

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y
ANTROPOLOGÍA FÍSICA

ANÁLISIS INTEGRADO DE MORFOLOGÍA Y MOVILIDAD
ESPERMÁTICA HUMANA CON EL USO DEL SPERM
CLASS ANALYZER

CRISTINA ÁLVAREZ LLEÓ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2003

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 04 de Setembre de 2003 davant un tribunal format per:

- Dr. D. Javier Núñez De Murga
- Dr. D. José Pertusa Grau
- Dra. D^a. Luisa Diéguez Belmonte
- Dr. D. José Álvaro Cebrián Pérez
- Dra. D^a. Inmaculada Molina Botella

Va ser dirigida per:
Dr. Carles Soler Vázquez

©Copyright: Servei de Publicacions
Cristina Álvarez Lleó

Depòsit legal:
I.S.B.N.:84-370-5759-0

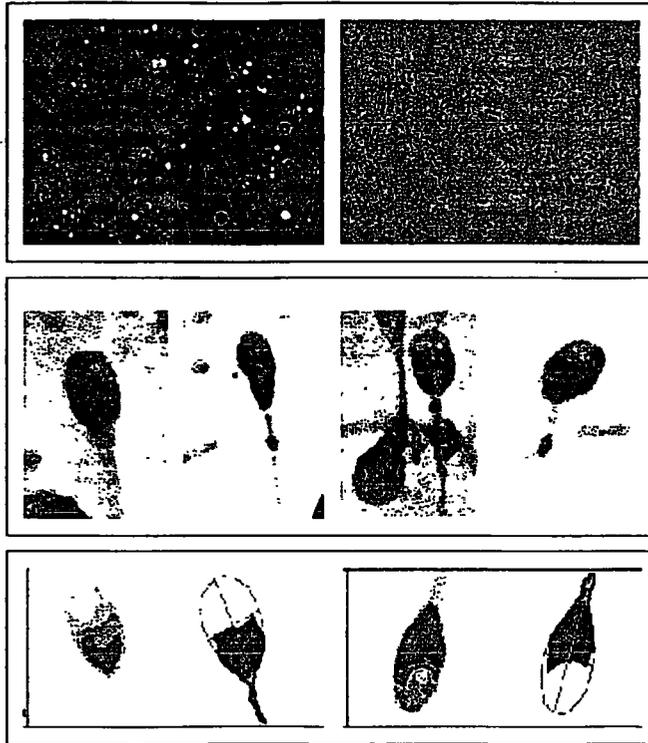
Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



Facultat de Ciències Biològiques

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA FUNCIONAL I
ANTROPOLOGIA FÍSICA
UNITAT ANTROPOLOGIA FÍSICA



ANÁLISIS INTEGRADO DE MORFOLOGÍA
Y MOVILIDAD ESPERMÁTICA HUMANA
CON EL USO DEL *SPERM CLASS ANALYZER*

CRISTINA ÁLVAREZ LLEÓ
TESIS DOCTORAL

2003

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

Departament de Biologia Funcional i Antropologia Física

Unitat Antropologia Física

**“Análisis integrado de morfología y movilidad espermática
humana con el uso del *Sperm Class Analyzer*.”**

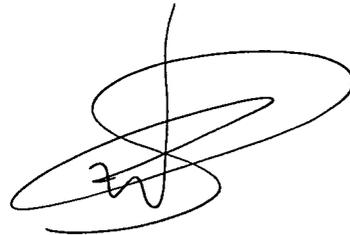
Memoria presentada por
Dña Cristina Álvarez Lleó para
optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas.
Facultat de Biologia.
Burjassot, Abril del 2003.

El Prof. Dr. D. Carles Soler i Vázquez, Titular de Antropología Física del Departament de Biologia Funcional i Antropologia Física de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que Dña. Cristina Álvarez i Lleó, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universitat de València ha realizado bajo su dirección, en laboratorios de la Unitat Docent i d'Investigació de Antropologia Física del Departament de Biologia Funcional i Antropologia Física de la misma Universidad, el trabajo original de investigación que lleva el título: **“Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del *Sperm Class Analyzer*.”** Para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que así conste a todos los efectos, expide el presente certificado en Burjassot, València a 10 de Abril del 2003.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a vertical stroke, positioned above the printed name.

Dr. Carles Soler i Vázquez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi agradecimiento más sincero al doctor Carles Soler i Vázquez por haberme brindado la oportunidad de realizar bajo su dirección este trabajo de investigación. Por sus consejos e interesantes conversaciones en torno a las cuestiones surgidas a lo largo de todo su desarrollo, que han dado lugar a ideas y sugerencias especialmente valiosas en el análisis y discusión de los resultados.

A Ricardo que me prestó su ayuda en el análisis estadístico de los resultados y en todo aquello que estuvo a su alcance, por su enorme paciencia.

Como no, a María que me hizo mucho más agradables los interminables días en el laboratorio, especialmente durante el último verano, cuando casi éramos los únicos seres vivos del edificio; por su inestimable ayuda en todo lo referente al manejo del SCA®.

A Javier Núñez y Manuel Núñez, por ayudarme en la elaboración de algunas figuras. Y a Paco Pérez por su contribución en la elaboración de los datos subjetivos.

A los compañeros de la escuela de Ingenieros Agrónomos de Albacete, especialmente a Julián Grade por poner a mi disposición el analizador de imagen.

A mis amigos que siempre me apoyaron y confiaron, por soportarme tal y como soy, en ocasiones complicada.

Gracias a mis padres, por el apoyo que me han dado y por el tiempo y esfuerzo que me han dedicado; y a mis hermanos que siempre han confiado en mí, me han animado y han permanecido a mi lado en los momentos más difíciles. A Juan M., Rosa, Juan L, Javier y Ana por estar junto a mí. A mis sobrinos David y Borja, especialmente a Borja por mostrarme ese “mundo feliz” en el que vive y contagiármelo.

Por último, no quisiera olvidar a mis compañeros del Hospital General de Albacete con quienes he pasado momentos muy agradables.

A todos ellos por estar ahí y darme el empujón necesario para llevar a buen término este proyecto. Nuevamente, gracias por todo.

El único modo de aprender el método científico es el largo y penoso camino de la experiencia personal

John Desmond Bernal

A mis padres y hermanos

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL TESTÍCULO	3
1.1.1. Túbulos seminíferos	3
<i>1.1.1.1. Células de Sertoli</i>	3
<i>1.1.1.2. Células germinales</i>	5
1.1.2. Tejido conjuntivo intersticial	5
1.2. EL ESPERMATOZOIDE	5
1.2.1. Morfología del espermatozoide	6
<i>1.2.1.1. La cabeza del espermatozoide</i>	6
<i>1.2.1.2. El flagelo del espermatozoide</i>	8
1.3. LA PRODUCCIÓN ESPERMÁTICA	12
1.3.1. La espermatogénesis	12
1.4. MADURACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE EN EL EPIDÍDIMO ..	17
1.5. COMPOSICIÓN DEL SEMEN	22
1.6. EL ESPERMIOGRAMA	23
1.6.1. Repaso histórico	23
1.6.2. El espermiograma según la O.M.S.	26
1.6.3. Concentración espermática	27
1.6.4. Movilidad espermática	28
<i>1.6.4.1 Alteraciones cinemáticas</i>	30
1.6.5. Morfología espermática	31
<i>1.6.5.1. Alteraciones morfológicas</i>	33
1.7. LIMITACIONES DEL ESPERMIOGRAMA	36
1.8. SISTEMAS COMPUTARIZADOS DE ANÁLISIS	37
1.9. SIGNIFICADO CLÍNICO DEL ESPERMIOGRAMA	43
1.10. NUEVAS POSIBILIDADES DE LOS SISTEMAS CASA	47
1.11. OBJETIVOS	49

2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	51
2.1. DONANTES.....	53
2.2. ANÁLISIS SUBJETIVO.....	53
2.2.1. Determinación manual de la concentración espermática.....	53
2.2.1.1. <i>Hemocitómetro.....</i>	53
2.2.1.2. <i>Cámara Makler.....</i>	55
2.2.2. Análisis manual de la movilidad espermática.....	57
2.2.3. Análisis manual de la morfología espermática.....	58
2.3. ANÁLISIS COMPUTARIZADO.....	58
2.3.1. Análisis cinemático.....	59
2.3.1.1. <i>Método seguido y procesado de las imágenes.....</i>	59
2.3.2. Análisis morfométrico.....	63
2.3.2.1. <i>Método seguido y procesado de las imágenes.....</i>	63
2.4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	66
2.4.1. Definición de las condiciones de trabajo en el	
análisis cinemático.....	66
2.4.2. Estudio cinemático global.....	67
2.4.3. Estudio morfométrico global.....	68
2.4.4. Integración de las variables cinemáticas y morfométricas.....	68
2.4.5. Análisis por grupos de diagnóstico.....	68
2.4.5.1. <i>Análisis cinemático y morfométrico por</i>	
<i>grupos de diagnóstico.....</i>	69
2.4.6. Análisis estadístico.....	69
3. RESULTADOS.....	71
3.1. DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES DE TRABAJO PARA	
EL ANÁLISIS CINEMÁTICO.....	73
3.1.1. Características de la población según el análisis subjetivo.....	73
3.1.2. Estudio de las diferencias entre las condiciones de análisis.....	73

3.1.3. Análisis de correlación entre determinaciones objetivas y subjetivas.....	77
3.2. ESTUDIO CINEMÁTICO GLOBAL.....	80
3.2.1. Estadística descriptiva.....	80
3.2.2. Análisis de correlación entre determinaciones objetivas y subjetivas.....	82
3.2.3. Análisis de correlación entre los parámetros cinemáticos.....	84
3.2.4. Correlación entre los parámetros cinemáticos, la concentración y el porcentaje de móviles calculados con el SCA®	85
3.2.5. Reducción de las variables cinemáticas a sus componentes principales.....	86
3.3. ESTUDIO MORFOMÉTRICO GLOBAL.....	87
3.3.1. Estadística descriptiva.....	87
3.3.2. Análisis de correlación entre determinaciones objetivas y subjetivas.....	90
3.3.3 Análisis de correlación entre los parámetros morfométricos.....	91
3.3.4. Correlación entre los parámetros morfométricos, la concentración y el porcentaje de móviles calculados con el SCA®	93
3.3.5. Reducción de las variables morfométricas a sus componentes principales.....	95
3.4. INTEGRACIÓN DE LAS VARIABLES CINEMÁTICAS Y MORFOMÉTRICAS.....	96
3.4.1. Análisis de correlación entre los parámetros cinemáticos y morfométricos.....	96
3.4.2. Reducción de los parámetros cinemáticos y morfométricos a sus componentes principales.....	98

3.5. ANÁLISIS CINEMÁTICO POR GRUPOS DE DIAGNÓSTICO.....	100
3.5.1. Diferencias de los parámetros cinemáticos entre grupos de diagnóstico.....	100
3.5.2. Diferencias entre las componentes principales cinemáticas de los distintos grupos de diagnóstico.....	102
3.6. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO POR GRUPOS DE DIAGNÓSTICO.....	103
3.6.1. Diferencias de los parámetros morfométricos entre grupos de diagnósticos.....	103
3.6.2. Diferencias entre las componentes principales morfométricas de distintos grupos de diagnóstico.....	105
3.7. ANÁLISIS CINEMÁTICO Y MORFOMÉTRICO POR GRUPOS DE DIAGNÓSTICO.....	106
4. DISCUSIÓN.....	109
4.1. DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS CINEMÁTICO.....	111
4.2. ESTUDIO CINEMÁTICO GLOBAL.....	117
4.3. ESTUDIO MORFOMÉTRICO GLOBAL.....	121
4.4. INTEGRACIÓN DE LAS VARIABLES CINEMÁTICAS Y MORFOMÉTRICAS.....	125
4.5. ANÁLISIS POR GRUPOS DE DIAGNÓSTICO.....	127
4.6. COMENTARIOS FINALES.....	131
5. CONCLUSIONES.....	133
6. REFERENCIAS.....	139

INTRODUCCIÓN

1.1. EL TESTÍCULO

El testículo humano tiene dos funciones esenciales: la producción y maduración de los espermatozoides (espermatogénesis), y la síntesis y secreción de hormonas sexuales (esteroidogénesis). Ambas funciones tienen lugar en dos compartimentos distintos, mientras el sustrato anatómico de la espermatogénesis está constituido por los túbulos seminíferos, el de la esteroidogénesis es el tejido intersticial. No obstante, ambas funciones están estrechamente relacionadas entre sí, ya que es necesaria la integridad de ambos compartimentos para conseguir una producción cuantitativa y cualitativamente normal de espermatozoides.

1.1.1. Túbulos seminíferos

Los testículos de mamíferos comprenden un gran número de túbulos seminíferos, que representan entre el 60-80 % del volumen testicular. El testículo humano está dividido en 250-300 lóbulos por tabiques de tejido conjuntivo, cada uno de los cuales contiene 2-3 túbulos seminíferos, densamente enrollados con estructura en bucle, que miden de 30-80 cm de longitud y constituyen la porción exocrina del testículo. El epitelio de los túbulos contiene dos tipos celulares, las células de Sertoli y las células de la línea germinal, organizadas en varias capas de células con una distribución vectorial en la que las células germinales son más maduras cuanto más cerca de la luz se encuentren (Ekwall et al., 1984) (Figura 1).

1.1.1.1. Células de Sertoli

Las células de Sertoli, son células somáticas que se localizan en la periferia de los túbulos, unidas a la membrana basal. Tienen abundante retículo endoplasmático liso, lo que es característico de las células productoras de hormonas esteroideas. Su forma es cilíndrica y se extienden radialmente desde la membrana basal hasta la luz tubular. De su porción axial cilíndrica irradia un sistema complejo de delgadas prolongaciones laterales que rodean a las células germinales que ocupan los intersticios que existen entre ellas.

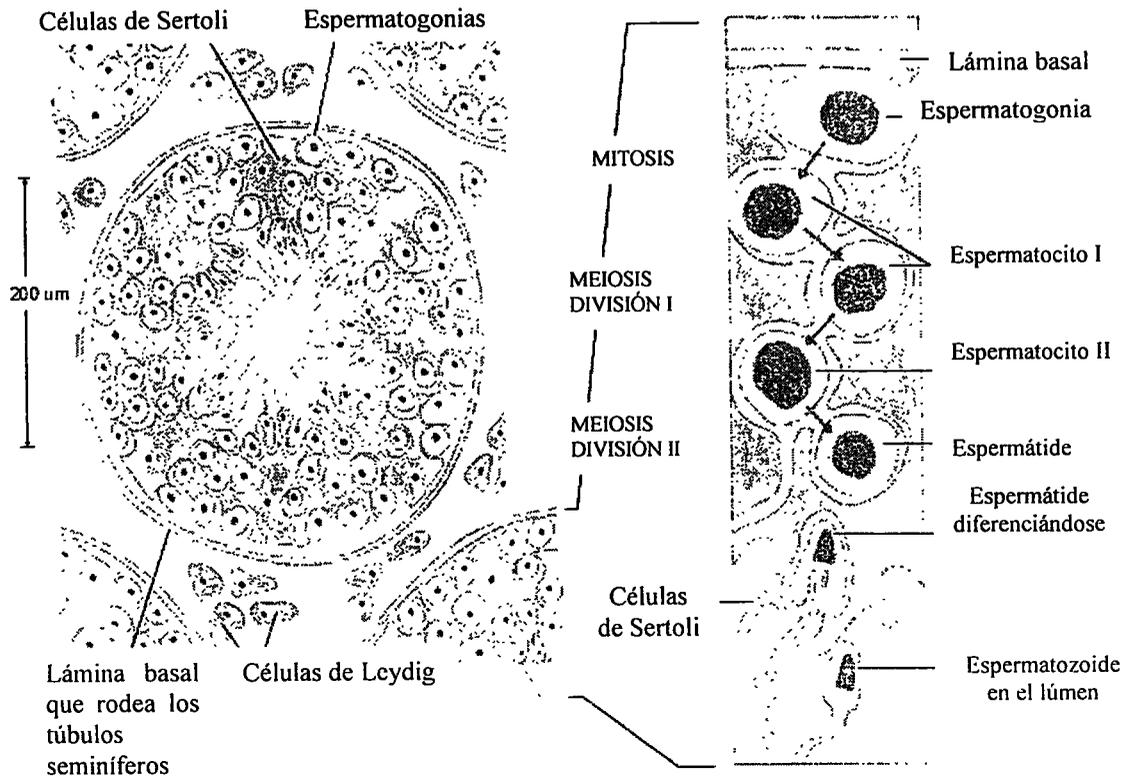


Figura 1. Túbulo seminífero y espermatogénesis (Modificado de Albert, 1994)

Desde un punto de vista funcional, las uniones de banda estrecha que hay en la porción basal entre las células de Sertoli dividen el epitelio germinal en dos partes: un compartimento basal adyacente a las células basales (espermátogonias) y un compartimento adluminal rodeado de células germinales en estadios más tardíos de la espermatogénesis. Por otra parte, la presencia de uniones GAP entre las células de Sertoli y las germinales son los puntos por lo que las primeras controlan las actividades de las segundas.

1.1.1.2. Células germinales

Las células germinales se multiplican en el epitelio germinal y presentan procesos de división celular (mitosis y meiosis), así como de diferenciación en espermatozoides. El desarrollo se inicia con las células germinales inmaduras o espermatogonias, situadas próximas a la membrana basal del túbulo, y continúa hasta las espermatidas pasando por espermatoцитos primarios y secundarios (Cortes *et al.*, 1987). Las células germinales difieren en algunos aspectos del resto de las células generales del organismo: pues son las únicas con capacidad meiótica, su diferenciación es temprana en el embrión y están conectadas entre sí mediante puentes intercelulares, de manera que se crean grupos celulares, que se encuentran en la misma fase de desarrollo.

1.1.2. Tejido conjuntivo intersticial

El tejido intersticial está situado entre los túbulos, y está compuesto por macrófagos, linfocitos, tejido conjuntivo, vasos sanguíneos, linfáticos y diferentes tipos celulares entre los que se encuentran las células de Leydig. Estas células presentan forma poliédrica, con abundante tejido endoplasmático liso y se agrupan en pequeños acúmulos entre los túbulos seminíferos, siendo las encargadas de la síntesis de hormonas esteroideas (fundamentalmente testosterona y dihidrotestosterona) (Chistensen, 1975), hormonas que son necesarias para la diferenciación sexual, la producción de gametos y la función sexual masculina.

1.2. EL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide es el producto final del proceso de la gametogénesis en el macho. Se trata de una célula haploide, es decir, que tiene la mitad de cromosomas que una célula somática y es la portadora de la información genética paterna.

Las células germinales masculinas, a diferencia de las femeninas, tan sólo comienzan a reducir el número diploide de cromosomas al comenzar la pubertad y una vez iniciados los procesos de división y diferenciación se mantienen de forma

cíclica durante toda la vida adulta. En principio, la necesidad de reducir el número de cromosomas parece obvia, ya que el cigoto originado tras la fecundación es diploide. Sin embargo, durante la meiosis tienen lugar otros aspectos interesantes como es el proceso de entrecruzamiento cromosómico y por tanto el intercambio genético entre cromátidas. Esto comporta un incremento de la diversidad genética, lo que constituye una de las bases de la evolución.

1.2.1. Morfología del espermatozoide

Morfológicamente el espermatozoide puede ser dividido en dos componentes principales: la cabeza y el flagelo o cola (Figura 2).

1.2.1.1. La cabeza del espermatozoide

La cabeza de los espermatozoides de mamífero presenta importantes variaciones en la forma entre las diferentes especies. Por ejemplo, es ovoide y discoidal en conejo, toro y cerdo; falciforme en ratón, rata y hámster; y algo aplastada y elipsoide en el hombre. En cuanto al tamaño también existen considerables diferencias (Bhattacharyya *et al.*, 1982; Cummins y Woodwall, 1985; Eddy *et al.*, 1988). Por ejemplo, el espermatozoide de morueco mide 8,7 μm de longitud y 4,6 μm de ancho (Sancho *et al.*, 1998), mientras que el espermatozoide humano presenta 5-6 μm de longitud, 2,5-3,5 μm de ancho (WHO, 1999). En la mayoría de las especies, su forma y tamaño son bastante constantes tanto en un mismo eyaculado como entre los eyaculados de diferentes animales, mientras que en el hombre se puede considerar característica la considerable variabilidad morfológica, incluso en individuos fértiles.

En la cabeza se distingue: un núcleo, un acrosoma, una pequeña cantidad de estructuras citoesqueléticas y un reducido citoplasma.

El núcleo contiene un número haploide de cromosomas y nucleoproteínas, principalmente protaminas, y en menor cantidad estructuras del citoesqueleto. La cromatina nuclear está altamente condensada, ocupando un volumen significativamente menor que el ocupado en células somáticas. De hecho, el DNA sufre un empaquetamiento

tan estrecho con las proteínas nucleares que la transcripción es casi imposible. Este empaquetamiento de la estructura cromatínica puede resultar esencial para evitar el daño del DNA si los espermatozoides son expuestos a ambientes agresivos, como pueda ser la elevada acidez del tracto reproductor femenino. La membrana nuclear no presenta estructuras de poro excepto en la región próxima al anillo posterior, donde son abundantes y se ordenan según un patrón hexagonal. Con frecuencia se pueden observar vacuolas de tamaño irregular en el núcleo espermático. En el espermatozoide humano estas vacuolas son bastante comunes y tienen un diámetro medio de $0,5 \mu\text{m}$ (Bhattacharyya *et al.*, 1982).

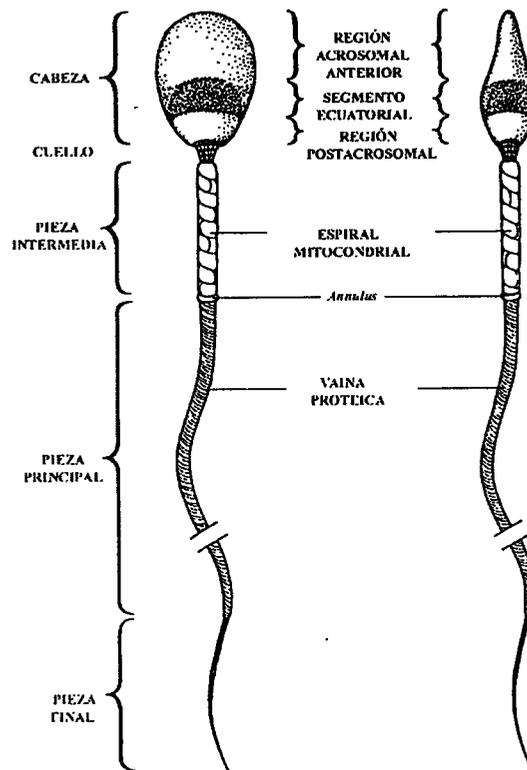


Figura 2. Esquema representativo del espermatozoide humano en visión frontal y lateral. (Modificado de Glover *et al.*, 1990).

El acrosoma es una vesícula intracelular, membranosa y aplanada que cubre la parte anterior del núcleo (30-70 % en humanos), variando considerablemente su tamaño y forma entre las distintas especies. Este orgánulo se origina durante la espermiogénesis a partir del complejo de Golgi de las espermátidas y contiene distintos enzimas hidrolíticos, algunos de ellos necesarios para pasar a través de las distintas capas que rodean al ovocito. También contiene glucoproteínas y carbohidratos. En el acrosoma distinguimos la membrana acrosomal interna (próxima a la parte anterior de la membrana nuclear externa) y la membrana acrosomal externa (próxima a la cara interna de la membrana plasmática). Durante la llamada reacción acrosómica, la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática se fusionan (a través de vesiculaciones) liberando al exterior la mayor parte del contenido acrosomal.

Las estructuras del citoesqueleto se localizan en el estrecho espacio existente entre la membrana acrosomal interna y la membrana nuclear, así como en el espacio próximo a la cara interna de la membrana plasmática. Su función podría ser estructural, jugando un papel en el establecimiento de la forma de la cabeza espermática; y dinámica, ayudando al espermatozoide a atravesar las distintas cubiertas del ovocito.

1.2.1.2. El flagelo del espermatozoide

El flagelo del espermatozoide de mamífero está constituido por cuatro regiones distintas: el cuello, la pieza intermedia, y los segmentos principal y terminal. La longitud total del flagelo es variable, por ejemplo mide 46 μm en conejo, siendo de 250 μm en hámster chino (Cummins y Woodwall, 1985; Eddy *et al.*, 1988). El flagelo del espermatozoide humano tiene una longitud de 55-60 μm y un diámetro de 1 μm en la pieza intermedia (Ralph y Stevens, 1990). Los principales componentes estructurales en el flagelo son el axonema, el complejo mitocondrial, la vaina fibrosa y las fibras densas externas.

La cabeza del espermatozoide se conecta a la cola a través de una estrecha franja llamada pieza conectiva o cuello. Las partes principales del cuello son el capítulo, columnas estriadas, placa basal y anillo posterior. Estas estructuras están alineadas con el

centriolo, estructura desde la que se originan las fibras y microtúbulos de la cola, y sirve como centro organizativo en la formación del axonema y columnas estriadas. Sin embargo, la presencia del centriolo no es necesaria para la iniciación o propagación del movimiento ondulatorio de la cola (Lindemann y Gibbons, 1975; Lindemann y Kanous, 1989).

Tras el cuello, el flagelo presenta una región llamada pieza intermedia que contiene, bajo la membrana plasmática, mitocondrias dispuestas helicoidalmente que envuelven al axonema. Las mitocondrias están ordenadas consecutivamente formando un número de hélices paralelas y giros que varía entre especies (Bahr y Engler, 1970). La hélice mitocondrial está adherida a un complejo filamentoso subyacente llamado retículo submitocondrial. Los filamentos de esta red, conectados entre sí lateralmente, se fusionan con el *annulus* en el punto de unión entre la pieza intermedia y la pieza principal. Otras estructuras presentes son las llamadas fibras densas externas que, en número de nueve, rodean el complejo del axonema a lo largo de la pieza intermedia y parte del segmento principal. En la pieza principal solo recorren el flagelo 7 fibras densas. Las fibras densas están compuestas por proteínas tipo queratina, ricas en cisteína, que presentan grupos sulfhidrilo (-SH) lo que da lugar a la formación de numerosos puentes disulfuro (-S-S-) durante la maduración epididimaria del espermatozoide (Cooper, 1986). Ello podría conferir propiedades elásticas que facilitarían la propagación del movimiento ondulatorio a través del flagelo (Soler *et al.*, 1994).

Las fibras densas muestran una estrecha asociación con el axonema, complejo de microtúbulos que recorre la parte central. El axonema del espermatozoide de mamífero tiene la misma organización que los cilios y flagelos de la mayoría de animales. Consiste en dos microtúbulos centrales rodeados por nueve dobletes de microtúbulos, en la llamada estructura de "9 + 2" (Afzelius *et al.*, 1995). Cada doblete consiste en un microtúbulo A completo unido a un microtúbulo B incompleto. De cada microtúbulo A se extienden dos brazos (brazos de dineína) hacia el microtúbulo B del siguiente doblete. Desde la pareja de microtúbulos centrales se irradian a lo largo del axonema. Los microtúbulos están compuestos por las proteínas α y β -tubulina (Eddy *et al.*, 1988) (Figura 3).

La estructura del citoesqueleto, característica de espermatozoides de mamífero (y algunas especies de pájaros), consiste en un cilindro hueco formado por dos columnas longitudinales unidas por anillos circulares. Las columnas (compuestas por el débil empaquetamiento longitudinal de estructuras filamentosas de 15 a 20 nm de diámetro) se sitúan en la región en la que dos de las fibras densas no están presentes, recorriendo toda la pieza principal. Los anillos de la vaina están compuestos por filamentos orientados circularmente que presentan un fuerte empaquetamiento. El grosor de estos anillos disminuye conforme se aproximan al extremo de la cola, terminando abruptamente en la parte final del segmento principal. La vaina fibrosa parece estar implicada en la modulación del plano de batida del flagelo espermático (Eddy *et al.*, 1988). Finalmente, el segmento terminal presenta una ausencia total de estructuras excepto los túbulos del axonema.

Por último, la membrana plasmática es la cubierta externa que envuelve cabeza y cola del espermatozoide. Una característica única de la membrana plasmática espermática es que está subdividida en regiones perfectamente definidas que difieren en composición y función. El mantenimiento de estas regiones podría estar mediado por una restricción de la movilidad de los lípidos y proteínas de la membrana por barreras moleculares, o por la distribución termodinámica de componentes en regiones específicas.

La composición química de las membranas espermáticas contiene altas concentraciones de fosfolípidos unidos a ácidos grasos insaturados de cadena larga (Poulos *et al.*, 1973; Jones *et al.*, 1979). También contiene importantes concentraciones de colesterol, molécula que juega un papel clave en la modulación de la fluidez de membrana. Ácidos grasos libres y glicolípidos son poco abundantes. En las membranas espermáticas de mamífero, la cantidad de proteínas es casi la misma que la cantidad de lípidos totales (Nikolopoulou *et al.*, 1985)

Los principales dominios de la membrana plasmática en la cabeza de la mayoría de los espermatozoides de mamíferos son la región acrosomal (parte anterior de la cabeza) y región postacrosomal (parte posterior de la cabeza y pieza conectiva). A su vez, la región acrosomal se subdivide en segmento marginal (cubre el extremo anterior de la cabeza),

segmento principal (cubre la mayor parte del acrosoma), y segmento ecuatorial (cubre la parte posterior del acrosoma). Los segmentos marginal y principal juntos suelen referirse como “capuchón” acrosomal.

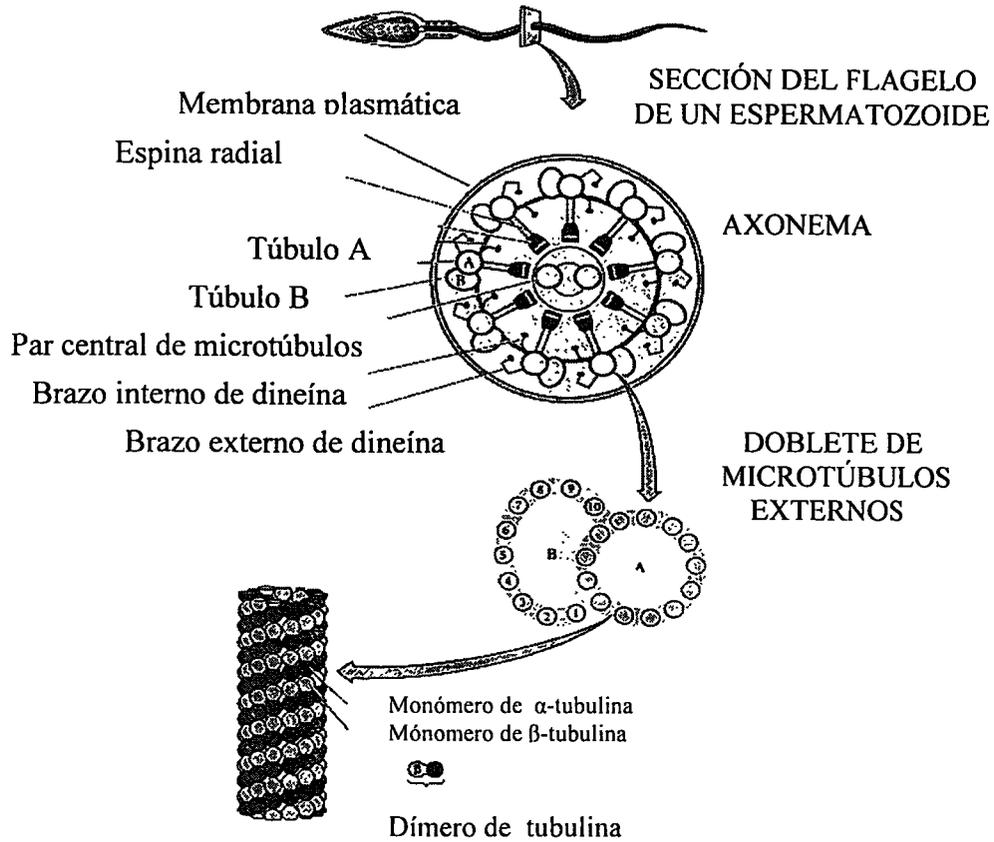


Figura 3. Disposición de los microtúbulos del axonema del flagelo (Modificado de Gilbert, 2000)

El límite entre región acrosomal y postacrosomal viene marcado por el llamado anillo subacrosomal, que constriñe la cabeza espermática en la parte posterior del segmento ecuatorial. El anillo posterior delimita la unión entre cabeza y cola, con lo que se establece un estrecho precinto entre los compartimentos citoplasmáticos de ambas partes del espermatozoide.

En la membrana plasmática del flagelo se puede diferenciar un dominio que cubre la envoltura mitocondrial y otro que se extiende desde la pieza intermedia hasta el extremo de la cola. Estos dominios están separados por el *annulus*, complejo fibroso (parte del citoesqueleto), que parece estar adherido a la superficie interna de la membrana plasmática.

La composición y organización características de cada uno de estos dominios sufren importantes cambios durante la vida del espermatozoide. La mayor parte de los dominios son establecidos durante la espermiogénesis, aunque también tienen lugar importantes cambios durante la maduración epididimaria y en los acontecimientos ocurridos durante y tras la eyaculación. A este respecto, las alteraciones en composición y estructura sufridas por las membranas del espermatozoide durante los procesos de capacitación y reacción acrosómica son fundamentales.

1.3. LA PRODUCCIÓN ESPERMÁTICA

1.3.1. La espermatogénesis

La espermatogénesis comprende una serie de fenómenos mediante los cuales las espermatogonias se transforman en espermatozoides. En el varón se calcula que la duración total es de 65-70 días. Este proceso depende de la testosterona producida en las células de Leydig y de la FSH (hormona folículo estimulante), las cuales actúan sobre los túbulos seminíferos ligándose específicamente a los receptores de las células de Sertoli. Estas células sintetizan una proteína fijadora de andrógenos (*androgen binding protein* o *ABP*) (Jegou y Legac-Jegou, 1978), que es necesaria para mantener una concentración elevada de testosterona en el epitelio seminífero, lo que es un requisito para poder completar el proceso espermatogénico.

La espermatogénesis se puede dividir en tres fases:

- Fase proliferativa: Las espermatogonias son las células diploides que provienen directamente de las células germinales primordiales del embrión. Se encuentran situadas en la base del epitelio seminífero y están confinadas en el espacio basal dejado por las células de Sertoli. En condiciones normales, no presentan actividad proliferativa; sin embargo, entran en mitosis siguiendo el dictado cíclico de las células de Sertoli de acuerdo a mecanismos locales de regulación, con lo que dan lugar a varias generaciones sucesivas de espermatogonias cada vez más diferenciadas. Ahora bien, en cada periodo proliferativo una de las espermatogonias permanece sin diferenciarse, con lo que se asegura un modelo de células tronco y, por consiguiente, una producción ilimitada de células.

- Meiosis: La meiosis es un proceso diferenciado de división celular, en el que a partir de una célula diploide se originan cuatro células haploides, lo que se consigue combinando dos divisiones celulares completas con una sola replicación de DNA.

Los *espermatoцитos primarios* son las células que sufren la primera división meiótica o meiosis reduccional. En la primera etapa de la profase se produce la replicación del DNA, de modo que los espermatoцитos primarios son células con un contenido de DNA tetraploide. El conjunto de esta profase dura entre 1 y 3 semanas, y durante la misma tiene lugar el proceso de la formación de quiasmas, lo que redundará en el incremento de la variabilidad genética, de forma que cada célula resultante posee un genotipo diferente. A continuación, se inicia la metafase de la primera división meiótica, en la que se disuelve la membrana nuclear y los pares de cromosomas se alinean en el ecuador formando el huso acromático. En la fase siguiente, la anafase, los centrómeros no se duplican ni se dividen, de modo que sólo la mitad del número original de cromosomas emigra hacia cada polo celular. Por último, en la telofase, los cromosomas se desenrollan y comienza a formarse una nueva membrana celular. A continuación se divide el citoplasma, quedando las células hijas (*espermatoцитos secundarios*) unidos por puentes intercelulares. Éstos

tienen un número haploide de cromosomas, pero su contenido en DNA es aún diploide, al estar cada cromosoma compuesto por dos cromátides.

La segunda división meiótica, o meiosis ecuacional, permite que de cada espermatocito secundario se formen dos *espermátides*, cada una de ellas con un número de cromosomas y un contenido en DNA haploide. La interfase entre ambos procesos de división es corta y no se produce replicación del DNA. Durante la segunda división meiótica, la profase es similar a la de la mitosis, con la diferencia de que el núcleo sólo tiene un número haploide de cromosomas.

- La espermiogénesis es un proceso de transformación y maduración, sin que se produzca división celular alguna, de las espermátidas en espermatozoides (Figura 4). Entre los cambios más evidentes que acontecen están la formación del acrosoma, el desarrollo del flagelo, la transformación del núcleo, la reorganización de los orgánulos y del citoplasma, y la liberación de los espermatozoides desde el epitelio tubular al lumen.

En la primera fase del desarrollo del espermatozoide (fase Golgi), el aparato de Golgi constituido por una serie de cisternas superpuestas, forma unas vesículas proacrosómicas que se van fundiendo hasta formar una única vesícula acrosomal.

Durante la fase "cap", la vesícula acrosomal se adhiere al núcleo y se desplaza junto al mismo hacia el extremo apical de la cabeza del espermatozoide, extendiéndose sobre casi dos tercios de su superficie y acomodándose a su forma.

Por su parte, el núcleo sufre una serie de cambios, volviéndose elíptico y desplazándose hacia la periferia de la espermátida. Simultáneamente, modifica su contenido, produciéndose una condensación progresiva de su cromatina asociada a modificaciones químicas en el DNA y en las proteínas nucleares, con una sustitución de las histonas por protaminas. Los poros que rodean la membrana nuclear migran al extremo caudal del núcleo. Las mitocondrias de la espermátida se van desplazando hacia la periferia para posteriormente congregarse próximas a la zona caudal, donde el flagelo empieza a formarse. Estas mitocondrias pueden replicarse, por lo que es probable que también constituyan la base de las futuras mitocondrias de la pieza

intermedia del espermatozoide. Otra característica sorprendente es la aparición en el citoplasma de una masa de material electrodens, el cuerpo cromático que está constituido por una mezcla de gránulos y filamentos densos, y que aparece en fases tempranas del desarrollo. Se cree que da lugar al *annulus*, pudiendo entonces, migrar al extremo de la pieza intermedia, lugar donde se localiza en el espermatozoide completamente formado.

Los centriolos de la espermatida, también migran a la región caudal del núcleo. El proximal, situado perpendicularmente al distal, se localiza en la fosa de implantación; en contraste, el centriolo distal siempre perpendicular a la membrana plasmática de la célula, se sitúa en la zona más lejana del núcleo, y a partir suyo, comienza la formación del axonema del flagelo, lo que tiene lugar durante la fase "Golgi" antes de que el acrosoma esté formado (Figura 4).

Mientras el centriolo proximal persiste y se une a las fibras del axonema, el centriolo distal, desaparece. Durante esta fase, sólo se observan los microtúbulos del axonema, ya que la cubierta de fibras externa se forma con posterioridad.

Cuando da comienzo el crecimiento flagelar, un grupo de microtúbulos citoplasmáticos se reúne alrededor del axonema en desarrollo. Estos microtúbulos que parecen tener su origen en la región del núcleo a nivel de la banda caudal del acrosoma, forman un anillo alrededor del flagelo. La formación de este anillo acompaña a la elongación de la espermatida y parece ser que está parcialmente asociada con este proceso y con el crecimiento temprano del flagelo.

Al completar la maduración, el citoplasma de la espermatida queda muy reducido y el espermatozoide se sitúa próximo a la célula de Sertoli vecina. Cuando el espermatozoide es liberado en el lumen de los túbulos, los restos de citoplasma de la espermatida también lo son, de modo que quedan flotando libremente en el lumen o son fagocitados por las células de Sertoli adyacentes. Estos restos de citoplasma se conocen como cuerpos residuales. Los cuerpos residuales contienen gran cantidad de lípidos en forma de colesterol y migran lentamente hacia la pared de las células de Sertoli antes de ser absorbidos por las mismas.

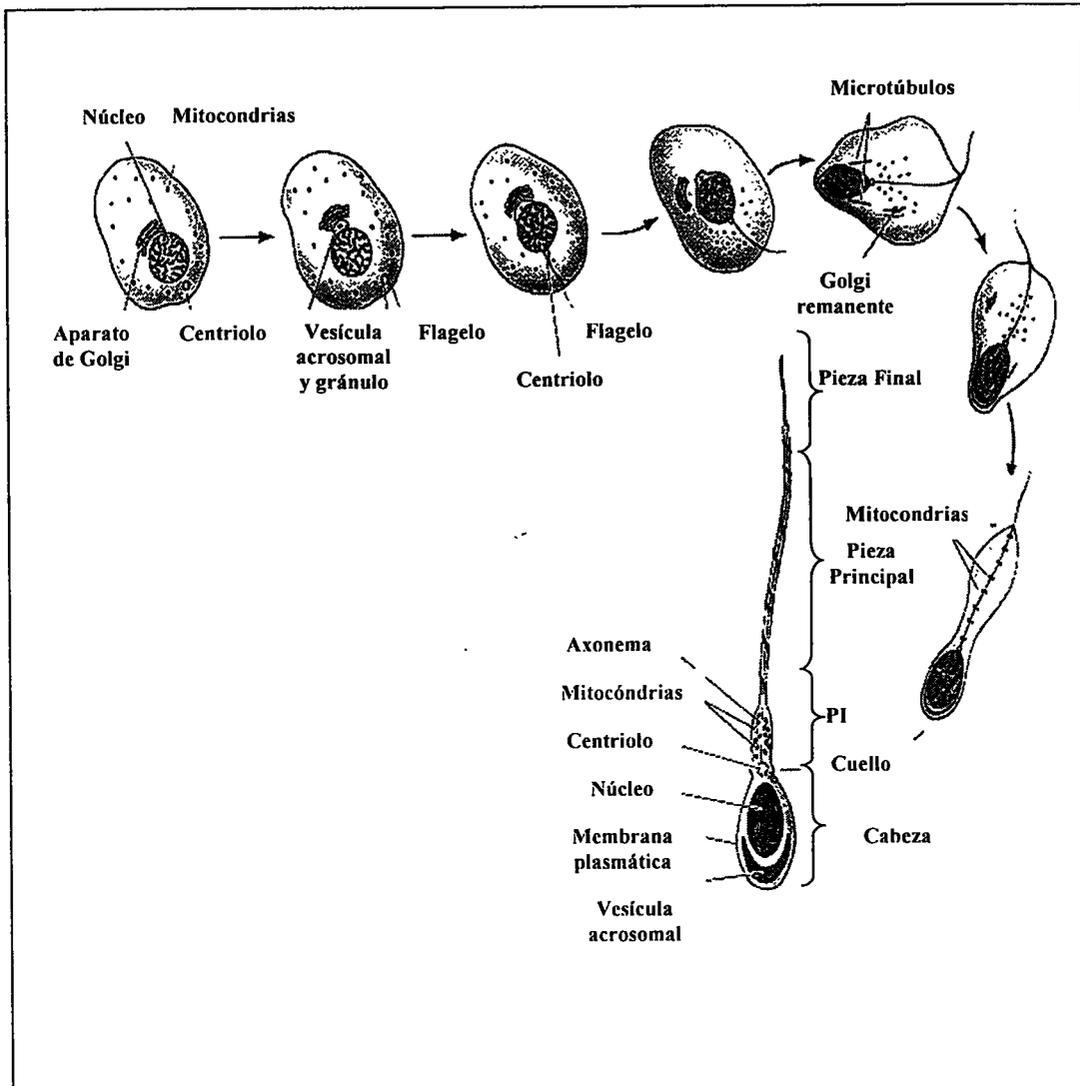


Figura 4. Esquema representativo de la espermiogénesis (Modificado de Gilbert, 2000)

Sin embargo, otros restos de citoplasma de las espermatidas, se mantienen unidos a los espermatozoides, estos restos son las llamadas gotas citoplasmáticas. En la mayoría de los mamíferos, estas gotas están discretamente situadas en la región del

cuello del espermatozoide, pero en la especie humana habitualmente se sitúan en el extremo de la pieza intermedia. El significado funcional de esta gota no está claro, pero tiene un extenso retículo endoplasmático y un elevado nivel de la enzima fosfatasa alcalina, estrechamente asociada con varios fenómenos de membrana. Tras la liberación del espermatozoide en el lumen de los túbulos seminíferos, son transportados a la *rete testis* y desde allí vía vasos eferentes al epidídimo.

Cuando los espermatozoides de mamíferos dejan el testículo están altamente diferenciados, pero todavía no poseen movimiento progresivo ni están preparados para fusionarse espontáneamente con el ovocito.

1.4. MADURACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE EN EL EPIDÍDIMO

Una vez concluida la espermiogénesis, los espermatozoides formados en los túbulos seminíferos son transportados, desde el testículo, vía *rete testis*, hasta los conductos eferentes, una serie de túbulos cuyo número varía, según las especies, entre 4 y 20 (Hemeida *et al.*, 1978; Bedford, 1994). Estos túbulos se anastomosan en un único conducto muy plegado y de gran longitud, el conducto epididimario, que presenta 6 metros en la rata (Jiang *et al.*, 1994) y en el hombre (Maneely, 1959) y hasta 80 en el caballo (Maneely, 1959). El túbulo epididimario se continúa con el vaso deferente, un conducto recto que está rodeado por una gruesa capa muscular que comunica con la uretra, la cual desemboca en el exterior del cuerpo.

Los espermatozoides de mamíferos, tras el proceso de formación testicular experimentan una amplia secuencia de cambios morfológicos y bioquímicos, además de cambios en sus características cinemáticas, durante su paso a través del epidídimo, su almacenamiento en este órgano, y su posterior transporte a lo largo del tracto reproductor de la hembra (Cooper, 1986).

El cambio en la morfología de los espermatozoides que ha mostrado ser más constante en las diferentes especies, es la migración de la gota citoplasmática desde una posición proximal hasta una posición distal en la pieza intermedia, y su posterior

desprendimiento del flagelo. Si bien la cinética de este fenómeno es distinto en diversas especies (Pérez-Sánchez *et al.*, 1996; Tablado *et al.*, 1998).

Además de esta modificación morfológica, se han descrito cambios en el tamaño, la forma y/o estructura interna del acrosoma de los espermatozoides durante su tránsito a través del tracto genital masculino. Fawcett y Hollenberg (1963) fueron los primeros en poner de manifiesto los importantes cambios experimentados por el acrosoma de los espermatozoides de cobaya durante su maduración en el epidídimo. En otras especies como el conejo (Bedford y Nicander, 1971; Pérez-Sánchez *et al.*, 1998), estos cambios son menos pronunciados, mientras que en roedores donde apenas son perceptibles (Bedford, 1979; De Rosas y Burgos, 1987), el análisis morfométrico asistido por ordenador ha resultado ser de gran utilidad para la identificación de estos cambios (Fornes y De Rosas, 1989; Pogany y Linder, 1993; Tablado *et al.*, 1998). Trabajos recientes llevados a cabo por nuestro equipo de investigación, utilizando el sistema computerizado para el análisis de la morfología espermática *Sperm Class Analyzer*[®] (SCA[®]), han revelado interesantes cambios en la frecuencia de aparición de las diferentes anomalías morfológicas de la cabeza espermática así como cambios significativos en los parámetros morfométricos de los mismos durante su tránsito epididimario (Soler *et al.*, 2000). Curiosamente, estos resultados coinciden con los correspondientes al mono reshus, mientras que difieren de los observados en una amplia variedad de especies de no primates (Gago *et al.*, 2000).

Además de los cambios morfológicos, los espermatozoides liberados en el fluido testicular experimentan cambios bioquímicos que se continúan durante su paso por el epidídimo. Estos cambios afectan a los diversos compartimentos celulares, es decir, al acrosoma, al núcleo y a los componentes del flagelo, pero parece que es la membrana plasmática la que sufre más modificaciones. Las propiedades físico-químicas de la membrana, especialmente de la cubierta glicoprotéica cambian de forma sustancial como resultado de la acción de ciertas sustancias (proteínas, ácido siálico, carnitina, iones inorgánicos, etc.) secretadas por las células del epitelio

epididimario (Holt, 1982; Brown *et al.*, 1983; Jones *et al.*, 1983; Eccleston *et al.*, 1994; Jones, 1998;). La adsorción de estas sustancias, principalmente glicoproteínas (Mahony *et al.*, 1994), a la superficie de la célula, parece desempeñar un papel fundamental en la interacción entre los gametos en el momento de la fecundación, como demuestran algunos trabajos (Bains *et al.*, 1993; Boue *et al.*, 1995; Navaneetham *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2000) o el bloqueo de la fecundación producido por la administración de anticuerpos contra macromoléculas (Cuasnicu *et al.*, 1984; Tezón *et al.*, 1985; Tulsiani *et al.*, 1993; Tulsiani *et al.*, 1998). Una de estas moléculas podría ser la fibronectina que se ha encontrado en el segmento ecuatorial de los espermatozoides humanos del eyaculado. La adquisición de esta molécula parece ser gradual a lo largo del epidídimo (Miranda y Tezón, 1992; Pinke *et al.*, 1997).

La composición lipídica de los espermatozoides (Rana *et al.*, 1991; Haidl *et al.*, 1994; Haidl y Opper, 1997) y especialmente de sus membranas varía durante su paso a través del epidídimo: la cantidad de colesterol disminuye mientras aumentan las de desmosterol y sulfato de colesterol (Legault *et al.*, 1979; Nikolopoulou *et al.*, 1985; Rana *et al.*, 1991). También cambia la composición en fosfolípidos y ácidos grasos contribuyendo a la característica organización en dominios de los lípidos de la membrana de los espermatozoides maduros (Friend., 1989; Rana y Majumder, 1990; Aveldaño *et al.*, 1992; Rana *et al.*, 1993;). Son también numerosos los cambios en la actividad metabólica de los espermatozoides durante su paso epididimario (Hammerstedt *et al.*, 1979, 1982; Inskip y Hammerstedt, 1982; Hammerstedt y Parks, 1987), ocurriendo, por ejemplo, una modificación en su actividad glicolítica. Paralelamente ocurre un cambio en los niveles de adenosín monofosfato cíclico (cAMP), atribuible a un incremento en la síntesis de este segundo mensajero y a una disminución de su hidrólisis (Purvis *et al.*, 1982; Jaiswal y Majumder, 1996). Este hecho se podría relacionar con el hecho de que en espermatozoides en paquiteno se observen elevados niveles de RNA mensajero (mRNA) de adenil-ciclasa y un incremento de su expresión a través de la espermiogénesis. La acumulación de

mRNA en las espermátidas redondas sugiere que la proteína adenil-ciclasa está implicada en la generación del cAMP de los espermatozoides, y más concretamente en su maduración a su paso por el epidídimo, capacitación, hiperactivación y reacción acrosómica (Sinclair *et al.*, 2000).

La cromatina de los espermatozoides presenta una condensación progresiva como resultado de la sustitución de las histonas organizadoras de la estructura del DNA por protaminas, y la posterior modificación de éstas por fosforilación y formación de puentes disulfuro a partir de los grupos tiol de los residuos de cisteína (Kosower *et al.*, 1992, Yossefi *et al.*, 1994; Golan *et al.*, 1996; Golan, 1997). Que la cromatina se compacte es esencial para evitar que el DNA resulte dañado al ser expuestos los espermatozoides a ambientes agresivos, como pueda ser la elevada acidez del tracto genital femenino. Además, cualquier daño sería imposible de reparar, dada la inercia metabólica del núcleo espermático, lo que llevaría a una peligrosa caída de la fertilidad (Manicardi *et al.*, 1995; Sakkas *et al.*, 1995).

Así, los espermatozoides aislados del testículo y de las porciones más proximales del epidídimo son, con unas pocas excepciones, como ocurre en algunos peces en los que su única función es servir de canal de transporte para los espermatozoides (Henderson, 1962), incapaces de participar con éxito en el proceso de la fecundación. Sin embargo, los espermatozoides de la cola del epidídimo y del eyaculado, presumiblemente como resultado de modificaciones experimentadas durante su paso a través del epidídimo, son “habilitados” para poder fecundar un óvulo. El término “habilitado” debe entenderse como la adquisición de un potencial para su participación en la fecundación, siendo necesarios otros cambios posteriores para que la fusión de los gametos pueda llevarse a cabo (Cooper, 1986).

Se debatió durante varias décadas si el papel del epidídimo en el desarrollo de esta capacidad era pasivo, es decir, constituía únicamente el lugar físico donde los espermatozoides desarrollarían una capacidad intrínseca, o si por el contrario, el fluido epididimario que rodea los espermatozoides podría desencadenar cambios en éstos que condujeran a la adquisición de esa capacidad potencial. Esta polémica se

produjo hasta mediados de los sesenta, cuando en una serie de trabajos (Bedford, 1967; Orgebin-Crist, 1967a; Orgebin-Crist, 1967b; Orgebin-Crist, 1968; Orgebin-Crist, 1969;) se estableció de forma definitiva que los espermatozoides maduran al atravesar este órgano, desarrollando su potencialidad para el movimiento y la capacidad de fecundación, demostrando a su vez que el suceso clave para esta maduración lo constituye la exposición de los espermatozoides al contenido luminal del túbulo epididimario y no el simple paso del tiempo empleado para su transporte (Cooper, 1993).

Los espermatozoides de testículo de mamífero en solución tamponada, son inmóviles o bien presentan un movimiento vibratorio débil, mientras que los espermatozoides de la región más proximal (cabeza) del epidídimo muestran, una amplia gama de movimientos circulares; y a medida que éstos alcanzan regiones más distales van adquiriendo un desplazamiento más rectilíneo (Gaddum, 1968; Paufler y Foote, 1968; Burgos y Tovar, 1974; Mooney *et al.*, 1972; Soler *et al.*, 1994; Weissenberg *et al.*, 1994; Briz *et al.*, 1995; Pérez-Sánchez *et al.*, 1996). Estas diferencias en la movilidad de los espermatozoides de cabeza y de cola del epidídimo podrían ser parcialmente responsables de su diferente capacidad fecundante, ya que después de la cópula o de inseminación artificial (IA), la proporción de espermatozoides de la cabeza que alcanzan el canal oviductal resulta ser muy inferior al de los de la cola del epidídimo (Blandau y Gaddum-Rosse, 1974; Critoph y Dennis, 1977). En carnero, únicamente los espermatozoides de la región distal, así como los espermatozoides de eyaculado muestran mayor movilidad y son capaces de penetrar ovocitos de hamster (Williams *et al.*, 1991). Por otra parte, los estudios *in vitro* realizados con ovocitos intactos y con ovocitos en los que se ha eliminado el cúmulo oóforo, indican que la adquisición de la capacidad fecundante está relacionada con la capacidad de los espermatozoides de unirse a la zona pelúcida y de atravesarla (Pavlok, 1974; Wazzan *et al.*, 1990) y que la hidrólisis ácida de la zona pelúcida hace que se incremente la proporción de espermatozoides de la cabeza del

epidídimo capaces de fecundar al óvulo (Wazzan *et al.*, 1990), pudiendo radicar su incapacidad para atravesar la zona pelúcida en una inadecuada propulsión.

Por otra parte, el patrón de movilidad en espermatozoides maduros e inmaduros es diferente. El flagelo de los espermatozoides inmaduros tiene mayor amplitud de batida que las formas maduras, lo que puede indicar que durante la maduración hay un aumento de la rigidez de la membrana celular, debido a un incremento de los puentes disulfuro en la superficie nuclear y flagelar durante el tránsito por el epidídimo (Glover *et al.*, 1990).

Los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la adquisición de la movilidad no son bien conocidos, aunque existe gran número de factores que modifican el estado de activación del axonema y que han sido propuestos como reguladores o mediadores. Estos factores son la FMP (*Forward Motility Protein*) (Acott y Hoskins, 1978; Brandt *et al.*, 1978; Acott y Hoskins, 1981), glicoproteínas epididimarias y albúmina (Baas *et al.*, 1983; Pholpramool *et al.*, 1983), carnitina (Hinton *et al.*, 1981; Inskip y Hammerstedt, 1982; Jeulin *et al.*, 1994; Jeulin y Lewin, 1996), cAMP (Setty y Jehan, 1977; Leclerc y Goupil, 2002), factor inhibidor de la movilidad espermática (Turner y Giles, 1982), inobilina (Usselman y Cone, 1983; Hermo *et al.*, 1994), cambios en la composición fosfolipídica de la membrana (Haidl *et al.*, 1993) y diversas condiciones ambientales (Dacheux *et al.*, 1979).

1.5. COMPOSICIÓN DEL SEMEN

El semen es producto de las secreciones de las distintas glándulas, incluyendo testículos, epidídimo, glándulas de Cowper, próstata, vesículas seminales y glándulas de Littre. En principio, se pensó que se limitaba a ser el medio que contenía los espermatozoides, si bien hoy se sabe que resulta vital para hacer que éstos tengan capacidad fecundante. La secuencia de secreción es muy constante y se inicia con los constituyentes de la próstata, testículos, epidídimo y vasos deferentes, para finalizar con la de las vesículas seminales. Ello permite una inicial lubricación de la uretra y una disposición óptima de los espermatozoides antes de la formación del coágulo

seminal. Gracias al estudio del eyaculado realizado en los últimos años se ha podido avanzar considerablemente en el conocimiento del proceso de fertilización. Los espermatozoides del eyaculado, deben ser capaces de desplazarse a través de la vagina, útero y trompas, requiriendo un aporte de energía y debiendo eliminar una serie de barreras naturales, proceso en que el plasma seminal juega un papel importante.

El plasma seminal contiene una serie de proteínas e hidratos de carbono de los cuales, en su mayor parte, no se conoce su función específica. Las proteínas del líquido seminal provienen en un 55-60% de la vesícula seminal y el resto de la próstata. Mientras que las proteínas de origen prostático son ácidas, las de la vesícula seminal son fuertemente básicas. La fructosa, elaborada por la vesícula seminal, es uno de los azúcares que se encuentra en el plasma seminal de los mamíferos, aunque su contenido y actividad difiere entre las diferentes especies. De hecho, en el hombre su concentración no es alta, ya que curiosamente, el espermatozoide humano prefiere la glucosa (Povoa *et al.*, 1986; Karow *et al.*, 1992) como sustrato metabólico para la movilidad. El ácido cítrico, producido en la próstata, se encuentra en el plasma seminal en concentraciones relativamente elevadas y como en el caso de la fructosa, su concentración depende del nivel de andrógenos circulantes.

El semen humano también contiene un gran número de proteínas de elevado peso molecular y una amplia variedad de enzimas, entre las que cabe destacar las fosfatasas ácidas (Jacob *et al.*, 2000) y alcalinas (Girgis *et al.*, 1981). Otros componentes son aminoácidos, entre los que se encuentra el ácido glutámico, y cuya concentración aparece enormemente reducida en hombres azoospermicos; sustancias como la hipotaurina, antioxidante que puede tener un importante papel en la protección de los espermatozoides de las especies reactivas de oxígeno (Holmes *et al.*, 1992); la espermina que le da su olor característico; el ácido siálico, que parece ser metabolizado a piruvato, fuente de energía para los espermatozoides (du Toit *et al.*, 1998) y algunos electrolitos como sodio, potasio, calcio y zinc. El zinc además, de un posible papel antibacteriano, puede ser que actúe en la estabilización del

coágulo seminal (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Por otra parte, contiene testosterona y esteroides androgénicos, así como, hormonas gonadotróficas (FSH y LH), prolactina, inhibina, y prostaglandinas. La inhibina en su isoforma inhibina B actúa en la regulación de la secreción de la FSH, y parece estar implicada en la interacción entre las células de Sertoli y las células germinales. La secreción de la inhibina B en el eyaculado es un marcador de la actividad funcional de los túbulos seminíferos (Anderson *et al.*, 1998; Anderson, 2001). Otras sustancias orgánicas interesantes son inositol, ácido ascórbico y ácido láctico.

Como resultado de esta compleja composición química, parece importante distinguir entre los productos de excreción del riego sanguíneo y aquellos que tienen un significado metabólico real en relación con el espermatozoide.

El eyaculado generalmente es expulsado en cuatro fracciones diferentes:

- Fracción preeyaculatoria, procedente de las glándulas de Cowper y Littre, de consistencia mucosa y con ausencia de espermatozoides.

- Fracción previa, fluida, proviene de la próstata, y también carece de espermatozoides. Tiene un pH ácido y se caracteriza por su elevada concentración de fosfatasa ácida y ácido cítrico. Corresponde del 13 al 33% del eyaculado.

- Fracción principal, constituida por elementos líquidos y gelatinosos, es rica en espermatozoides y procede del epidídimo, vaso deferente y ampolla deferencial.

- Fracción terminal, gelatinosa. Es la más abundante del eyaculado, entre el 50 y el 80%. Procede de las vesículas seminales y es rica en fructosa. Su pH es alcalino y tiene espermatozoides, mayoritariamente inmóviles.

1.6. EL ESPERMIOGRAMA

1.6.1. Repaso histórico

Fue en el siglo XVII (1677) cuando Antoni van Leeuwenhoek observó en el semen humano “multitud de animálculos vivos, progresando con un movimiento serpentiforme de la cola, y nadando a modo de una anguila”.

El descubrimiento de Leeuwenhoek dividió las teorías preformistas en dos grupos: ovistas y animalculistas o espermátistas, según concedieran más importancia al huevo, o a los espermatozoides. Nicolaas Hartsoeker (1694) afirmó que cada espermatozoide contenía un homúnculo, un hombre diminuto pero completamente formado (Irvine y Aitken, 1994; Morice *et al.*, 1995). Sin embargo, no fue hasta el año 1780 cuando Lazaro Spallanzani (Zorgniotti, 1975) mostró que el “licor seminal” era esencial para la fecundación. Posteriormente, Cary (1916) por primera vez, asoció las anomalías espermáticas con la infertilidad masculina (Ombelet *et al.*, 1995). En 1929, Macomber y Sanders empezaron a establecer rangos de concentración seminal asociados con la fertilidad. Por su parte, MacLeod y Gold (1953), propusieron que el valor de 20 millones de espermatozoides por mililitro de eyaculado separaba a varones fértiles de infértiles y contribuyeron a la estandarización de los criterios morfológicos espermáticos (Ombelet *et al.*, 1995). Desde entonces, se ha intentado establecer valores de referencia que identifiquen las muestras de semen en fértiles e infértiles, pero desafortunadamente, la selección de un valor óptimo aún permanece en discusión.

El espermiograma permite realizar una rápida evaluación inicial de la calidad espermática, de gran efectividad y ayuda en la predicción del potencial de fertilidad así como en la identificación de posibles causas de infertilidad. En el estudio de la pareja con problemas de fertilidad, el análisis del semen es una de las pruebas básicas para la elaboración de un diagnóstico en reproducción, el estudio del semen en el varón es, a pesar de sus numerosas limitaciones, indicativo de ciertas patologías y nos sirve de base para orientar la pauta del estudio que ha de seguirse. No hay un consenso sobre la validez de las diferentes pruebas utilizadas en andrología en cuanto a predicción de la fertilidad masculina, sin embargo, el espermiograma sigue siendo un dato fidedigno.

En el estudio del semen básico se valoran fundamentalmente los parámetros físicos, citomorfológicos y bioquímicos, a partir de los que puede estar indicado el estudio hormonal, inmunológico, bacteriológico o citogenético. Cada test analiza

diferentes parámetros que pueden afectar a la capacidad potencial de fertilización del varón. Por ejemplo, la medida del volumen seminal evalúa la capacidad de las glándulas sexuales accesorias para proporcionar suficiente fluido seminal, mientras que el recuento espermático cuantifica la capacidad del testículo para producir espermatozoides.

Sin embargo, el conjunto de estos tests no es más que sistemático, los resultados normales de un test individual no implican necesariamente fertilidad, sino solamente que la posible infertilidad no está causada por el factor analizado en particular. Del mismo modo, pacientes aparentemente normales por los resultados obtenidos en los tests, aunque es bastante probable que sean fértiles, puede que sufran alguna disfunción que no ha podido ser evaluada. De hecho es una observación común que pacientes con mala calidad seminal (de acuerdo a las pruebas comúnmente realizadas) se muestren perfectamente fértiles, mientras que otros con un espermiograma aparentemente normal muestran cuadros de esterilidad. Ello se puede atribuir a dos causas principales, una relativa al hecho de que la fertilidad es, en último término un problema de dos, y puede ser que, aún tratándose de dos individuos fértiles, se den problemas de compatibilidad reproductiva entre hombre y mujer; otro que las pruebas clásicas del espermiograma no abarcan todos los niveles analíticos posibles y así pueden presentarse, por ejemplo, daños moleculares en el espermatozoide que pasen desapercibidos. Además, como se discutirá más adelante, el uso de discriminadores individuales para la definición de la calidad seminal (movilidad, morfología, concentración...) supone una gran limitación metodológica.

1.6.2. El espermiograma según la O.M.S.

El estudio seminal requiere:

-Un examen macroscópico: licuefacción, aspecto, olor, viscosidad, volumen y pH. Estos parámetros son importantes, y sus anomalías deben comunicarse, independientemente de la calidad de otros parámetros seminales.

-Un examen microscópico: concentración espermática, porcentaje de células

móviles y con movilidad progresiva, porcentaje de espermatozoides con morfología normal, aglutinación y presencia de otros elementos celulares (células inmaduras, células epiteliales, leucocitos y hematíes), considerándose como parámetros básicos e imprescindibles en la valoración de la fertilidad natural del varón los tres primeros. Una vez fijados estos parámetros, debemos establecer qué límites son los que vamos a aceptar como normales, ya que hemos visto importantes variaciones a la baja en los últimos años, probablemente como consecuencia de un mayor conocimiento de los diversos factores que influyen en la fertilidad conyugal, y de la disposición de más y mejor información. Es evidente que el desarrollo tecnológico y el refinamiento de las técnicas utilizadas en el diagnóstico de la esterilidad masculina, permite el estudio de numerosos y complejos parámetros.

Por tanto, el objetivo del análisis de semen convencional es, por una parte, obtener una respuesta rápida sobre las posibilidades de procrear del varón, y por otra, obtener un diagnóstico preciso, para poder determinar el origen de la infertilidad y así emplear la terapéutica más apropiada a cada caso.

1.6.3. Concentración espermática

En todo estudio seminal se comienza con el recuento de espermatozoides por mililitro. La concentración puede determinarse ya sea utilizando un hemocitómetro (cámara de Neubauer), una cámara Makler o métodos de recuento electrónico (autoanalizadores o equipos *CASA-Computer Aided Sperm Analysis*). Antes de realizar el recuento la muestra debe estar totalmente licuada y mezclada cuidadosamente. Como se especificará en el apartado de Material y Métodos, no todos los métodos son igualmente fiables, por una cuestión del sistema de muestreo. La OMS (WHO, 1999) considera normales, muestras con concentraciones $\geq 20 \times 10^6$ espermatozoides/mililitro. Sin embargo, en ocasiones, muestras seminales con valores inferiores pueden fecundar al ovocito.

1.6.4. Movilidad espermática

La movilidad es otro parámetro fundamental para valorar la calidad del eyaculado. Ésta depende de factores intrínsecos como son la estructura del flagelo y la actividad enzimática de la dineína, así como de factores extrínsecos como por ejemplo la composición bioquímica del medio extracelular en que se encuentra el espermatozoide.

La fuente inmediata de energía para la movilidad es la hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP) catalizada por una dineín-ATPasa responsable del deslizamiento entre microtúbulos adyacentes del axonema (Gibbons y Rowe, 1965; Gibbons, 1996). Las estructuras específicas del axonema, tales como las uniones entre los microtúbulos, y la presencia de fibras densas crean resistencia al deslizamiento, induciendo fuerzas que provocan la curvatura flagelar (Amelar *et al.*, 1980; Dacheux *et al.*, 1990).

El ATP puede ser generado a partir de la transformación de azúcares (principalmente fructosa y glucosa) a lactato mediante la ruta metabólica de la glucólisis, así como por la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. Cambios en las concentraciones citoplasmáticas de ATP, adenosín difosfato (ADP) y AMP pueden modular la respuesta de la glucólisis y fosforilación oxidativa para satisfacer la demanda energética. Aproximadamente entre un 35 y 60% de la energía total disponible a partir de la hidrólisis del ATP es empleada en el movimiento del flagelo (Ford y Rees, 1990).

El término “movilidad” incluye dos conceptos diferentes, la “movilidad lineal activa” y el “porcentaje total de espermatozoides dotados de movimiento”. Los espermatozoides muestran diferentes patrones de movimiento adaptados a sus necesidades funcionales. Así, los espermatozoides del eyaculado, dentro del plasma seminal muestran unas trayectorias lineales que son las que fisiológicamente mostrarían al penetrar en el moco cervical. Cuando el espermatozoide abandona el plasma seminal e inicia su ascenso por el tracto reproductor femenino, sus características de movilidad cambian. Con la capacitación, aumenta la longitud de la

onda flagelar, originándose trayectorias que muestran con mayor desplazamiento lateral de la cabeza (Mack *et al.*, 1988; Robertson *et al.*, 1988), llegando un momento en que la amplitud de la onda comienza a hacerse asimétrica, dando lugar a un movimiento no progresivo y vigoroso conocido como “hiperactivación”. Este movimiento le proporciona al espermatozoide la fuerza necesaria para que pueda atravesar la zona pelúcida del ovocito (Burkman, 1984).

Las limitaciones intrínsecas al proceso de evaluación de la movilidad en el microscopio óptico implican una considerable variabilidad, lo que hace que se resienta la objetividad de dicha estima. Son numerosos los espermatozoides que atraviesan el campo óptico con diferentes patrones de movilidad. La subjetividad del observador puede distorsionar el resultado del análisis.

En todo caso, los métodos seguidos para la valoración subjetiva de la movilidad espermática son sencillos, determinándose en portaobjetos o cámara de Makler.

Los espermatozoides móviles se clasifican según cuatro categorías según la OMS:

- Grado a: velocidad alta con trayectoria rectilínea.
- Grado b: velocidad media con trayectoria poco o nada rectilínea.
- Grado c: movilidad no progresiva.
- Grado d: espermatozoides inmóviles.

La OMS (WHO, 1999) aconseja aceptar una muestra seminal como normal cuando tenga más de un 25 % de espermatozoides con movilidad tipo (a) o al menos un 50 % con movilidad (a+b).

La movilidad espermática puede verse alterada por diversos factores exógenos: método de recogida del eyaculado y tiempo de transporte, temperaturas extremas, pérdida de alguna fracción de la muestra e infecciones (Núñez-Calonge *et al.*, 1998)

1.6.4.1 Alteraciones cinemáticas

Observando los cambios de movilidad espermática en los distintos ambientes necesarios para alcanzar la fecundación, se ha llegado a la conclusión que este hábito de conducta debe ser de extrema importancia.

Como se indicó anteriormente, el desarrollo de la capacidad de movimiento por parte de los espermatozoides de mamíferos se produce de forma progresiva a lo largo del tracto reproductor masculino (Soler *et al.*, 1992). En la mayoría de las especies, los espermatozoides testiculares son virtualmente inmóviles, adquiriendo su potencialidad para el movimiento en las primeras porciones del epidídimo, y su movilidad progresiva a su paso por el cuerpo de este órgano (Dacheux *et al.*, 1990; Soler *et al.*, 1994; Pérez-Sánchez *et al.*, 1996). El desarrollo de la capacidad fecundante y la movilidad ocurren de forma paralela, de ahí que se haya utilizado como medida indirecta de la capacidad de una población de espermatozoides para producir la fecundación (Vantman *et al.*, 1989a; Vantman *et al.*, 1989b; Holland-Moritz y Krause, 1992).

Los cambios a nivel de membrana que se producen en los espermatozoides a su paso por el epidídimo incrementan la producción de ATP (Bedford y Hoskins, 1990). Sin embargo, mientras los espermatozoides permanecen en la cabeza proximal del epidídimo estos cambios no se desencadenan, probablemente como resultado de mecanismos asociados con un pH intracelular bajo, concentraciones de Ca^{2+} elevadas, y otros factores que pueden ser dependientes de la especie, como la producción por parte del epitelio epididimario de proteínas que confieren gran viscosidad al fluido luminal (Lindemann y Kanous, 1989). Tras la eyaculación, los espermatozoides se activan y se desplazan de forma vigorosa, describiendo trayectorias en su mayoría rectilíneas aunque algunos, todavía nadan en círculos.

La movilidad del flagelo resulta fundamental para el desplazamiento del espermatozoide y para la función reproductiva. En ocasiones se han observado disfunciones en la movilidad espermáticas de origen testicular (Bonet *et al.*, 1992; Foote *et al.*, 1992), epididimario (Wenkoff, 1978) y en algunas ocasiones asociadas

con mutaciones en el DNA mitocondrial (mtDNA) (Kao *et al.*, 1995; St John *et al.*, 1997; Ruiz-Pesini *et al.*, 2000). Estas alteraciones genéticas, que suelen manifestarse como alteraciones en la morfología del espermatozoide, afectan a orgánulos del flagelo, como pueden ser la vaina de fibras, los túbulos del axonema o las fibras accesorias. Como consecuencia, la movilidad de los espermatozoides se ve afectada, llegando incluso a resultar inmóviles.

Aunque muchas disfunciones en la movilidad espermática tienen un origen genético (Sturgess y Chao, 1982; Marmar, 2001), en ocasiones son consecuencia de distintas patologías como la prostatitis (Leib *et al.*, 1994).

1.6.5. Morfología espermática

A diferencia de la mayoría de los mamíferos, que generalmente presentan una población espermática morfológicamente homogénea (Sancho *et al.*, 1998; Gago *et al.*, 1999), los varones muestran una gran heterogeneidad o pleomorfismo respecto a la morfología espermática tanto en un mismo eyaculado (Hartmann *et al.*, 1964) como entre individuos (Menkveld *et al.*, 1990). Este hecho, ha llevado a un proceso de descripción de los espermatozoides morfológicamente normales, largo y complejo hasta la edición del primer manual de la OMS (WHO, 1980).

Con posterioridad a esa fecha, se estableció otro criterio de clasificación basado en el aspecto de los espermatozoides encontrados en el moco postcoital (Fredricsson y Sennerstam, 1984), o en la zona superior del canal endocervical (Kruger *et al.*, 1987). Estas muestras presentaban un aspecto homogéneo, en contraste con poblaciones espermáticas heterogéneas encontradas próximas al orificio cervical externo. En varios trabajos, se puso de manifiesto que con la migración de los espermatozoides a través del moco cervical se produce una selección morfológica que conduce a una población espermática relativamente homogénea (Fredricsson y Björk, 1977; Hanson y Overstreet, 1981; Ragni *et al.*, 1985).

El estudio de la morfología se ha visto generalmente afectado por numerosos factores, como son la forma de realizar la extensión y tipo de tinción empleada, la

zona del portaobjeto que se lee al microscopio, los criterios que se siguen y la subjetividad del propio observador. La OMS (WHO, 1980) desde que publicó el primer manual basado en el sistema de clasificación de MacLeod (1970), ha intentado estandarizar e interpretar la morfología, publicando nuevas versiones del mismo.

Por otro lado, desde 1988 el grupo de Tygerberg, (Sud-Africa) ha publicado varios estudios utilizando criterios más estrictos que los de la OMS (Kruger *et al*, 1988a).

Actualmente, para valorar la morfología en un estudio básico se pueden seguir los dos criterios: el recomendado por la OMS (WHO, 1999), o el denominado criterio estricto de Kruger (Kruger *et al*, 1988a; Menkveld *et al.*, 1990; Menkveld *et al.*, 1991), cuyas diferencias están basadas, principalmente en la definición del espermatozoide normal o de las diversas anomalías morfológicas. Para cada uno de ellos, se ha establecido un límite por debajo del cual se considera una muestra como patológica (15 % según los criterios de la OMS para tratamientos de FIV y del 14 % según el criterio estricto) (Tabla 1). Cuando se considera el criterio estricto, dentro del grupo de anormales se diferencian dos subgrupos: los que tienen de un 5-14 % de formas anormales que son considerados de buen pronóstico, y aquellos con un 4 % o menos que son considerados de pobre pronóstico (Kruger *et al.*, 1988a).

En todos caso, para valorar la morfología se utilizan diversas tinciones entre las que cabe destacar: Diff-Quik, Hemacolor, Giemsa y Papanicolau, se recomienda contar un mínimo de 200 espermatozoides por frotis y 2 frotis, en la medida de lo posible, para obtener resultados fiables.

Tabla 1. Morfología espermática. Criterios de Tygerberg y de la OMS.

		Criterios estrictos	OMS 1992	OMS 1999
CABEZA	FORMA	Regular ovalada	Ovalada	Ovalada
	ACROSOMA	40-70% del área de la cabeza	40-70% del área de la cabeza	Bien definido, 40-70% del área de la cabeza
	LONGITUD (L)	5-6 μm	4-5,5 μm	4-5 μm
	ANCHURA (A)	2,5-3,5 μm	2,5-3,5 μm	2,5-3,5 μm
PIEZA INTERMEDIA (PI)	LONGITUD (L)	1,5 la longitud de la cabeza	Uniforme, recta y no ensanchada, con un ángulo de 90° entre el eje longitudinal de cabeza y plano de inserción.	1,5 la longitud de la cabeza
	ANCHURA (A)	<1 μm		<1 μm
	FORMA	Delgada, unida axialmente a la cabeza.		Delgada, unida axialmente a la cabeza.
FLAGELO		Longitud de unos 45 μm , uniforme y desenrollada.	Desenrollado, entero, uniforme y sin restos citoplasmáticos.	Recto, uniforme, más delgado que la PI, desenrollado y de 45 μm de longitud.
Restos citoplasmáticos de la PI		<1/2 del área de la cabeza	<1/3 del área de la cabeza	<1/2 del área de la cabeza
Formas con valores limitantes.		Se consideran anormales.	Se consideran anormales.	Se consideran anormales.
Porcentaje de normalidad		>14 % de formas normales	>30 % de formas normales	>15% en casos de FIV

1.6.5.1. Alteraciones morfológicas

Algunas de las morfoanomalías de los espermatozoides son de origen genético, es el caso de la globozoospermia, patología que impide la formación de las estructuras acrosomales de la cabeza del espermatozoide (Check *et al.*, 1993); y la presencia de espermatozoides acéfalos o con uniones anormales entre la cabeza y el cuello, como consecuencia de alteraciones en la espermiogénesis. Chemes *et al.* (1999) indicaron su posible origen genético por el fenotipo característico de la patología y por su incidencia entre varones de la misma familia. Previamente, otros

autores ya habían descrito este tipo de alteración en la especie humana y en otras especies animales (Bloom y Birch, 1970; Chemes *et al.*, 1987; Baccetti *et al.*, 1989). Baccetti *et al.* (2002) demostraron que la teratozoospermia severa era concomitante con patologías andrológicas tales como el varicocele, criptorquidia e infecciones seminales, y observaron que la mayoría de las alteraciones genéticas estaban relacionadas con problemas de consanguinidad. Muchas de ellas conllevan a esterilidad masculina y parecen ser debidas a mutaciones autosómicas recesivas: “síndrome de deficiencia de los brazos de dineína” (Edwards *et al.*, 1989; Walter *et al.*, 1990), “síndrome del flagelo atrofiado” (Chemes *et al.*, 1998), “cabeza redonda” (Check *et al.*, 1993), “miniacrosoma” (Baccetti *et al.*, 1991) y “acéfalos” (Chemes *et al.*, 1999). Estas alteraciones afectan a orgánulos del flagelo, a la conexión entre la cabeza y la pieza intermedia, vaina de fibras, túbulos del axonema, fibras accesorias y estructuras acrosomales. Como consecuencia, los espermatozoides son inmóviles o muestran una movilidad alterada. En otras ocasiones, las alteraciones morfológicas son consecuencia de distintas situaciones patológicas como la prostatitis (Leib *et al.*, 1994; Pironcheva *et al.*, 1998) e hiperprolactinemia (Laszczynska *et al.*, 1992.), así como por el efecto negativo de algunos agentes externos: exposición a rayos X (Chatterjee *et al.*, 1994), plomo ambiental (Kaur y Prashad, 1994), 2,4-diclorofenoxacético (Garabrant y Philbert, 2002) y en general, a todos compuestos tóxicos para el sistema reproductor.

La morfología de los espermatozoides es valorada de forma rutinaria en los laboratorios de Andrología por su importancia en el diagnóstico de infertilidad masculina, siendo cada día más estrictos los criterios que se utilizan para su evaluación.

Las morfoanomalías se pueden clasificar en diversas categorías:

- Forma o tamaño de la cabeza: grande, pequeña, alargada, piriforme, redonda, amorfa, vacuolada, de alfiler y dobles cabezas.
- Defectos del cuello o pieza intermedia: incluye ausencia de flagelos, angulados, gruesos y vacuolados.

- Defectos del flagelo: cortos, múltiples, rotos, angulados, en horquilla y enrollados.

Además se incluyen todas las posibles combinaciones(OMS, 1999)

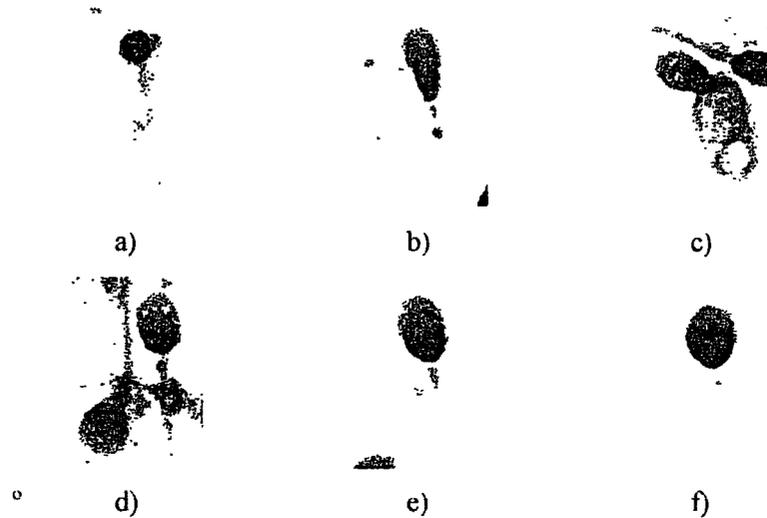


Figura 5. Espermatozoides humanos: a) Cabeza anormal: tamaño pequeño y ausencia de acrosoma, forma típicamente redonda; b) Cabeza anormal: elongación severa del área postacrosomal; c) Cabeza ligeramente anormal, cuello/pieza anormales, cola enrollada; d) Espermatozoide izquierdo: cabeza anormal, región postacrosomal posterior alargada. Espermatozoide derecho, cabeza normal, aunque lateral izquierdo del área postacrosomal ligeramente aplanado; e) Cabeza anormal, acrosoma pequeño; f) Espermatozoide normal.

Los espermatozoides morfológicamente anormales, a menudo presentan múltiples defectos. Para informar de este tipo de alteraciones sin priorizar las de la cabeza sobre las de la pieza intermedia, ni éstas sobre las del flagelo, durante los últimos años se viene empleando el índice de teratozoospermia que se define como: el número de anomalías dividido por el número de espermatozoides anormales. Este índice se utiliza como predictor de la función espermática *in vivo* e *in vitro*.

1.7. LIMITACIONES DEL ESPERMIOGRAMA

La técnica convencional utilizada para la realización del espermiograma se halla sujeta a distintos grados de imprecisión. Como se ha indicado, determinación de la concentración espermática, porcentaje de móviles y proporción de formas normales representan los principales parámetros del análisis. Los pronósticos basados en estos análisis son importantes para ofrecer un valor de probabilidad, sin embargo, no constituyen un veredicto definitivo.

El espermiograma está sujeto a una serie de limitaciones:

- La correcta realización de estos análisis requiere tiempo, y un intensivo y laborioso trabajo, tras un periodo de aprendizaje largo.

- Como consecuencia, la valoración de la fertilidad masculina se basa en la evaluación subjetiva y sesgada de los técnicos. La determinación de la movilidad y morfología son especialmente susceptibles al error humano. Además, el análisis detallado de las características de movilidad como la velocidad, linealidad, y desplazamiento lateral de la cabeza son imposible de evaluar mediante observación al microscopio. Lo mismo se puede decir de las características morfométricas de los espermatozoides.

- Por otra parte, uno de los principales problemas del espermiograma es su difícil repetitividad. Al igual que la movilidad, la clasificación morfológica está sujeta a una considerable variabilidad. La evaluación morfológica es difícilmente reproducible entre laboratorios. Por ello, es de gran importancia introducir controles de calidad sistemáticos del análisis seminal para incrementar la fiabilidad de los resultados y reducir los errores intra e interobservadores inherentes a los métodos de medida visual. Davis *et al.* (1995) encontraron en los análisis morfológicos coeficientes de variación entre observadores del 32 al 65 % dependiendo de la clasificación utilizada. Marnet *et al.* (2000) observaron al comparar el método convencional con el computarizado que la variabilidad del análisis morfológico intraobservadores era escasa para ambos; mientras que la variabilidad entre observadores, incluso dentro del mismo laboratorio, era considerablemente más

elevada mediante el método convencional que mediante el método computarizado (coeficiente de variación: 0.43 vs. 0.08, respectivamente). Esto dificulta la interpretación de los resultados y limita su relevancia clínica.

- Por último, hay una falta de criterios universales. Se conocen, al menos, tres clasificaciones diferentes de normalidad lo que deriva en diversos puntos de corte respecto de qué considerar normal: 14 % para Kruger *et al.* (1988a), 15 % para la OMS (WHO, 1999) y 40 % para Jouannet *et al.* (1988). La evaluación morfológica mediante estos métodos es indirecta y se está obteniendo simplemente un indicador morfológico o un índice de probabilidad de que una determinada muestra sea o no capaz de fecundar. Es más, la morfología se evalúa independientemente de la calidad y cantidad de movilidad, vitalidad, y del resto de procesos fisiológicos implicados en la interacción entre gametos, como sucede durante la fecundación en condiciones naturales. A pesar de estos hechos, hoy en día se reconoce ampliamente que la morfología espermática es la característica seminal de mayor relevancia en la valoración de la capacidad de fecundación, y más concretamente con la capacidad de fecundación en casos de FIV e IA.

1.8. SISTEMAS COMPUTARIZADOS DE ANÁLISIS

En los últimos años, se ha coincidido en que las características anormales de los espermatozoides desempeñan un papel en quizás un 30-40% de los casos de esterilidad en las parejas. Como se ha constatado, el estudio de la movilidad y morfología de los espermatozoides y sus efectos sobre la esterilidad es un proceso terriblemente lento y laborioso. Los avances en los conocimientos científicos se han producido muy lentamente, debido en parte al método manual de evaluar visualmente los espermatozoides, susceptible de un elevado grado de subjetividad e imprecisión. Por tanto, no sorprende, que estas medidas visuales hayan sido predictores mediocres de la fertilidad, que ofrecían una descripción general de la movilidad espermática pero cuya exactitud y precisión estaban limitadas por las condiciones del sistema de medida y por la destreza del observador. En todo caso, este método todavía es

utilizado por la mayoría de los laboratorios, aunque hay que ser conscientes de que, debido a su elevada subjetividad, puede presentar resultados dispares para una misma muestra entre laboratorios e incluso entre distintos observadores de un mismo laboratorio (Cooper *et al.*, 1992; 1999; 2002).

Al constatar la amplia variabilidad en estas evaluaciones manuales de los espermatozoides, se empezó a investigar formas de automatizar el proceso de análisis espermático mediante sistemas informáticos. Las medidas objetivas de la movilidad empezaron a determinarse mediante métodos directos e indirectos. Los métodos directos implicaban el uso de la cine- o video-micrografía y visualizaban las células espermáticas individuales, grabando su movilidad; mientras que los indirectos, como la espectrofotometría o velocímetro laser-Doppler (Jouannet *et al.*, 1977), estimaban la velocidad media de desplazamiento del espermatozoide midiendo alguna de las propiedades ópticas de la suspensión espermática.

La micrografía de exposición continua es un método con más de 50 años de antigüedad (Rothschild, 1949) y fue utilizado por Janick y MacLeod (1970), Overstreet *et al.* (1979) y Milligan *et al.* (1980) para medir las características de movilidad de los espermatozoides humanos. Una variación de la video-micrografía de exposición es la “fotomicrografía de exposición múltiple” en la cual la iluminación es estroboscópica (Makler, 1978). Con esta técnica las trayectorias espermáticas aparecen como cadenas de exposiciones individuales y es posible obtener el porcentaje exacto de movilidad, velocidad media individual (expresada en micras por segundo), frecuencia de distribución de la velocidad del espermatozoide, y concentración espermática. En la década de los 70, el carrete o rollo original de película fotográfica fue reemplazado por los sistemas estandarizados de video cassette consiguiéndose una mejor grabación y resolución óptica. Inicialmente, las cintas de video se analizaban de forma manual, pero pronto se introdujo el uso de digitalizadores electrónicos controlados manualmente (Neil y Olds-Clarke, 1987; Mortimer *et al.*, 1988a). El desarrollo de la tecnología de digitalización de la imagen de video inevitablemente llevó a su aplicación en el análisis de la movilidad

espermática (Liu y Warne, 1977; Katz y Overstreet, 1981). La introducción de los sistemas semiautomáticos (Schmassmann *et al.*, 1979; Jagoe *et al.*, 1986; Moruzzi *et al.* 1988) y automáticos denominados genéricamente CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*) (Katz *et al.*, 1982; Davis y Katz, 1989), permitió generar medidas rápidas y seguras de las características de movilidad de los espermatozoides. Los primeros analizadores que surgieron fueron el *Cell Soft Semen Analyzer* y el *Hamilton Thorn Motility Analyzer*. El sistema Cell Soft identifica los espermatozoides por su tamaño y luminosidad, mientras que el Hamilton Thorn por su movilidad, de modo que la adquisición de imágenes sucesivas proporciona las posiciones puntuales de los espermatozoides a distintos tiempos y la unión de estos puntos origina trayectorias rectilíneas que definen el movimiento espermático. Desde entonces, se ha publicado multitud de artículos que han incidido en los beneficios de estas técnicas. Muchos de ellos han subrayado el valor que tienen estos sistemas a la hora de conseguir una mayor precisión y objetividad en la evaluación del semen tanto en humano como en otras especies (Mortimer *et al.*, 1988a; Mortimer *et al.*, 1988b; Davis *et al.*, 1989; Davis *et al.*, 1992; Macleod *et al.*, 1994; Pérez-Sánchez *et al.*, 1994; Paston *et al.*, 1994). Con ayuda de estos sistemas, estamos empezando a acumular datos de las relaciones entre la movilidad espermática y su competencia funcional. Sin embargo, tanto el *hardware* como el *software* para la identificación y rastreo de los espermatozoides individuales y para el análisis de las características del movimiento difieren entre los sistemas comercialmente disponibles. Cuando la concentración espermática es muy elevada, muchos de estos sistemas tienen dificultad para distinguir los espermatozoides de otras células no espermáticas, así como de discriminar trayectorias cruzadas. Estos problemas pueden reducirse por dilución de las muestras seminales con diluyentes que no alteren las características de movilidad espermática (Vantman *et al.*, 1988; Farrel *et al.*, 1996; Maxwell *et al.*, 1999).

La utilización de la movilidad espermática como herramienta de diagnóstico ha hecho posible el desarrollo de los sistemas de digitalización de imágenes y su

aplicación para el seguimiento de puntos e imágenes sucesivas, proporcionando una información más objetiva y detallada de las trayectorias espermáticas. Estos sistemas han automatizado y simplificado el proceso y nos permiten obtener medidas individuales del movimiento de cada espermatozoide.

Los sistemas automáticos de medición de la imagen en general y el *Sperm Class Analyzer*[®] (SCA[®]) en particular son sistemas basados en la captura sucesiva de imágenes que provienen de un microscopio, su digitalización, la identificación de las células espermáticas que contiene la primera imagen, el seguimiento de estas células en imágenes sucesivas, el establecimiento de trayectorias y, finalmente, la exposición de los resultados. Estos resultados reflejan una serie de medidas derivadas del análisis del desplazamiento en dos planos de la cabeza espermática a través del tiempo. Los principales parámetros que se evalúan son: VSL (velocidad rectilínea), VCL (velocidad curvilínea), VAP (velocidad de la trayectoria media), ALH (amplitud desplazamiento lateral de la cabeza), STR (rectitud), LIN (linealidad), WOB (oscilación) y BCF (frecuencia de batida) (Figura 6).

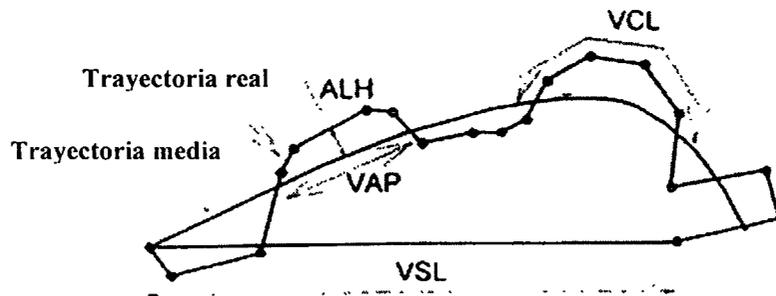


Figura 6. Parámetros del movimiento espermático (VCL, VSL, VAP) calculados a partir de la trayectoria descrita por los espermatozoides.

Cuando el análisis se hace en condiciones óptimas, las medidas detalladas de la movilidad proporcionan información muy útil sobre la integridad general de la membrana del espermatozoide, del axonema y de este modo proporciona información predictiva sobre la función espermática. Sin embargo, la exactitud de los valores obtenidos está limitada por factores técnicos y biológicos. El resultado del análisis depende de: las condiciones en que se realizan las medidas (temperatura, volumen, tipo de cámara etc.), el estado en que se encuentra la población de espermatozoides (muestras en fresco o capacitadas, concentración de la población, diluyente utilizado etc.) y de los sistemas de medidas (óptica empleada, tipo de iluminación, calibración del instrumento, aumentos utilizados etc.) Por ello es necesario conocer en todo momento las condiciones del análisis y reevaluar los resultados en caso que estos no sean los esperados. Si bien, la buena repetitividad de las medidas comporta una considerable fiabilidad de las mismas.

Estos sistemas deben de utilizarse con rigor para asegurar que las medidas obtenidas no sean erróneas y reflejen las características de movilidad reales de la población que se está analizando (Burkman, 1991). Las medidas realizadas por cada sistema, deben adaptarse a las condiciones de cada laboratorio y estandarizarse de acuerdo a los criterios adoptados por cada equipo de trabajo. Utilizando diferentes sistemas CASA, pueden obtenerse diferentes resultados del análisis de una única muestra de semen. Cada uno de ellos puede reconstruir trayectorias diferentes, o utilizar distintos métodos para la localización e identificación de espermatozoides, así como diferentes algoritmos para la reconstrucción de las características de movimiento. En todo caso, se ha comprobado que la correlación obtenida entre los resultados de diversos sistemas CASA es muy significativa (Davis *et al.*, 1992; Davis y Katz, 1992, Holt *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 2002).

Algunos sistemas CASA, además de un componente de *software* para evaluar la movilidad ha incorporado un módulo de *software* capaz de determinar la morfología espermática (Pérez-Sánchez *et al.*, 1994; Pérez-Sánchez *et al.*, 1998; Steigerwald y Krause, 1998; Soler *et al.*, 2000). Utilizando este módulo, las muestras, previamente

fijadas y teñidas pueden ser analizadas individualmente para determinar características morfométricas. Los parámetros obtenidos hacen referencia al tamaño de la cabeza: área, perímetro, longitud y anchura, otras están relacionadas con su forma y con la proporción de la misma que pertenece al acrosoma. Incluso, alguno de ellos ofrecen información sobre la pieza intermedia: área y anchura, así como datos referentes a la inserción de la pieza intermedia en el núcleo, como son la distancia y el ángulo de la inserción.

Estos sistemas también pueden clasificar los espermatozoides en categorías morfológicas como normales y anormales, y proporcionar información sobre defectos en la cabeza, acrosoma y pieza intermedia.

El estudio de la caracterización de las diferentes formas espermáticas, y su relación con la fertilidad son, actualmente, uno de los puntos clave en el análisis del semen. En la especie humana, la morfología espermática es uno de los parámetros que presenta una mayor correlación con la tasa de fecundación (Kruger *et al.*, 1988b) pero el alto grado de subjetividad de la evaluación morfológica tradicional, ha mermado su potencial en el pronóstico de la infertilidad (Davis and Gravance, 1994). Este hecho influyó en el desarrollo de estos sistemas CASA, por algunos llamados ASMA (*Automatic Semen Morphology Analysis*) o CASMA (*Computer Automatic Semen Morphology Analysis*), como medida para reducir la variabilidad existente en el análisis espermático. Algunos autores han postulado que la morfología tiene un valor mas limitado a la hora de determinar la tasa fecundación (Bartoov *et al.*, 1993), sin embargo estas conclusiones varían según la técnica de tinción, protocolos de preparación de las muestras seminales, y los sistemas de clasificación morfológica (Kruger *et al.*, 1986; Menkveld *et al.*, 1990). Con estos sistemas se capturan las imágenes de los espermatozoides de una muestra seminal, teñida previamente. Estas imágenes son procesadas por el *software* del ordenador, calculando los parámetros métricos de la cabeza espermática, pieza intermedia y acrosoma. Estos parámetros permiten la clasificación de los espermatozoides según su forma y tamaño. Con estos sistemas se han localizado sutiles diferencias entre muestras, tanto en la especie

humana como en otras especies animales (Gravance y Davis, 1995; Pérez-Sánchez *et al.*, 1998; Sancho *et al.*, 1998; Gago *et al.*, 2000). Esto lleva a pensar que dentro de una población de espermatozoides normales, pueden existir diferentes subpoblaciones con diferente capacidad fecundante. La utilización de los sistemas CASA nos permite identificar y separar estas subpoblaciones, ya que el análisis seminal gana en precisión y objetividad (Gravance y Davis, 1995).

Por tanto, al igual que al analizar los parámetros de movilidad espermática, cuando se trata de valorar los parámetros morfométricos se deben capturar imágenes de los espermatozoides que al realizar el análisis, no nos conduzcan a error al considerar como parte del espermatozoide artefactos de la tinción.

1.9. SIGNIFICADO CLÍNICO DEL ESPERMIOGRAMA

La concentración, el porcentaje de espermatozoides móviles y la proporción de formas morfológicamente normales son características relevantes en el proceso de fecundación natural o en la elección de técnicas de reproducción asistida (IA, FIV e ICSI). El espermiograma nos ofrece una información clínica de gran valor si se estudian cuidadosamente sus datos. En el estudio de la pareja estéril, el análisis de semen es una de las pruebas básicas para la elaboración de un diagnóstico en reproducción; sin embargo, no hay un consenso sobre la validez de las distintas pruebas utilizadas en andrología en cuanto a la predicción de la fertilidad masculina.

El análisis del seminograma permite una rápida evaluación inicial de la calidad espermática, de gran ayuda en la predicción del potencial de fertilidad del varón, así como las posibles causas de la infertilidad.

La morfología y movilidad son factores importantes en relación con la capacidad del espermatozoide de atravesar la barrera vaginal (Fredicsson y Bjork, 1977) y fecundar al ovocito. Sin embargo, no está igualmente claro su valor pronóstico en reproducción asistida (Kruger, 1988b; Hinting *et al.*, 1990; Barlow *et al.*, 1991; Svalander *et al.*, 1996; Karabinus y Gelety, 1997; Yavetz *et al.*, 2001).

Como se ha visto, la movilidad espermática es un requisito fundamental para fecundar al ovocito. Sin embargo, en reproducción asistida el concepto de movilidad varía dependiendo de la técnica utilizada. Para que este concepto sea válido, se debe de hablar de espermatozoides capacitados, ya que los patrones de movilidad espermática varían tras capacitación (Serres *et al* 1984), y se pueden encontrar eyaculados normales con cifras de recuperación de espermatozoides móviles muy bajas (REM) y viceversa.

En IA, el número mínimo más o menos estandarizado que se requiere para inseminar es de 5×10^6 espermatozoides móviles (con movilidad a+b) por mililitro, ya que por debajo de estas cifras el porcentaje de gestación baja considerablemente (Aribarg y Sukcharoen, 1995; Bollendorf *et al.*, 1996; Hauser *et al.*, 2001; Van Voorhis *et al.*, 2001).

En FIV, la concentración de espermatozoides necesarios es inferior y oscila entre $2-3 \times 10^6$ espermatozoides móviles por mililitro, por debajo de estas cifras la tasa de gestación disminuye de forma significativa, habiéndose constatado la relación que existe entre los parámetros cinéticos y los resultados de FIV (Rosenborg *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1991; Duncan *et al.*, 1993; Grow *et al.*, 1994; Bollendorf *et al.*, 1996; Donnelly *et al.*, 1998; Repping, 2002). Sin embargo, cuando se habla de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), parece que no es apenas necesaria la movilidad espermática y sólo se requiere para saber que el espermatozoide que vamos a seleccionar está vivo. Hasta hace relativamente poco tiempo, no estaba muy claro si la movilidad de los espermatozoides microinyectados podía afectar a la tasa de fecundación y embarazo tras la ICSI (Nagy *et al.*, 1998a; Nagy *et al.*, 1988b). Recientemente, se publicó un trabajo en el que se demostraba una clara relación entre la movilidad del espermatozoide microinyectado y la tasa de fecundación. Van den Bergh *et al.* (1998) demostraron un mayor porcentaje de fecundación (84 % vs. 68 %) tras ICSI con los espermatozoides de mayor velocidad rectilínea (VSL) (Van den Bergh *et al.*, 1998). Aquí la movilidad espermática se revela como uno de los parámetros principales implicados en la capacidad

fecundante, ya que la ausencia de movilidad, incluso la movilidad alterada, está asociada en numerosas ocasiones con otro tipo de alteraciones como los defectos en el DNA (Kao *et al.*, 1995; Kao *et al.*, 1998; St John *et al.*, 2001).

Por otra parte, la morfología espermática sí parece ser un claro predictor de la fecundación natural (Bartoov *et al.*, 1993, 1994), IA (Berkovitz *et al.*, 1999), y FIV convencional (Kruger *et al.*, 1988a; Mashlach *et al.*, 1992). Además hay varios trabajos que hablan sobre la disminución de las tasas de fecundación, implantación y embarazo en casos de teratozoospermia (Tasdemir *et al.*, 1997), globozoospermia (Liu *et al.*, 1995; Bourne *et al.*, 1995; Trokoudes *et al.*, 1995), y megalozoospermia (Kahraman *et al.*, 1999), así como, una disminución en el número de embriones que se desarrollan hasta el estadio de blastocisto (Miller y Smith, 2001; Plachot *et al.*, 2002). Sin embargo, otros autores concluyen que no parece haber un efecto significativo de la infertilidad masculina severa sobre la implantación y el embarazo, tras ICSI. Aunque, no ignoran la posibilidad de que determinadas aberraciones espermáticas específicas puedan ejercer un efecto negativo sobre la embriogénesis y sobre el potencial de implantación *in vivo* o tras técnicas de reproducción asistida (Oehninger *et al.*, 1998).

Hay que destacar dos revisiones de la literatura sobre este tema. La primera en FIV realizada por Coetzee *et al.* (1998) donde tras revisar 216 artículos, llegaron a la conclusión que la morfología según los criterios estrictos de Kruger, es una buena herramienta para predecir la tasa de fecundación pero no de embarazos en un programa de FIV; y la segunda revisión realizada en IA por Van Waart *et al.* (2001) sobre 421 artículos en la que se concluyó que la morfología espermática evaluada con criterios estrictos se relaciona con la tasa de embarazo.

Con la aparición de la ICSI, se dejó de dar a la morfología espermática la importancia que tenía hasta entonces, ya que esta técnica parecía solucionar los problemas de infertilidad masculina. Muchos autores coinciden al considerar que no existe una clara relación entre la morfología espermática y el éxito tras ICSI (Mansour *et al.*, 1995; Nagy *et al.*, 1995; Svalander *et al.*, 1996; Küpker *et al.*, 1998;

Oehninger *et al.*, 1998). Es evidente, que con la ICSI se superan las barreras del tracto reproductor femenino y las envolturas que rodean al ovocito y que de forma natural, sólo los espermatozoides morfológicamente normales son capaces de atravesar con éxito (Nikolettos *et al.*, 1999). Además, mediante esta técnica se seleccionan los mejores espermatozoides, descartándose aquellos que son morfológicamente muy anormales, por lo que se supone que se debe incrementar la tasa de fecundación, implantación y embarazo (Battaglia *et al.*, 1997; Kahraman *et al.*, 1999; Osawa *et al.*, 1999). No obstante el uso de sistemas computarizados para valorar la morfometría espermática ha puesto de manifiesto que el pronóstico de las muestras depende de los valores obtenidos. Al respecto se ha comprobado que las muestras que contienen espermatozoides de menor tamaño, siempre dentro de la normalidad, presentan mayor probabilidad de éxito tras FIV (Soler *et al.*, 2000).

Con gran frecuencia se ha relacionado una morfología anormal con una mala movilidad del espermatozoide (Katz *et al.*, 1982; Bonduelle *et al.*, 2002), demostrándose su importancia en la fecundación y en la calidad de los embriones resultantes (Parinaud *et al.*, 1993). De modo, que su anormalidad es, en ocasiones, reflejo de la carga genética con la que están dotados, lo que con frecuencia deriva en fallos de fecundación e implantación (Sun *et al.*, 1997).

No cabe duda de que muchos aspectos de la función espermática dependen de la calidad de movimiento y características morfológicas, y este hecho ejerce un efecto directo sobre el resultado de fertilidad, pero hay que reconocer que el interés reside en el aspecto clínico, en poder diferenciar, en base a las características cinéticas y morfométricas, qué eyaculados son capaces de fecundar y cuales no.

Los sistemas CASA nos pueden ayudar a interpretar el significado de los parámetros de los eyaculados y sémenes capacitados, ofreciéndonos una orientación de carácter predictivo de la fertilidad (Larsen *et al.*, 2000).

1.10. NUEVAS POSIBILIDADES DE LOS SISTEMAS CASA

Las nuevas tecnologías de análisis de imagen están permitiendo el estudio de las características y las funciones de los espermatozoides individuales de un mismo eyaculado, dejando clara su enorme heterogeneidad. El análisis automatizado se está utilizando para identificar diferentes subpoblaciones morfológicamente diferentes de espermatozoides en y entre eyaculados de mamíferos (Davis y Gravance, 1994; Thuston *et al.*, 1999). La morfología espermática es un reflejo de la espermatogénesis y una herramienta potencialmente valorable para medir las variaciones celulares que influyen en el éxito de la fecundación (Barratt *et al.*, 1995). Thurson *et al.* (2001) demostraron en verraco la variación interindividual en la criopreservación seminal y su origen genético. La diferencia genética entre los individuos puede estar unida a la criosupervivencia y ofrecer una nueva aproximación para estudiar la criobiología espermática. Los espermatozoides se muestran sensibles al rápido descenso de la temperatura, esta sensibilidad varía entre individuos y puede proporcionar una explicación a la variación de la calidad seminal tras descongelación. Estudios bioquímicos y biofísicos de la membrana plasmática han proporcionado alguna explicación para la variación entre especies, en las cuales el grado de sensibilidad al enfriamiento se cree que está unido a la función de la membrana (Watson y Morris, 1987) y se ha correlacionado con el contenido de colesterol y fosfolípidos de la misma (Darin-Bennett y White, 1977). Se ha sugerido que la variación de la calidad seminal tras descongelación es el resultado de la utilización de protocolos de criopreservación inadecuados; sin embargo, las modificaciones en las condiciones de criopreservación mejoran la calidad seminal solamente en algunos individuos (Parkinson y Whitfield, 1987). Medrano Hernández (1998) observó en verraco que aquellos cuyas muestras criopreservaban “bien”, se veían menos afectados por procesos de criopreservación inadecuados, recuperándose sémenes con buena calidad tras descongelación; que aquellos cuyas muestras criopreservaban “mal” y tenían mala tolerancia a procesos de criopreservación inadecuados. Las modificaciones de las condiciones de criopreservación fueron

efectivas solamente en algunos individuos, proporcionando evidencias del efecto genético sobre la criopreservación seminal.

El análisis automatizado se puede utilizar para detectar pequeñas diferencias entre subpoblaciones espermáticas en eyaculado de verraco (Thurston *et al.*, 2001). Las dimensiones del espermatozoide de verraco morfológicamente "normal" no muestran diferencias significativas entre eyaculados o entre individuos (Thurston, 1999). Unas medidas más claras de la morfología se obtuvieron por aplicación de los descriptores de forma de Fournier para definir la estructura detallada de la cabeza del espermatozoide, y se observaron subpoblaciones de espermatozoides con ligeras diferencias en la forma de la cabeza, en el mismo eyaculado.

La correlación entre la forma de la cabeza en el eyaculado fresco y la recuperación espermática tras descongelación, nos proporciona información sobre la función de las subpoblaciones espermáticas. La variabilidad en la proporción de cada subpoblación del eyaculado entre verracos, puede explicar porque ciertos verracos tienen muestras seminales más susceptibles a la criopreservación que otros. La aplicación de las técnicas de análisis de Fournier a los datos resultantes del análisis permite identificar espermatozoides con diferencias adaptativas, tales como el incremento de la capacidad fecundante y la resistencia a la criopreservación, promoviendo el análisis morfológico como útil herramienta diagnóstica.

1.11. OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio fueron los siguientes:

Objetivo principal:

- Se pretende validar el uso del *Sperm Class Analyzer*[®] en el laboratorio clínico humano, así como abordar un análisis integrado de los diversos parámetros cinemáticos y morfométricos de los espermatozoides aportados por el sistema.

Objetivos generales:

- Definir las condiciones óptimas de trabajo para el análisis cinemático de las muestras: aumento, dilución y contraste de fases.
- Analizar la correlación entre las determinaciones subjetivas y objetivas.
- Analizar la correlación entre los parámetros cinemáticos.
- Reducir las variables cinemáticas a sus componentes principales.
- Analizar la correlación entre los parámetros morfométricos.
- Reducir las variables morfométricas a sus componentes principales.
- Analizar la integración de las variables cinemáticas y morfométricas.
- Analizar los parámetros cinemáticos entre grupos de diagnóstico.
- Analizar los parámetros morfométricos entre grupos de diagnóstico.
- Analizar las componentes principales cinemáticas y morfométricas entre grupos de diagnóstico.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. DONANTES

Se utilizaron muestras seminales pertenecientes a 63 donantes voluntarios, en su mayor parte estudiantes de la *Universitat de Valencia*, excluyéndose aquellos voluntarios que estuvieron sometidos a algún tipo de tratamiento y padecían o hubieron padecido algún tipo de enfermedad que afectara al aparato reproductor. Tras la exclusión de 7 de los donantes, el grupo quedó reducido a 56 individuos, cuya edad osciló entre 19-38 años ($23,98 \pm 3,69$). Las muestras fueron recogidas por masturbación en un recipiente de plástico según las indicaciones de la OMS. El estímulo erótico se estandarizó proporcionando material gráfico. El periodo de tiempo transcurrido entre la recogida de la muestra y su valoración fue inferior a una hora. Se midió el volumen y se dejó licuar en un incubador (Lab-line, Instruments, Inc., Melrose Park, IL, USA) en atmósfera de CO₂ al 5 %, a 37°C durante 30 minutos o hasta licuefacción.

2.2. ANÁLISIS SUBJETIVO

2.2. 1. Determinación manual de la concentración espermática

2.2.1.1. Hemocitómetro

La determinación de la concentración se realizó mediante recuento con un hemocitómetro (Cámara Neubauer mejorada. Brand, Alemania) (Figura 7).

En primer lugar, se calculó la dilución que se debía utilizar para realizar el recuento. Para ello, se depositaron 10 µl de semen sobre un portaobjeto, se cubrieron con un cubreobjetos de 24 x 24 mm y se contó el número de espermatozoides por campo microscópico con el objetivo de 40x. El medio utilizado para hacer las diluciones consistió en 50g Na HCO₃, 10 ml de formalina al 35 % (v/v), y completado hasta 1000 ml con agua destilada (Tabla 2).

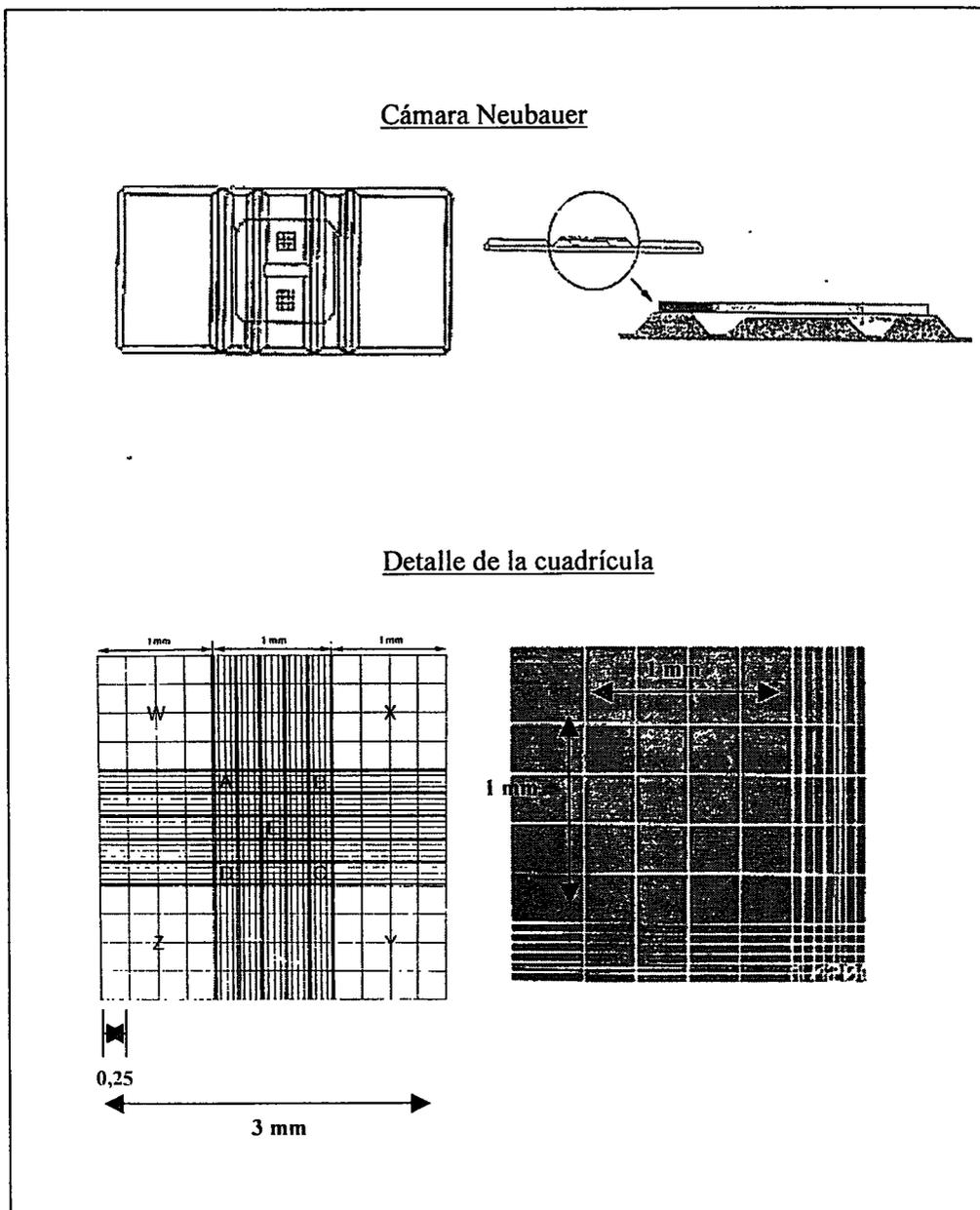


Figura 7. Cámara Neubauer mejorada

Tabla 2. Diluciones del semen fresco para determinación de concentración en un hemocitómetro (cámara Neubauer mejorada)

Nº espermatozoides /campo (40x)	Dilución	Semen (μ l)	Medio de dilución (μ l)
10-20	1:10	20	180
>20	1:20	20	380
>50	1:50	20	980
>100	1:100	10	990

La muestra diluida, se mezcló homogéneamente utilizando un vórtex, y con ella se cargaron por capilaridad las dos cámaras del hemocitómetro, dejándose sedimentar durante 5 minutos en una cámara húmeda antes de realizarse el recuento.

El recuento se realizó en un microscopio Olympus BH-2 de contraste de fases (Olympus, Tokio, Japón) (este microscopio se utilizó para todo el trabajo). El microscopio estaba equipado con un condensador de contraste de fases, objetivos de 10x, 20x y 40x (tanto de contraste positivo como negativo) y uno de 100x de campo claro (plan acromático). Observando con el objetivo de 40x, se contó el número de espermatozoides morfológicamente maduros y con flagelo en un área de 1 mm², distribuidos en 16 cuadrados intermedios de la cámara, dispuestos en las 4 diagonales de la misma.

El cálculo final se realizó según la siguiente expresión:

$$\text{Volumen en } 1 \text{ mm}^2 = 1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm (profundidad de la cámara)} = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ ml}$$

$$\text{Concentración (espermatozoides/ml)} = \text{n}^\circ \text{ de espermatozoides en } 1 \text{ mm}^2 \times 1/\text{dilución} \times 10^4$$

2.2.1.2. Cámara Makler

Se depositaron 5 μ l de suspensión espermática, fijada según lo anteriormente expuesto, en una cámara Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) diseñada inicialmente para recuento y movilidad espermática (Makler, 1980) (Figura 8). La

característica fundamental de esta cámara es tener una profundidad de sólo 10 μm , en lugar de los 100 μm del hemocitómetro, lo que permite que los espermatozoides sean observados en un único plano focal, moviéndose horizontalmente de forma libre y sin fricciones con la superficie de la cámara, si bien el volumen sobre el que se realiza el recuento era 10 veces inferior, lo que lleva a problemas de muestreo en el recuento como ha indicado la OMS (WHO, 1999).

El cubrecámara circular tiene en su centro una rejilla subdividida en 10 cuadros de 0,1 x 0,1 mm.

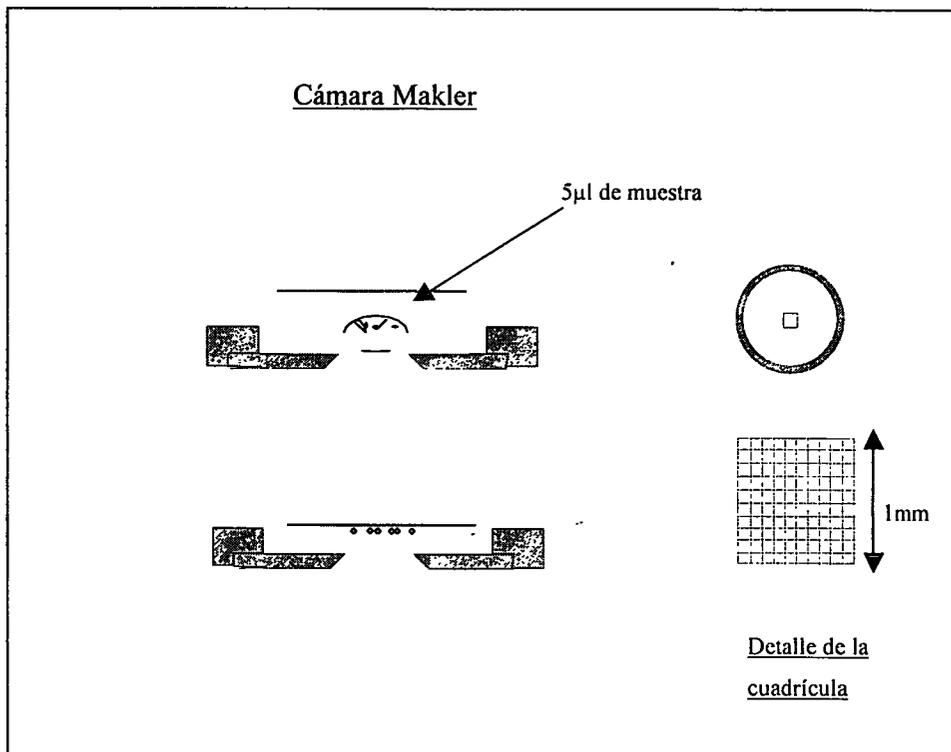


Figura 8. Cámara Makler

Con el mismo microscopio utilizado anteriormente, pero con el objetivo de 20x, se realizó el recuento. Se contó el número de espermatozoides en los 10 cuadrados de una fila o columna de la rejilla. Este número representó su concentración en millones

por mililitro. El recuento se repitió dos veces más para determinar el valor medio y reducir los errores. En el caso de muestras oligozoospermicas, se contó el número de espermatozoides en la totalidad del área de la rejilla. En esta ocasión, al valor obtenido se le añadieron 5 ceros y el resultado también se expresó en millones por mililitro

2.2.2. Análisis manual de la movilidad espermática

Se utilizó una cámara Makler, previamente precalentada a $37 \pm 0,1$ °C en una placa calefactora Plactronic (Plactronic 1000W, 6157100, P-Selecta. Barcelona, España), para evitar cambios de temperatura que pudieran afectar a la movilidad espermática. Se depositaron sobre la cámara 5 μ l de la suspensión espermática en fresco y se contó en el microscopio de contraste de fases (un total de 200 células), valorándose el porcentaje total de espermatozoides móviles y el porcentaje de espermatozoides con movilidad grado (a+b), grado c y grado d (Tabla 3).

Tabla 3. Tipos de movilidad espermática según los criterios de la OMS (1999)

Clasificación	Tipo de movilidad	Velocidad
Clase a	Excelente (velocidad alta con trayectoria rectilínea)	$\geq 25\mu\text{m/s}$ a 37°C * $\geq 20\mu\text{m/s}$ a 20°C
Clase b	Moderada (velocidad media con trayectoria poco o nada rectilínea)	$5 \geq X < 25 \mu\text{m/s}$
Clase c	No progresiva (movimiento del espermatozoide sin apenas desplazamiento)	$< 5\mu\text{m/s}$
Clase d	Ausencia de movilidad.	$0 \mu\text{m/s}$

*25 μm son aproximadamente la longitud de 5 cabezas o la mitad de la longitud del flagelo

2.2.3. Análisis manual de la morfología espermática

A partir de 5 μ l de cada muestra (56 donantes), se realizaron los frotis y se dejaron secar al aire durante 30 minutos, extremándose las precauciones durante su realización para no producir alteraciones físicas en los espermatozoides. Para ello, se utilizó un portaobjetos esmerilado y con los cantos pulidos, con una inclinación aproximada de 30° y aplicando una ligera presión durante el arrastre de la suspensión espermática. Tras una hora de secado, se tiñeron con el Kit Hemacolor (Merk, Darmstadt, Alemania, Cat. No.11661), que consta de un fijador (metanol al 50% con agua) y dos colorantes (Pérez-Sánchez *et al.*, 1994; Gago *et al.*, 1998). El protocolo de tinción es el siguiente: 5 inmersiones en el fijador, 7 inmersiones en el primer colorante y 6 en el segundo colorante (cada inmersión, tanto para el fijador como para los colorantes, fue inferior a un segundo). Los frotis se dejaron secar durante 30-60 minutos, se aclararon con xileno durante unos segundos y se montaron de forma permanente con Eukkit (O.Kindler GMBH&Co., Freiburg, Alemania). Se observaron en el microscopio óptico con el objetivo de inmersión 100x, contándose 200 células que se clasificaron en normales y anormales, distinguiendo entre estas últimas las seis clases que relacionan los defectos de cabeza, pieza intermedia y cola (según los criterios de la OMS, 1999).

2.3. ANÁLISIS COMPUTARIZADO

Los análisis computarizados, se realizaron utilizando el *software* del SCA® (*Sperm Class Analyzer V5.1*, Microptic, S.L., Barcelona, España). La generación de la imagen se realizó a través de una cámara de vídeo de blanco y negro Sony CCD AVC-D7CE (Sony Corporation, Tokio, Japón) con un ocular fotográfico interpuesto de 3.3x, conectado al microscopio Olympus BH-2, equipado con una platina a temperatura a 37°C y un ordenador PC (Pentium IV), visualizándose las imágenes en un monitor auxiliar en color de alta resolución Sony Trinitron PVM-1443MD. Sobre el foco de luz se colocó un filtro verde (IF 550, Olympus, Tokio, Japón) para aumentar el contraste en grises de la imagen. La digitalización se realizó mediante

una tarjeta Matrox MeteorII, de 512x512x8 bits (Matrox Electronic Systems Ltd., Québec, Canadá) y 256 niveles de gris. La resolución final de las imágenes fue de 0,083 $\mu\text{m}/\text{píxel}$ en los ejes horizontal y vertical (al trabajar con el objetivo de 100x) (Figura 9).

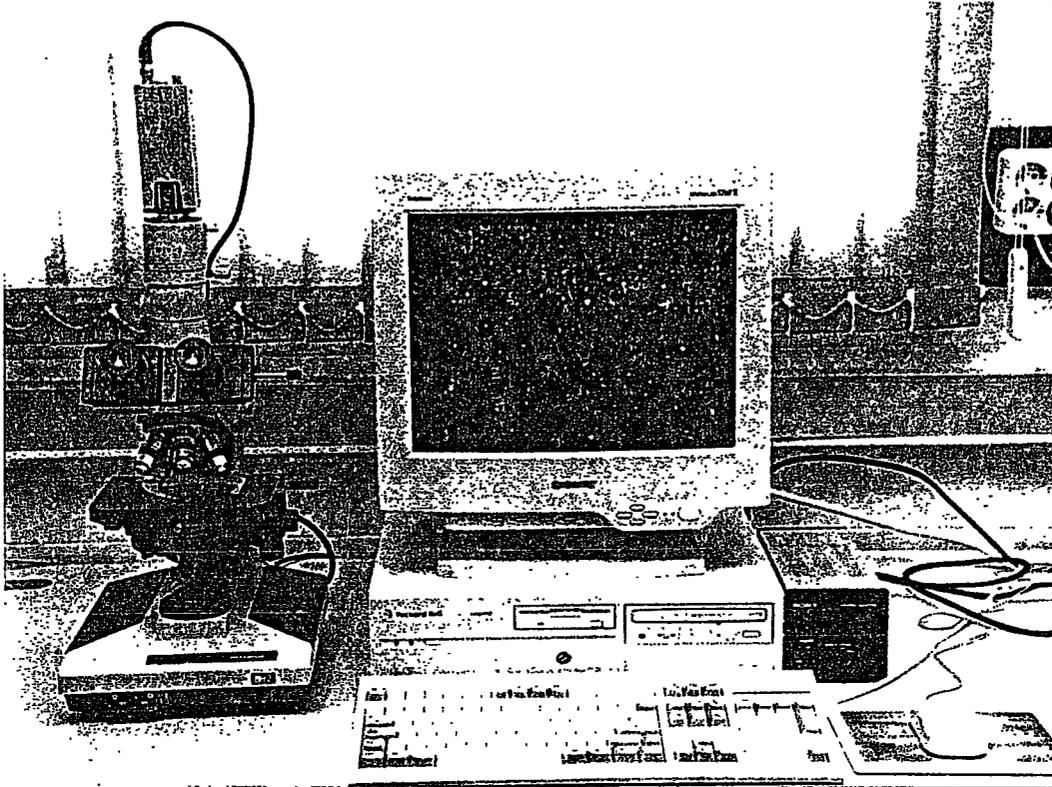


Figura 9. Fotografía del sistema utilizado

2.3.1. Análisis cinemático

2.3.1.1. Método seguido y procesado de las imágenes

Tras la licuefacción de las muestras, se depositaron 5 μl de la suspensión espermática en una cámara Makler, previamente precalentada (según se ha descrito anteriormente). La cámara se colocó sobre la platina del microscopio (37°C) para comenzar la captura de las imágenes.

Se estandarizó las condiciones de iluminación y la posición del condensador

para cada proceso de captura, con el fin de facilitar la posterior binarización manual de las imágenes.

Dado el elevado tiempo de análisis se procedió a la grabación de los campos necesarios para cada muestra los días de recogida, evitando la captura de aquellos que presentaron suciedad u otros problemas similares.

Tras realizar unas valoraciones previas en las condiciones de trabajo, se estableció el *set up* más adecuado (Tabla 4) a cada caso. Para el procesado de la muestra se seleccionó la opción “partículas” del programa para limpiar las pequeñas partículas que pudieran existir en la imagen. En segundo lugar se seleccionó la opción del sistema que analizaba los “multicruces”, es decir, todas las trayectorias cruzadas que existían y por último, la opción “conectividad” cuando las muestras se capturaron con el objetivo de 20x, tanto en positivo como en negativo. Con este proceso se pretendió evitar la rotura de las trayectorias.

La selección manual del nivel de gris correspondiente a los espermatozoides, se realizó sobre la primera imagen de cada secuencia. El mismo nivel se aplicó automáticamente al resto. Ello implica seleccionar un rango amplio con el fin de evitar pérdidas de trayectorias debidas a cambios de intensidad en las sucesivas imágenes de la secuencia. Una vez terminado el proceso de análisis, el *software* del sistema efectuó automáticamente la detección de cruces, los cálculos de la información de cada serie y la del conjunto de todas para el cálculo de las medias y del informe del caso analizado.

La trayectoria de cada espermatozoide fue detectada automáticamente por el *software* del sistema. A continuación, se visualizó el conjunto de trayectorias analizadas por cada campo, mediante la función de control. Cuando las trayectorias descritas por el ordenador parecían erróneas, se procedió a la visualización de la trayectoria individual de los espermatozoides implicados. Con esta opción, se visualizaron las trayectorias correspondientes a las velocidades lineal, curvilínea y media del espermatozoide seleccionado. De este modo, aquellos espermatozoides que no se trataron correctamente, fueron eliminados. (Figura 10).

Tabla 4. *Set up* del sistema utilizado

Parámetros	
Frames/segundo: imágenes capturadas por segundo.	25
Numero de Frames: imágenes grabadas.	16
Volumen del eyaculado (ml)	¿?
Dilución: relación entre volumen inicial y volumen de diluyente utilizado por 100.	¿?
Límite LVV ($\mu\text{m/s}$): velocidad máxima que presenta un espermatozoide lento.	5
Límite MVV ($\mu\text{m/s}$): velocidad máxima de un espermatozoide medio, por encima es considerado rápido	25
STR mínimo (%): valor utilizado para definir los espermatozoides que además de rápidos son considerados progresivos.	80
Frames mínimo (ALH): número mínimo de imágenes para que sea calculado el desplazamiento lateral de la cabeza.	7
Contraste de fases utilizado por el microscopio al grabar las imágenes.	Positivo (PH) Negativo (NH)
Aumentos	10x/20x

Por último, sobre las imágenes binarias, el programa realizó los cálculos y proporcionó los parámetros cinemáticos. Para los cálculos referentes a los parámetros cinemáticos, se filtró la base de datos obtenidos para eliminar trayectorias con menos de siete segmentos y se almacenaron en el ordenador para su posterior tratamiento estadístico.

Los parámetros del movimiento espermático calculados a partir de la trayectoria descrita por los espermatozoides fueron los siguientes (Figura 11).

- **VCL** Velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$): se obtiene a partir de la unión de los puntos donde se localiza el centroide de la cabeza del espermatozoide en cada *frame* durante el tiempo de adquisición de la imagen.
- **VSL** Velocidad rectilínea ($\mu\text{m/s}$): se obtiene a partir de la unión entre el primer y el último punto durante el tiempo de adquisición de la imagen.
- **VAP** Velocidad de la trayectoria media ($\mu\text{m/s}$): se obtiene por extrapolación a partir de los puntos que determinan la VCL.

- **LIN** Linealidad= $(VSL/VCL) \times 100$: indica la rectitud de la trayectoria curvilínea.
- **STR** Rectitud= $(VSL/VAP) \times 100$: indica la rectitud de la trayectoria media.
- **WOB** Oscilación= $(VAP/VCL) \times 100$: es una medida de la oscilación de la trayectoria curvilínea respecto de la trayectoria media.
- **ALH** Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm): indica la amplitud del desplazamiento de la cabeza del espermatozoide respecto de la trayectoria media (Davis y col., 1981)
- **BCF** Frecuencia de batido (Hz): indica el número de veces que la cabeza cruza la trayectoria media.



Figura 10. Aspecto de una pantalla con todas las trayectorias analizadas

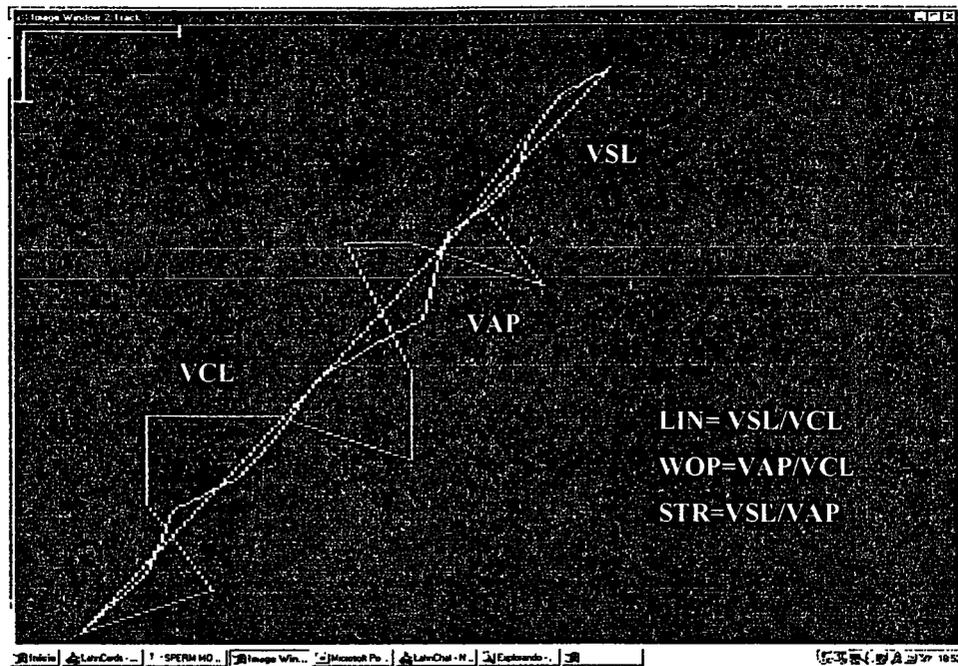


Figura 11. Se representan las trayectorias correspondientes a las tres velocidades calculadas, en azul oscuro la VCL, en verde la VSL y en azul claro la VAP

2.3.2. Análisis morfométrico

2.3.2.1. Método seguido y procesado de las imágenes

A partir de 5 μ l de cada muestra (56 donantes), se realizaron los frotis que se tiñeron con el Kit Hemacolor (según se ha descrito anteriormente), y se montaron permanentemente con Eukkit. A continuación, se observaron en el microscopio óptico y con el objetivo de inmersión 100x.

El análisis de las características morfométricas (cabeza y pieza intermedia) de los espermatozoides se realizó utilizando el *software* del módulo de morfometría del analizador de semen SCA[®].

En primer lugar se especificaron los parámetros de configuración que se deseaba utilizar en la sesión. Estos parámetros tienen unos valores por defecto, que se cargan en la primera ejecución de la aplicación, y que se guardan por el programa, de forma

que pulsando el botón “configuración”, por defecto estos valores vuelven cargarse automáticamente. Hay varias subventanas en las que podemos encontrar diferentes opciones de las que dispone la aplicación para cada parámetro y con las cuales se puede trabajar. Antes de comenzar la captura, seleccionamos la especie, los aumentos, la tinción utilizada, las opciones de análisis y el método de clasificación (Tabla 5).

Tabla 5. Configuración del sistema

Configuración	
Especie	Humano
Aumento	100x
Tinción	Hemacolor
Opciones de análisis	Acrosoma y pieza intermedia
Cuadro de captura:	
Tamaño X:	100
Tamaño Y:	100
Factor para análisis:	25
Espermatozoides/sesión:	200

Tras la localización del área del frotis donde la concentración de espermatozoides resultaba adecuada para su análisis (hay que evitar zonas con espermatozoides superpuestos o extremadamente sucias), y con el enfoque situado en el plano ecuatorial de la cabeza de los espermatozoides, se procedió a la adquisición de la imagen. Este proceso se repitió hasta capturar 200 células. La detección de la silueta de cada cabeza y pieza intermedia (PI) fue obtenida de forma automática por el *software* del sistema. En este punto, el programa presenta la silueta detectada, superpuesta sobre la imagen de gris original, permitiendo al observador la comprobación de la exactitud en la detección del perfil de la cabeza y pieza

intermedia; y en caso negativo, el reanálisis automático modificando el “factor análisis” y la eliminación de aquellas no correctamente tratadas (Figura 12).

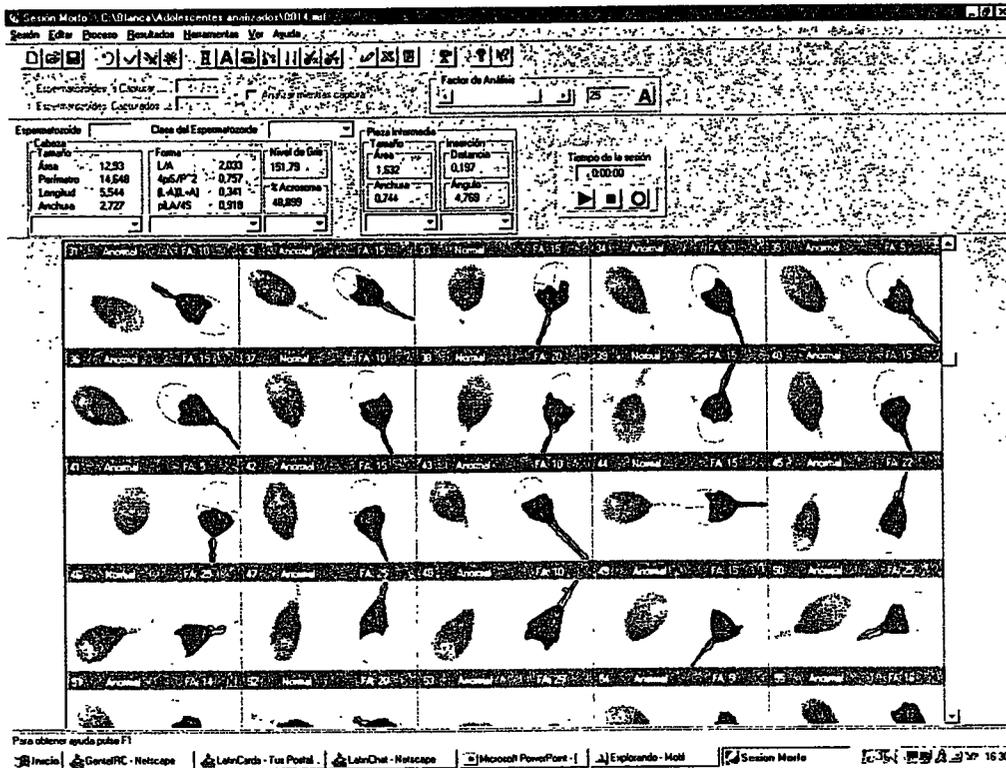


Figura 12. Imagen de la pantalla del módulo de morfología

A continuación, sobre las imágenes binarias, el programa realizó los cálculos y proporcionó cinco parámetros de tamaño de la cabeza: área (μm^2), perímetro (μm), longitud (μm), anchura (μm) y porcentaje de acrosoma; cuatro de forma de la cabeza: elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad; dos parámetros de tamaño de la pieza intermedia: anchura y área, y dos de inserción: la distancia y ángulo entre los ejes mayores de la cabeza-pieza intermedia (Figura 13). Los datos obtenidos se guardaron como ficheros Excel para su posterior análisis.

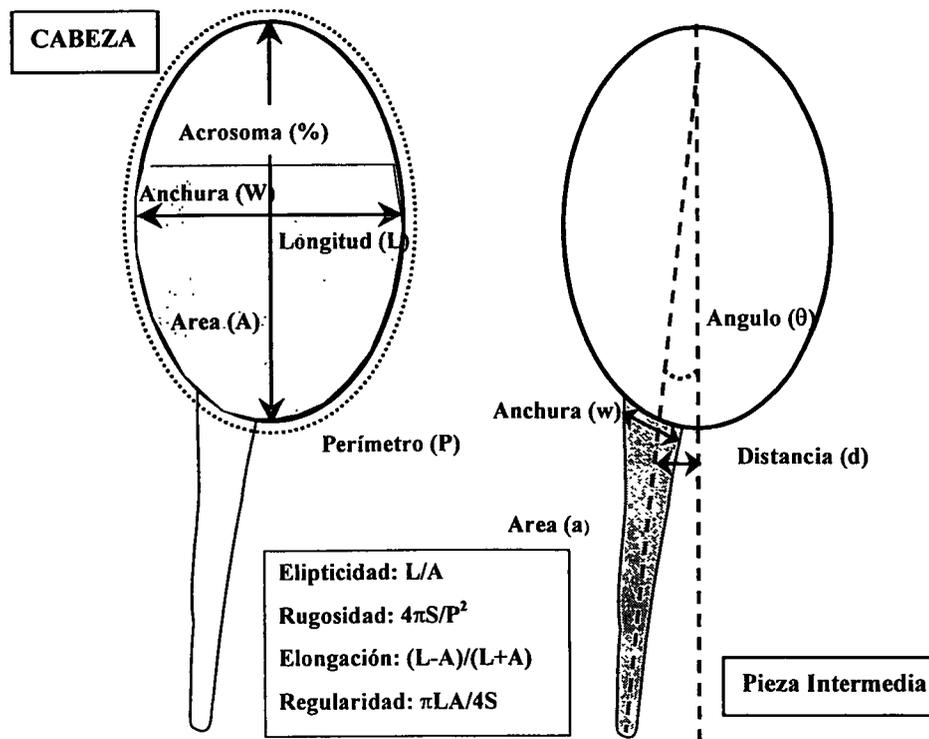


Figura 13. Esquema representativo de los parámetros calculados

2.4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.4.1. Definición de las condiciones de trabajo en el análisis cinemático

De las 56 muestras recogidas, 10 se utilizaron para definir las condiciones de trabajo del SCA[®], estableciéndose el *set up* más adecuado: contraste de fase, aumentos y dilución de las muestras. Tras la licuefacción, un alícuota de cada una de las 10 muestras se centrifugó en una centrífuga Heraeus (Biofuge Pico, Heraeus. Osterode, Alemania) con el fin de obtener plasma seminal con el que realizar las diluciones homólogas. Las muestras se diluyeron con su propio plasma seminal (50 %), para evitar modificaciones en sus características físico-químicas que pudiesen afectar a los parámetros de movilidad (Wetzels y col., 1993). Los análisis se realizaron con el *software* del módulo de movilidad del analizador SCA[®], a partir de

semen fresco y diluido, con contraste de fases positivo y negativo, y con los objetivos de 10x y 20x.

De las 10 muestras seleccionadas al azar, una de ellas se excluyó por problemas de visualización de una de las imágenes grabadas. La edad de los 9 voluntarios restantes estuvo comprendida entre 19-36 años ($23,89 \pm 5,06$).

Se analizó la posible influencia de las variables metodológicas consideradas en el porcentaje de trayectorias erróneas, así como respecto de los parámetros cinemáticos (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH y BCF) entre sí. Por otra parte, se valoró la correlación entre las determinaciones subjetivas y las objetivas de la concentración y del porcentaje de móviles progresivos (a+b) y totales (a+b+c).

2.4.2. Estudio cinemático global

De acuerdo con los resultados previos, se eligió como condición de trabajo: contraste de fases negativo, objetivo de 20x y muestra sin diluir. Se procedió al análisis cinemático con el SCA[®] de 56 las muestras seminales, según se ha descrito anteriormente.

Se realizó un estudio previo de correlación entre la concentración subjetiva determinada con las cámaras Neubauer y Makler.

Seguidamente, se analizó la correlación entre las determinaciones subjetivas y las objetivas de concentración (con la cámara Neubauer), y porcentaje de móviles progresivos y totales (con la cámara Makler)

A continuación, se hizo un estudio de correlación entre las diversas variables aportadas por el sistema SCA[®]. Tras lo cual, se analizó la correlación entre los parámetros cinemáticos, y las determinaciones objetivas de concentración y porcentaje de móviles progresivos y totales.

Finalmente, se procedió a la reducción de los parámetros cinemáticos a sus componentes principales, con el fin de tratar de establecer parámetros matemáticos de máxima capacidad de explicación de las muestras en estudio.

2.4.3. Estudio morfométrico global

Se procedió al análisis morfométrico con el SCA[®] de las 56 muestras, según se ha descrito anteriormente. En primer lugar, se analizó la correlación entre las determinaciones subjetivas y las objetivas (formas normales, defecto de cabeza, defecto de pieza intermedia, y defecto de cabeza + pieza intermedia)

Después, se estudió la correlación entre las diversas variables morfométricas aportadas por el sistema SCA[®]. A continuación, se hizo un análisis de correlación entre parámetros morfométricos, y determinaciones objetivas de concentración y porcentaje de móviles progresivos y totales.

Por último, se procedió a la reducción de los parámetros morfométricos a sus componentes principales.

2.4.4. Integración de las variables cinemáticas y morfométricas

Se analizó la correlación entre los parámetros cinemáticos y morfométricos aportados por el SCA[®], y se estudió su reducción a sus componentes principales.

2.4.5. Análisis por grupos de diagnóstico

Las 56 muestras se dividieron en cinco grupos según los criterios de la OMS (1999) en: normozoospermicos (N), teratozoospermicos (T), oligozoospermicos (O), teratoastenospermicos (TA) y teratoasteno oligozoospermicos (TAO). Diferenciamos diagnóstico 1, cuando consideramos teratozoospermicos los individuos con menos de un 15 % de espermatozoides con morfología normal (criterios de la OMS, 1999); y diagnóstico 2, cuando consideramos teratozoospermicos los individuos con menos de un 30 % de espermatozoides con morfología normal (criterios de la OMS, 1992). Los grupos quedaron del siguiente modo (Tabla 6).

Tabla 6. Grupos de estudio y número de individuos por grupo según diagnóstico

	N	T	O	TA	TAO
Diagnóstico 1	26	15	2	8	5
Diagnóstico 2	10	31	2	8	5

Diagnóstico 1 ($\leq 15\%$ formas normales, según la OMS, 1999)

Diagnóstico 2 ($\leq 30\%$ formas normales, según la OMS, 1992)

2.4.5.1. Análisis cinemático y morfométrico por grupos de diagnóstico

Para los dos diagnósticos se procedió según lo descrito anteriormente. Primero, se valoró las diferencias de los parámetros cinemáticos y morfométricos entre los distintos grupos de diagnóstico. Lo mismo, se hizo con las componentes principales de cinética y morfología, para finalizar con el análisis integrado en componentes principales globales.

2.4.6. Análisis estadístico

Previamente a la realización de los cálculos estadísticos se comprobó la normalidad de las funciones de distribución para cada uno de los conjuntos de datos, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene.

Para comparar entre grupos y cuando las variables siguieron una distribución normal, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) ($p < 0,05$) seguido por el test HSD de Tukey para comparaciones múltiples. Cuando las variables no siguieron una distribución normal, se realizó el test no paramétrico H de Kruskal-Wallis.

Para ver el grado de correlación entre variables, se utilizó la correlación bivariada de Pearson. Dado que, en algunas ocasiones, el número de correlaciones analizadas era alto, se realizó el test de ajuste de Bonferroni, que consistió en dividir el valor de significación por el número de correlaciones. En nuestro caso, cuando

comparamos los parámetros cinemáticos entre sí fue: $0,05/28=0,0018$; los parámetros cinemáticos con la concentración y el porcentaje de móviles: $0,05/24=0,002$; los parámetros morfométricos entre sí: $0,05/78=0,0006$; los parámetros morfométricos con la concentración y el porcentaje de móviles: $0,05/39: 0,0013$; y por último los parámetros cinemáticos con los morfométricos: $0,05/104 =0,0005$. Estos valores se consideraron como los límites para el establecimiento del nivel de significación en las correlaciones; de este modo, confirmamos que las diferencias estadísticas entre los parámetros no eran al azar.

Por último, se calcularon y analizaron las componentes principales, con el fin de reducir el número de variables y definir factores o componentes que explicaran la mayor parte de la varianza total. Se evaluó la matriz de componentes, calculada a partir de las variables cinemáticas y morfométricas y, después de la extracción inicial de dichas componentes, los factores ortogonales fueron rotados utilizando el criterio Varimax. La interpretación de los resultados se basó en el análisis de los factores dominantes y en el porcentaje total de la varianza explicativa. Además, se realizó un análisis de la varianza para estudiar las diferencias de las componentes principales entre los diferentes grupos de diagnóstico.

Todos los cálculos estadísticos se realizaron con la versión 11,0 del programa SPSS para Windows (SPSS® Inc. 1989-2001).

RESULTADOS

3.1. DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES DE TRABAJO PARA EL ANÁLISIS CINEMÁTICO

3.1.1. Características de la población según el análisis subjetivo

Se utilizaron 9 muestras seminales para definir las condiciones del análisis cinemático. El análisis subjetivo de esta población se define en la Tabla 7.

Tabla 7. Valoración subjetiva de la concentración y la movilidad de la muestra utilizada (n=9).

Caso	Concentración (10 ⁶ /ml)	% Móviles (a+b)	% Móviles (a+b+c)
1	68	67	72
2	81	70	74
3	150	75	78
4	168	65	70
5	65	52	58
6	85	67	69
7	74	60	67
8	88	72	77
9	120	63	66
Media±DE	99,89±37,38	65,67±6,86	70,11±6,15
CV	37,42	10,45	8,77

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

3.1.2. Estudio de las diferencias entre las condiciones de análisis

En primer lugar, se trató de determinar las condiciones más adecuadas de adquisición de imágenes. Para ello, las capturas se realizaron a partir de semen fresco

diluido y sin diluir, con contraste de fase positivo y negativo y con los objetivos de 10x y 20x.

Inicialmente se procedió a la comparación de los resultados aportados por el SCA[®] para concentración, porcentaje de móviles (a+b) y (a+b+c) y porcentaje de trayectorias erróneas en las diferentes condiciones de trabajo (Tabla 8).

Se observó diferencias significativas en la concentración y el en porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva (a+b) entre contraste de fase positivo y negativo, en muestras sin diluir, con el objetivo de 10x; la concentración, el porcentaje de móviles progresivos y móviles totales también mostraron diferencias entre contrastes a 10x en muestras diluidas (Tabla 8).

El porcentaje de móviles totales (a+b+c) fue diferente entre contrastes de fase a 20x en muestras tanto diluidas como sin diluir (Tabla 8); y el porcentaje de móviles progresivos (a+b) mostró diferencias entre contrastes de fase cuando las muestras se analizaron diluidas a 20x (Tabla 8).

Solamente se observó diferencias significativas entre muestras diluidas y sin diluir cuando comparamos el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y totales, en contraste de fases negativo y a 20x (Tabla 8).

A continuación, se observó la trayectoria individual de los espermatozoides de cada serie. Cuando las trayectorias descritas por el ordenador fueron erróneas, se eliminó aquellos espermatozoides que no se trataron correctamente, calculándose el porcentaje de trayectorias erróneas en cada una de las 8 condiciones de análisis.

Se encontraron diferencias en el porcentaje de trayectorias erróneas entre contrastes, en muestras sin diluir con los objetivos de 10x y 20x, observándose más trayectorias erróneas en positivo que en negativo; y entre aumentos, en muestras sin diluir y en negativo, siendo en estas condiciones mayor el número de trayectorias erróneas a 10x (Tabla 8).

Tabla 8. Valoración objetiva de la concentración y porcentajes de movilidad y de trayectorias erróneas para las diferentes condiciones de análisis

		10x		20x	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Concentración	Sin diluir	55,22±25,07 ^{A,m}	130,39±63,14	115,97±69,95	163,03±55,04
	Diluido	70,60±37,18 ^{a,m}	123,71±47,14	123,79±54,07	156,92±53,52
Móviles (a+b)	Sin diluir	67,60±15,77 ^a	75,06±9,71	75,52±15,72	69,48±12,70 ^y
	Diluido	77,58±17,64 ^a	68,79±9,19	70,03±14,00 ^A	56,16±12,06
Móviles (a+b+c)	Sin diluir	82,54±15,28	76,85±8,87	88,92±7,30 ^A	73,97±11,65 ^y
	Diluido	88,11±12,18 ^A	70,16±9,83	81,39±10,14 ^A	60,65±12,73
Trayectorias erróneas	Sin diluir	12,01±9,75 ^a	4,29±3,30 ^m	11,48±12,76 ^a	0,98±0,82
	Diluido	14,28±13,87	8,07±8,8	9,11±9,98	2,95±4,85

Los valores se indican como la media±desviación estándar. La concentración se expresa en millones de espermatozoides/ml, la movilidad y las trayectorias erróneas en porcentajes.

^{a,m,y} diferencias significativas (P<0,05) en el contraste, aumento y dilución utilizados, respectivamente. Las diferencias se representan con letras mayúsculas cuando P<0,01 (Kruskal-Wallis).

En cuanto a los parámetros cinemáticos se procedió de forma equivalente. Todos los parámetros mostraron diferencias significativas entre diferentes contrastes de fase cuando las muestras se analizaron sin diluir y a 10x (Tabla 9).

La VCL, LIN, WOP y ALH fueron diferentes cuando el análisis se realizó con los objetivos de 10x y 20x, sin diluir y en positivo. También, las tres velocidades (VSL, VCL y VAP) y ALH mostraron diferencias entre aumentos cuando el análisis se realizó sobre muestras sin diluir pero con contraste de fase negativo (Tabla 9).

Resultados

Tabla 9. Parámetros cinemáticos para las distintas condiciones de análisis.

		10x		20x	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
VCL	Sin diluir	60,08±6,87 ^{a,m}	66,87±4,24 ^M	50,70 ±9,86	53,96±4,40
	Diluido	64,85±11,39	64,09±13,99	58,17±10,70	57,07±6,88
VSL	Sin diluir	12,35±7,95 ^A	36,27±4,74 ^m	20,26±13,88	29,91±4,55
	Diluido	24,16±16,01	34,95± 9,24	26,18±14,21	31,52±6,17
VAP	Sin diluir	27,10±8,98 ^A	44,02±4,43 ^M	30,73±11,93	37,43±3,35
	Diluido	35,65±13,26	41,18±9,42	35,32±12,16	39,22±5,49
LIN	Sin diluir	20,22±10,82 ^{A,m}	54,16±7,22	36,34±19,84 ^a	52,09±7,32
	Diluido	35,19±20,17 ^a	54,39±6,19	42,78±20,07	53,14±8,30
STR	Sin diluir	46,57±11,37 ^A	78,45±4,90	60,99±17,70 ^a	75,35±4,67
	Diluido	62,48±19,63 ^a	79,91±4,08	65,38±18,60	76,29±5,77
WOB	Sin diluir	41,04±8,47 ^{A,m}	66,43±5,57	53,81±14,58 ^a	65,30±5,55
	Diluido	50,85±14,89 ^A	66,17±4,53	59,36±13,87	66,45±5,89
ALH	Sin diluir	3,02±0,38 ^{a,M}	2,58±0,25 ^M	2,30±0,46	2,02±0,21
	Diluido	2,89±0,39 ^m	2,48±0,53	2,39±0,57	2,20±0,46
BCF	Sin diluir	18,48±3,91 ^a	13,75±0,86	16,02±3,19	14,09±0,64
	Diluido	16,47±3,30	17,09±12,05	14,83±1,95	13,33±0,92

Los valores indican el valor medio obtenido a partir de la media de cada individuo (n=9).

VCL, VSL, VAP y ALH se indican en $\mu\text{m/s}$, LIN, STR y WOB en porcentajes, y BCF en hercios.

^{a,m} Indican diferencias significativas ($p<0,05$) en el contraste y aumento utilizados, respectivamente. Las diferencias se representan con letras mayúsculas cuando $p<0,01$ (Kruskal-Wallis).

Los parámetros relacionados con el tipo de desplazamiento lineal de los espermatozoides (LIN, STR y WOP) fueron diferentes entre contraste de fase positivo y negativo cuando los análisis se efectuaron con el objetivo de 10x, tras

diluir las muestras. Los mismos parámetros mostraron diferencias entre contrastes de fase al analizar las muestras sin diluir y a 20x (Tabla 9).

La ALH fue diferente entre aumentos al analizar muestras diluidas en positivo (Tabla 9).

Valorando todos estos resultados optamos por seleccionar la condición: sin diluir, con contraste de fase negativo y a 20x, ya que mostró menos diferencias frente a las otras condiciones a nivel de velocidades, concentración y porcentaje de móviles. Además el número de trayectorias erróneas era notablemente inferior.

3.1.3. Análisis de correlación entre determinaciones objetivas y subjetivas

Se analizó la correlación entre las determinaciones objetivas (SCA[®]) y las subjetivas, observándose la presencia de correlación positiva entre la movilidad progresiva (a+b) objetiva y subjetiva, tanto diluida ($r = 0,789$, $p < 0,05$) como sin diluir ($r = 0,883$, $p < 0,01$) (Figura 14); y entre la movilidad total (a+b+c) objetiva y subjetiva, diluida ($r = 0,734$, $p < 0,05$) y sin diluir ($r = 0,794$, $p < 0,05$), siempre con contraste de fase negativo y a 20x (Figura 15).

También mostró correlación positiva la concentración de espermatozoides objetiva y subjetiva, al realizar el análisis en positivo, a 20x y con la muestra diluida ($r = 0,720$; $p < 0,05$).

Cuando tratamos de ver el efecto de la concentración y movilidad subjetiva y objetiva sobre las trayectorias erróneas, se observó correlación positiva del porcentaje de trayectorias erróneas con la concentración subjetiva, en positivo, a 10x y sin diluir ($r = 0,668$; $p < 0,05$). No encontramos correlación en ninguna de las otras condiciones de análisis entre las trayectorias erróneas y la concentración y movilidad objetiva y subjetiva.

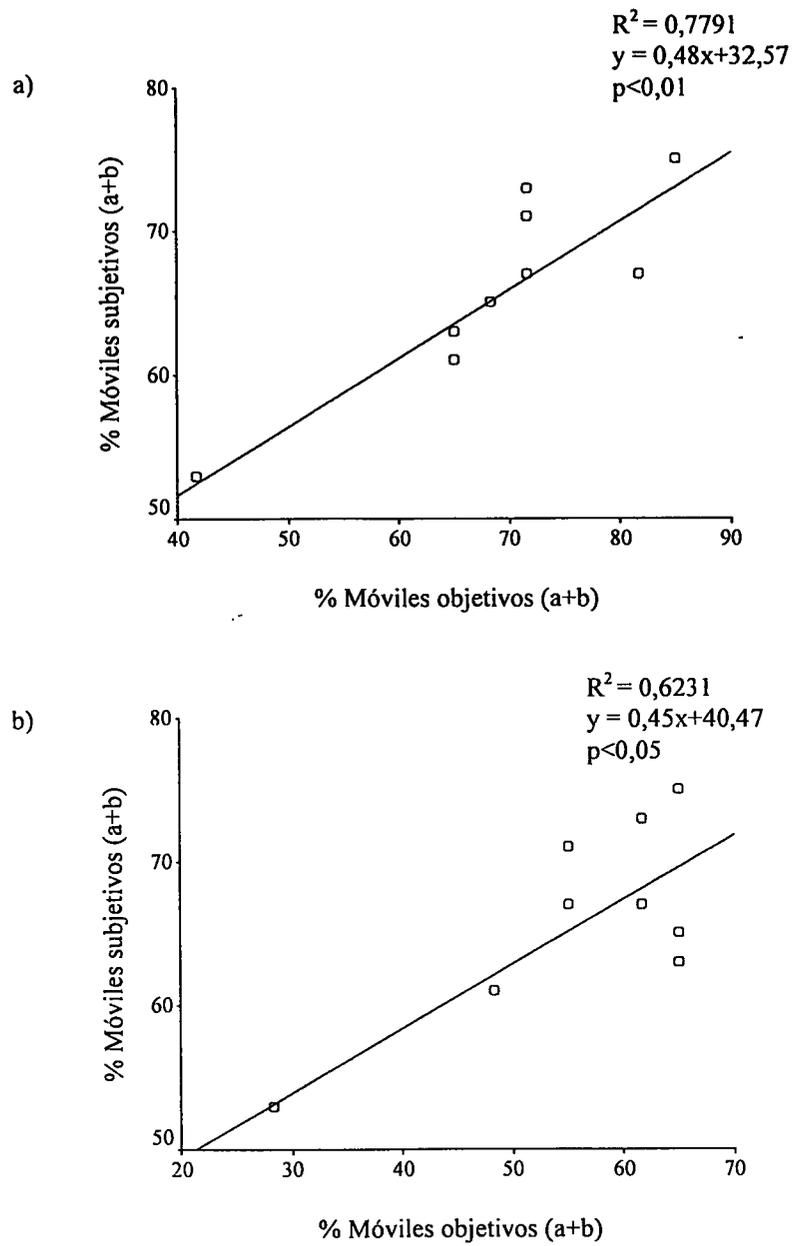


Figura 14. Correlación entre porcentaje de espermatozoides con movilidad (a+b) subjetiva y objetiva. a) Negativo, 20x y sin diluir. b) Negativo, 20x y diluido.

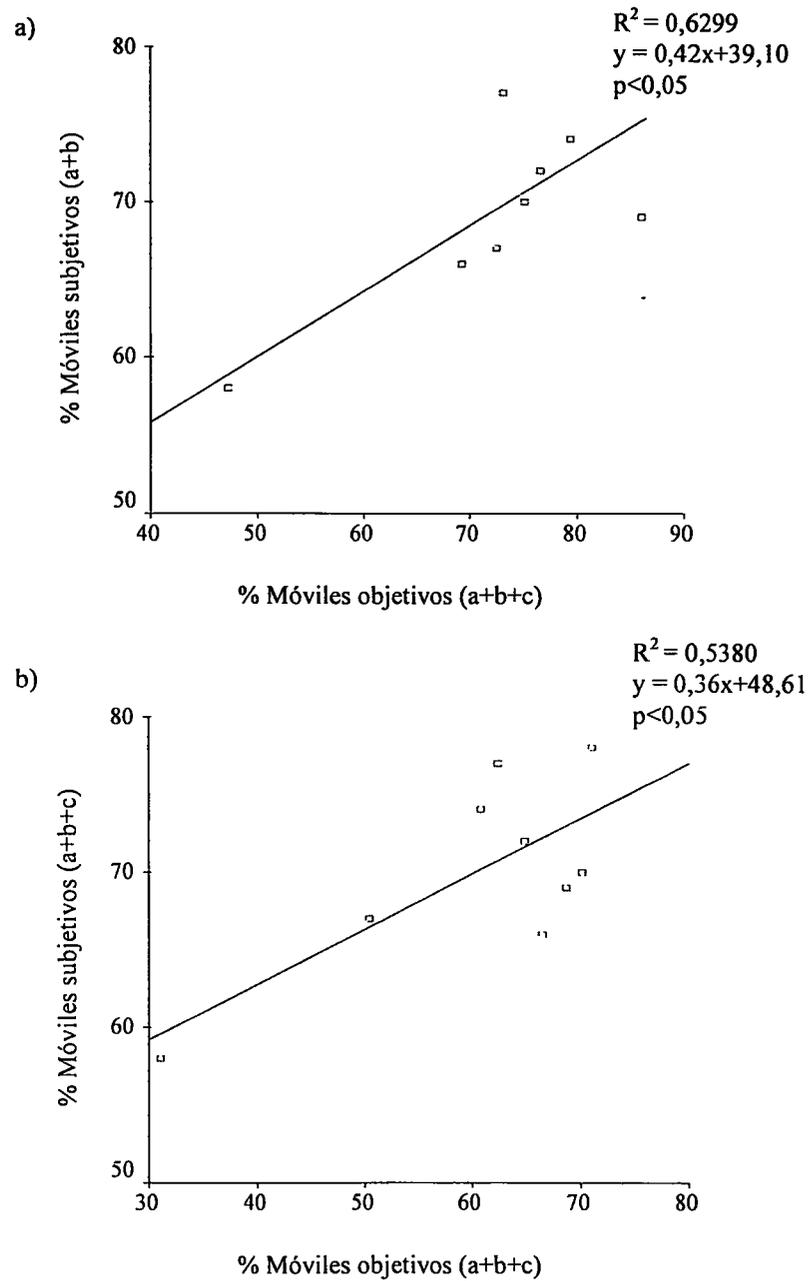


Figura 15. Correlación entre porcentaje de espermatozoides con movilidad (a+b+c) subjetiva y objetiva. a) Negativo, 20x y sin diluir. b) Negativo, 20x y diluido.

3.2. ESTUDIO CINEMÁTICO GLOBAL

Previamente, se analizó la correlación entre la concentración espermática determinada de forma subjetiva mediante la cámara de Neubauer y la cámara Makler, observándose una correlación positiva entre ambas ($r = 0,959$) (Figura 16)

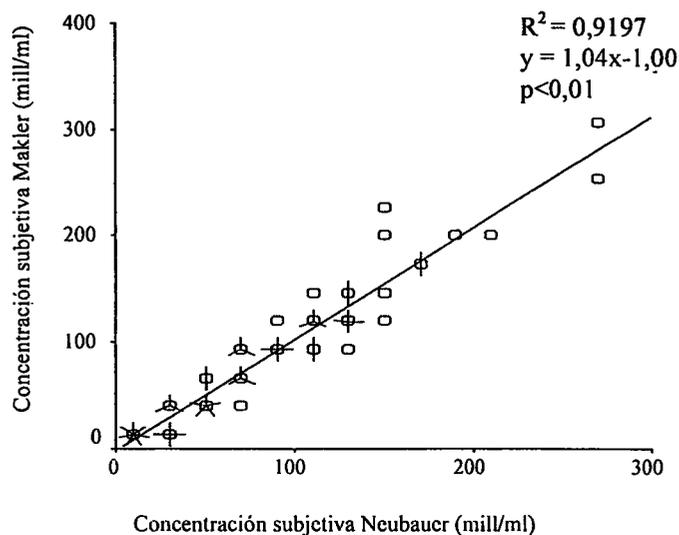


Figura 16. Correlación de la concentración de espermatozoides/ml entre la cámara de Neubauer y la cámara Makler. El número de segmentos en cada punto indica cuantos valores coincidieron.

3.2.1. Estadística descriptiva

En primer lugar, se calculó la estadística descriptiva de las valoraciones de concentración, movilidad subjetiva y objetiva (Tabla 10), así como de los parámetros cinéticos (Tabla 11).

No se observaron diferencias significativas al comparar la concentración determinada con la cámara Neubauer, Makler y SCA[®]. Tampoco se observaron diferencias al comparar la movilidad subjetiva y objetiva.

Tabla 10. Valoración subjetiva y objetiva de la concentración y movilidad calculada a partir del análisis de 56 casos

	Concentración (10 ⁶ /ml)		Movilidad progresiva (%)		Movilidad total (%)		
	Subjetiva Neubauer	Subjetiva Makler	Objetiva	Subjetiva	Objetiva	Subjetiva	Objetiva
Media	87,75	90,63	94,85	60,23	58,37	65,59	62,48
Desviación Estándar	62,52	68,07	47,55	18,51	13,32	17,27	12,43
Coefficiente Variación	71,25	75,11	50,13	30,73	22,82	26,33	19,89
Máximo	272	318	226,64	80,00	88,37	82,00	90,70
Mínimo	4,00	5,00	21,78	21,00	18,48	26,00	25,54
Curtosis	0,76	1,36	1,00	0,47	-0,71	1,73	-0,69
Asimetría	0,93	1,10	1,10	-0,91	-0,41	-1,34	-0,42

Resultados

Tabla 11. Parámetros cinéticos

	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
Media	56,70	30,73	38,08	52,19	75,00	65,21	2,24	13,49
Desviación Estándar	25,43	19,07	18,44	24,11	23,35	16,37	1,20	4,71
Coficiente Variación	45,08	62,60	48,72	46,55	31,30	25,17	53,73	34,80
Máximo	82,92	48,77	57,71	73,13	84,10	77,07	3,37	15,18
Mínimo	38,34	18,81	26,28	38,96	62,93	49,24	1,55	11,53
Curtosis	0,10	0,67	0,82	0,44	-0,10	0,71	0,36	-0,23
Asimetría	0,54	0,43	0,52	0,55	-0,35	-0,08	0,89	-0,22

Los valores de VCL, VSL, VAP y ALH se indican en $\mu\text{m/s}$, LIN, STR y WOB en porcentajes, y BCF en herzios.

3.2.2. Análisis de correlación entre determinaciones objetivas y subjetivas

Se calculó la correlación entre las determinaciones objetivas (SCA[®]) y las subjetivas (manual) de las 56 muestras. Se observó correlación positiva altamente significativa entre las determinaciones subjetivas y las objetivas en el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva ($r=0,725$; $p=6,99 \times 10^{-11}$) (Figura 17), el porcentaje de móviles totales ($r=0,656$; $p=3,64 \times 10^{-8}$) (Figura 18), así como las concentraciones subjetivas determinadas con la cámara Neubauer y las objetivas ($r=0,493$; $p=1,13 \times 10^{-4}$) (Figura 19). Se obtuvo una mayor concentración de células espermáticas con el SCA[®] que mediante el método manual, probablemente debido a que en las muestras muy sucias el SCA[®] contabilizó como espermatozoides algunas partículas del plasma seminal, cuyo tamaño entraba dentro del rango correspondiente a los mismos.

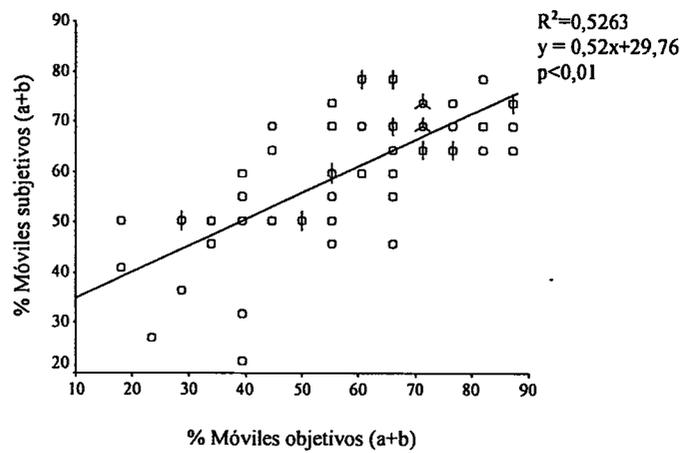


Figura 17. Correlación entre la movilidad (a+b) subjetiva y objetiva. El número de segmentos en cada punto indica cuantos valores coincidieron.

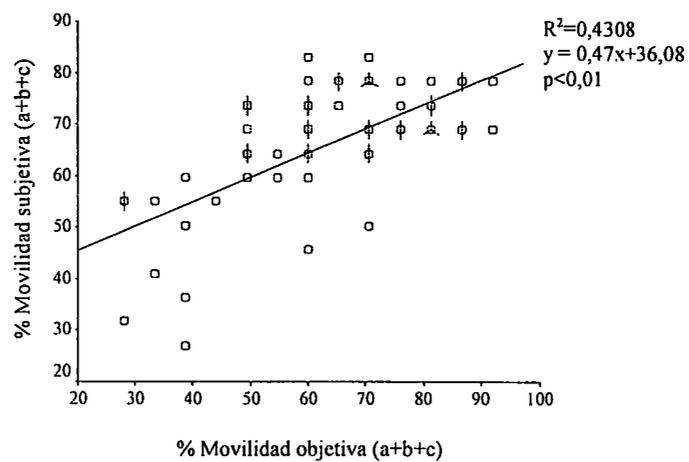


Figura 18. Correlación entre la movilidad (a+b+c) subjetiva y objetiva. El número de segmentos en cada punto indica cuantos valores coincidieron.

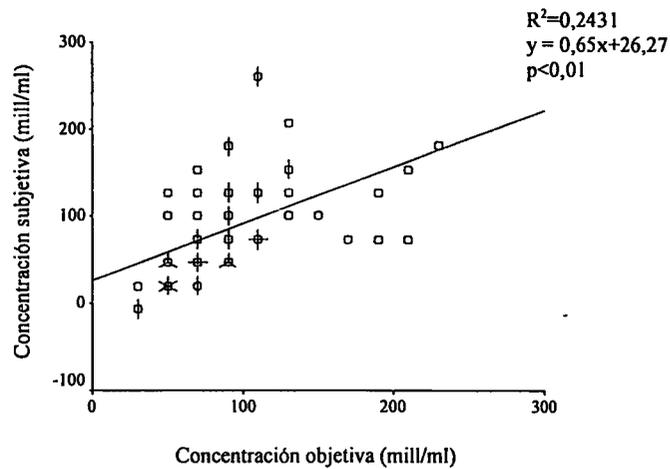


Figura 19. Correlación entre la concentración subjetiva determinada de forma subjetiva con la cámara Neubauer y la objetiva. El número de segmentos en cada punto indica cuantos valores coincidieron.

3.2.3. Análisis de correlación entre los parámetros cinemáticos.

Se estudió la correlación entre los diversos parámetros cinemáticos mediante la correlación bivariada de Pearson. Dado que, el número de correlaciones analizadas era muy elevado, se realizó el test de ajuste de Bonferroni.

Al aplicar el ajuste de corrección de Bonferroni, la única variable que no mostró correlación con las demás fue BCF, mientras que VSL se correlacionó de forma positiva con todas salvo con ALH y BCF. La LIN, STR y WOB estaban inversamente correlacionadas con ALH, lo que confirmó un menor “cabeceo” de los espermatozoides cuanto más rectilíneo es su desplazamiento (Tabla 12).

Tabla 12. Correlación entre los parámetros cinemáticos.

Parámetros	VCL	VSL	VAP	WOP	LIN	STR	ALH
VSL	0,66 ^{***a}						
VAP	0,83 ^{***a}	0,95 ^{***a}					
WOP	-0,12	0,46 ^{**a}	0,26				
LIN	-0,20	0,55 ^{**a}	0,33 [*]	0,65 ^{**a}			
STR	-0,07	0,50 ^{**a}	0,25	0,84 ^{**a}	0,67 ^{**a}		
ALH	0,78 ^{***a}	0,18	0,44 ^{**a}	-0,56 ^{***a}	-0,54 ^{***a}	-0,52 ^{***a}	
BCF	0,22	0,34 [*]	0,29 [*]	-0,14	0,25	0,08	0,07

Los valores indican el Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP).

*P<0,05; **P<0,01; ^a tras Corrección de Bonferroni <0,0018.

3.2.4. Correlación entre los parámetros cinemáticos, la concentración y el porcentaje de móviles calculados con el SCA[®]

Se realizó un estudio de correlación bivariada de los parámetros cinemáticos con la concentración y el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva (a+b) y total (a+b+c). Como el número de correlaciones era alto, se realizó el test de ajuste de Bonferroni (Tabla 13).

Se observó una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y totales y VCL, VSL, VAP y ALH; y correlación negativa de la concentración con STR, aunque esta correlación dejó de ser significativa tras el ajuste de Bonferroni (Tabla 13).

Tabla 13. Correlación de los parámetros cinemáticos con la concentración y el porcentaje de móviles por valoración objetiva.

Parámetros	VCL	VSL	VAP	WOP	LIN	STR	ALHMED	BCF
Concentración (10 ⁶ /ml)	0,13	0,08	0,17	-0,21	-0,01	-0,29*	0,16	0,21
% Movilidad (a+b)	0,50**a	0,42**a	0,55**a	-0,08	0,02	-0,21	0,41**a	0,16
% Movilidad (a+b+c)	0,49**a	0,41**a	0,54**a	0,11	0,01	-0,21	0,41**a	0,20

Los valores indican el Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP).

*P<0,05; ** P<0,01; ^a tras Corrección de Bonferroni <0,002.

3.2.5. Reducción de las variables cinemáticas a sus componentes principales

El estudio cinemático se completó mediante la reducción de las variables a sus componentes principales, tratando de este modo de hallar componentes o factores que sucesivamente explicaran la mayor parte de la varianza total.

Los parámetros se agruparon en tres componentes principales con una varianza total explicativa del 91,93 %. La primera representaba el 42,52 % del total de la varianza, recayendo el peso mayor sobre WOB, STR y LIN, por tanto haciendo referencia a las características del movimiento de los espermatozoides (Índices); la segunda representaba el 36,74 % de la varianza, recayendo el peso sobre las variables de velocidad: VCL, VSL y VAP (Velocidades); y la tercera con menor peso era la que implicaba a la frecuencia de batida del flagelo (Frecuencia), y representaba el 12,67 % de la varianza (Tabla 14).

Tabla 14. Matriz de las componentes principales (CP) para los parámetros cinemáticos.

Parámetros	Índices	Velocidades	Frecuencia
VSL	0,51	0,82	
VCL		0,96	
VAP		0,94	
WOP	0,93		
LIN	0,85		0,33
STR	0,91		
ALH	-0,68	0,68	
BCF			0,96
% de la varianza	42,52	36,74	12,67

Sólo se han incluido valores de correlación mayores de 0,30.

3.3. ESTUDIO MORFOMÉTRICO GLOBAL

3.3.1. Estadística descriptiva

En primer lugar, se calculó la estadística descriptiva referida a los parámetros morfológicos (Tabla 15) y morfométricos (Tabla 16) subjetivos y objetivos.

A continuación, se compararon los parámetros morfológicos subjetivos con los objetivos, encontrándose diferencias significativas ($P < 0.01$) únicamente en los defectos de la pieza intermedia (Tabla 15).

Tabla 15. Parámetros morfológicos subjetivos y objetivos

	% normales		% defecto cabeza		% defecto pieza intermedia		% defecto cabeza + pieza intermedia	
	subjetivo	objetivo	subjetivo	objetivo	subjetivo	objetivo	subjetivo	objetivo
Media	18,42	15,58	37,51	38,50	7,36 *	12,15 *	36,37	35,66
Desviación Estándar	12,38	10,09	12,38	11,19	4,69	7,73	15,20	14,45
Coefficiente Variación	67,21	64,76	27,67	36,86	63,72	63,62	41,79	40,52
Máximo	48,50	41,50	60,00	99,30	20,00	33,90	77,00	83,00
Mínimo	2,00	0,70	19,00	12,80	0,50	2,00	8,50	10,30
Curtosis	-0,61	-0,10	-0,91	5,14	-0,13	0,19	0,65	0,83
Asimetría	0,63	0,76	0,20	1,39	0,56	0,83	0,82	0,68

*p<0,01

Tabla 16. Parámetros morfométricos

	CABEZA										PIEZA INTERMEDIA			
	L	A	S	P	Acr	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad	W	Y	A (c-f)	D (c-f)	
Media	4,94	3,16	12,55	13,83	41,41	1,59	0,82	0,22	0,97	1,28	1,94	12,23	0,24	
Desviación Estándar	0,54	0,32	1,81	1,14	10,55	0,23	0,05	0,07	0,04	0,59	0,96	16,29	0,28	
Coefficiente Variación	10,87	10,21	14,47	8,28	26,06	14,40	5,61	30,90	4,04	44,19	49,30	130,39	111,40	
Máximo	5,61	3,59	14,97	15,28	51,59	2,03	0,88	0,33	1,00	1,70	2,85	20,94	0,41	
Mínimo	4,10	2,63	9,52	11,88	28,46	1,31	0,73	0,13	0,94	0,97	1,24	7,66	0,16	
Curtosis	0,42	-0,44	0,60	0,62	-0,56	0,37	0,71	-0,002	1,37	-0,06	0,01	0,58	1,64	
Asimetría	-0,26	-0,27	-0,36	-0,58	-0,12	0,92	-0,97	0,62	-0,32	0,48	0,55	0,90	1,32	

Los valores representan la longitud (L), anchura (A), área (S), perímetro (P) y acrosoma (Acr) de la cabeza; elipticidad: L/A , rugosidad: $4\pi S/P^2$, elongación $(L-A)/(L+A)$, regularidad: $\pi LA/4S$; anchura (W) y área (Y) de pieza intermedia; D (c-f): distancia entre los ejes mayores de la cabeza y pieza intermedia (μm); A (c-f): ángulo entre los ejes mayores de la cabeza y PI (grados).

Los valores se indican en micras: la longitud, anchura y perímetro, en micras cuadradas el área, y en porcentajes el acrosoma, mientras que los factores de forma son adimensionales.

3.3.2. Análisis de correlación entre determinaciones objetivas y subjetivas

Se calculó la correlación entre las determinaciones objetivas y las subjetivas de las 56 muestras seminales.

Se observó correlación positiva entre las determinaciones objetivas y subjetivas, principalmente en cuanto al porcentaje de formas normales ($r=0,849$; $p=1,92 \times 10^{-17}$) (Figura 20). También, existía correlación entre los que presentaban defectos en la cabeza y pieza intermedia ($r=0,775$; $p=3,29 \times 10^{-14}$); defectos en la cabeza ($r=0,517$; $p=4,46 \times 10^{-5}$) y defectos en la pieza intermedia ($r=0,438$; $p=7,30 \times 10^{-4}$).

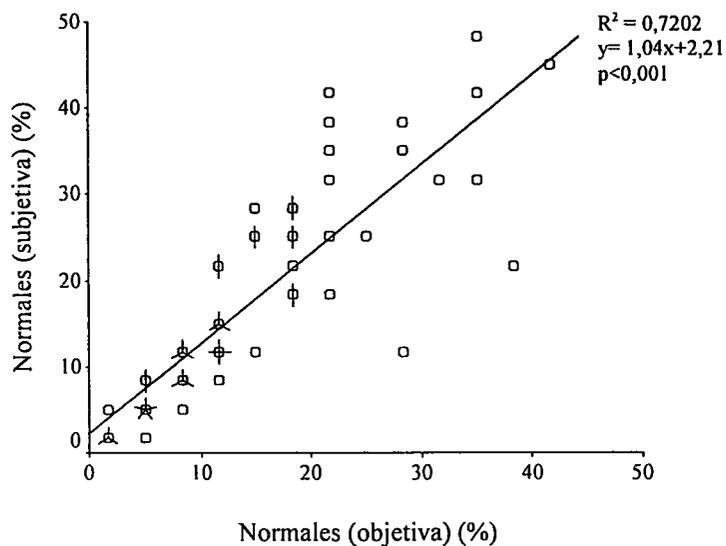


Figura 20. Correlación entre porcentaje de formas normales determinadas de forma subjetiva y objetiva. El número de segmentos en cada punto indica cuantos valores coincidieron.

3.3.3 Análisis de correlación entre los parámetros morfométricos.

Se estudió la correlación entre los parámetros morfométricos mediante la correlación bivariada de Pearson. Como el número de correlaciones analizadas era muy elevado, se aplicó la corrección del ajuste de Bonferroni (Tabla 17).

Se observó correlación positiva tras la corrección de Bonferroni entre área (S), y longitud (L) y anchura de la cabeza (A); entre perímetro (P) y longitud (L) y área de la cabeza (S); entre porcentaje de acrosoma (Acr), y longitud (L), anchura (A), área (S) y perímetro de la cabeza (P); entre área (Y) y anchura (W) de la pieza intermedia; entre ángulo (c-f) y anchura (W) de la pieza intermedia; y entre distancia (c-f), y anchura (W) y área (S) de pieza intermedia y ángulo (c-f). Finalmente, y como un resultado anecdótico, la correlación observada fue negativa entre ángulo (c-f) y rugosidad (Tabla 17).

También, se observó correlación positiva (previamente a la corrección de Bonferroni) entre elipticidad y longitud de la cabeza (L); entre rugosidad, y anchura (A) y perímetro (P) de la cabeza; entre elongación, y longitud de la cabeza (L) y elipticidad; y por último entre regularidad y anchura de la cabeza (A). Por su parte, la correlación fue negativa entre elongación y anchura de la cabeza (A); rugosidad y longitud de la cabeza (L) y elipticidad; y finalmente entre elongación, y anchura de la cabeza (A) y rugosidad (Tabla 17).

Tabla 17. Correlación entre los parámetros morfométricos

	CABEZA							PIEZA INTERMEDIA				
	L	A	S	P	Acr	Elíptica	Rugosidad	Elongación	Regularidad	W	Y	A (c-f)
A	-0,02											
S	0,70 ^{***a}	0,70 ^{***a}										
P	0,93 ^{***a}	0,35 ^{**}	0,91 ^{***a}									
Acr	0,46 ^{***a}	0,45 ^{***a}	0,67 ^{***a}	0,61 ^{***a}								
Elíptica	0,71 ^{***a}	-0,72 ^{***a}	-0,01	0,40 ^{**}	-0,01							
Rugosidad	-0,74 ^{***a}	0,64 ^{***a}	-0,06	0,47 ^{***a}	-0,03	-0,98 ^{***a}						
Elongación	0,72 ^{***a}	-0,70 ^{***a}	0,02	0,42 ^{**}	0,02	1,00 ^{***a}	-0,97 ^{***a}					
Regularidad	0,08	0,57 ^{***a}	0,37 ^{**}	0,24	0,08	-0,34	0,20	-0,34 [*]				
W	0,22	-0,15	0,04	0,18	-0,08	0,26 [*]	-0,34 [*]	0,25	-0,02			
Y	0,22	-0,04	0,12	0,11	-0,11	0,19	-0,24	0,18	-0,02	0,79 ^{***a}		
A (c-f)	0,27 [*]	-0,31 [*]	-0,06	0,24	-0,19	0,41 [*]	-0,50 ^{***a}	0,38 ^{**}	0,07	0,60 ^{***a}	0,44 ^{**}	
D (c-f)	0,11	-0,06	0,01	0,45	-0,16	0,13	-0,23	0,09	0,14	0,64 ^{***a}	0,48 ^{***a}	0,79 ^{***a}

Los parámetros representan la longitud (L), anchura (A), área (S), perímetro (P) y acrosoma (Acr) de la cabeza; elíptica: L/A, rugosidad: 4rS/P2, elongación: (L-A)/(L+A), regularidad: πL/A4S, anchura (W) y área (Y) de la pieza intermedia; D (c-f): distancia entre los ejes mayores de la cabeza y pieza intermedia; A (c-f): ángulo entre los ejes mayores de la cabeza y pieza intermedia. Los valores indican el Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP).

3.3.4. Correlación entre los parámetros morfométricos, la concentración y el porcentaje de móviles calculados con el SCA®

Se realizó un estudio de correlaciones entre los parámetros morfométricos con la concentración y el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva (a+b) y total (a+b+c). Como el número de correlaciones era alto, se realizó el test de ajuste de Bonferroni (Tabla 18).

Se observó correlación negativa tras la corrección de Bonferroni entre el porcentaje de móviles progresivos y totales con la anchura de la pieza intermedia (W), el ángulo [A (c-f)] y distancia [D (c-f)] entre los ejes mayores de la cabeza y pieza intermedia (Tabla 18).

Tabla 18. Correlación de los parámetros morfométricos con la concentración y el porcentaje de móviles objetivos.

	CABEZA										PIEZA INTERMEDIA			
	L	A	S	P	Acr	Elipicidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad	W	Y	A (c-f)	D (c-f)	
Concentración (10 ⁶ /ml)	-0,09	0,12	0,03	-0,06	-0,03	-0,15	0,20	-0,13	0,01	-0,14	-0,09	-0,20	-0,29*	
% Movilidad (a+b)	-0,10	0,26	0,12	-0,03	0,09	-0,25	0,32*	-0,23	0,08	-0,46**a	-0,35**	-0,45**a	-0,45**a	
% Movilidad (a+b+c)	-0,11	0,24	0,10	-0,05	0,07	-0,25	0,33*	-0,23	0,06	-0,48**a	-0,37**	-0,45**a	-0,47**a	

Los parámetros representan la longitud (L), anchura (A), área (S), perímetro (P) y acrosoma (Acr) de la cabeza; elipicidad: L/A, rugosidad: 4πS/P², elongación (L-A)/(L+A), regularidad: πLA/4S, anchura (W) y área (Y) de pieza intermedia; D (c-f): distancia entre los ejes mayores de la cabeza y pieza intermedia (µm); A (c-f): ángulo entre los ejes mayores de la cabeza y pieza intermedia (grados).
 Los valores indican el Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP).
 *P<0,05; **P<0,01; ^a tras Corrección de Bonferroni < 0,0013

3.3.5. Reducción de las variables morfométricas a sus componentes principales

El estudio morfométrico se completó reduciendo las variables obtenidas a sus componentes principales, con la finalidad de hallar componentes o factores que explicaran la mayor parte de la varianza total (Tabla 19).

Tabla 19. Matriz de las componentes principales (CP) para los parámetros morfométricos

Parámetros	Forma cabeza	Tamaño cabeza	Pieza intermedia
L	0,60	0,78	
A	-0,79	0,59	
S		0,97	
P		0,94	
Acr		0,76	
W			0,87
Y			0,78
A (c-f)			0,82
D (c-f)			0,87
Elipticidad	0,97		
Rugosidad	-0,92		
Elongación	0,98		
Regularidad	-0,49	0,39	
% de la varianza	37,91	26,57	18,64

Sólo se han incluido valores de correlación mayores de 0,30

Al igual que en el caso de las variables cinemáticas, la reducción factorial de los parámetros morfométricos dio lugar a tres componentes que explicaban la mayor parte de la varianza total (83,12 %). La primera componente explicaba el 37,91 % de la varianza y el peso mayor recaía sobre los parámetros de forma elipticidad, rugosidad y elongación; la segunda componente representaba el 26,57 % de la

varianza y el peso recaía sobre los parámetros del tamaño de la cabeza y la tercera componente, el 18,64 % de la varianza, representaba los parámetros relacionados con la pieza intermedia del espermatozoide.

3.4.INTEGRACIÓN DE LAS VARIABLES CINEMÁTICAS Y MORFOMÉTRICAS.

3.4.1. Análisis de correlación entre los parámetros cinemáticos y morfométricos.

A continuación, se estudió la correlación entre los parámetros cinemáticos y morfométricos de las 56 muestras analizadas. Se utilizó la Correlación de Pearson y se calculó la Corrección de Bonferroni para confirmar que las diferencias estadísticas entre las variables no eran al azar (Tabla 20).

Se observó correlación negativa ($p < 0,01$) de VCL con elongación, anchura (W) y área (Y) de la pieza intermedia, ángulo [A (c-f)] y distancia [D (c-f)]; de VAP con anchura (W) de la pieza intermedia; y de ALH con elipticidad, elongación, anchura (W) y área (S) de la pieza intermedia, y ángulo [A (c-f)] y distancia [D (c-f)] entre los ejes. Y correlación positiva de ALH con rugosidad. Sin embargo, tras la corrección de Bonferroni, sólo se observó correlación negativa de VCL y ALH con anchura (W) y área (Y) de la pieza intermedia.

Tabla 20. Correlación entre parámetros cinemáticos y morfométricos.

	CABEZA										PIEZA INTERMEDIA			
	L	A	S	P	Acr	Elipticidad	Rugosidad	Elongación	Regularidad	W	Y	A (c-f)	D (c-f)	
VSL	0,60	0,24	0,21	0,14	0,22	-0,11*	0,11	-0,12	0,09	-0,34*	-0,24	-0,19	-0,18	
VCL	-0,17	0,29*	0,08	-0,08	0,06	-0,32*	0,35	-0,32**	0,19	-0,56*** ^a	-0,46*** ^a	-0,38**	-0,37**	
VAP	-0,04	0,32*	0,20	0,07	0,21	-0,24	0,25	-0,24	0,14	-0,44**	-0,33*	-0,32*	-0,29*	
WOP	0,25	-0,01	0,16	0,24	0,11	0,20	-0,22	0,18	0,01	0,15	0,19	0,26	0,23	
LIN	0,26	-0,01	0,18	0,26	0,26	0,21	-0,23	0,19	-0,11	0,13	0,20	0,16	0,12	
STR	0,22	-0,17	0,02	0,15	0,004	0,29*	-0,32*	0,26*	-0,08	0,06	0,14	0,29*	0,19	
ALH	-0,33*	0,16	-0,12	-0,28*	-0,06	-0,36**	0,39**	-0,35**	0,14	-0,50*** ^a	-0,56*** ^a	-0,42**	-0,37**	
BCF	0,13	0,14	0,21	0,19	0,26	0,002	0,002	-0,002	-0,02	-0,27*	-0,17	-0,16	-0,16	

Los parámetros representan la longitud (L), anchura (A), área (S), perímetro (P) y acrosoma (Acr) de la cabeza; elipticidad: L/A, rugosidad: $4\pi S/P^2$, elongación: $(L-A)/(L+A)$, regularidad: $\pi L/A^2 S$; anchura (W) y área (Y) de pieza intermedia; D (c-f): distancia entre los ejes mayores de la cabeza y pieza intermedia (μm); A (c-f): ángulo entre los ejes mayores de la cabeza y pieza intermedia (grados).
Los valores indican el Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ^a tras Corrección de Bonferroni $< 0,0005$

3.4.2. Reducción de los parámetros cinemáticos y morfométricos a sus componentes principales

Para explicar la varianza total redujimos los parámetros morfométricos y cinemáticos en conjunto, a sus componentes principales (Tabla 21).

En la matriz se distinguieron cinco componentes principales: la primera de las cuales representaba el 29,65% del total de la varianza, siendo los parámetros con mayor peso los referidos a de forma de la cabeza; la segunda representaba el 20,57% de la varianza y los parámetros con mayor peso fueron los relativos al tamaño de la cabeza del espermatozoide; la tercera representó el 13,71% de la varianza, y en este caso pesaron los parámetros relacionados con las características del movimiento del espermatozoide (Índices); la cuarta componente representó el 12,47% de la varianza e hizo referencia a la velocidad de los espermatozoides y la última representó el 6,78% de la varianza, haciendo referencia a los parámetros relacionados con la pieza intermedia. En conjunto, las cinco componentes obtenidas representaron el 83,19% de la varianza total (Tabla 21).

Tabla 21. Matriz de las componentes principales (CP) de los parámetros cinemáticos y morfométricos

Parámetros	Forma cabeza	Tamaño cabeza	Índices	Velocidades	Pieza intermedia
VSL			0,614	0,712	
VCL				0,909	
VAP			0,372	0,824	
WOP			0,859		
LIN			0,878		
STR			0,878		
ALH			-0,577	0,671	
BCF					-0,363
L	0,640	0,738			
A	-0,753	0,626			
S		0,971			
P	0,322	0,921			
Acr		0,760			
W				-0,438	0,718
Y				-0,433	0,602
A (c-f)	0,345				0,807
D (c-f)					0,856
Elipticidad	0,975				
Rugosidad	-0,940				
Elongación	0,976				
Regularidad	-0,374	0,391		0,331	0,400
% de la varianza	29,65	20,57	13,71	12,44	6,78

Sólo se han incluido valores de correlación mayores de 0,30

3.5. ANÁLISIS CINEMÁTICO POR GRUPOS DE DIAGNÓSTICO

Las 56 muestras se dividieron en cinco grupos de diagnóstico, de acuerdo a la valoración subjetiva siguiendo los criterios de la OMS (WHO, 1999): normozoospermicos (N), teratozoospermicos (T), oligozoospermicos (O), teratoastenozoospermicos (TA) y teratoastenoooligozoospermicos (TAO). No se observaron muestras con ninguno de los diagnósticos restantes. Por otra parte, se diferenció un diagnóstico 1, cuando se consideró como teratozoospermicos a los individuos que presentaron menos de un 15% de espermatozoides con morfología normal (criterios morfológicos de la OMS, 1999); y diagnóstico 2, cuando la teratozoospermia se refirió a individuos con menos de un 30% de espermatozoides con morfología normal (criterios morfológicos de la OMS, 1992).

3.5.1. Diferencias de los parámetros cinemáticos entre grupos de diagnóstico.

Se calculó la estadística descriptiva de los parámetros cinemáticos: medias y desviaciones típicas (Tablas 22 y 23) para los cinco diagnósticos.

Para el "Diagnóstico 1", se encontró diferencias significativas entre el grupo N y el TAO en las tres velocidades (VCL, VSL y VAP) y la ALH. También se observó diferencias con el O, pero en este caso, se debe relativizar el resultado por el escaso número de muestras de este grupo.

Para el "Diagnóstico 2" (criterios morfológicos de la OMS, 1992), se encontraron diferencias entre N, T y TAO para los mismos parámetros que en el "Diagnóstico 1". Como era de esperar, las velocidades disminuyeron de las muestras normales a las que presentaban una patología más severa, excepto en el caso de los oligozoospermicos.

Tabla 22. Diferencias cinemáticas entre distintos grupos. Diagnóstico 1 (criterios morfológicos de OMS, 1999)

Parámetros	N n=26	T n=15	O n=2	TA n=8	TAO n=5
VCL	59,76±8,78 ^{abcd}	55,95±8,60 ^{abcde}	67,78±12,32 ^{abcd}	52,91±6,31 ^{abcde}	44,66±5,25 ^{bde}
VSL	32,20±5,30 ^{abcd}	29,60±4,37 ^{abcde}	42,20±9,30 ^{ac}	29,72±3,97 ^{abcde}	23,46±4,59 ^{bde}
VAP	40,32±5,62 ^{abcd}	36,80±4,43 ^{abcde}	48,99±12,33 ^{ac}	35,84±3,29 ^{abcde}	29,45±4,43 ^{bde}
LIN	50,08±7,84	51,27±7,18	58,75±3,39	53,03±8,57	51,50±2,67
STR	74,26±4,67	74,99±4,84	80,02±0,87	75,95±5,56	75,41±3,21
WOP	64,63±5,76	64,96±5,34	69,68±5,28	65,99±6,24	65,94±2,77
ALH	2,38±0,46 ^{abcd}	2,24±0,44 ^{abcde}	2,18±0,09 ^{abcde}	2,09±0,46 ^{abcde}	1,74±0,08 ^{bde}
BCF	13,59±0,71	13,50±0,72	13,83±1,20	13,48±0,71	12,84±1,09

Los valores se indican como media±desviación estándar (DE). Los resultados se indican en micras/segundo: VCL, VSL, VAP, en micras: ALH, en porcentajes: LIN, STR y WOP, y en hercios: BCF.

^{abcde} diferentes letras indican diferencias entre diagnósticos diferentes ($p<0,05$) (ANOVA)

Tabla 23. Diferencias cinemáticas entre distintos grupos. Diagnóstico 2 (criterios morfológicos de la OMS, 1992)

Parámetros	N n=10	T n=31	O n=2	TA n=8	TAO n=5
VCL	61,88±11,00 ^{abcd}	57,23±7,85 ^{abcd}	67,79±12,32 ^{abcd}	52,91±6,31 ^{abcde}	44,66±5,25 ^{de}
VSL	33,58±4,81 ^{abcd}	30,50±5,02 ^{abd}	42,20±9,30 ^{ac}	29,72±3,97 ^{abcde}	23,46±4,59 ^{de}
VAP	42,30±5,34 ^{abcd}	37,98±5,12 ^{abd}	48,99±12,33 ^{ac}	35,84±3,29 ^{abcde}	29,45±4,43 ^{de}
LIN	53,63±9,40	51,19±6,89	58,75±3,39	53,03±8,57	51,50±2,67
STR	73,70±5,66	74,79±4,40	80,02±0,87	75,95±5,56	75,41±3,21
WOP	63,75±6,85	65,07±5,15	69,68±5,28	65,99±6,24	65,94±2,77
ALH	2,47±0,44 ^{abcd}	2,28±0,42 ^{abcde}	2,18±0,09 ^{abcd}	2,09±0,46 ^{abcd}	1,74±0,08 ^{bde}
BCF	13,64±0,74	13,53±0,71	13,83±1,20	13,48±0,71	12,84±1,09

Los valores se indican como media±desviación estándar (DE). Los resultados se indican en micras/segundo: VCL, VSL, VAP, en micras: ALH, en porcentajes: LIN, STR y WOP, y en hercios: BCF.

^{abcde} diferentes letras indican diferencias entre diagnósticos diferentes ($p<0,05$) (ANOVA)

3.5.2. Diferencias entre las componentes principales cinemáticas de los distintos grupos de diagnóstico.

Para comparar las componentes principales de los distintos diagnósticos se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). (Tabla 24 y 25).

Tanto para el “Diagnóstico 1” como para el “Diagnóstico 2” solamente la componente que hacía referencia a las características del movimiento de los espermatozoides fue diferente entre el grupo de TAO y el resto de los grupos (Tabla 24). También se observó diferencias con los O, si bien, como ya hemos indicado, su relevancia es discutible por el escaso número de casos.

Tabla 24. Diferencias entre las componentes principales (CP) de los parámetros cinemáticos para distintos grupos. Diagnóstico 1 (criterios morfológicos de la OMS, 1999).

Parámetros	N n=26	T n=15	O n=2	TA n=8	TAO n=5
Índices	0,36±0,91 ^{abcd}	-1,16±0,86 ^{abcd}	1,29±1,58 ^{abcd}	-0,40±0,61 ^{abcde}	-1,39±0,51 ^{de}
Velocidades	-0,09±1,01	-0,10±1,04	1,22±0,89	0,16±1,15	0,03±0,39
Frecuencia	0,10±1,04	-0,01±0,88	0,31±1,60	0,03±0,86	-0,64±1,30

^{abcde} diferentes letras indican diferencias entre diagnósticos diferentes ($p < 0,05$) (ANOVA).

Tabla 25. Diferencias entre las componentes principales (CP) de los parámetros cinemáticos para distintos grupos. Diagnóstico 2 (criterios morfológicos de la OMS, 1992).

Parámetros	N n=10	T n=31	O n=2	TA n=8	TAO n=5
Índices	0,65±1,06 ^{abcd}	0,04±0,82 ^{abcd}	1,29±1,58 ^{abcd}	-0,40±0,61 ^{abcde}	-1,39±0,51 ^{de}
Velocidades	-0,12±1,07	-0,08±1,01	1,22±0,89	0,16±1,15	0,03±0,39
Frecuencia	0,24±1,37	-0,001±0,83	0,31±1,60	0,03±0,86	-0,64±1,30

^{abcde} diferentes letras indican diferencias entre diagnósticos diferentes ($p < 0,05$) (ANOVA).

3.6. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO POR GRUPOS DE DIAGNÓSTICO

Se siguieron los mismos criterios de clasificación que en el apartado anterior.

3.6.1. Diferencias de los parámetros morfométricos entre grupos de diagnósticos.

Para el “Diagnóstico 1” se observaron diferencias entre el grupo de N y T en la anchura de la cabeza, porcentaje de acrosoma y elipticidad. La rugosidad fue diferente entre el grupo de N y TA (Tabla 26).

Por lo que respecta a la pieza intermedia, la anchura y el área mostraron diferencias significativas entre los grupos N y TAO; mientras que el ángulo y la distancia entre los ejes fueron diferentes entre los grupos de N y TA (Tabla 27).

Tabla 26. Diferencias morfométricas de parámetros del tamaño de la cabeza y forma entre distintos grupos. Diagnóstico 1 (criterios morfológicos de la OMS, 1999)

Parámetros	N n=26	T n=15	O n=2	TA n=8	TAO n=5
L	4,90±0,21	4,98±0,40	4,74±0,08	4,95±0,51	5,04±0,21
A	3,25±0,14 ^{acde}	3,05±0,19 ^{bcde}	3,25±0,08 ^{abcde}	3,04±0,30 ^{abcde}	3,16±0,23 ^{abcde}
S	12,82±0,87	12,28±1,22	12,46±0,09	12,10±1,54	12,76±0,85
P	13,85±0,51	13,78±0,85	13,62±0,12	13,74±1,00	14,06±0,47
Acr	43,47±5,09 ^{acde}	38,42±5,73 ^{bcde}	45,75±1,11 ^{abcde}	39,36±5,49 ^{abcde}	41,21±3,00 ^{abcde}
Elipticidad	1,52±0,08 ^{acde}	1,64±0,17 ^{bcde}	1,47±0,07 ^{abcde}	1,67±0,27 ^{abcde}	1,62±0,15 ^{abcde}
Rugosidad	0,84±0,01 ^{abce}	0,81±0,03 ^{abcde}	0,84±0,02 ^{abcde}	0,80±0,05 ^{bcde}	0,81±0,03 ^{abcde}
Elongación	0,20±0,02	0,24±0,05	0,19±0,02	0,24±0,07	0,23±0,04
Regularidad	0,98±0,01	0,97±0,02	0,97±0,00	0,98±0,000	0,98±0,01

Los valores se indican como media±desviación estándar (DE). Los resultados se indican en micras: longitud (L), anchura (A) y perímetro (P), en micras al cuadrado: área (S), y en porcentajes: acrosoma (Acr), mientras que los factores de forma (elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad) son adimensionales.

^{abcde} diferentes letras indican diferencias entre diagnósticos diferentes ($p < 0,05$) (ANOVA).

Resultados

Tabla 27. Diferencias morfométricas de parámetros de forma e inserción de la pieza intermedia entre distintos grupos. Diagnóstico 1 (criterios morfológicos de la OMS, 1999)

Parámetros	N n=26	T n=15	O n=2	TA n=8	TAO n=5
W	1,21±0,13 ^{abcd}	1,34±0,15 ^{abcde}	1,09±0,02 ^{abcde}	1,31±0,21 ^{abcde}	1,45±0,20 ^{bcde}
Y	1,83±0,28 ^{abcd}	2,00±0,33 ^{abcde}	1,67±0,03 ^{abcde}	1,97±0,46 ^{abcde}	2,42±0,38 ^{bcde}
A (c-f)	10,92±2,04 ^{abce}	12,86±2,75 ^{abcde}	10,59±0,12 ^{abcde}	14,48±3,47 ^{bcde}	14,23±3,86 ^{abcde}
D (c-f)	0,22±0,04 ^{abce}	0,25±0,05 ^{abcde}	0,20±0,04 ^{abcde}	0,28±0,08 ^{bcde}	0,27±0,05 ^{abcde}

Los valores se indican como media±desviación estándar (DE). Los resultados se indican en micras: anchura (W) y distancia entre los ejes de la cabeza y pieza intermedia [D (c-f)], en micras cuadradas: área (Y), y en grados: el ángulo entre la cabeza y la pieza intermedia [A (c-f)].
^{abcde} diferentes letras indican diferencias entre diagnósticos diferentes (p<0,05) (ANOVA).

Para el “Diagnóstico2” no se encontraron diferencias en los parámetros morfométricos de la cabeza entre los diferentes grupos (Tabla 28). Mientras que la anchura y área de la pieza intermedia si que fue diferente entre el grupo de N y de TAO, y el ángulo y la distancia entre los ejes entre el grupo de N y de TA (Tabla 29).

Tabla 28. Diferencias morfométricas de parámetros del tamaño la cabeza forma entre distintos grupos. Diagnóstico 2 (criterios morfológicos de la OMS, 1992)

Parámetros	N n=10	T n=31	O n=2	TA n=8	TAO n=5
L	4,89±0,21	4,94±0,32	4,74±0,08	4,95±0,51	5,04±0,21
A	3,28±0,09	3,14±0,20	3,24±0,08	3,05±0,30	3,16±0,23
S	12,93±0,80	12,52±1,09	12,46±0,09	12,10±1,54	12,76±0,85
P	13,88±0,50	13,81±0,69	13,62±0,12	13,75±1,00	14,06±0,47
Acr	44,88±4,93	40,57±1,11	45,75±1,11	39,36±5,50	41,21±3,00
Elipticidad	1,50±0,05	1,59±0,14	1,47±0,07	1,67±0,27	1,62±0,15
Rugosidad	0,84±0,01	0,82±0,03	0,84±0,02	0,80±0,05	0,81±0,03
Elongación	0,20±0,02	0,22±0,04	0,19±0,02	0,24±0,07	0,23±0,04
Regularidad	0,98±0,00	0,97±0,01	0,97±0,00	0,98±0,00	0,98±0,02

Los valores se indican como media±desviación estándar (DE). Los resultados se indican en micras: longitud (L), anchura (A) y perímetro (P), en micras al cuadrado: área (S), y en porcentajes: acrosoma (Acr), mientras que los factores de forma (elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad) son adimensionales.

^{abcde} diferentes letras indican diferencias entre diagnósticos diferentes (p<0,05) (ANOVA).

Tabla 29. Diferencias morfométricas de parámetros de forma e inserción de la pieza intermedia entre distintos grupos. Diagnóstico 2 (criterios morfológicos de la OMS, 1992)

Parámetros	N n=10	T n=31	O n=2	TA n=8	TAO n=5
W	1,19±0,17 ^{abcd}	1,28±0,14 ^{abcde}	1,09±0,02 ^{abcde}	1,31±0,21 ^{abcde}	1,45±0,20 ^{bcde}
Y	1,80±0,26 ^{abcd}	1,93±0,32 ^{abcd}	1,67±0,03 ^{abcde}	1,97±0,46 ^{abcde}	2,42±0,38 ^{cde}
A (c-f)	10,46±2,25 ^{abce}	12,00±2,47 ^{abcde}	10,59±0,12 ^{abcde}	14,48±3,47 ^{bcde}	14,23±3,86 ^{abcde}
D (c-f)	0,21±0,03 ^{abce}	0,24±0,05 ^{abcde}	0,20±0,00 ^{abcde}	0,28±0,08 ^{bcde}	0,27±0,05 ^{abcde}

Los valores se indican como media±desviación estándar (DE). Los resultados se indican en micras: anchura (W) y distancia entre los ejes de la cabeza y pieza intermedia [D (c-f)], en micras cuadradas: área (Y), y en grados: el ángulo entre la cabeza y la pieza intermedia [A (c-f)].
^{abcde} diferentes letras indican diferencias entre diagnósticos diferentes ($p<0,05$) (ANOVA).

3.6.2. Diferencias entre las componentes principales morfométricas de distintos grupos de diagnóstico.

Para comparar las componentes principales de los distintos diagnósticos se realizó un análisis de la varianza (ANOVA).

La tercera componente relacionada con los parámetros de la pieza intermedia fue diferente entre el grupo de N y de TAO para ambos diagnósticos (Tablas 30 y 31).

Tabla 30. Diferencias entre las componentes principales (CP) de los parámetros morfométricos para distintos grupos. Diagnóstico 1 (criterios morfológicos de la OMS, 1999).

Parámetros	N n=26	T n=15	O n=2	TA n=8	TAO n=5
Forma cabeza	-0,36±0,53	0,48±1,10	-0,46±0,49	0,40±1,60	-1,7.10 ⁻³ ±1,00
Tamaño cabeza	0,24±0,84	-0,31±1,15	-0,01±0,07	-0,33±1,36	0,23±0,65
Pieza intermedia	-0,43±0,63 ^{abcd}	0,23±0,94 ^{abcde}	-0,95±0,04 ^{abcde}	0,53±1,32 ^{abcde}	1,08±1,10 ^{bcde}

^{abcde} diferentes letras indican diferencias entre diagnósticos diferentes ($p<0,05$) (ANOVA).

Resultados

Tabla 31. Diferencias entre las componentes principales (CP) de los parámetros morfométricos para distintos grupos. Diagnóstico 1 (criterios morfológicos de la OMS, 1992).

Parámetros	N n=10	T n=31	O n=2	TA n=8	TAO n=5
Forma cabeza	-0,47±0,31	0,08±0,96	-0,46±0,49	0,40±1,60	-1,7.10 ⁻³ ±1,00
Tamaño cabeza	0,37±0,76	-0,07±1,04	-0,01±0,07	-0,33±1,36	0,23±0,65
Pieza intermedia	-0,61±0,76 ^{abcd}	-0,06±0,80 ^{abcde}	-0,95±0,04 ^{abcde}	0,53±1,32 ^{abcde}	1,08±1,10 ^{bcd}

^{abcde} diferentes letras indican diferencias entre diagnósticos diferentes (p<0,05) (ANOVA).

3.7. ANÁLISIS CINEMÁTICO Y MORFOMÉTRICO POR GRUPOS DE DIAGNÓSTICO.

Para comparar las componentes principales de los distintos diagnósticos se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) (Tablas 32 y 33).

Para el “Diagnóstico 1”, la primera componente que representaba a los parámetros de forma de la cabeza fue diferente entre el grupo de N y T; mientras que la cuarta y quinta componente que agrupaban a los parámetros de velocidad y pieza intermedia fueron diferentes entre el grupo de N y TAO (Tabla 32).

Tabla 32. Diferencias entre las componentes principales (CP) de los parámetros morfométricos para distintos grupos. Diagnóstico 1 (criterios morfológicos de la OMS, 1999).

Parámetros	N n=26	T n=15	O n=2	TA n=8	TAO n=5
Forma cabeza	-0,37±0,56 ^{acde}	0,50±1,05 ^{bcd}	-0,60±0,48 ^{abcde}	0,45±1,58 ^{abcde}	-0,06±1,03 ^{abcde}
Tamaño cabeza	0,24±0,85	-0,31±1,13	-0,15±0,25	-0,35±1,35	0,29±0,65
Índices	-0,04±0,99	-0,12±1,10	1,43±0,67	0,08±1,05	-0,14±0,39
Velocidades	0,18±1,02 ^{abcd}	-0,02±0,90 ^{abcde}	0,94±1,38 ^{abcd}	-0,01±0,62 ^{abcde}	-1,27±0,72 ^{bde}
Pieza intermedia	-0,39±0,61 ^{abcd}	0,19±1,07 ^{abcde}	-0,92±0,48 ^{abcde}	0,57±1,24 ^{abcde}	0,92±1,15 ^{bcd}

^{abcde} diferentes letras indican diferencias entre diagnósticos diferentes (p<0,05) (ANOVA).

Para el “Diagnóstico 2”, fueron los parámetros relacionados con la velocidad y la pieza intermedia son los que mostraron diferencias entre el grupo de N y TAO (Tabla 33).

Tabla 33. Diferencias entre las componentes principales (CP) de los parámetros morfométricos para distintos grupos. Diagnóstico 2 (criterios morfológicos de la OMS, 1992).

Parámetros	N n=10	T n=31	O n=2	TA n=8	TAO n=5
Forma cabeza	-0,47±0,36	0,08±0,95	-0,60±0,48	0,45±1,58	-0,06±1,03
Tamaño cabeza	0,38±0,85	-0,07±1,02	-0,15±0,25	-0,35±1,35	0,29±0,65
Índices	-0,03±1,02	-0,08±1,04	1,43±0,67	0,08±1,05	-0,14±0,39
Velocidades	0,36±1,19 ^{abcd}	0,03±0,90 ^{abcd}	0,94±1,38 ^{abcd}	-0,01±0,62 ^{abcde}	-1,27±0,72 ^{de}
Pieza intermedia	-0,56±0,77 ^{abcd}	-0,06±0,85 ^{abcde}	-0,92±0,48 ^{abcde}	0,57±1,24 ^{abcde}	0,92±1,15 ^{bcde}

^{abcde} diferentes letras indican diferencias entre diagnósticos diferentes ($p < 0,05$) (ANOVA).

DISCUSIÓN

4.1. DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS CINEMÁTICO

Desde finales de los años 20, se ha analizado la relación entre el eyaculado masculino y la fertilidad. Pero fue a partir de la década de los 80 (Mathur *et al.*, 1986; Hinting *et al.*, 1988; Mack *et al.*, 1988; Mortimer *et al.*, 1988a; Mortimer *et al.*, 1988b; Mortimer *et al.*, 1988c; Vantman *et al.*, 1988; Aanesen *et al.*, 1989; Pedigo *et al.*, 1989; Vantman *et al.*, 1989a) cuando se planteó la necesidad de estandarizar el procedimiento para analizar el semen humano, por la importancia de la evaluación objetiva de la calidad y características funcionales de los espermatozoides y de las variables relacionadas con la función secretora de las glándulas accesorias, esencial en la evaluación de la pareja infértil y en las técnicas de fecundación *in vitro*, e inseminación artificial.

En el presente trabajo se ha evaluado de forma subjetiva y objetiva los parámetros de concentración, movilidad y morfología espermática, con la intención inicial de validar los resultados aportados por el sistema automatizado de análisis seminal Sperm-Class Analyzer (SCA[®]). Además, se aporta un nuevo abordaje del problema del análisis espermático mediante la reducción del conjunto de variables a sus componentes principales. Con ello se ha perseguido obviar el problema de buscar un único parámetro de referencia para la diagnosis de la calidad seminal.

Como se ha descrito en otros trabajos (Mortimer *et al.*, 1986b; 1995), existe una serie de factores técnicos y biológicos que afectan a los resultados presentados por los sistemas CASA. Por este motivo es necesario conocer en todo momento las condiciones de análisis y reevaluar los resultados en caso de que estos no sean los esperados. La interpretación de los datos cinéticos es dependiente del conocimiento que tengamos de las condiciones de análisis, cuyo resultado depende de una serie de factores, como son temperatura, volumen, profundidad de la cámara, óptica del microscopio, valores del *set up*, sistema de análisis de resultados, algoritmos utilizados, y por supuesto de las características de la población analizada (muestras frescas, criopreservadas o capacitadas, diluidas o no, etc.). Por ello, el presente trabajo comenzó, previamente al estudio cinemático, definiendo las condiciones

óptimas de trabajo del sistema utilizado, con el fin de conseguir una estandarización de los resultados.

La temperatura es un factor de gran importancia en el análisis seminal, ya que su incremento o disminución afecta notablemente a los parámetros cinemáticos de los espermatozoides (Kraemer *et al.*, 1998), por ello, todas las determinaciones se realizaron a la temperatura fisiológica de 37°C.

Otro factor que puede restringir la movilidad de los espermatozoides, es la profundidad de la cámara, aunque su efecto sobre las características de las trayectorias espermáticas varía según los autores (Mack *et al.*, 1989; Ginsburg y Armant., 1990). Ishijima *et al.* (1986) demostraron que la batida del flagelo del espermatozoide humano es tridimensional, y que este tipo de movimiento es el responsable de su rotación sobre una trayectoria helicoidal. Le Lannou *et al.* (1992) comprobaron que la reducida amplitud del movimiento, unida al corto flagelo y a la elevada viscosidad del plasma seminal, permitía la utilización de cámaras con 10 µm de profundidad para la determinación de los parámetros cinemáticos, sin grandes modificaciones al compararlos con los obtenidos con cámaras de mayor profundidad. Sin embargo, el análisis de espermatozoides más rápidos, tales como los capacitados, reveló grandes variaciones entre las dos cámaras empleadas de 10 y 20 µm de profundidad, siendo en este caso aconsejable la utilización de la cámara de mayor profundidad. Nosotros trabajamos con muestras en fresco y todos los análisis se realizaron con una cámara Makler de profundidad constante (10 µm).

En trabajos anteriores (Neuwinger *et al.*, 1990; Davis y Katz, 1992; Davis y Katz, 1993), se demostró que algunos sistemas CASA no daban concentraciones ni porcentaje de móviles reales cuando la concentración era superior a 50×10^6 espermatozoides/ml o inferior a 20×10^6 espermatozoides/ml, o cuando la muestra tenía abundante suciedad. En estas ocasiones, se requería la dilución, concentración o lavado de la muestra lo que limitaba su uso rutinario en la aplicación clínica. La mayoría de los investigadores coinciden en afirmar que concentrar la muestra puede afectar potencialmente a los espermatozoides. Sin embargo, los criterios respecto a la

dilución o no de las muestras no son coincidentes entre laboratorios, por los que no se ha llegado a establecer un estándar convincente. Schrandner *et al.* (1992) recomiendan la dilución rutinaria de todas las muestras para asegurar una manipulación constante de las mismas. Otros grupos han aconsejado la dilución sólo en casos necesarios y con el propio plasma seminal, ya que el uso de otros diluyentes puede afectar a las características espermáticas (Vantman *et al.*, 1989a). Davis y Boyers (1992) evaluaron el efecto de la dilución sobre los parámetros seminales, observando que el porcentaje de espermatozoides móviles disminuyó entre un 5% y un 10% tras una dilución 1:1 con plasma seminal homólogo o con PBS, si bien esta reducción se incrementó cuando la dilución en plasma seminal fue mayor. Por otra parte, las velocidades aumentaron de un 10 % a un 17 % cuando las muestras se diluyeron en PBS, pero no en plasma seminal. (Davis y Boyers, 1992).

En nuestro trabajo, se observó un menor porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y totales en las muestras diluidas con contraste de fase negativo a 10x y 20x, siendo las diferencias significativas sólo en contraste negativo y a 20x.

En concordancia con Davis y Boyers (1992), el factor dilución no afectó a los parámetros cinemáticos, indicando que el uso como diluyente del propio plasma seminal no modificaba la movilidad celular en negativo y a 20x, sino tan sólo el porcentaje de móviles progresivos y totales. Por su parte, Larsen *et al.* (2000), tampoco observaron que la dilución afectase a los parámetros cinéticos, salvo para el caso de la BCF y la STR.

Por otra parte, cuando se consideró el contraste de fase, se observó mayor concentración en contraste de fase negativo, tanto en muestras diluidas como sin diluir a 10x y 20x. Además estas diferencias fueron significativas a 10x, y altamente significativas a 10x sin diluir. Esto nos lleva a pensar que en contraste de fases negativo se obtiene una mayor calidad de imagen y un mayor contraste entre la cabeza espermática y el fondo, lo que permite la mejor identificación de los espermatozoides. En cambio, cuando el contraste es positivo y la concentración

espermática elevada, algunos espermatozoides son demasiado pequeños o no brillan con suficiente intensidad como para poder ser reconocidos por el sistema.

La movilidad espermática, también mostró diferencias significativas entre contrastes de fases en todas las situaciones salvo para el porcentaje de móviles progresivos, sin diluir y a 20x y para el porcentaje de móviles totales sin diluir y a 10x. El hecho de que las trayectorias analizadas a 10x sean menores que las analizadas a 20x se tradujo en diferencias significativas entre parámetros cinemáticos, siendo la mayoría de las diferencias entre contrastes a 10x. Solamente se observaron diferencias a 20x en LIN y WOB, en muestras sin diluir.

Aunque la mayoría de los sistemas CASA están equipados con una óptica con contraste de fase positivo, hay otros sistemas como el IVOS de Hamilton-Thorn Research Inc. y el SM-CMA de Strömberg-Mika Medical Equipment, que utilizan contraste de fase negativo. Al comparar ambos sistemas, se observa en contraste de fase negativo una imagen más clara y exacta de la cabeza del espermatozoide y un flagelo más brillante (Yeung y Nieschalg, 1993). De ello se deduce que el contraste de fase negativo, sino imprescindible, sí puede considerarse óptimo.

A continuación, valoramos la importancia de los aumentos en el análisis, encontrándose diferencias en los valores de concentración espermática, a 10x en muestras diluidas y sin diluir, mientras que el porcentaje de móviles no se vio afectado. Sin embargo, sí que se encontraron diferencias significativas de algunos parámetros cinéticos como son las velocidades en negativo y sin diluir; y la VCL, LIN, WOB y ALH sin diluir en positivo y ALH en positivo diluido y en negativo sin diluir.

Por último, el número de trayectorias erróneas fue menor en muestras sin diluir, en contraste negativo y a 20x. Cuando se utiliza el contraste positivo, la rotación de la cabeza del espermatozoide, así como el enfoque pueden alterar el tamaño y brillo de su imagen, formándose un halo que puede interferir en el correcto reconocimiento de la posición de la cabeza. Mientras que en contraste de fases negativo, la calidad de la imagen de la cabeza resulta ser más estable y, además, el halo está ausente. Por

ello, el reconocimiento de partículas no espermáticas y de puntos de la trayectoria fuera de la imagen de la cabeza provocó el reconocimiento de un mayor número de trayectorias erróneas. Esto coincide con los resultados obtenidos por Yeung y Nieschlag (1993) en espermatozoides humanos al comparar distintos sistemas CASA equipados con diferentes contrastes de fase.

Así pues, se puede considerar que el contraste de fase utilizado resultó ser el factor más determinante y la dilución el de menor importancia. Estos resultados nos indican la necesidad de referir correctamente el método utilizado en la valoración de la movilidad espermática con el SCA[®] para su correcta interpretación. En conclusión, el método que parece más útil es el que combina la muestra sin diluir, salvo si la concentración espermática es excesiva, con contraste de fase negativo y a 20x.

A continuación, se correlacionaron las estimaciones objetivas y subjetivas de concentración y movilidad. Cada método utiliza cámaras de recuento diferentes, lo que, por tanto, podría llevar a resultados erróneos. El método objetivo emplea como cámara de recuento la Makler en vez de la Neübauer recomendada por la OMS (WHO, 1999). La cámara Neübauer debido a su profundidad 10 veces mayor a la de la Makler, permite el recuento en un volumen de muestra seminal notablemente superior, lo que implica un muestreo más significativo; sin embargo los sistemas computarizados como requieren que para el recuento las células se encuentren en un solo plano focal, utilizan la cámara Makler. Además de esta limitación, en algunos sistemas CASA se reconocen como espermatozoides partículas que no lo son y se determinan trayectorias erróneas que al ser eliminadas también pueden llevar a error en alguna de las determinaciones. Como consecuencia de estas limitaciones, en el nuevo sistema SCA-2002 se ha incluido un módulo específico de concentración.

Cuando comparamos ambos criterios, la mayor correlación se consiguió en el porcentaje de móviles progresivos en muestras sin diluir, en contraste negativo y a 20x ($p < 0,01$). Aunque, también se observó correlación positiva en el porcentaje de móviles progresivos diluido, en negativo y a 20x, y en el porcentaje de móviles totales en negativo, a 20x tanto diluido como sin diluir ($p < 0,05$).

Por otra parte, al estudiar la correlación de la concentración subjetiva y objetiva de espermatozoides, el coeficiente de correlación en contraste negativo siempre fue mayor que en positivo (aunque sin diferencias significativas) salvo para muestras diluidas, analizadas a 20x, donde la correlación en el caso de contraste de fases positivo fue significativamente mayor. Este hecho parece paradójico, porque nos indica que en cuanto a la concentración la mayor correlación entre los dos criterios se consigue en esta situación. Sin embargo, este resultado se puede explicar al observar el número de trayectorias eliminadas en cada condición de análisis. Mientras que en la mayoría de las situaciones, en particular en las calculadas con contraste de fase negativo, el porcentaje de trayectorias erróneas eliminado fue bajo y concretamente muy bajo a 20x, en negativo y sin diluir. Cuando se trabajó con muestras diluidas, en positivo y a 20x, el número de trayectorias eliminadas fue muy superior. Por tanto, la concentración de espermatozoides determinados mediante el método objetivo se redujo tanto que se aproximó al valor de concentración subjetivo. Este error en el análisis, llevó a la no sobreestimación de la concentración objetiva y a su elevada correlación con la subjetiva en las condiciones mencionadas (diluido, positivo y 20x).

Igualmente, se observó correlación positiva entre las trayectorias erróneas y la concentración subjetiva, sin diluir en contraste positivo y a 10x. Es decir, un aumento de la concentración suponía un incremento en el número de trayectorias erróneas y viceversa. Estos resultados fueron evidentes ya que el analizador tuvo mayor dificultad para reconocer los espermatozoides en positivo, lo que unido a una mayor concentración y campo de análisis, incrementó el porcentaje de trayectorias erróneas en estas condiciones de análisis.

Sin embargo, al valorar el efecto de la concentración objetiva sobre las trayectorias erróneas, no se observó correlación.

Finalmente, cabe mencionar que al comparar la versión de movilidad 5.1 empleada para realizar este trabajo con la última versión del sistema SCA-2002, se

aprecia un aumento notable de la velocidad del proceso de análisis y una ligera disminución en el porcentaje de trayectorias erróneas.

4.2. ESTUDIO CINEMÁTICO GLOBAL

Como ya hemos apuntado anteriormente, son muchos los autores que han tratado de seleccionar la cámara de recuento más adecuada y que induzca un menor error en la determinación de la concentración espermática. A pesar de que la cámara Neubauer mejorada es la más ampliamente aceptada como la más exacta para la estimación de la concentración (WHO, 1992, 1999) y la cámara Makler la más popular entre los laboratorios de FIV, no se ha llegado a un consenso debido a la diversidad de los resultados obtenidos. La diferencia más importante entre el método seguido por ambas cámaras se refiere a las condiciones de muestreo, ya que en la Neubauer (de 100 μm de profundidad) se cuenta los espermatozoides en un área de 1 mm^2 , en la Makler (de 10 μm de profundidad), se suelen contar los espermatozoides presentes en un área de 0.01 mm^2 , lo que se traduce en un volumen total 100 veces superior en la primera que en la segunda. En el presente trabajo, se valoró la correlación de la concentración analizada de forma subjetiva con la cámara Neubauer mejorada y la Makler, observándose entre ambas una correlación positiva altamente significativa ($p < 0,01$) (Imade *et al.*, 1993; Sukcharoen *et al.*, 1994).

Los resultados obtenidos al comparar la concentración determinada de forma subjetiva con ambas cámaras y con el SCA[®], y la movilidad progresiva y total subjetiva y objetiva, no mostraron diferencias significativas; sin embargo una mayor desviación estándar en los resultados subjetivos, indicó una menor reproducibilidad de los mismos. Imade *et al.* (1993) coinciden con nosotros, al señalar que los recuentos mediante la cámara Neubauer mejorada son inferiores a los calculados con la Makler. Sukcharoen *et al.* (1994) tampoco obtuvieron diferencias significativas entre la concentración determinada mediante la Neubauer y la Makler cuando la concentración era superior a 40×10^6 espermatozoides/ml, mientras que para concentraciones inferiores la Makler sobreestimaba los resultados. Sin embargo,

Shiran *et al.* (1995) determinaron con la Makler concentraciones ligeramente inferiores, aunque no significativas. Igualmente, Mahmoud *et al.* (1997) observaron que la cámara Neubauer sobreestimaba la concentración determinada por la Makler y mostraba una menor variabilidad (7,1%). Así pues, resulta paradójica la diferencia de resultados contrastados por estos autores, por lo que no es posible establecer un criterio definitivo al respecto de las cámaras. En todo caso, y como consecuencia de las diferencias de muestreo, parece sensato abogar por el uso de la Neubauer, como postula la propia OMS (WHO, 1999).

Por otra parte, la correlación entre las determinaciones objetivas y subjetivas, de concentración, movilidad progresiva y movilidad total fue positiva y altamente significativa ($p < 0,01$), especialmente para la movilidad progresiva. Esto indica que existe una consistencia entre estos parámetros determinados mediante el método subjetivo y el objetivo, por lo que se puede considerar validado el uso del SCA[®] en las condiciones usadas en nuestro caso.

La concentración determinada con el SCA[®] fue ligeramente mayor, lo que puede deberse a que en muestras muy sucias se reconozcan como espermatozoides partículas que no lo son. Nuestros resultados coinciden con los de Vantman *et al.* (1988), quienes encontraron una correlación altamente significativa entre el método subjetivo (Neubauer) y el objetivo (sistema CellSoft), al comparar la concentración y la movilidad, si bien el método automático sobreestimaba la concentración en un 30% cuando el número de partículas por campo era inferior a 60. Sin embargo, las estimaciones más representativas de la velocidad lineal las obtuvieron al analizar concentraciones inferiores a 40×10^6 espermatozoides/ml. Otros autores consiguieron resultados similares (Donnelly *et al.*, 1998) al comparar ambos métodos (manual-Neubauer vs Hamilton Thorne V10.7), evidenciando que el método objetivo era rápido, cuantitativo, tenía valor clínico y permitía comparar los resultados entre diferentes centros.

Por otra parte, la movilidad progresiva y total fue mayor cuando se determinó mediante el método subjetivo, lo que según algunos autores (Holt y Palomo, 1996) se

debe a que el ojo humano tiene tendencia a favorecer la determinación de las células que se mueven más rápidamente.

Cuando estudiamos la correlación de los parámetros cinemáticos, el único que no mostró correlación con el resto tras corrección de Bonferroni fue la BCF, lo que indicó su menor importancia en el análisis seminal. Hay algunos trabajos que confirman estos resultados, Mortimer y Maxwell (1999) excluyeron de su estudio sobre hiperactivación de espermatozoide de carnero la BCF por su pobre sensibilidad y especificidad; de modo similar Pilikian *et al.* (1993) al comparar muestras seminales de individuos astenozoospermicos con normozoospermicos, encontraron diferencias en todos los parámetros cinemáticos salvo en la BCF.

Respecto al resto de los parámetros, VSL mostró correlación positiva con todos los parámetros menos con el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH); mientras que LIN, STR y WOB se correlacionaron negativamente con ALH, de modo que a menor "cabecceo", un desplazamiento más rectilíneo.

Seguidamente, se valoró la correlación entre los parámetros cinemáticos, la concentración y el porcentaje de móviles calculados con el SCA[®]. Como era de esperar, el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y totales presentó una correlación positiva con las velocidades (VCL, VSL y VAP) y con el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), siendo éste último un parámetro que afecta a los resultados de FIV (Chan *et al.*, 1989; Barlow *et al.*, 1991) y a la capacidad de los espermatozoides humanos para penetrar en el moco cervical y fusionarse con el ovocito (Aitken *et al.*, 1986; Mortimer *et al.*, 1986a). Esta variable es de gran importancia biológica ya que nos indica el vigor de la batida flagelar junto con la frecuencia de rotación celular (Serres *et al.*, 1984), lo que probablemente determina la progresión del espermatozoide en el moco cervical.

Finalmente, el estudio cinemático se completó reduciendo las variables a componentes que explicaban la mayor parte de la varianza total. Las componentes principales son combinaciones lineales de las variables originales y proporcionan un camino objetivo para explicar la variación de los datos de forma concisa. Además, en

los estudios de correlación, cuando hay muchas variables a analizar se produce un efecto de seudesignificación, lo que obliga a realizar correcciones estadísticas, como la de Bonferroni (Sokal and Rohlf, 2001). Este hecho se obvia cuando ese conjunto de variables se reduce a sus componentes, lo que ofrece una herramienta estadística muy útil, aunque no siempre fácil de explicar (Manly, 1994).

Los parámetros cinemáticos se pudieron agrupar en tres componentes que explicaban el 91,93% de la varianza total observada. Se denominaron “Índices”, que agrupaba las variables que hacían referencia a las características del movimiento de los espermatozoides (WOB, STR y LIN); “Velocidades”, agrupaba las variables de velocidad (VCL, VSL y VAP) y “Frecuencia”, representaba a la frecuencia de batida del flagelo (BCF), poniendo una vez más de manifiesto que esta variable merece un tratamiento a parte y puede, de hecho llegar a ser excluida. Por su parte, ALH se incluía de forma negativa en la componente de “Índices” y positiva en la de “Velocidades”.

Las componentes principales obtenidas son variables más robustas para la valoración seminal que las variables individuales, de modo que al reducir WOB, STR y LIN a una sola componente, la importancia que puede tener LIN como variable individual, se ve reforzada al considerar en su conjunto las variables que representan las características del movimiento. De modo que si LIN como parámetro individual es un importante indicador de la capacidad fecundante de los espermatozoides, especialmente en individuos con semen de baja calidad; y se ha relacionado con las tasas de fecundación en FIV e IA (Liu *et al.*, 1991; Irvine *et al.*, 1994; Krause, 1995), cabe esperar que sea mucho mayor el valor pronóstico de la componente “Índices”. De forma similar, si las velocidades determinadas mediante los sistemas CASA proporcionan una aceptable estimación de la capacidad fecundante de los espermatozoides tanto en humanos como en otras especies animales (Cancel *et al.*, 2000; King *et al.*, 2000; Hirano *et al.*, 2001; Kasai *et al.*, 2002), mayor valor pronóstico tendrá la componente “Velocidad” que las agrupa. En todo caso, es

necesario el desarrollo de futuros trabajos para confirmar estas expectativas, como se insistirá más adelante.

4.3. ESTUDIO MORFOMÉTRICO GLOBAL

La morfología espermática tiene una gran relevancia clínica en cuanto al valor predictivo del potencial fertilizador del semen, *in vivo* (Eggert-Kruse *et al.*, 1996) e *in vitro* (Kruger *et al.*, 1996). En el análisis morfológico se utilizan criterios de normalidad cada vez más estrictos, pues se ha visto que así se incrementa la capacidad de predicción. A pesar de ello, todavía se cuestiona la utilidad de la evaluación morfológica debido a los distintos criterios de clasificación, distintas técnicas de tinción y preparación de muestra, y a la no-estandarización en los análisis.

En primer lugar, se compararon los porcentajes de valoración morfológica (normales, defecto de la cabeza, defecto de la pieza intermedia, defecto de cabeza y pieza intermedia) entre determinaciones subjetivas y objetivas calculadas con el SCA[®], encontrándose valores coincidentes en lo referente a la cabeza, mientras que se apreciaron diferencias en el porcentaje de espermatozoides con defecto en la pieza intermedia. Los resultados mostraron el valor subjetivo inferior al objetivo, esto es fácilmente explicable ya que resulta evidente que para el ojo humano es muy difícil poder apreciar algunas alteraciones de la pieza intermedia que son fácilmente detectables mediante el analizador. De ello, se deduce que el sistema puede considerarse validado para el análisis automático de la morfología espermática, de acuerdo con el estándar marcado por la OMS (WHO, 1999).

A continuación se analizó la correlación entre las determinaciones subjetivas y las objetivas de los porcentajes de valoración morfológica (normales, defecto de la cabeza, defecto de la pieza intermedia, defecto de cabeza y pieza intermedia), observándose en todas ellas correlación positiva altamente significativa ($p < 0,01$), principalmente en cuanto al porcentaje de formas normales. Este resultado concuerda con el obtenido por Wang *et al.* (1991) que observaron una correlación positiva de

los defectos de la cabeza entre el método subjetivo y el objetivo (Morphologizer II-Cryo Resources Ltd.)

Seguidamente, el análisis de correlación entre los parámetros morfométricos, mostró una correlación positiva, tras la corrección de Bonferroni, entre la longitud y el resto de parámetros de la cabeza, salvo la regularidad con la que no mostró correlación y la rugosidad con la que se correlacionó negativamente; entre la anchura y los parámetros de la cabeza que no eran ni la elipticidad ni la elongación, ya que con éstos la correlación fue negativa; entre el área y el perímetro y porcentaje de acrosoma; entre el perímetro y el porcentaje de acrosoma y la rugosidad; y por último entre la elipticidad y la elongación. La correlación fue negativa entre la elipticidad y la rugosidad; y la rugosidad con la elongación y ángulo entre los ejes mayores de la cabeza y la pieza intermedia.

Según estos resultados y como cabía esperar, las variables de la cabeza están altamente correlacionadas entre sí, al igual que las variables de la pieza intermedia. De tal forma que las variaciones de unas afectan a las otras, a unas positiva y a otras negativamente, de lo que se deduce que no todas las variables significan lo mismo por lo que resulta imprescindible su inclusión en el análisis morfométrico.

Cuando se consideraron los parámetros de la pieza intermedia, tras la corrección de Bonferroni, la correlación fue positiva entre la anchura y el resto de parámetros de la pieza intermedia; y entre distancia entre los ejes y el área y ángulo. Al igual que con las variables de la cabeza, la modificación de la mayoría de las variables de la pieza intermedia afectaba al resto, y un incremento de cualquiera de ellas implicaba un incremento de las demás, salvo el área de la pieza intermedia y el ángulo entre los ejes que no estaban correlacionados. Sin embargo las variaciones en los parámetros de la pieza intermedia no afectaban a los parámetros de la cabeza del espermatozoide, a excepción del ángulo que paradójicamente se correlacionaba negativamente con la rugosidad de la cabeza. Ello parece indicar que durante la espermiogénesis, la formación de la cabeza y de la pieza pueden seguir patrones independientes.

En un estudio sobre la evolución de la morfometría de los espermatozoides de mamíferos, Gage (1998) cotejó los datos publicados de 445 especies y realizó un análisis filogenético de las mismas, estudiando la relación entre las dimensiones morfométricas de la cabeza, pieza intermedia y flagelo de los espermatozoides. A diferencia de nuestros resultados, y al comparar los parámetros morfológicos de la cabeza con los del flagelo observó una correlación positiva entre la longitud de la cabeza y la longitud del flagelo ($r^2=0,34$, $p<0,0001$) y pieza intermedia ($r^2=0,05$, $p<0,017$), y entre el área de la cabeza y la longitud del flagelo ($r^2=0,2$, $p<0,001$). Sin embargo, los valores que obtuvo de r^2 mostraron que solamente del 5-34% de la variación en la longitud flagelar era explicada por estos parámetros.

En el presente trabajo, se realizó un estudio de correlaciones bivariadas de los parámetros morfométricos con la concentración y el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva ($a+b$) y total ($\bar{a}+\bar{b}+\bar{c}$). Tras el ajuste de Bonferroni, se observó una correlación negativa entre la anchura de la pieza intermedia y el porcentaje de móviles progresivos y totales. Otros autores que coinciden con nuestros resultados (Hancock y Kretser, 1992; Wilton *et al.*, 1992; Mundy *et al.*, 1995), han puesto de manifiesto que ciertas anomalías de la pieza intermedia pueden ser el origen de un tipo de astenozoospermia. Por su parte, los defectos ultraestructurales del flagelo dificultan el desplazamiento de los espermatozoides en varones infértiles, siendo algunos de estos defectos muy poco perceptibles y no detectables mediante un examen cualitativo.

Igualmente, el ángulo y la distancia entre los ejes mayores de la cabeza y pieza intermedia, también se correlacionaron negativamente con la movilidad progresiva y total. Evidentemente, la inserción de la pieza intermedia afecta al desplazamiento de la onda a lo largo del flagelo, cuando el ángulo o la distancia entre los ejes aumentan más dificultad tiene el espermatozoide para desplazarse. Todas estas anomalías pueden ser resultado de una espermiogénesis defectuosa que conlleve a un mal funcionamiento de los centriolos, ocasionando insuficiencias en la formación del aster espermático, y por tanto alteraciones en la división embrionaria que provocarían

abortos tempranos (Chemes *et al.*, 1999). En este mismo sentido, Rawe *et al.* (2002) observaron que en pacientes con astenozoospermia severa y espermatozoides estructuralmente anormales, cuando se seleccionaban espermatozoides sin anomalías aparentes, se llegaba a obtener fecundación y división embrionaria, incluso test de embarazo positivo que finalizaba en aborto bioquímico.

Cabe señalar que entre el resto de los parámetros no se encontró correlación, lo que nos lleva a pensar que aunque es enormemente importante la forma de la cabeza y sus parámetros de tamaño en la fecundación, lo realmente importante para su desplazamiento es la “maquinaria” generadora de la energía necesaria para su propulsión, la pieza intermedia y su inserción en la cabeza.

Por último, el estudio morfométrico se completó reduciendo las variables a componentes que explicaban la mayor parte de la varianza total. La reducción factorial de los parámetros morfométricos dio lugar a tres componentes que, en conjunto, explicaban el 83,12 % de la varianza, que se denominaron “Forma” de la cabeza (37,91 %) que hacía referencia a la elipticidad, rugosidad y elongación de la cabeza; “Tamaño” de la cabeza (26,57 %), que agrupaba los parámetros de tamaño (longitud, anchura, área, perímetro de la cabeza y acrosoma) y “Pieza intermedia” (18,64 %), que se refería a los parámetros relacionados con el tamaño de la pieza intermedia y su inserción. Con esta reducción, se trató de sintetizar un gran conjunto de datos, crear estructuras de interdependencia entre variables cuantitativas para conseguir unas nuevas variables que fueran función lineal de las originales. El objetivo de este análisis de componentes principales fue reducir la dimensión de un conjunto de variables a un conjunto de menor número de variables para mejorar la interpretación de los datos.

4.4. INTEGRACIÓN DE LAS VARIABLES CINEMÁTICAS Y MORFOMÉTRICAS

La determinación cuantitativa, mediante sistemas CASA, de las variables morfométricas y cinemáticas de los espermatozoides es un indicador pronóstico de su capacidad fecundante (Kruger *et al.*, 1986; Barratt *et al.*, 1993). El análisis objetivo de estos parámetros es el primer paso, obligatorio, en la evaluación crítica de los pacientes antes de comenzar un tratamiento de reproducción asistida (Chan *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1991; Duncan *et al.*, 1993; Joshi *et al.*, 1996).

En este trabajo, se analizó la correlación entre los parámetros cinemáticos y los morfométricos, observándose correlación negativa tras el ajuste de Bonferroni de VCL y ALH con la anchura y área de la pieza intermedia. De modo, que un incremento de la anchura y del área se tradujo en una disminución de VCL y ALH; y por tanto en una mayor linealidad del movimiento.

A principios de la década de los 80 y mediante videomicrografía, se pudo determinar la movilidad y morfología de células espermáticas individuales, observando que los espermatozoides con morfología anormal eran inmóviles o se desplazaban más lentamente que los normales (Overstreet *et al.* 1981). Más tarde se puso de manifiesto que los espermatozoides normales de donante nadaban de forma significativamente más rápida que los espermatozoides normales de un grupo de pacientes con cuadro de infertilidad (Morales *et al.*, 1988).

En concordancia con nuestros resultados, se ha descrito que las anomalías estructurales de la pieza intermedia son las que parecen afectar en mayor medida a la movilidad del espermatozoide (Afzelius *et al.*, 1976; Afzelius *et al.*, 1995; Chemes *et al.*, 1998; Nagy, 2000). De forma semejante, un examen mediante microscopía electrónica de espermatozoides de pacientes infértiles astenozoospermicos, mostró que la escasa movilidad espermática en estos individuos era causada principalmente por anomalías ultraestructurales del flagelo: defectos en el axonema, alteraciones numéricas y organizativas de las mitocondrias y probablemente por deficiencias metabólicas no detectables a nivel estructural (Wilton *et al.*, 1992). Todas estas

anomalías no fueron observadas mediante un examen cualitativo habitual. En la misma línea, otros autores observaron que individuos infértiles astenozoospermicos presentaban la pieza intermedia más corta y con menor número de giros mitocondriales que individuos fértiles (Mundy *et al.*, 1995). Esto justificaba la astenozoospermia, ya que las mitocondrias proporcionan la energía necesaria para el movimiento y un déficit de estos orgánulos implica una función espermática deficiente. Mientras, la anchura de la pieza intermedia y la longitud de la cola fue similar entre ambos grupos de individuos.

Otros autores y a diferencia de lo visto hasta ahora, han propuesto que el origen de la astenozoospermia puede residir en anomalías de la forma de la cabeza (Katz *et al.*, 1986; Dadoune, 1988; Moruzzi *et al.*, 1988; Garret y Baker, 1995, Aziz *et al.*, 1998; Osawa *et al.*, 1999), alteraciones no estructurales en el control de propagación de la onda flagelar y metabólicas en el mecanismo de producción de energía y transducción de la célula (Storey y Kayne, 1975; Wilton *et al.*, 1992; Mahadevan *et al.*, 1997; Kao *et al.*, 1998). Nosotros hemos constatado que la linealidad del desplazamiento se ve afectada positivamente por cambios en la elipticidad y la elongación y negativamente en la rugosidad.

Antes de realizar el ajuste de Bonferroni, el ángulo y la distancia entre los ejes mayores de cabeza y pieza intermedia, también mostraron correlación negativa con VCL y ALH. De modo que un incremento en el ángulo y la distancia entre los ejes se tradujo en una disminución en VCL y ALH, y consecuentemente en una mayor linealidad del desplazamiento.

Todos estos resultados, como ya hemos mencionado anteriormente, nos llevan a considerar que estas alteraciones en la unión entre la cabeza y el flagelo del espermatozoide pueden ser el origen de una extrema astenozoospermia o total inmovilidad (Chemes *et al.*, 1987; Chemes *et al.*, 1998), al afectar al correcto funcionamiento de los centríolos, por anomalías a nivel del DNA (Nikoletos *et al.*, 1999), que originan insuficiencias en la formación del aster espermático. En el presente trabajo, a diferencia de Mundy *et al.* (1995) sí que observamos correlación

negativa entre la anchura de la pieza intermedia y VCL y VAP, y es posible que las alteraciones en la anchura y área estén relacionadas con anomalías del axonema y de las mitocondrias, y aunque no se determinó la longitud de la pieza intermedia, probablemente ésta también pueda verse afectada.

Posteriormente, redujimos los parámetros cinemáticos y morfométricos a sus componentes principales distinguiéndose en la matriz resultante cinco componentes que representaban el 83,19 % de la varianza total. La primera componente era la “Forma de la cabeza” (29,65 %), la segunda el “Tamaño de la cabeza” (20,57 %), la tercera el “Índice” que hacía referencia a las características del movimiento (13,71 %), la cuarta las “Velocidades” (12,44 %) y la quinta la “Pieza intermedia” (6,78 %). Ello nos indica, que el elemento más significativo en el conjunto de los datos se refiere a las características morfométricas que son, justamente, las que menos atención han merecido hasta el momento en la bibliografía, mientras que las cinemáticas explican una parte relativamente secundaria del conjunto de la varianza de la población. Ello debe introducir nuevos criterios de valoración seminal en el futuro.

De hecho, la reducción de los parámetros aportados por el SCA[®] a cinco componentes abre las puertas a una comprensión integrada de las características espermáticas, de este modo se introducen criterios mucho más robustos en la valoración seminal que la valoración individualizada de los parámetros.

4.5. ANÁLISIS POR GRUPOS DE DIAGNÓSTICO

En el presente trabajo se agrupó las muestras seminales siguiendo los criterios de la OMS de 1992 y 1999 (WHO, 1992; WHO, 1999). No todas las patologías combinadas quedaron representadas en nuestra agrupación, quedando uno de los grupos constituido por tan sólo dos casos.

Como hipótesis se planteó determinar si el SCA[®] podía considerarse validado para el análisis automático morfométrico y cinemático, de acuerdo con el estándar marcado por la OMS (WHO, 1999), que, a lo largo de la historia, ha ido siendo

modificado en cuanto a los criterios de normalidad, aunque siempre basándose en criterios subjetivos de concentración, movilidad y morfología. Sin embargo, el uso de los sistemas CASA se ha permitido introducir criterios cinemáticos y morfométricos discriminatorios, objetivos y estrictos. Además, la nueva información permite abordar el análisis seminal desde una perspectiva poblacional, pudiéndose diferenciar subpoblaciones espermáticas que hasta ahora se habían incluido, según los criterios de la OMS, dentro de una misma población.

Ésto se pone de manifiesto al analizar los resultados obtenidos en nuestro caso, tanto si consideramos las variables cinemáticas de forma independiente como tras su reducción a componentes principales, ya que sólo se observaron diferencias entre el grupo de normozoospermicos (N) y el de teratoastenoooligozoospermicos (TAO) en cuanto a los parámetros de velocidad (VCL, VSL y VAP) y desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), así como en la componente "Índices", que tenía un valor negativo en los grupos patológicos.

Esto nos lleva a pensar, que sólo las muestras que se clasificaron inicialmente como TAO eran tan patológicas y mostraban anomalías tan evidentes en cuanto a la forma y tamaño de la cabeza y pieza intermedia, que llegaron a presentar diferencias en sus parámetros de velocidad frente a las muestras normales. Estas diferencias no se encontraron en los otros grupos, bien porque las muestras teratozoospermicas (T) y teratoastenozoospermicas (TA) no mostraban anomalías muy severas sino que se encontraban muy próximas al límite de normalidad, bien porque los criterios subjetivos de la OMS no nos permitieron discriminar correctamente las muestras con características cinemáticas y morfométricas diferentes.

En lo referente a la comparación entre los grupos N y TA, la explicación podría consistir también en que las características cinemáticas de las células que presentan movilidad sean semejantes en ambos grupos, aunque ambos grupos sean diferentes, ya que el segundo tiene <50% de espermatozoides con movilidad progresiva y probablemente un mayor número de células inmóviles.

Por otra parte, aunque el grupo de oligozoospermicos (O) está constituido únicamente por dos muestras y sus resultados no son comparables a los de los otros grupos, se observa una tendencia al aumento de todos los parámetros con la salvedad del ALH que disminuye; es decir se trata de muestras con escaso número de células pero con buena movilidad. La excelente movilidad de estas dos muestras podría llevarnos a pensar en la existencia de una relación entre ese el bajo número de espermatozoides y una menor producción de especies reactivas-de oxígeno (ROS). Sin embargo, estos resultados estarían en contraposición con lo descrito en la literatura, ya que la oligozoospermia, esencialmente si el número de células redondas es elevado, se ha asociado con la producción de radicales libres y con tasas bajas de fecundación y embarazo en técnicas de reproducción asistida (Aitken *et al.*, 1992; Zalata *et al.*, 1995; Ford *et al.*, 1997). Incluso, hay algunos trabajos que sugieren el inicio de la generación de especies reactivas de oxígeno durante la espermatogénesis (Aitken *et al.*, 1992), hecho constatado por la producción de ROS por parte de células germinales precursoras.

A la vista de los datos, las diferencias entre los grupos de diagnóstico al analizar los parámetros cinemáticos por separado, se manifiestan en aquellos relacionados con la velocidad; mientras que cuando éstos se reducen a sus componentes principales las diferencias se trasladan al tipo de movimiento.

El análisis de los parámetros morfométricos nos llevó a las mismas conclusiones que el análisis cinemático. Entre el grupo N y el resto de grupos no se observaron las diferencias que cabía esperar al analizar las variables tanto de forma individual como reducidas a sus componentes principales. Estas diferencias se observaron entre algunos parámetros de la cabeza según el criterio más estricto (WHO, 1999), aunque la mayoría de ellas se manifestaron entre los parámetros de la pieza intermedia para uno y otro criterio (WHO, 1992 y 1999). Las diferencias más significativas, se dieron en la anchura y área de la pieza intermedia, incrementándose los valores de estos parámetros en el grupo TAO. Ésto puede tener una explicación, cuando la espermiogénesis se ve alterada los espermatozoides que son liberados del epitelio de

los túbulos seminíferos, retienen mayores cantidades de citoplasma residual. Esta retención de citoplasma se manifestaría en el incremento observado de anchura y área de la pieza intermedia, lo que dificultaría el desplazamiento del espermatozoide. Por otra parte, en estas condiciones, se produce más glucosa-6-fosfato deshidrogenasa con capacidad de producir suficiente NADPH para dirigir la síntesis de mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno (anión superóxido) (Huszar y Vigue, 1994; Gomez *et al.*, 1996). Además, las especies reactivas de oxígeno, en concreto el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Aitken *et al.*, 1992; De Lamirande y Gagnon, 1992; Griveau *et al.*, 1995) generado por el sistema oxidasa de los espermatozoides ataca a los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana plasmática, iniciándose una cascada de peroxidación lipídica (Jones *et al.*, 1979; Storey, 1997). Este daño oxidativo de la membrana plasmática lleva a una pérdida de la fluidez e integridad de la misma, perjudicando su capacidad de fecundar al ovocito (Aitken y Fisher, 1994; Alvarez y Storey, 1995; Storey, 1997).

Cuando comparamos las componentes principales morfométricas en los dos diagnósticos las diferencias entre el grupo N y T se mostraron en la componente "Pieza intermedia". Probablemente, el grupo de N no muestra las diferencias que cabría esperar con el resto de grupos patológicos, porque el criterio subjetivo no nos permite discriminar espermatozoides que se encuentren muy al límite de uno u otro grupo de diagnóstico.

Finalmente el análisis integrado de las componentes principales morfométricas y cinemáticas entre los grupos de diagnóstico, mostró que la componente "Forma de la cabeza" era estadísticamente diferente entre el grupo N y T, mientras que las componentes "Velocidades" y "Pieza intermedia" diferían entre el grupo de N y TAO. Parece ser que al considerar conjuntamente las componentes morfométricas y cinemáticas, las características de la pieza intermedia son las que más afectan a la velocidad del desplazamiento de los espermatozoides. Como ya hemos mencionado anteriormente, es posible, que una espermiogénesis alterada provoque la retención de citoplasma en la pieza intermedia y se genere suficiente NADPH como para producir

mayores cantidades de especies reactivas de oxígeno que afecten a la velocidad de los espermatozoides. Estos resultados coinciden con los de otros autores (Katz *et al.*, 1982) que observaron a los espermatozoides morfológicamente normales nadar más rápidos y rectilíneos que los anormales; siendo estas diferencias más pronunciadas para espermatozoides con cabeza *tapering* piriforme o elongada o pieza intermedia amorfa (excesivo citoplasma o con ángulo anormal entre los ejes de la cabeza y la pieza intermedia). Otra posible línea de explicación, se referiría al hecho de que los espermatozoides mantuvieran un número reducido de mitocondrias, que pudieran proporcionar la suficiente energía para conservar el metabolismo basal y mantener al espermatozoide vivo, pero no la suficiente como para conservar la actividad del flagelo. La presencia de abundantes mitocondrias libres en las gotas citoplasmáticas de los espermatozoides inmaduros de ciertos individuos hace pensar que durante la espermiogénesis, las mitocondrias se pierden con la liberación del citoplasma residual (Moore y Reijo-Pera, 2000). Algunos trabajos, también han sugerido una correlación entre el volumen mitocondrial y la longitud espermática y frecuencia de batida flagelar (Cardullo y Baltz, 1991).

4.6. COMENTARIOS FINALES

Como ya hemos indicado, han sido diversos los parámetros espermáticos humanos que han mostrado cierta capacidad predictiva respecto de la capacidad fecundante del semen. Ahora bien, la mayoría de los estudios se han centrado en parámetros aislados sin realizar una valoración global. Este hecho, unido a la gran variabilidad inter-laboratorio, hace que las conclusiones finales sean poco sólidas. De todo lo expuesto, cabe señalar que para diagnosticar una muestra seminal se requiere del estudio integrado de las componentes cinemáticas y morfométricas de los espermatozoides. En un trabajo previo, pusimos de manifiesto que el análisis convencional también podía reducirse a componentes principales. Después de considerar un conjunto de 12 variables, obtuvimos el mejor resultado al excluir el test de la eosina y el número de células redondas, obteniendo una explicación total de la

varianza de más del 80%. Las componentes obtenidas se denominaron “movilidad” (los tres grados de movilidad, más defectos de pieza y cola), “morfología” (% de normalidad, más defectos de cabeza y pieza), “funcionalidad” (Host, más defectos de pieza y cola) y “recuento” (volumen más concentración) (Soler *et al.*, 2000). Igualmente, Marnet *et al.* (2000) postularon que la capacidad fecundante de los espermatozoides se debería determinar a través de un estudio multiparamétrico de movilidad, morfología y función acrosómica. En el presente trabajo hemos incidido en este tipo de aproximación, aunando y simplificando la información aportada por el SCA[®]. Ahora bien, el significado real del presente estudio sólo se tendrá cuando se comience a aplicar el conjunto de conocimientos aquí desarrollados en el campo de la clínica, lo que puede conducir, al menos así lo esperamos, a la definición de nuevos parámetros diagnósticos más potentes y precisos.

CONCLUSIONES

- Las condiciones de análisis óptimas para la valoración de la movilidad espermática mediante el SCA[®] versión 5.1 combinan la muestra sin diluir, con contraste de fase negativo y a 20x.
- El uso del SCA[®] se puede considerar validado, en el contexto del laboratorio clínico humano, para el análisis automático de la movilidad y morfología espermática en las condiciones utilizadas.
- Todos los parámetros aportados por el sistema han puesto de manifiesto su importancia en la definición de la cinemática y morfometría espermáticas por lo que su inclusión en el análisis resulta imprescindible.
- Se ha comprobado que los parámetros morfométricos responsables del desplazamiento del espermatozoide son aquellos relacionados con la pieza intermedia y su inserción en la cabeza; su alteración es causa de extrema astenozoospermia o total inmovilidad.
- Por su parte, la calidad del movimiento y, especialmente la linealidad del desplazamiento, se ve afectada de forma positiva por incrementos en la elipticidad y elongación y negativamente con los correspondientes a la rugosidad de la cabeza.
- La reducción del conjunto de parámetros aportados por el SCA[®] a cinco componentes principales permite sintetizarlos, abriendo las puertas a una comprensión integrada de las características espermáticas, introduciendo criterios mucho más robustos en la valoración seminal que la valoración individualizada de dichos parámetros.
- Los criterios diagnósticos seguidos hasta ahora por parte de la OMS no se ajustan a la valoración cuantitativa de la que ahora se dispone. Por ello, el trabajo futuro debe centrarse en el establecimiento de nuevos criterios.

REFERENCIAS

- Aanesen, A. and Bendvold, E., (1989) The CellSoft computerized semen analysis system. I. Consistency of measurements and stability of results in relation to sample size analyzed. *Andrologia*, **21**: 559-567.
- Acott, T. S. and Hoskins, D. D., (1978) Bovine sperm forward motility protein. Partial purification and characterization. *J Biol Chem*, **253**: 6744-6750.
- Acott, T. S. and Hoskins, D. D., (1981) Bovine sperm forward motility protein: binding to epididymal spermatozoa. *Biol Reprod*, **24**: 234-240.
- Afzelius, B. A., (1976) A human syndrome caused by immotile cilia. *Science*, **193**: 317-319.
- Afzelius, B. A., Dallai, R., Lanzavecchia, S. and Bellon, P. L., (1995) Flagellar structure in normal human spermatozoa and in spermatozoa that lack dynein arms. *Tissue Cell*, **27**: 241-247.
- Aitken, R. J., Warner, P. and Reid, C., (1986) Factors influencing the success of sperm-cervical mucus interaction in patients exhibiting unexplained infertility. *J Androl*, **7**: 3-10.
- Aitken, R. J., Buckingham, D., West, K. M., Wu, F. C., Zikopoulos, K. and Richardson, D. W., (1992) Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *J Reprod Fertil*, **94**: 451-462.
- Aitken, R. J. and Fisher, H., (1994) Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioassays*, **16**: 259-267.
- Albert, B., (1994) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York and London.
- Alvarez, J. G. and Storey, B., (1995) Differential incorporation of fatty acids in peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, **42**: 334-336.
- Amelar, R. D., Dubin, L. and Schoenfeld, C. Y., (1980) Sperm motility. *Fertil Steril*, **34**: 197-215.

- Anderson, R. A., Irvine, D. S., Balfour, C., Groome, N. P. and Riley, S. C., (1998) Inhibin B in seminal plasma: testicular origin and relationship to spermatogenesis. *Hum Reprod*, **13**: 920-926.
- Anderson, R. A., (2001) Clinical studies: inhibin in the adult male. *Mol Cell Endocrinol*, **180**: 109-116.
- Aribarg, A. and Sukcharoen, N., (1995) Intrauterine insemination of washed spermatozoa for treatment of oligozoospermia. *Int J Androl Suppl*, **1**: 62-66.
- Aveldaño, M. I., Rotstein, N. P. and Vermouth, N. T., (1992) Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmenylcholines containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-9 series. *Biochem J*, **1**: 235-241.
- Aziz, N., Fear, S., Taylor, A., Kingsland, C. R. and Lewis-Jones, I., (1998) Human sperm head morphometric distribution and its influence on human fertility. *Fertil Steril*, **70**: 883-891.
- Baas, J. W., Molan, P. C. and Shannon, P., (1983) Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *J Reprod Fertil*, **68**: 275-280.
- Baccetti, B., Burrini, A. G., Collodel, G., Magnano, A. R., Piomboni, P., Renieri, T. and Sensini, C., (1989) Morphogenesis of the decapitated and decaudated sperm defect in two brothers. *Gamete Res*, **23**: 181-188.
- Baccetti, B., Burrini, A. G., Collodel, G., Piomboni, P. and Renieri, T., (1991) A "miniacrosome" sperm defect causing infertility in two brothers. *J Androl*, **12**: 104-111.
- Baccetti, B., Capitani, S., Collodel, G., Strehler, E. and Piomboni, P., (2002) Recent advances in human sperm pathology. *Contraception*, **65**: 283-287.
- Bahr, G. F. and Engler, W. F., (1970) Considerations of volume, mass, DNA, and arrangement of mitochondria in the midpiece of bull spermatozoa. *Exp Cell Res*, **60**: 338-40.

- Bains, H. K., Pabst, M. A. and Bawa, S. R., (1993) Changes in the lectin binding sites on the testicular, epididymal, vas, and ejaculated spermatozoon surface of dog. *Andrologia*, **25**: 19-24.
- Barlow, P., Delvigne, A., Van Dromme, J., Van Hoeck, J., Vandebosch, K. and Leroy, F., (1991) Predictive value sperm of classical and automated sperm analysis for *in vitro* fertilization. *Human Reprod*, **6**: 1119-1124.
- Barratt, C. L. R., Tomlinson, M. J. and Cook, I. D., (1993) Prognostic significance of computerized motility analysis for *in vivo* fertility. *Fertil Steril*, **60**: 520-525.
- Barratt, C. L., Naeeni, M., Clements, S. and Cooke, I. D., (1995) Clinical value of sperm morphology for *in-vivo* fertility: comparison between World Health Organization criteria of 1987 and 1992. *Hum Reprod*, **10**: 587-593.
- Bartoov, B., Eltes, F., Pansky, M., Lederman, H., Caspi, E. and Soffer, Y., (1993) Estimating fertility potential via semen analysis data. *Hum Reprod*, **8**: 65-70.
- Bartoov, B., Eltes, F., Pansky, M., Langzam, J., Reichart, M. and Soffer, Y., (1994) Improved diagnosis of male fertility potential via a combination of quantitative ultramorphology and routine semen analyses. *Hum Reprod*, **9**: 2069-2075.
- Battaglia, D. E., Koehler, J. K., Klein, N. A. and Tucker, M. J., (1997) Failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection using round-head sperm. *Fertil Steril*, **68**: 118-122.
- Bedford, J. M., (1967) Effects of duct ligation of the fertilizing ability of spermatozoa from different regions of the rabbit epididymis. *J Exp Zool*, **166**: 271-282.
- Bedford, J. M. and Nicander, L., (1971) Ultrastructural changes in the acrosome and sperm membranes during maturation of spermatozoa in the testis and epididymis of the rabbit and monkey. *J Anat*, **108**: 527-43.
- Bedford, J. M. (1979) Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis., En: *The spermatozoon*, Fawcett, D. W. and Bedford, J. M. Urban & Schwarzenberg, Baltimore.

- Bedford, J. M. and Hoskins, D. D. (1990) Reproduction in the male, En: Physiology of Reproduction, Lamming, G. E.
- Bedford, J. M., (1994) The status and the state of the human epididymis. *Hum Reprod*, **9**: 2187-2199.
- Berkovitz, A., Eltes, F., Soffer, Y., Zabludovsky, N., Beyth, Y., Farhi, J., Levran, D. and Bartoov, B., (1999) ART success and in vivo sperm cell selection depend on the ultramorphological status of spermatozoa. *Andrologia*, **31**: 1-8.
- Bhattacharyya, A. K. and Zaneveld, L. J. (1982) The sperm head., En: *Biochemistry of mammalian reproduction. I. Gametes and genital tract fluids.*, Zaneveld, L. J. and Chatterton, R. T. Wiley & Sons Inc., New York.
- Blandau, R. J. and Gaddum-Rosse, P., (1974) Mechanism of sperm transport in pig oviducts. *Fertil Steril*, **25**: 61-67.
- Bloom, E. T. and Birch Andersen, A., (1970) Ultrastructure of the "decapitated sperm defect" in Guernsey bulls. *J Reprod Fertil*, **23**: 67-72.
- Bollendorf, A., Check, J. H. and Lurie, D., (1996) Evaluation of the effect of the absence of sperm with rapid and linear progressive motility on subsequent pregnancy rates following intrauterine. *J Androl*, **17**: 550-557.
- Bonduelle, M., Van Assche, E., Joris, H., Keymolen, K., Devroey, P., Van Steirteghem, A. C. and Liebaers, I., (2002) Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod*, **17**: 2600-2614.
- Bonet, S., Briz, M., Fradera, A. and Egozcue, J., (1992) Origin, development and ultrastructure of boar spermatozoa with folded tails and with two tails. *Hum Reprod*, **7**: 523-528.
- Boue, F., Duquenne, C., Lassalle, B., Lefevre, A. and Finaz, C., (1995) FLB1, a human protein of epididymal origin that is involved in the sperm-oocyte recognition process. *Biol Reprod*, **52**: 267-278.

- Bourne, H., Liu, D. Y., Clarke, G. N. and Baker, H. W., (1995) Normal fertilization and embryo development by intracytoplasmic sperm injection of round-headed acrosomeless sperm.
- Brandt, H., Acott, T. S., Johnson, D. J. and Hoskins, D. D., (1978) Evidence for an epididymal origin of bovine sperm forward motility protein. *Biol Reprod*, **19**: 830-835.
- Briz, M. D., Bonet, S., Pinart, B., Egozcue, J. and Camps, R., (1995) Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. *J Androl*, **16**: 175-188.
- Brown, C. R., von Glos, K. I. and Jones, R., (1983) Changes in plasma membrane glycoproteins of rat spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Cell Biol*, **96**: 256-64.
- Burgos, M. H. and Tovar, E. S., (1974) Sperm motility in the rat epididymis. *Fertil Steril*, **25**: 985-991.
- Burkman, L. J., (1984) Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligozoospermic sperm populations. *Arch Androl*, **13**: 153-165.
- Burkman, L. J., (1991) Discrimination between nonhyperactivated and classical hyperactivated motility patterns in human spermatozoa using computerized analysis. *Fertil Steril*, **55**: 363-371.
- Cancel, A. M., Lobdell, D., Mendola, P. and Perreault, S. D., (2000) Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. *Hum Reprod*, **15**: 1322-1328.
- Cardullo, R. A. and Baltz, J. M., (1991) Metabolic regulation in mammalian sperm: mitochondrial volume determines spermlength and flagellar beat frequency. *Cell Motil Cytoskel*, **19**: 180-188.
- Chan, S., Wang, C., Chan, S., Ho, P. and So, W., (1989) Predictive value sperm morphology and movement characteristics in the outcome of *in vitro* fertilization of human oocytes. *J In Vitro Fert Embryo Transfer*, **6**: 142-148.

- Chatterjee, J., De, K., Basu, S. K. and Das, A. K., (1994) Alteration of spermatozoal structure and trace metal profile of testis and epididymis of rat under chronic low-level x-ray irradiation. *Biol Trace Elem Res*, **41**: 305-319.
- Check, J. H., Kozak, J. and Katsoff, D., (1993) Hypoosmotic swelling: evaluation of sperm tails using strict criteria in cases of globozoospermia. *Arch Androl*, **30**: 125-128.
- Chemes, H. E., Carizza, C., Scarinci, F., Brugo, S., Neuspiller, N. and Schwarsztein, L., (1987) Lack of a head in human spermatozoa from sterile patients: a syndrome associated with impaired fertilization. *Fertil Steril*, **47**: 310-316.
- Chemes, H. E., Brugo, S., Carrere, C., Oses, R., Carizza, C., Leisner, M. and Blaquier, J. A., (1998) Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men. *Hum Reprod*, **13**: 2521-2526.
- Chemes, H. E., Puigdomenech, E. T., Carizza, C., Olmedo, S. B., Zanchetti, F. and Hermes, R., (1999) Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head-neck attachment: a human syndrome of genetic origin. *Hum Reprod*, **14**: 1811-1818.
- Chistensen, K., (1975) *Handbook of Physiology*. Wilkins, Baltimore.
- Coetzee, K., Kruger, T. F. and Lombard, C. J., (1998) Predictive value of normal sperm morphology: A structure literature review. *Hum Reprod Update*, **4**:73-82.
- Cooper, T. G., (1986) *The epididymis, sperm maturation and fertilisation*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Cooper, T. G., Neuwinger, J., Bahrs, S. and Nieschlag, E., (1992) Internal quality control of semen analysis. *Fertil Steril*, **58**: 172-178.
- Cooper, T.G.,(1993)The human epididymis-is it necessary? *Int J Androl*, **16**:245-300.
- Cooper, T. G., Atkinson, A. D. and Nieschlag, E., (1999) Experience with external quality control in spermatology. *Hum Reprod*, **14**: 765-769.

- Cooper, T. G., Bjorndahl, L., Vreeburg, J. and Nieschlag, E., (2002) Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. *Int J Androl*, **25**: 306-311.
- Cortes, D., Müller, J. and Skakeback, N. E., (1987) Proliferación of Sertoli cells during development of the human testis assessed by sterological methods. *Int J Androl*, **10**: 589-596.
- Critoph, F. N. and Dennis, K. J., (1977) Ciliary activity in the human oviduct. *Obstet Gynecol Surv*, **32**: 602-603.
- Cuasnicu, P. S., Gonzalez Echeverria, F., Piazza, A. D., Cameo, M. S. and Blaquier, J. A., (1984) Antibodies against epididymal glycoproteins block fertilizing ability in rat. *J Reprod Fertil*, **72**: 467-471.
- Cummins, J. M. and Woodwall, P. F., (1985) On mammals sperm dimensions. *J Reprod Fertil*, **75**: 153-175.
- Dacheux, J. L., O'Shea, T. and Paquignon, M., (1979) Effects of osmolality, bicarbonate and buffer on the metabolism and motility of testicular, epididymal and ejaculated spermatozoa of boars. *J Reprod Fertil*, **55**: 287-296.
- Dacheux, J. J., Chevrier, C., Dacheux, F., Jeulin, C., Gatti, J. L., Pariset, C. and Paquignon, M. (1990) Sperm biochemical changes during epididymal maturation, En: *Gamete Interaction: Prospects for immunocontraception*, Alexander, N. J., Griffin, D., Spieler, J. M. and Waites, G. M. H. Wiley-Liss, Inc., New York.
- Dadoune, J. P., (1988) Ultrastructural abnormalities of human spermatozoa. *Hum Reprod*, **3**: 311-318.
- Darin-Bennett, A. and White, I. G., (1977) Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold shock. *Cryobiology*, **14**: 466-470.
- Davis, R. O., Serres, R. J. and Jouannet, P., (1981) Kinematics of human spermatozoa. *Gamete Res*, **4**: 83-95.

- Davis, R. O. and Katz, D. F., (1989) Computer-aided sperm analysis (CASA): image digitization and processing. *Biomater Artif Cells Artif Organs*, **17**: 93-116.
- Davis, R. O. and Boyers, S. P., (1992) The role of digital image analysis in reproductive biology and medicine. *Arch Pathol Lab Med*, **116**: 351-363.
- Davis, R. O. and Katz, D. F., (1992) Standardization and comparability of CASA instruments. *J Androl*, **13**: 81-86.
- Davis, R. O., Bain, D. E., Siemers, R. J., Thal, D. M., Andrew, J. B. and Gravance, C. G., (1992) Accuracy and precision of the CellForm-Human automated sperm morphometry instrument. *Fertil Steril*, **58**: 763-769.
- Davis, R. O. and Katz, D. F., (1993) Operational standards for CASA instruments. *J Androl*, **14**: 385-394.
- Davis, R. O. and Gravance, C. G., (1994) Consistency of sperm morphology classification methods. *J Androl*, **15**: 83-91.
- Davis, R. O., Gravance, C. G. and Overstreet, J. W., (1995) A standardized test for visual analysis of human sperm morphology. *Fertil Steril*, **63**: 1058-63.
- De Lamirande, E. and Gagnon, C., (1992) Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl*, **13**: 368-378.
- De Rosas, J. C. and Burgos, M. H., (1987) Epididymal transit and morphology of the hamster sperm head. *Microsc Electron Biol Celular*, **11**: 67-79.
- Donnelly, E. T., Lewis, S. E., McNally, J. A. and Thompson, W., (1998) In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil Steril*, **70**: 305-314.
- du Toit, D., Bornman, M. S., Fourie, M. H., Aneck-Hahn, N. H. and Pitout, M. J., (1998) Sialic acid in semen of normozoospermic men. *Arch Androl*, **41**: 97-101.
- Duncan, W. W., Glew, M. J., Wang, X. J., Flaherty, S. P. and Matthews, C. D., (1993) Prediction of in vitro fertilization rates from semen variables. *Fertil Steril*, **59**: 1233-1238.

- Eccleston, E. D., White, T. W., Howard, J. B. and Hamilton, D. W., (1994) Characterization of a cell surface glycoprotein associated with maturation of rat spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, **37**: 110-119.
- Eddy, E. M. and O'Brien, D. A. (1988) The spermatozoon., En: *The Physiology of Reproduction*, Knobil, E., Neill, J. D., Greenwald, G. S. and Markert, C. L. Raven Press, Ltd., New York.
- Edwards, D. F., Kennedy, J. R., Patton, C. S., Toal, R. L., Daniel, G. B. and Lothrop, C. D., (1989) Familial immotile-cilia syndrome in English springer spaniel dogs. *Am J Med Genet*, **33**: 290-298.
- Eggert-Kruse, W., Schwarz, H., Rohr, G., Demiraka, T., Tilgen, W. and Runnebaum, B., (1996) Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under in-vivo conditions of conception. *Human Reprod*, **11**: 139-146.
- Ekwall, H., Jansson, A., Sjöberg, P. and Polen, L., (1984) Differentiation of the rat testis between 20 and 120 days of age. *Arch Androl*, **13**: 27-36.
- Farrell, P. B., Foote, R. H., McArdle, M. M., Trouern-Trend, V. L. and Tardif, A. L., (1996) Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *J Androl*, **17**: 293-300.
- Fawcett, D. W. and Hollenberg, R. D., (1963) Changes in the acrosome of ginea-pig during pasaje through the epididymis. *Z Zellforsch Mikr Anat*, **60**: 276-292.
- Foote, R. H., Hough, S. R., Johnson, L. A. and Kaproth, M., (1992) Electron microscopy and pedigree study in an Ayrshire bull with tail-stump sperm defects. *Vet Rec*, **130**: 578-579.
- Ford, W. C. L. and Rees, J. M. (1990) The bioenergetics of mammalian sperm motility., En: *Controls of sperm motility: Biological and clinical aspects.*, Gagnon, C. CRC Press., Boca Raton.
- Ford, W. C., Whittington, K. and Williams, A. C., (1997) Reactive oxygen species in human sperm suspensions: production of leukocytes and the generation of NADPH to protect sperm against their effects. *Int J Androl*, **20**: 44-49.

- Fornes, M. W. and De Rosas, J. C., (1989) Changes in the rat sperm head during epididymal transit. *Gamete Res*, **24**: 453-459.
- Fredricsson, B. and Sennerstam, R., (1984) Morphology of live seminal and postcoital cervical spermatozoa and its bearing on human fertility. *Acta Obstet Gynecol Scand*, **63**: 329-333.
- Fredricsson, B. and Bjork, G., (1977) Morphology of postcoital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance. *Fertil Steril*, **28**: 841-845.
- Friend, D. S., (1989) Sperm maturation: membrane domain boundaries. *Ann N Y Acad Sci*, **567**: 208-221.
- Gaddum, P., (1968) Sperm maturation in the male reproductive tract: development of motility. *Anat Rec*, **161**: 471-482.
- Gage, M. J. G., (1998) Mammalian sperm morphometry. *Proc R Soc Lond B*, **265**: 97-103.
- Gago, C., Pérez-Sánchez, F., Yeung, C., Tablado, L., Cooper, T. G. and Soler, C., (1998) Standardization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm heads using computer-assisted image analysis. *Int J Androl*, **21**: 169-176.
- Gago, C., Soler, C., Perez-Sanchez, F., Yeung, C. H. and Cooper, T. G., (2000) Effect of cetrorelix on sperm morphology during migration through the epididymis in the cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *Am J Primatol*, **51**: 103-117.
- Garabrant, D. H. and Philbert, M. A., (2002) Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) epidemiology and toxicology. *Crit Rev Toxicol*, **32**: 233-257.
- Garrett, C. and Baker, G., (1995) A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. *Fertil Steril*, **63**: 1306-1317.
- Gibbons, I. R. and Rowe, A. J., (1965) Dynein: a protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science*, **149**: 424.
- Gibbons, I. R., (1996) The role of dynein in microtubule-based motility. *Cell Struct Funct*, **21**: 331-342.

- Gilbert, S. F. (2000) Early embryonic development. Fertilization: Beginning a new organism. Structure of the gametes, En: *Developmental Biology*, Wigg, C. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts.
- Ginsburg, K. A. and Armant, D. R., (1990) The influence of chamber characteristics on the reliability of sperm concentration and movement measurements obtained by manual and videomicrographic analysis. *Fertil Steril*, **53**: 882-887.
- Girgis, S. M., Deinasury, M. K., El-Kodary, M., Metawy, B., Moussa, M. M., Momen, N. and Saleh, S. M., (1981) Diagnostic value of determination of acid and alkaline phosphatase levels in the seminal plasma of infertile males. *Andrologia*, **13**: 330-334.
- Glover, T. D., Barrat, C. L. R., Tyler, J. P. P. and Hennessey, J. F. (1990) Sperm production and its control, En: *Human Male Fertility and Semen Analysis*, Academic Press, London.
- Golan, R., Cooper, T. G., Oschry, Y., Oberpenning, F., Schulze, H., Shochat, L. and Lewin, L. M., (1996) Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. *Hum Reprod*, **11**: 1457-1462.
- Gómez, E., Buckingham, D. W., Brindle, J., Lazafame, F., Irvine, D. S. and Aitken, R. J., (1996) Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress and sperm function. *J Androl*, **17**: 276-287.
- Gravance, C. G. and Davis, R. O., (1995) Automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbit. *J Androl*, **16**: 88-93.
- Griveau, J. F., Dumont, E., Renard, P. and Le Lannou, D., (1995) Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil*, **103**: 17-26.
- Grow, D. R., Oehninger, S., Seltman, H. J., Toner, J. P., Swanson, R. J., Kruger, T. F. and Muasher, S. J., (1994) Sperm morphology as diagnosed by strict criteria:

- probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large in vitro fertilization population. *Fertil Steril*, **62**: 559-567.
- Haidl, G., Badura, B., Hinsch, K. D., Ghyczy, M., Gareiss, J. and Schill, W. B., (1993) Disturbances of sperm flagella due to failure of epididymal maturation and their possible relationship to phospholipids. *Hum Reprod*, **8**: 1070-1073.
- Haidl, G., Badura, B. and Schill, W. B., (1994) Function of human epididymal spermatozoa. *J Androl*, **15**, Suppl: 23S-27S.
- Hammerstedt, R. H., Keith, A. D., Hay, S., Deluca, N. and Amann, R. P., (1979) Changes in ram sperm membranes during epididymal transit. *Arch Biochem Biophys*, **196**: 7-12.
- Hammerstedt, R. H. and Parks, J. E., (1987) Changes in sperm surfaces associated with epididymal transit. *J Reprod Fertil*, Suppl **34**: 133-149.
- Hancock, A. D. and de Kretser, D. M., (1992) The axonemal ultrastructure of spermatozoa from men with asthenospermia. *Fertil Steril*, **57**: 661-664.
- Hanson, F. W. and Overstreet, J. W., (1981) The interaction of human spermatozoa with cervical mucus in vivo. *Am J Obstet Gynecol*, **1140**: 173-178.
- Hartmann, G. G., Schoenfeld, C. and Copeland, E., (1964) Individualism in the seminal picture of infertile men. *Fertil Steril*, **15**: 231-253.
- Hauser, R., Yogev, L., Botchan, A., Lessing, J. B., Paz, G. and Yavetz, H., (2001) Intrauterine insemination in male factor subfertility: significance of sperm motility and morphology assessed by strict criteria. *Andrologia*, **33**: 13-17.
- Hemeida, N. A., Sack, W. O. and McEntee, K., (1978) Ductuli efferentes in the epididymis of boar, goat, ram, bull and stallion. *Am J Vet Res*, 1832-1900.
- Henderson, N. E., (1962) The annual cycle in the testis of the eastern brook trout, *Salvelinus fontinalis mitchill*. *Can J Zool*, **40**: 631-641.
- Hermo, L., Barin, K. and Oko, R., (1994) Developmental expression of immobilin in the rat epididymis. *Anat Rec*, **240**: 86-103.

- Hinting, A., Comhaire, F. and Schoonjans, F., (1988) Capacity of objectively assessed sperm motility characteristics in differentiating between semen of fertile and subfertile men. *Fertil Steril*, **50**: 635-639.
- Hinting, A., Comhaire, F., Vermeulen, L., Dhont, M., Vermeulen, A. and Vandekerckhove, D., (1990) Value of sperm characteristics and the result in-vitro fertilization for predicting the outcome of assisted reproduction. *Int J Androl*, **13**: 59-66.
- Hinton, B. T., Brooks, D. E., Dott, H. M. and Setchell, B. P., (1981) Effects of carnitine and some related compounds on the motility of rat spermatozoa from the caput epididymidis. *J Reprod Fertil*, **61**: 59-64.
- Hirano, Y., Shibahara, H., Obara, H., Suzuki, T., Takamizawa, S., Yamaguchi, C., Tsunoda, H. and Sato, I., (2001) Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *J Assist Reprod Genet*, **18**: 213-218.
- Holland-Moritz, H. and Krause, W., (1992) Semen analysis and fertility prognosis in andrological patients. *Int J Androl*, **15**: 473-484.
- Holmes, R. P., Goodman, H. O., Shihabi, Z. K. and Jarow, J. P., (1992) The taurine and hypotaurine content of human semen. *J Androl*, **13**: 289-92.
- Holt, W. V., (1982) Functional development of the mammalian sperm plasma membrane. *Oxford Rev Reprod Biol*, **4**: 195-240.
- Holt, W. V., Watson, P., Curry, M. and Holt, C., (1994) Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil Steril*, **62**: 1277-1282.
- Holt, W. V. and Palomo, M. J., (1996) Optimization of a continuous real-time computerized semen analysis system for ram sperm motility assessment, and evaluation of four methods of semen preparation. *Reprod Fertil Dev*, **8**: 219-230.

- Huszar, G. and Vigue, L., (1994) Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. *J Androl*, **15**: 71-77.
- Imade, G. E., Towobola, O. A., Sagay, A. S. and Otubu, J. A., (1993) Discrepancies in sperm count using improved Neubauer, Makler, and Horwells counting chambers. *Arch Androl*, **31**: 17-22.
- Inskeep, P. B. and Hammerstedt, R. H., (1982) Changes in metabolism of ram sperm associated with epididymal transit or induced by exogenous carnitine. *Biol Reprod*, **27**: 735-743.
- Irvine, D. S. and Aitken, R. J., (1994) Seminal fluid analysis and sperm function testing. *Clinical Andrology*, **23**: 725-748.
- Irvine, D. S., Macleod, I. C., Templeton, A. A., Masterton, A. and Taylor, A., (1994) A prospective clinical study of the relationship between the computer-assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy *in vivo*. *Human Reprod*, **9**: 2324-2334.
- Ishijima, S., Oshio, S. and Mohri, H., (1986) Flagellar movement of human spermatozoa. *Gamete Res*, **13**: 185-197.
- Jagoe, J. R., Washbrook, N. P. and Hudson, E. A., (1986) Morphometry of spermatozoa using semiautomatic image analysis. *J Clin Pathol*, **39**: 1347-1352.
- Jaiswal, B. S. and Majumder, G. C., (1996) Cyclic AMP phosphodiesterase: a regulator of forward motility initiation during epididymal sperm maturation. *Biochem Cell Biol*, **74**: 669-674.
- Jakob, C. G., Lewinski, K., Kuciel, R., Ostrowski, W. and Lebioda, L., (2000) Crystal structure of human prostatic acid phosphatase. *Prostate*, **42**: 211-218.
- Janick, J. and MacLeod, J., (1970) The measurement of human spermatozoan motility. *Fertil Steril*, **21**: 140-146.
- Jegou, B. and Legac-Jegou, F., (1978) Androgen-binding protein in the seminal plasma of some mammalian species. *J Endocr*, **77**: 267-268.

- Jeulin, C., Dacheux, J. L. and Soufir, J. C., (1994) Uptake and release of free L-carnitine by boar epididymal spermatozoa in vitro and subsequent acetylation rate. *J Reprod Fertil*, **100**: 263-271.
- Jeulin, C. and Lewin, L. M., (1996) Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Hum Reprod Update*, **2**: 87-102.
- Jiang, F. X., Temple-Smith, P. D. and Wreford, N. G., (1994) Postnatal differentiation and development of the rat epididymis: a stereological study. *Anat Rec*, **238**: 191-198.
- Jones, R., Mann, T. and Sherins, R., (1979) Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril*, **31**: 531-537.
- Jones, R., von Glos, K. I. and Brown, C. R., (1983) Changes in the protein composition of rat spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fert*, **67**: 299-306
- Jones, R., (1998) Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fert Suppl*, **53**: 73-84.
- Joshi, N., Kodwany, G., Balaiah, D., Parikh, M. and Parikh, F., (1996) The importance of computer-assisted semen analysis and sperm function testing in an IVF program. *Int J Fertil Menopausal Stud*, **41**: 46-52.
- Jouannet, P., Volochine, B., Deguent, P., Serres, C. and David, G., (1977) Light scattering determination of various characteristic parameters of spermatozoa motility in a series of human sperm. *Andrologia*, **9**: 36-49.
- Jouannet, P., Ducot, B., Feneux, D. and Spira, A., (1988) Male factors and likelihood of pregnancy in infertile couples: I study of sperm characteristics. *Int J Androl*, **11**: 379-394.
- Kahraman, S., Akarsu, C., Cengiz, G., Dirican, K., Sozen, E., Can, B., Guven, C. and Vanderzwalmen, P., (1999) Fertility of ejaculated and testicular megalohed spermatozoa with intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod*, **14**: 726-730.

- Kao, S., Chao, H. T. and Wei, Y. H., (1995) Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm. *Biol Reprod*, **52**: 729-736.
- Kao, S. H., Chao, H. T. and Wei, Y. H., (1998) Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, **4**: 657-666.
- Karabinus, D. S. and Gelety, T. J., (1997) The impact of sperm morphology evaluated by strict criteria on intrauterine insemination success. *Fertil Steril*, **67**: 536-541.
- Karow, A. M., Gilbert, W. B. and Black, J. B., (1992) Effects of temperature, potassium concentration, and sugar on human spermatozoa motility: a cell preservation model from reproductive medicine. *Cryobiology*, **29**: 250-254.
- Kasai, T., Ogawa, K., Mizuno, K., Nagai, S., Uchida, Y., Ohta, S., Fujie, M., Suzuki, K., Hirata, S. and Hoshi, K., (2002) Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J Androl*, **4**: 97-103.
- Katz, D. F. and Overstreet, J. W., (1981) Sperm motility assessment by videomicrography. *Fertil Steril*, **35**: 188-193.
- Katz, D. F., Diel, L. and Overstreet, J. W., (1982) Differences in the movement of morphologically normal and abnormal human seminal spermatozoa. *Biol Reprod*, **26**: 566-570.
- Katz, D. F., Overstreet, J. W., Samuels, S. J., Niswander, P. W., Bloom, T. D. and Lewis, E. L., (1986) Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *J Androl*, **7**: 203-210.
- Kaur, R. and Prashad, V. R., (1994) Effects of dietary selenium on differentiation, morphology and functions of spermatozoa of the house rat, *Rattus rattus*. *L Mutat Res*, **309**: 29-35.

- King, L. M., Holsberger, D. R. and Donoghue, A. M., (2000) Correlation of CASA velocity and linearity parameters with sperm mobility phenotype in turkeys. *J Androl*, **21**: 65-71
- Kosower, N. S., Katayose, H. and Yanagimachi, R., (1992) Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl*, **13**: 342-348.
- Kraemer, M., Fillion, C., Martin-Pont, B. and Auger, J., (1998) Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Human Reprod*, **13**: 611-619.
- Krause, W., (1995) Computer-assisted semen analysis systems: comparison with routine evaluation and prognostic value in males fertility and assisted reproduction. *Hum Reprod*, **10**: 60-66.
- Kruger, T. F., Menkweld, R., Stander, F. S. H. and Lombard, C. J., (1986) Sperm morphological features as a prognostic factor in IVF. *Fertil Steril*, **46**: 1118-1123.
- Kruger, T. F., Acosta, A. A., Simmons, K. F., Swanson, R. J., Matta, J. F., Veeck, L. L., Morshedi, M. and Brugo, S., (1987) New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. *Urology*, **30**: 248.
- Kruger, T. F., Acosta, A. A., Simons, K. F., Swanson, R. J., Matta, J. F. and Oehninger, S., (1988a) Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, **49**: 112-117.
- Kruger, T. F., Haque, D. and Acosta, A. A., (1988b) Correlation between sperm morphology, acrosin and fertilization in an IVF program. *Arch Androl*, **20**: 237-241.
- Kruger, T. F., Lacquet, F. A., Sanchez Sarmiento, C. A., Menkveld, R., Ozgor, K., Lombard, C. J. and Franken, D. R., (1996) A prospective study on the predictive value of normal sperm morphology as evaluated by computer (IVOS). *Fertil Steril*, **66**: 285-291.

- Küpker, W., Schulze, H. and Diedrich, K., (1998) Ultrastructure of gametes and intracytoplasmic sperm injection: the significance of sperm morphology. *Human Reprod*, **13**(suppl 1): 99-106.
- Larsen, L., Scheike, T., Jensen, T. K., Bonde, J. P., Ernst, E., Hjollund, N. H., Zhou, Y., Skakkebaek, N. E., Giwercman, A. and Team, T. D. F. P. P. S., (2000) Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Human Reprod*, **15**: 1562-1567.
- Le Lannou, D., Griveau, J. F., Le Pichon, J. P. and Quero, J. C., (1992) Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in semen or in capacitating medium. *Human Reprod*, **7**: 1417-1421.
- Leclerc, P. and Goupil, S., (2002) Regulation of the human sperm tyrosine kinase c-yes . activation by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and inhibition by Ca^{2+} . *Biol Reprod*, **67**: 301-307.
- Legault, Y., Bouthillier, M., Bleau, G., Chapdelaine, A. and Roberts, K. D., (1979) The sterol and sterol sulfate content of the males hamster reproductive tract. *Biol Reprod*, **20**: 1213-1219.
- Leib, Z., Bartoov, B., Eltes, F. and Servadio, C., (1994) Reduced semen quality caused by chronic abacterial prostatitis: an enigma or reality? *Fertil Steril*, **61**: 1109-1116.
- Lindemann, C. B. and Gibbons, B. H., (1975) Adenosine triphosphate-induced motility and sliding of filaments in mammalian sperm extracted with Triton X-100. *J Cell Biol*, **65**: 147-162.
- Lindemann, C. B. and Kanous, K. S., (1989) Regulation of mammalian sperm motility. *Arch Androl*, **23**: 1-22.
- Liu, D. Y., Clarke, G. N. and Baker, H. W., (1991) Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro. *J Androl*, **12**: 231-239.

- Liu, H. W., Lin, Y. C., Chao, C. F., Chang, S. Y. and Sun, G. H., (2000) GP-83 and GP-39, two glycoproteins secreted by human epididymis are conjugated to spermatozoa during maturation. *Mol Hum Reprod*, **6**: 422-428.
- Liu, J., Nagy, Z., Joris, H., Tournaye, H., Devroey, P. and Van Steirteghem, A., (1995) Successful fertilization and establishment of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection in patients with globozoospermia. *Hum Reprod*, **10**: 626-629.
- Liu, Y. T. and Warne, P. K., (1977) Computerized evaluation of sperm cell motility. *Comp Biomed Res*, **10**: 127-138.
- Mack, S. O., Wolf, D. P. and Tash, J. S., (1988) Quantitation of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. *Biol Reprod*, **38**: 270-281.
- Mack, S. O., Wolf, D. P. and Tash, J. S., (1989) Effect of measurement conditions on quantification of hyperactivated human sperm subpopulations by digital image analysis. *Biol Reprod*, **40**: 1162-1169.
- MacLeod, J. and Gold, R. Z., (1953) The male factor in fertility and infertility. VI. Semen quality and certain other factors in relation to ease of conception. *Fertil Steril*, **4**: 10-33.
- MacLeod, J., Rosemberg, E. and Paulsen, C. A. (1970) The significance of deviations in human sperm morphology., En: *The Human Testis*, Rosemberg, E. and Paulsen, C. A. Plenum Press, New York.
- MacLeod, I. C., Irvine, D. S., Masterton, A., Taylor, A. and Templeton, A. A., (1994) Assessment of the conventional criteria of semen quality by computer-assisted image analysis: evaluation of the Hamilton-Thorn motility analyser in the context of a service andrology laboratory. *Hum Reprod*, **9**: 310-319.
- Macomber, D. and Sanders, M. B., (1929) The spermatozoa count. Its value in the diagnosis, prognosis and treatment of sterility. *N Engl J Med*, **200**: 981.

- Mahadevan, M. M., Miller, J. E. and Moutos, D. M., (1977) Absence of glucose decreases human fertilization and sperm movement characteristic *in vitro*. *Hum Reprod*, **12**: 119-123.
- Mahmoud, A. M., Depoorter, B., Piens, N. and Comhaire, F. H., (1997) The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. *Fertil Steril*, **68**: 340-345.
- Mahony, M. C., Fan, Q., Cartwright, S. and Hodgen, G. D., (1994) Maturation antigens present in epididymis of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Am J Reprod Immunol*, **31**: 133-140.
- Makler, M. D., (1978) A new multiple exposure photography method for objective human spermatozoal motility determination. *Fertil Steril*, **30**: 192-199.
- Makler, A., (1980) The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil Steril*, **33**: 337-338.
- Maneely, R. B., (1959) Epididymal structure and function. A historical and critical review. *Acta Zool*, **40**: 1-21.
- Manicardi, G. C., Bianchi, P. G., Pantano, S., Azzoni, P., Bizzaro, D., Bianchi, U. and Sakkas, D., (1995) Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod*, **52**: 864-867.
- Manly, B. F. J., (1994) Multivariate statistical methods. Chapman & Hall, Madras, India.
- Mann, T. and Lutwak-Mann, C. (1981) Secretory function of the prostate, seminal vesicle, Copwer's gland and other accessory organs of reproduction., En: *Male reproductive function and semen.*, Sprin-Verlag, Berlin.
- Mansour, R. T., Aboulghar, M. A., Serour, G. I., Amin, Y. M. and Ramzi, A. M., (1995) The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, **64**: 982-986.
- Marmar, J. L., (2001) The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. *Hum Reprod Update*, **7**: 461-472.

- Marnet, B., Vieitez, G., Milhet, P., Richoilley, G., Lesourd, F. and Parinaud, J., (2000) Computer-assisted assessment of sperm morphology: comparison with conventional techniques. *Int J Androl*, **23**: 22-28.
- Mashiach, R., Fisch, B., Eltes, F., Tadir, Y., Ovadia, J. and Bartoov, B., (1992) The relationship between sperm ultrastructural features and fertilization capacity in vitro. *Fertil Steril*, **57**: 1052-1057.
- Mathur, S., Carlton, M., Ziegler, J., Rust, P. F. and Williamson, H. O., (1986) A computerized sperm motion analysis. *Fertil Steril*, **46**: 484.
- Maxwell, W. M. and Johnson, L. A., (1999) Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, **52**: 1353-1362.
- Menkveld, R., Stander, F. S. H., Katze, T. J. W., Kruger, T. F. and van Zyl, J. A., (1990) The evaluation of morphological characterization of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod*, **5**: 586-592.
- Menkveld, R., Otéele, E. E., Kruger, T. F., Swanson, R. J., Acosta, A. A. and Oehninger, S., (1991) *Atlas of Human Sperm Morphology*. Williams & Wilkins., Baltimor, Maryland, USA.
- Miller, J. E. and Smith, T. T., (2001) The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development *in vitro*. *Human Reprod*, **16**: 918-924.
- Milligan, M. P., Harris, S. and Dennis, K. J., (1980) Comparison of sperm velocity in fertile and infertile groups as measured by time-lapse photography. *Fertil Steril*, **34**: 509-511.
- Miranda, P. V. and Tezon, J. G., (1992) Characterization of fibronectin as a marker for human epididymal sperm maturation. *Mol Reprod Dev*, **33**: 443-450.
- Mooney, J. K. J., Horan, A. H. and Lattimer, J. K., (1972) Motility of spermatozoa in the human epididymis. *J Urol*, **108**: 443-445.
- Moore, G. D. and Reijo-Pera, R. A., (2000) Male sperm motility dictated by mother's mtDNA. *Am J Hum Genet*, **67**: 543-548.

- Morales, P., Katz, D. F., Overstreet, J. W., Samuels, S. J. and Chang, R. J., (1988) The relationship between the motility and morphology of spermatozoa in human semen. *J Androl*, **9**: 241-247.
- Morice, P., Josset, P., Chapron, C. and Dubuisson, J. B., (1995) History of infertility. *Hum Reprod Up*, **1**: 497-504.
- Mortimer, D., Pandya, I. J. and Sawers, R. S., (1986a) Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into cervical mucus *in vitro*. *J Reprod Fertil*, **78**: 93-102.
- Mortimer, D., Shu, M. A. and Tan, R., (1986b) Standardization and quality control of sperm concentration and sperm motility counts in semen analysis. *Hum Reprod*, **1**: 299.
- Mortimer, D., Curtis, E. F. and Ralson, A., (1988a) Semi-automated analysis of manually reconstructed tracks of progressively motile human spermatozoa. *Hum Reprod*, **3**: 303-309.
- Mortimer, D., Goel, N. and Shu, M. A., (1988b) Evaluation of CellSoft automated semen analysis system in a routine laboratory setting. *Fertil Steril*, **50**: 960-968.
- Mortimer, D., Serres, C., Mortimer, S. T. and Jouannet, P., (1988c) Influence of image sampling frequency on the perceived movement characteristics of progressively motile human spermatozoa. *Gamete Res*, **20**: 313-327.
- Mortimer, D., Aitken, R. J., Mortimer, S. T. and Pacey, A. A., (1995) Workshop report: Clinical CASA. The quest for consensus. *Reprod Fertil Dev*, **7**: 951-959.
- Mortimer, S. T. and Maxwell, W. M. C., (1999) Kinematic definition ram sperm hyperactivation. *Reprod Fertil Dev*, **11**: 25-30.
- Moruzzi, J. F., Wyrobek, A. J., Mayal, B. H. and Gledhill, B. L., (1988) Quantification and classification of human sperm morphology by computer-assisted image analysis. *Fertil Steril*, **50**: 142-152.
- Mundy, A. J., Ryder, T. A. and Edmonds, D. K., (1995) Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. *Hum Reprod*, **10**: 116-11.
- Nagy, Z., Liu, J., Joris, M., Verheyen, G., Tournaye, H., Camus, M., Derde, M. C., Devroey, P. and Van Steirteghem, A. C., (1995) The results of intracytoplasmic

- sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Human Reprod*, **10**: 1123-1129.
- Nagy, Z., (2000) Sperm centriole dysfunction and sperm immotility. *Mol Cell Endocrinol*, **166**: 59-62.
- Nagy, Z., Verheyen, G., Torunaye, H. and Van Steirteghem, A. C., (1998a) Special applications of intracytoplasmic sperm injection: The influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. *Hum Reprod*, **13**: 143-154
- Nagy, Z., Joris, H., Verheyen, G., Tournaye, H., Devroey, P. and Van Steirteghem, A. C., (1998b) Correlation between motility of testicular spermatozoa, testicular histology and the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod*, **13**: 890-895.
- Navaneetham, D., Sivashanmugam, P. and Rajalakshmi, M., (1996) Changes in binding of lectins to epididymal, ejaculated, and capacitated spermatozoa of the rhesus monkey. *Anat Rec*, **245**: 500-508.
- Neil, J. M. and Olds-Clarke, P., (1987) A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete Res*, **18**: 121-140.
- Neuwinger, J., Knuth, U. A. and Nieschlag, E., (1990) Evaluation of Hamilton-Thorn 2030 motility analyzer for routine semen analysis in an infertility clinic. *Int J Androl*, **13**: 100-109.
- Nikolettos, N., Kupker, W. and Demirel, C., (1999) Fertilization potential of spermatozoa with abnormal morphology. *Hum Reprod*, **14 (supl 1)**: 47-70.
- Nikolopoulou, M., Soucek, D. A. and Vary, J. C., (1985) Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididimal maturation. *Biochim Biophys Acta*, **815**: 486-498.
- Núñez-Calonge, R., Caballero, P., Redondo, C., Baquero, F., Martínez Ferrer, M. and Meseguer, M., (1998) *Ureaplasma urealyticum* reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. *Human Reprod*, **13**: 2756-2761.

- Oehninger, S., (1998) Semen quality: is there a paternal effect on pregnancy outcome in in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection? *Hum Reprod*, **13**: 2161-2164.
- Ombelet, W., Menkvel, R., Kruger, T. F. and Steeno, O., (1995) Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. *Human Reprod Up*, **1**: 543-557.
- Orgebin-Crist, M. C., (1967a) Sperm maturation in the rabbit epididymis. *Nature (Lond.)*, **216**: 816-818.
- Orgebin-Crist, M. C., (1967b) Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis: fertilizing ability and embryonic mortality in does inseminated with epididymal spermatozoa. *Annls Biol Anim Biochim Biophys*, **7**: 373-389.
- Orgebin-Crist, M. C., (1968) Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis: delayed fertilization in does inseminated with epididymal spermatozoa. *J Reprod Fert*, **16**: 29-33.
- Orgebin-Crist, M. C., (1969) Studies of the function of the epididymis. *Biol Reprod*, **1**: 155-175.
- Osawa, Y., Sueoka, K., Iwata, S., Shinohara, N., Kuji, N. and Yoshimura, Y., (1999) Assessment of the dominant abnormal form is useful for predicting the outcome of intracytoplasmic sperm injection in the case of severe teratozoospermia. *J Assist Reprod Genet*, **16**: 436-442.
- Overstreet, J. W., Katz, D. F., Hanson, F. W. and Fonseca, J., (1979) A simple inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics. *Fertil Steril*, **31**: 162-172.
- Overstreet, J. W., Price, M. J., Blazak, W. F., Lewis, E. L. and Katz, D. F., (1981) Simultaneous assessment of human sperm motility and morphology by videomicrography. *J Urol*, **126**: 357-360.
- Parinaud, J., Mieusset, R., Vieitez, G., Labal, B. and Richoilley, G., (1993) Influence of sperm parametrs on embryo quality. *Fertil Steril*, **60**: 888-892.

- Parkinson, T. J. and Whitfield, C. H., (1987) Optimisation of freezing conditions for bovine spermatozoa. *Theriogenology*, **27**: 781-797.
- Paston, M. J., Sakar, S., Oates, R. P. and Badawy, S., (1994) Computer-aided semen analysis variables as predictor of male fertility potential. *Arch Androl*, **33**: 93-99.
- Paufler, S. K. and Foote, R. H., (1968) Morphology, motility and fertility of spermatozoa recovered from different areas of ligated rabbit epididymides. *J Reprod Fertil*, **17**: 125-137.
- Pavlok, A., (1974) Development of the penetration activity of mouse epididymal spermatozoa in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil*, **36**: 203-205.
- Pedigo, N. G., Vernon, M. W. and Curry, T. E. J., (1989) Characterization of a computerized semen analysis system. *Fertil Steril*, **52**: 659-666.
- Pérez-Sánchez, F., de Monserrat, J. J. and Soler, C., (1994) Morphometric analysis of human sperm morphology. *Int J Androl*, **17**: 248-255.
- Pérez-Sánchez, F., Tablado, L., Yeung, C.-H., Cooper, T. G. and Soler, C., (1996) Changes in the motility patterns of spermatozoa from the rabbit epididymis as assessed by computer-aided sperm motion analysis. *Mol Reprod Dev*, **45**: 364-371.
- Pérez-Sánchez, F., Tablado, L. and Soler, C., (1998) Quantitative changes in sperm head morphology during passage through the male excurrent duct system of the rabbit. *Mol Reprod Dev*, **51**: 203-209.
- Pholpramool, C., Lea, O. A., Burrow, P. V., Dott, H. M. and Setchell, B. P., (1983) The effects of acidic epididymal glycoprotein (AEG) and some other proteins on the motility of rat epididymal spermatozoa. *Int J Androl*, **6**: 240-248.
- Pilikian, S., Adeleine, P., Czyba, J. C. and Guerin, J. F., (1993) Kinetic activity of spermatozoa from fertile subjects and asthenozoospermic infertile patients. *Andrologia*, **25**: 341-344.

- Pinke, L. A., Swanlund, D. J., Hensleigh, H. C., McCarthy, J. B., Roberts, K. P. and Pryor, J. L., (1997) Analysis of fibronectin on human sperm. *J Urol*, **158**: 936-941.
- Pironcheva, G., Miteva, K., Russev, G. C., Vaisberg, C. and Zlatarev, S., (1998) The effect of prostaglandin E1 on in vitro transcription of sperm chromatin, isolated from patients with azoospermia, teratospermia and chronic prostatitis. *Z Naturforsch*, **53**: 421-424.
- Plachot, M., Belaisch-Allart, J., Mayenga, J.-M., Chouraqui, A., Tesquier, L. and Serkine, A. M., (2002) Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in mild male factor infertility. *Human Reprod*, **17**: 362-369.
- Pogany, G. C. and Linder, K. A., (1993) Morphometric analysis of intact sperm heads and of sperm nuclei in the mouse. *Anat Rec*, **235**: 539-546.
- Poulos, A. and White, I. G., (1973) The phospholipid composition of human spermatozoa and seminal plasma. *J Reprod Fert*, **35**: 265-272.
- Povoa, H. J., Bastos, J. J., Silva, M. E., Ariza, A., Moraes, M. I., Rodrigues, R. B. and Silva, M. S., (1986) Glucose in human semen. *Biomed Biochim Acta*, **45**: 685-686.
- Purvis, K., Cusan, L., Attramadal, H., Ege, A. and Hansson, V., (1982) Rat sperm enzymes during epididymal transit. *J Reprod Fertil*, **65**: 381-387.
- Ragni, G., Di Pietro, R., Bestetti, O., De Lauretis, L., Olivares, D. and Guercilena, S., (1985) Morphological selection of human spermatozoa in cervical mucus "in vivo". *Andrologia*, **17**: 508-512.
- Ralph, W. and Stevens, I. (1990) Basic spermatozoon anatomy and physiology for the clinician., En: *Human Spermatozoa in Assisted Reproduction*., Acosta, A. A., Swanson, R. J., Ackerman, S. B., Kruger, T. F., Van Zyl, J. A. and Menkveld, R. Williams & Wilkins., Baltimore.
- Rana, A. P. and Majumder, G. C., (1990) Changes in the fluidity of the goat sperm plasma membrane in transit from caput to cauda epididymis. *Biochem Int*, **21**: 797-803.

- Rana, A. P., Majumder, G. C., Misra, S. and Ghosh, A., (1991) Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta*, **30**: 185-196.
- Rana, A. P., Misra, S., Majumder, G. C. and Ghosh, A., (1993) Phospholipids asymmetry of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta*, **1210**: 1-7.
- Rawe, V. Y., Terada, Y., Nakamura, S., Chillik, C. F., Olmedo, S. B. and Chemes, H. E., (2002) A pathology of the sperm centriole responsible for defective sperm aster formation, syngamy and cleavage. *Hum Reprod*, **17**: 2344-2349.
- Repping, S., van Weert, J. M., Mol, B. W., J.W., d. V. and van der Veen, F., (2002) Use of the total motile sperm count to predict total fertilization failure in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, **78**: 22-28.
- Robertson, L., Eolf, D. and Tash, J. S., (1988) Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biol Reprod*, **39**: 797-805.
- Rosenborg, L., Gustafson, O., Lunell, N. O., Nylund, L., Pousette, A., Slotte, H., Akerlof, E. and Fredricsson, B., (1990) Morphology of seminal and swim-up spermatozoa and the outcome of in vitro fertilization and embryo transfer. *Andrologia*, **4**: 369-375.
- Rothschild, V., (1949) Measurements of sperm activity before artificial insemination. *Nature*, **163**: 358-359.
- Ruiz-Pesini, E., Lapena, A. C., Diez-Sanchez, C., Perez-Martos, A., Montoya, J., Alvarez, E., Diaz, M., Urries, A., Montoro, L., Lopez-Perez, M. J. and Enriquez, J. A., (2000) Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet*, **67**: 682-696.
- Sakkas, D., Manicardi, G., Bianchi, P. G., Bizzaro, D. and Bianchi, U., (1995) Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biol Reprod*, **52**: 1149-1155.

- Sancho, M., Pérez-Sánchez, P., Tablado, L., de Monserrat, J. J. and Soler, C., (1998) Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. *Theriogenology*, **50**: 27-37.
- Schmassmann, A., Mikuz, G., Bartsch, G. and Rohr, H., (1979) Quantification of human sperm morphology and motility by means of semi-automatic image analysis systems. *Microsc Acta*, **82**: 163-178.
- Schrader, S. M., Chapin, R. E., E.D., C., Davis, R. O., Fourcroy, J. L., Katz, D. F., Rothmann, S. A., Toth, G., Turner, T. W. and Zinaman, M., (1992) Laboratory methods for assessing human semen in epidemiologic studies: a consensus report. *Reprod Tox*, **6**: 275-279.
- Serres, C., Feneux, D., Jouannet, P. and David, G., (1984) Influence of the flagellar wave development and propagation on the human sperm movement in seminal plasma. *Gamete Res*, **9**: 1983-195.
- Setty, B. S. and Jehan, Q., (1977) Functional maturation of the epididymis in the rat. *J Reprod Fertil*, **49**: 317-322.
- Shiran, E., Stoller, J., Blumenfeld, Z., Feigin, P. D. and Makler, A., (1995) Evaluating the accuracy of different sperm counting chambers by performing strict counts of photographed beads. *J Assist Reprod Genet*, **12**: 434-442.
- Sinclair, M. L., Wang, X. Y., Mattia, M., Conti, M., Bick, J., Wolgemuth, D. J. and Levin, L. R., (2000) Specific expresión of soluble adenylyl cyclase in male germ cells. *Mol Reprod Dev*, **56**: 6-11.
- Sokal, R. R. and Rohlf, F. J., (2001) Biometry. The principles and practice statistics in biological research. W.H. Freeman and Company, New York, USA.
- Soler, C., Pérez-Sánchez, F., Pertusa, J., Nuñez, J. and Nuñez, A., (1992) Morphological and quantitative study of multinucleated bodies appearing in rat seminiferous tubules after bilateral caput epididymectomy. *Int J Fertil*, **37**: 237-243.

- Soler, C., Perez-Sanchez, F., Schulze, H., Bergmann, M., Oberpenning, F., Yeung, C. and Cooper, T. G., (2000) Objective evaluation of the morphology of human epididymal sperm heads. *Int J Androl*, **23**: 77-84.
- Soler, C., Núñez, J., Buendía, P., Núñez, M., R. Gutiérrez and Pérez-Sánchez, F., (2000) Valoración de la calidad espermática humana mediante análisis de componentes principales Actualidad Andrológica 8: 133.
- Soler, C., Yeung, C. H. and Cooper, T. G., (1994) Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *Int J Androl*, **17**: 271-278
- St John JC, Cooke, I. D. and Barratt, C. L., (1997) Mitochondrial mutations and male infertility. *Nat Med*, **3**: 124-125.
- St John, J. C., Jokhi, R. P. and Barratt, C. L., (2001) Men with oligoasthenoteratozoospermia harbour higher numbers of multiple mitochondrial DNA deletions in their spermatozoa, but individual deletions are not indicative of overall aetiology. *Mol Hum Reprod*, **7**: 103-111.
- Steigerwald, P. and Krause, W., (1998) Estimation of sperm morphology using a new CASA system. *Andrologia*, **30**: 23-27.
- Storey, B. and Kayne, F. J., (1975) Energy metabolism of spermatozoa. The Embden-Myerhof pathway of glycolysis. *Fertil Steril*, **26**: 1257-1265.
- Storey, B. T., (1997) Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, **3**: 203-214
- Sturgess, J. M. and Chao, J., (1982) Ultrastructural features of a human genetic defect of cilia. *Prog Clin Biol Res*, **80**: 7-12.
- Sukcharoen, N., Ngeamjirawat, J., Chanprasit, Y. and Aribarg, A., (1994) A comparison of Makler counting chamber and improved Neubauer hemocytometer in sperm concentration measurement. *J Med Assoc Thai*, **77**: 471-476.
- Sun, J. G., Jurisicova, A. and Casper, R. F., (1997) Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*, **56**: 602-607.

- Suzuki, T., Shibahara, H., Tsunoda, H., Hirano, Y., Taneichi, A., Obara, H., Takamizawa, S. and Sato, I., (2002) Comparison of the Sperm Quality Analyzer IIC variables with the computer-aided sperm analysis estimates. *Int J Androl*, **25**: 49-54.
- Svalander, P., Jakobsson, A. H., Forberg, A. S., Bengtsson, A. C. and Wikland, M., (1996) The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to "strict criteria" sperm morphology. *Hum Reprod*, **11**: 1019-1022.
- Tablado, L., Perez-Sanchez, F., Nunez, J., Nunez, M. and Soler, C., (1998) Effects of exposure to static magnetic fields on the morphology and morphometry of mouse epididymal sperm. *Bioelectromagnetics*, **19**: 377-383.
- Tasdemir, I., Tasdemir, M., Tavukwosky, S., Lahramen, S. and Biberogly, K., (1997) Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome of intracytoplasmic sperm injection in humans. *Hum Reprod*, **12**: 1214-1217.
- Tezon, J. G., Ramella, E., Cameo, M. S., Vazquez, M. H. and Blaquier, J. A., (1985) Immunochemical localization of secretory antigens in the human epididymis and their association with spermatozoa. *Biol Reprod*, **32**: 591-597.
- Thurston, L. M., Watson, P. F. and Holt, W. V., (1999) Sources of variation in the morphological characteristics of sperm sub-populations objectively assessed by a novel automated sperm morphology analysis system. *J Reprod Fertil*, **117**: 271-280.
- Thurston, L. M., Watson, P. F., Mileham, A. J. and Holt, W. V., (2001) Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl*, **22**: 382-394.
- Trokoudes, K. M., Danos, N., Kalogirou, L., Vlachou, R., Lysiotis, T., Georghiades, N., Lerios, S. and Kyriacou, K., (1995) Pregnancy with spermatozoa from a globozoospermic man after intracytoplasmic sperm injection treatment. *Hum Reprod*, **10**: 880-882.

- Tulsiani, D. R., Skudlarek, M. D., Holland, M. K. and Orgebin-Crist, M. C., (1993) Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biol Reprod*, **48**: 417-428.
- Tulsiani, D. R., Orgebin-Crist, M. C. and Skudlarek, M. D., (1998) Role of luminal fluid glycosyltransferases and glycosidases in the modification of rat sperm plasma membrane glycoproteins during epididymal maturation. *J Reprod Fertil Suppl*, **53**: 85-97.
- Turner, T. T. and Giles, R. D., (1982) Sperm motility-inhibiting factor in rat epididymis. *Am J Physiol*, **242**: 199-203.
- Usselman, M. C. and Cone, R. A., (1983) Rat sperm are mechanically immobilized in the caudal epididymis by "immobilin," a high molecular weight glycoprotein. *Biol Reprod*, **29**: 1241-1253.
- Van den Bergh, M., Emiliani, S., Biramane, J., Vannin, A. S. and Englert, Y., (1998) A first prospective study of the individual straight line velocity of the spermatozoon and its influences on the fertilization rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, **13**: 3103-3107.
- Van Voorhis, B. J., Barnett, M., Sparks, A. E., Syrop, C. H., Rosenthal, G. and Dawson, J., (2001) Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization. *Fertil Steril*, **75**: 661-668.
- Van Waart, J., Kruger, T. F., Lombard, C. J. and Ombelet, W., (2001) Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI) a structured literature review. *Hum Reprod Update*, **7**: 495-500.
- Vantman, D., Koukoulis, G., Dennison, L., Zinaman, M. and Sherins, R. J., (1988) Computer assisted semen analysis: Evaluation of method and assessment of the influence of sperm concentration on linear velocity determination. *Fertil Steril*, **49**: 510-516.

- Vantman, D., Bands, S. M., Koukoulis, G., Dennison, L. and Sherins, R. J., (1989a) Assessment of sperm motion characteristics from fertile and infertile men using a fully automated computer-assisted semen analyzer. *Fertil Steril*, **51**: 156-161.
- Vantman, D., Koukoulis, G., Burris, A. S., Banks, S. M., Dennison, L. and Sherins, R. J., (1989b) Sperm motion characteristics in men with isolated hypogonadotropic hypogonadism treated with gonadotropin. *Fertil Steril*, **51**: 162-166.
- Walter, R. J., Danielson, J. R. and Reyes, H. M., (1990) Characterization of a chemotactic defect in patients with Kartagener syndrome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, **116**: 465-469.
- Wang, C., Leung, A., Tsoi, W. L., Leung, J., Ng, V., Lee, K. F. and Chan, S. Y., (1991) Computer-assisted assessment of human sperm morphology: comparison with visual assessment. *Fertil Steril*, **55**: 983-988.
- Watson, P. F. and Morris, G. J., (1987) Cold shock injury in animal cells. *Symp Soc Exp Biol*, **41**: 311-340.
- Wazzan, W. C., Gwatkin, R. B. and Thomas, A. J. J., (1990) Zona drilling enhances fertilization by mouse caput epididymal sperm. *Mol Reprod Dev*, **27**: 332-336.
- Weissenberg, R., Yossefi, S., Oschry, Y., Madgar, I. and Lewin, L. M., (1994) Investigation of epididymal sperm maturation in the golden hamster. *Int J Androl*, **17**: 256-261.
- Wenkoff, M. S., (1978) A sperm mid-piece defect of epididymal origin in two hereford bulls. *Theriogenology*, **10**: 275-281.
- Wetzels, A. M., Janssen, H. G., Goverde, H. M., Bastiaans, B. A., Takahashi, K. and Rolland, R., (1993) The influence of sperm density on the motility characteristics of washed human spermatozoa. *Int J Androl*, **16**: 15-19.
- WHO, (1980) *World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*. Cambridge University Press, New York. Cambridge.

- WHO, (1992) *World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*. Cambridge University Press, New York. Cambridge.
- WHO, (1999) *World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*. Cambridge University Press, New York. Cambridge.
- Wilton, L. J., Temple-Smith, P. D. and de Kretser, D. M., (1992) Quantitative ultrastructural analysis of sperm tails reveals flagellar defects associated with persistent asthenozoospermia. *Hum Reprod*, **7**: 510-516.
- Yavetz, H., Yogev, L., Kleiman, S., Botchan, A., Hauser, R., Lessing, J. B., Paz, G. and Gamzu, R., (2001) Morphology of testicular spermatozoa obtained by testicular sperm extractin in obstructive and nonobstructive azoospermic men and its relation to fertilization success in the in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection system. *J Androl*, **22**: 376-381.
- Yeung, C. and Nieschlag, E., (1993) Performance and comparison of CASA systems equipped with different phase-contrast optics. *J Androl*, **14**: 222-228.
- Yossefi, S., Oschry, Y. and Lewin, L. M., (1994) Chromatin condensation in hamster sperm: a flow cytometric investigation. *Mol Reprod Dev*, **37**: 93-98.
- Zalata, A., Hafez, T. and Comhaire, F., (1995) Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Hum Reprod*, **10**: 1444-1451.
- Zorgniotti, A. W., (1975) The spermatozoa count, a short history. *Urology*, **5**: 672