rimcluisit, S. y Mishell, D. R. J.: Sperm distribution and degradation in the human female reproductive tract. *Obstet. Gynecol.*, 35:831-840, 1970.
52. Nicholson, R. F. y Calamera, J. C.: Bioquímica del contenido cervical y endometrial para el estudio de la migración espermática en mujeres estériles. *O.G.L.A.*, 40:293-295, 1982.
53. Overstreet, J. W.: Transport of gametes in the reproductive tract of the female mammal. En: *Mechanism and control of animal fertilization*. Ed. J. F. Hartmann Academic Press New York, p. 499, 1983.
54. Overstreet, J. W.; Price, M. J.; Blazak, W. F.; Lewis, E. L. y Katz, D. F.: Simultaneous assessment of human sperm motility and morphology by videomicrography. *J. Urol.*, 126:357-370, 1981.
55. O.M.S.: Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press. Cambridge, 1992.
56. Oehninger, S.; Acosta, A. A.; Morshedi, M.; Veek, L.; Swanson, R. J.; Simmons, K. y Rozenwacs, Z.: Corrective measures and pregnancy outcome in in vitro fertilization in patients with severe sperm morphology abnormalities. *Fertil. Steril.*, 50:283-287, 1988.
57. Piko, L. y Tyler: Fine structural studies of sperm penetration in the rat. Proceeding of the 5th International Congress on animal reproduction Trento, Italia, Vol. 2 p. 372-374, 1964.
58. Rubinstein, B. B.; Atrass, H.; Lazarus, M. L. y Hankin, H.: Sperm survival in women. Motile sperm in the fundus and tubes of surgical cases. *Fertil. Steril.*, 2:15-19, 1951.
59. Ruhlmann, C.; Brugo Olmedo, S.; Aun, E.; Chillik, C.; González Fabbrizzi, E.; Nicholson, R. E.; Calamera, J. C. y Nicholson, R. F.: Inseminación artificial intrauterina. La experiencia del CEG y R. *Ginecol. Reprod.*, 1:11-16, 1988.

60. Rogers, B. J.; Bedford, B. J.; van Campen, H.; Helmbrecht, G.; Sderhall, D. y Hale R. W.: Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity. *J. Androl.*, 4:119-124, 1983.
61. Sobrero, A. J. y McLeod, J.: The immediate post-coital test. *Fertil. Steril.*, 13:184-189, 1962.
62. Settlage, D. S. F.; Motoshima, M. y Tredway, D. R.: Sperm transport from the external cervical os to the fallopian tubes in woman: A time and quantitation study. *Fertil. Steril.*, 24:655-661, 1973.
63. Soupart, P. y Strong, P. A.: Ultrastructural observations of human oocyte fertilized in vitro. *Fertil. Steril.*, 25:11-44, 1974.
64. Singer, S. L.; Lambert, H.; Overstreet, J. W.; Hauson, F. y Yanagimachi, R.: The kinetics of human sperm binding to the human zona pellucida and zona free hamster oocyte in vitro. *Gamete Res.*, 12:29-39, 1985.
65. Swenson, C. E. y Dunbar, B. S.: Specific sperm-zona interaction. *J. Exp. Zool.*, 219:97-104, 1982.
66. Sas, M. y Szollosi, J.: Impaired spermatogenesis as a common finding among professional drivers. *Arch. Androl.* 3: 57-60, 1979.
67. Schmassmann, A.; Mikuz, G.; Bartsch, G. y Rohr, H.: Quantification of human sperm morphology and motility by means of semi-automated image analysis systems microscopic. *Acta* 82:163-178, 1979.
68. Schmassmann, A.; Mikuz, G.; Bartsch, G. y Rohr, H.: Objective and reproducible methods for evaluating sperm morphology. *Eur. Urol.*, 8:274-279, 1982.
69. Van Zyl, J. A.; Van, W. Kotze y Menkveld, R.: Predictive value of spermatozoa morphology in natural fertilization. En: Human spermatozoa in assisted reproductive. Eds. Acosta, A. A.; Swanson, R. J.; Ackerman, S. B.; Kruger, T. F.; Van Zyl, J. A. y Menkveld, R. Williams y Wilkins. London, p. 319, 1990.
70. Wang, C.; Ng, V.; Leung, A.; Lee, K. F.; Tsoi, W. L. y Chang, S. Y. W.: Computer assisted assessment of human sperm morphology: comparison with visual assessment. *Fertil. Steril.*, 55:983-998, 1991.
71. Wyrobek, A. S. y Bruce, W. R.: Induction of sperm-shape abnormalities in mice and human. En: Chemical Mutagens. Eds. Hollander, A.; de Serres, F. S. *Plenum Press.*, 5:257, 1978.
72. Yanagimachi, R.: Mechanism of fertilization in mammals. En: Fertilization and Embryonic Development in vitro. Eds. Mastroianni L. J. D. Biggers. Plenum Press New York, 81-182, 1981.
73. Yanagimachi, R. y Chang, M. C.: Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature* 200:155-166, 1963.
74. Yanagimachi, R.: Mammalian fertilization. En: The physiology of reproduction. Eds. Knobil E and Neill J. Raven Press, New York, p. 135-185, 1988.
75. Yavetz, H.; Mosek, A.; Yogev, L.; Paz, G. y Homonnai, Z. T.: Intrauterine insemination in subfertile couples. *Andrologia*, 22:29-33, 1990.