

TABLA 6-12: Aproximación diagnóstica en pacientes oligo-zoospérmicos. Diagnóstico diferencial entre infección de glándulas genitales anexas, obstrucción parcial, insuficiencia testicular primaria y causas inmunológicas.  
(Lunenfeld, 1.984).

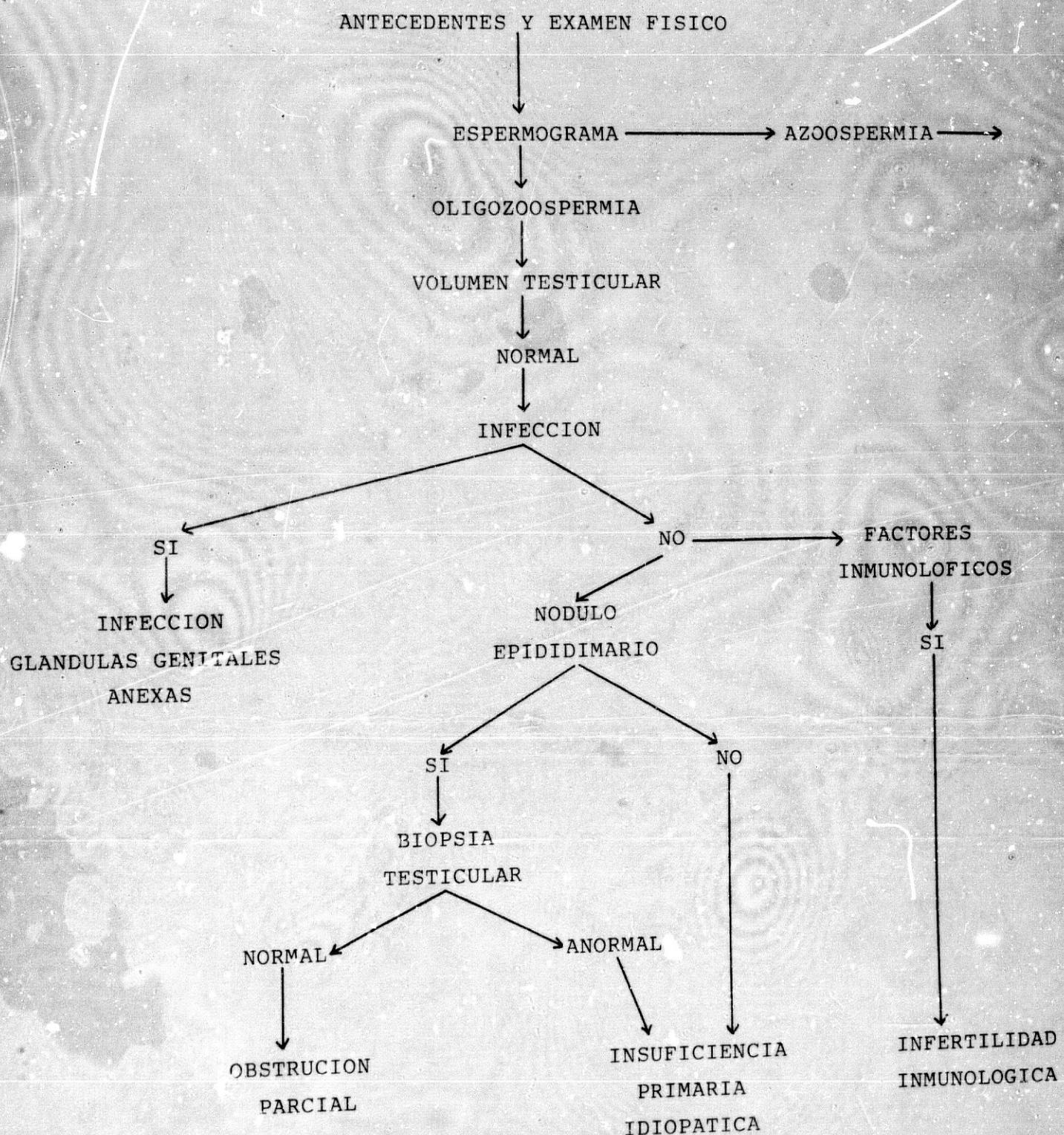


TABLA 6-13: Aproximación diagnóstica de infertilidad en pacientes que presentan una oligozoospermia severa. Diagnóstico diferencial entre obstrucción parcial, inficiencia testicular primaria idiopática y aberraciones cromosómicas. (Lunenfeld, 1.984).

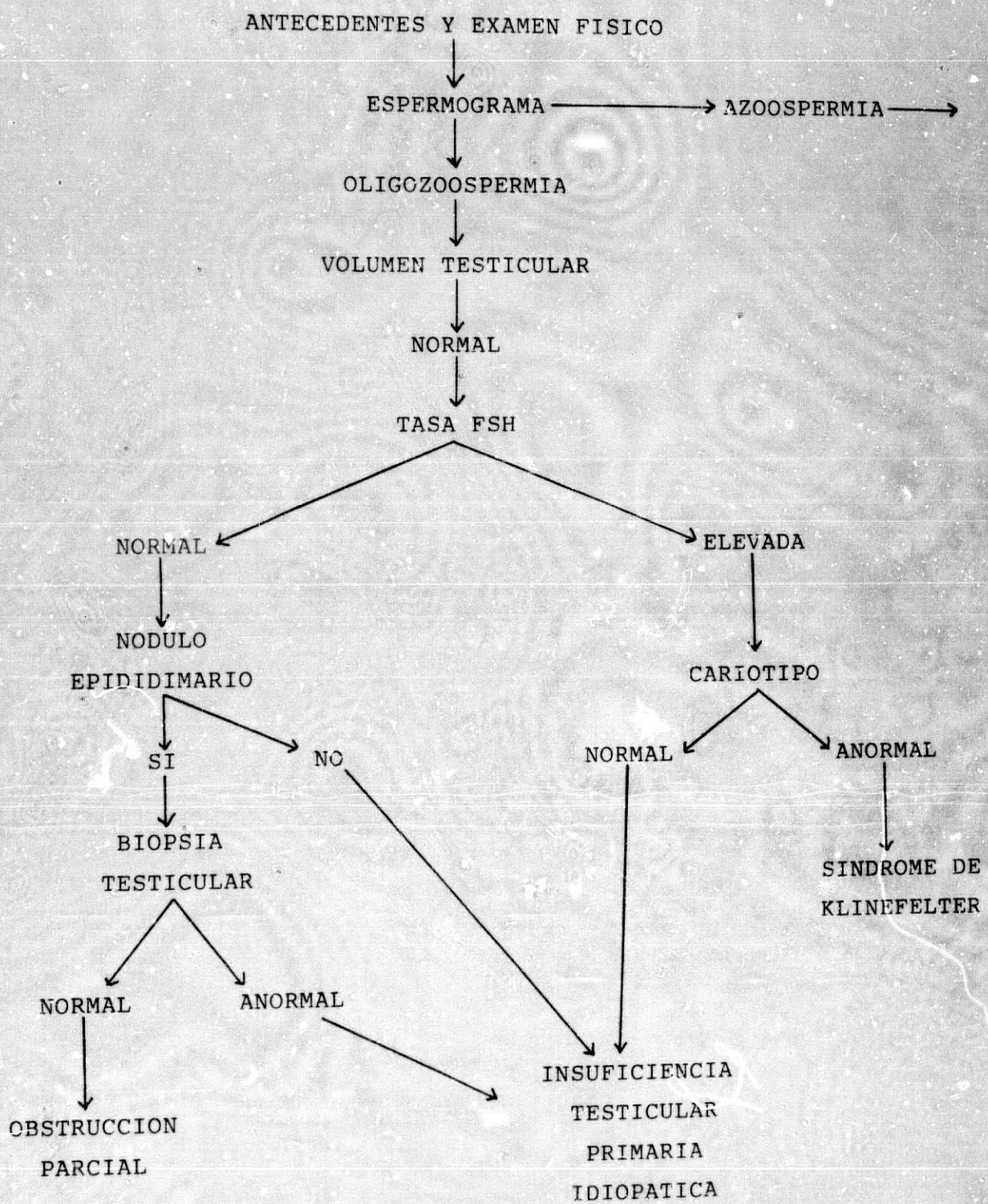


TABLA 6-14: Aproximación diagnóstica etiológica de la astenozoospérmia. (Lunenfeld, 1.984).

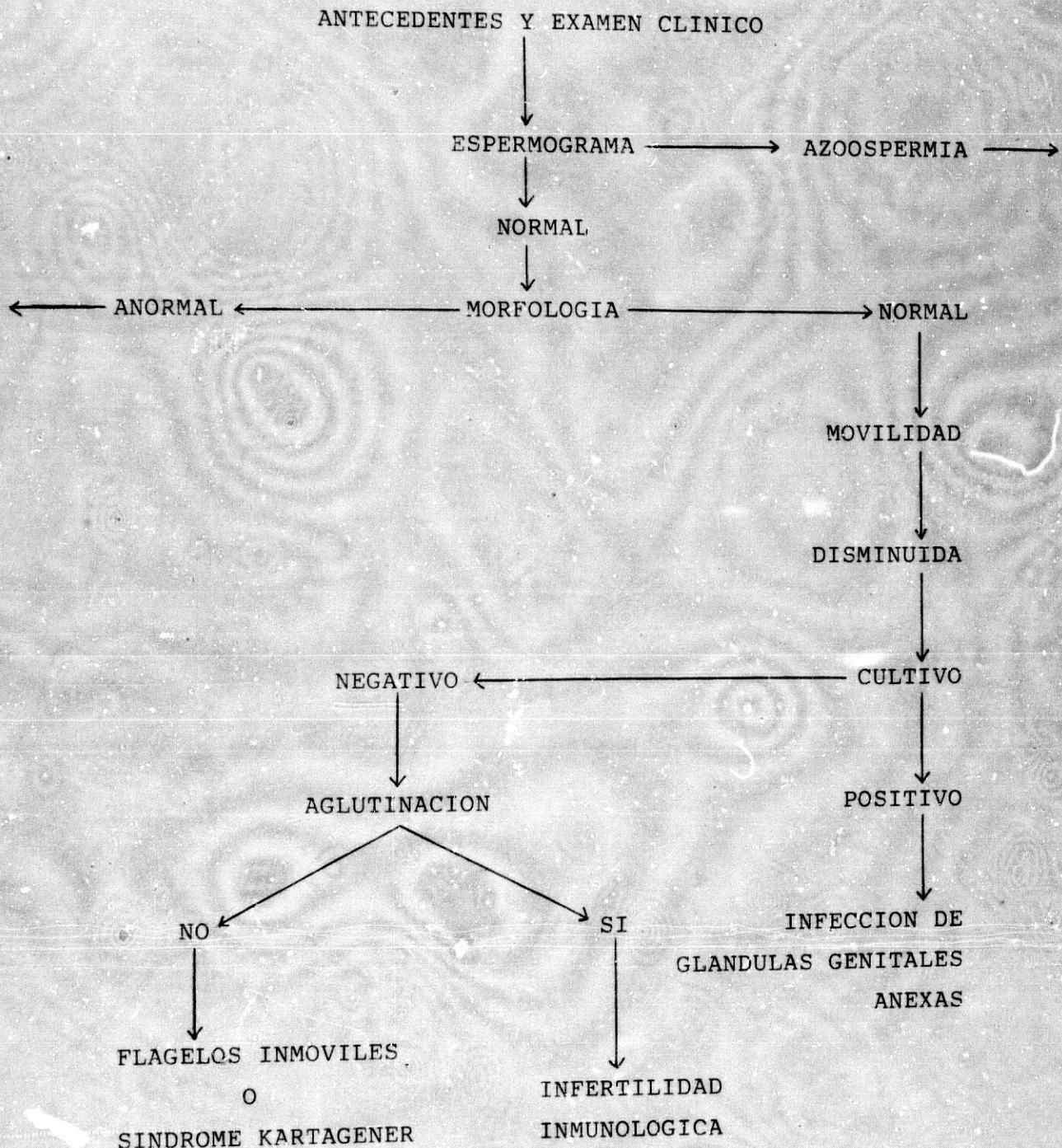
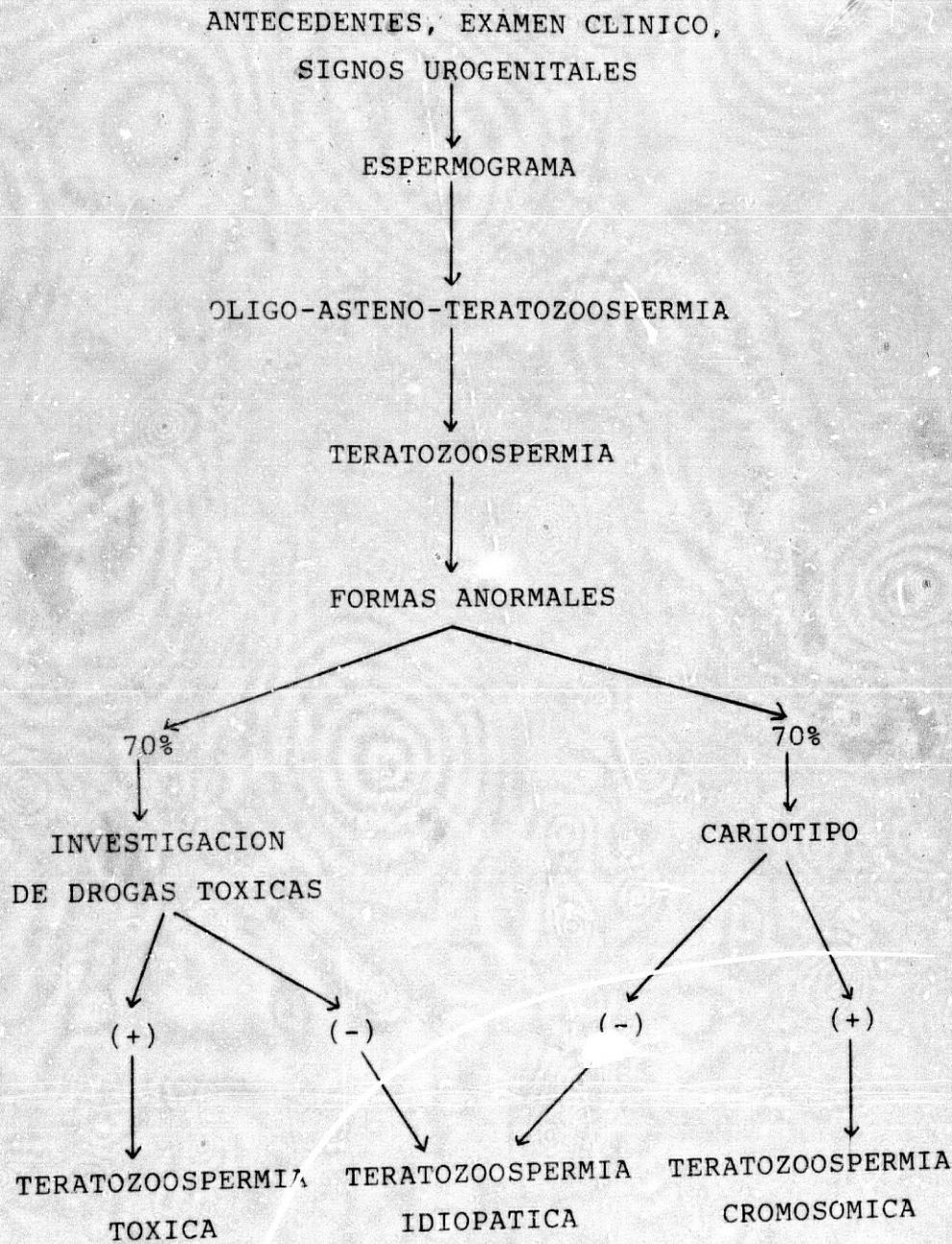


TABLA 6-15: Aproximación diagnóstica estiológica de las teratozoospérmicas. (Lunenfeld, 1984).



**O B J E T I V O S**

### 7. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es el estudio de la aplicación del test de hinchamiento hipo-osmótico (HOS-Test), que mide la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide, función de la capacidad de hinchamiento de la membrana que cubre el flagelo, en respuesta a la exposición a una medio hipo-osmótico, como parámetro seminal para el estudio de las anomalías de la fertilidad masculina y como criterio de calidad del espermatozoide, correlacionandolo con otros parámetros de calidad espermática en las técnicas de separación de espermatozoides, utilizadas normalmente en protocolos de fecundación asistida (IUI y FIV).

MATERIAL Y MÉTODOS

### 8.1. MATERIALES Y APARATOS

#### 8.1.1. Materiales

- Agujas estériles de un solo uso 21 G.
- Bandeja de plástico para transporte de porta objetos.
- Canastillas de vidrio para tinción.
- Cubetas de vidrio para tinción.
- Cubre objetos de 24x36 mm y 24x60 mm.
- Gasas estériles.
- Guantes estériles de plástico de un solo uso.
- Gradillas del tamaño adecuado para el transporte de cada tipo de tubos.
- Impresos:
  - Hoja de instrucciones para la recogida de la muestra de semen.
  - Hoja impresa para resultados del espermograma.
- Jeringuillas estériles de un solo uso de 2, 5, y 10 ml.
- Montante para muestras de microscopía Eukitt.
- Papel de filtro.
- Pipetas Pasteur de 150 x 0,7 mm Ø x 2 ml.
- Porta objetos de 26 x 76 mm.
- Recipientes estériles de plástico de boca ancha, de 100 ml, para la recogida de muestras.
- Tubos estériles de plástico de un solo uso.

#### 8.1.2. Aparatos

- Baño termorregulado (Mod. Boehringer Mannheim Liquitherm F.V.).
- Báscula de precisión (Mod. Stamby Sartorius Research).

- Cámara de recuento Makler (Sefi Medical Instruments).
- Cámara fria con temperaturas entre 2º y 4º C.
- Centrifugadora Beckman TJ-6. Selecta Mod. 202 nº 160150.
- Contador manual de células (Erma).
- Cronómetro (Mod. Assistent).
- Estufa de CO<sub>2</sub> para cultivo celular con bombona de 90% N<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub> 5% O<sub>2</sub> (Anhídrica Malagueña S. A.).
- Filtros estériles Millipore (Millex-GV, 0,22 um).
- Microscopio óptico de contraste de fases Olympus-FH-2.
- Millipore de H<sub>2</sub>O Alambique (Mod. Milli-Ro).
- Sistema de fotografía Olympus-PM-10AD.

#### 8.2. REACTIVOS

- Ácido Clorhídrico 35%. PANRFAC Ref. 141019.
- Bicarbonato Sódico. MERCK Ref. 6329.
- BSA (Albúmina-Sérica-Bovina). SIGMA A4503.
- Citrato Sódico. SIGMA C-385.
- Cloruro Cálcico. MERCK Ref. 2083.
- Cloruro Magnésico Sexta-Hidratado. MERCK Ref. 5833.
- Cloruro Potásico. MERCK Ref. 5043.
- Cloruro Sódico. MERCK Ref. 6404.
- Dihidrógeno Fosfato Potásico. MERCK Ref. 4873.
- Disodio-Hidrógeno Fosfato. MERCK Ref. 6589.
- Disodio-Hidrógeno Fosfato Hepta Hidratado. MERCK Ref. 6574.
- Eosina. MERCK Ref. 1344.
- Etanol Absoluto. MERCK Ref. 983.

- Fosfato de Sodio monobásico monohidratado:  
MERK Ref. 6346.
- Fructosa: SIGMA F-0127.
- Gentamicina: SIGMA G-1014.
- Giemsa (Analema).
- Glucosa: PANREAC.
- Hematoxilina de Harris: SIGMA HHS 1-80.
- HEPES: SIGMA H-3375.
- Lactato Sódico (50%): SIGMA L-1375.
- Metanol: MERK Ref. 6009.
- Nigrosina: MERK Ref. 15924.
- Penicilina-G: SIGMA P-3032.
- Piruvato Sódico: MERK Ref. 6619.
- Solución de Armil.
- Sulfato de Magnesio: MERK Ref. 5885.
- Tiras de reactivo para pH: MERK Ref. 9533.

### 8.3. MEDIOS DE CULTIVO

- TYRODE:	Na Cl	4,00 g
	K Cl	0,10 g
	Cl <sub>2</sub> Ca	0,10 g
	Cl <sub>2</sub> Mg-6H <sub>2</sub> O	0,05 g
	PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na-H <sub>2</sub> O	0,02 g
	CO <sub>3</sub> HNa	0,50 g
	Glucosa	0,50 g
	Aqua Destilada	500 ml

- B<sub>2</sub> (INRA + MENEZO): API-SYSTEM S.A. 500720 A.

- BWW (Bigger-Whitten-Whittingham) (Biggers et al,  
1.971).

## BWW-Solución Stock:

ClNa	5,54 g
ClK	0,356 g
Cl <sub>2</sub> Ca	0,189 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,162 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,446 g
H <sub>2</sub> O Destilada	1.000 ml

## BWW-Final:

Solución Stock	200 ml
NaHCO <sub>3</sub>	0,2 g
Na Piruvato	0,006 g
BSA (Albúmina Sérica Bovina)	0,6 g
Na Lactato (50%)	0,888 ml
HEPES 1 molar	4 ml
Penicilina G- Gentamicina	2 ml

8.4 MUESTRAS

Las muestras de semen utilizadas en este estudio procedían de individuos que acudían a nuestro laboratorio para la realización del espermograma y espermocitograma.

Los pacientes procedentes de la consulta de Ginecología-Obstetricia eran enviados para el estudio de la fertilidad de la pareja, los procedentes de la consulta de Endocrinología para diagnóstico y control de las alteraciones endocrinas y los procedentes de la consulta de Urología lo hacían por un doble motivo,

por una parte el estudio analítico con fin diagnóstico y por otro lado, individuos de fertilidad probada para su inclusión en un programa de vasectomía y que fueron utilizados como grupo control.

#### 8.5. OBTENCION DE LA MUESTRA

Para la obtención de la muestra, al paciente se le hace entrega de una hoja de instrucciones para la adecuada recogida y transporte del semen (Tabla 8-1).

La muestra debe ser obtenida trás un período mínimo de abstinencia sexual de 3 ó 4 días y máximo de 7 días. El nombre completo del paciente, el período de abstinencia, la edad y la hora de la recolección, así como la duración y posibles dificultades se hacen constar en la hoja del espermograma (Tabla 8-2).

La muestra debe ser obtenida por masturbación y recogida en un recipiente estéril de boca ancha que previamente se le ha entregado al paciente, lo que nos permite obtener una muestra completa y no contaminada.

Fueron desestimados del estudio las muestras de semen recogidas con otro método, como las obtenidas con preservativo ya que interfieren en la vitalidad de los espermatozoides

Tabla 8.1: Hoja de instrucciones para la recogida y transporte del esperma.

INSTRUCCIONES PARA LA RECOGIDA Y TRANSPORTE  
DEL ESPERMA

- 1.- ES CONVENIENTE MICCIONAR ANTES DE OBTENER LA MUESTRA.
- 2.- LAVARSE BIEN EL APARATO GENITAL CON JABON ANTISEPTICO, ACLARANDO CON AGUA ABUNDANTE.
- 3.- SECARSE CON GASAS ESTERILES.
- 4.- LAVARSE LAS MANOS Y DESINFECTARSELAS CON SOLUCION DE ARAMIL.
- 5.- OBTENER LA MUESTRA POR MASTURBACION.
- 6.- ABRIR EL RECIPIENTE ESTERIL POCO ANTES DEL MOMENTO DE LA DONACION, TENIENDO CUIDADO DE NO ROZAR LAS PAREDES DEL RECIPIENTE CON CON EL GLANDE.
- 7.- CERRAR EL RECIPIENTE INMEDIATAMENTE, UNA VEZ OBTENIDA LA MUESTRA Y PONER EL NOMBRE Y APELLIDOS EN LA ETIQUETA.
- 8.- EL TRANSPORTE DE LA MUESTRA AL LABORATORIO DEBE HACERSE EN EL TIEMPO MAS BREVE POSIBLE (NO MAS DE 30 MINUTOS) Y SIN SUFRIR CAMBIOS BRUSCOS DE TEMPERATURA (TRANSPORTAR EN UN BOLSILLO INTERIOR DE SU CHAQUETA, O PANTALON, O ENTRE SUS MANOS).

Tabla 8.2.: Hoja de recogida de datos del espermograma.

<u>ESPERMOGRAMA</u>			
NOMBRE MARIDO:		EDAD:	
NOMBRE ESPOSA:		EDAD:	
INDICACION:			
RECOGIDA DE LA MUESTRA:			
Fecha:	Duración:		
Hora:	Dificultad:		
Días de abstinencia:			
CARACTERISTICAS DEL ESPERMA (Hora del análisis):			
Volumen:	ml.	Numeración:	
Color:		Movilidad:	
pH:		- Flechantes:	%
Viscosidad:		- Progresivos:	%
Aglutinación:		- No Progresivos:	%
Cabeceo Lateral:		- Inmóviles:	%
Mov. Rectilíneo:		Cél. Espermatogénesis:	
Autoanticuerpos:		Leucocitos:	
Cristales:		Morfología:	
Vitalidad:		- Formas normales:	%
-Formas vivas:	%	- Formas anormales:	%
-Formas muertas:	%		
Test de Baker:		HOS-TEST:	
		+ =	%
		- =	%
COMENTARIOS:			

las sustancias espermicidas concenidas en él (Zavos, 1.985); así como las muestras obtenidas por coito interruptus, ya que es muy probable que la primera parte del eyaculado se pierda, que es donde normalmente se encuentra la máxima concentración de espermatozoides.

Las muestras de semen incompletas fueron excluidas también, particularmente las que perdieron la primera porción del eyaculado.

En el laboratorio la muestra de semen se mantiene a 37° C, en una estufa con una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>, hasta el momento de su análisis.

#### 8.6. ANALISIS DE LAS MUESTRAS: ESPERMOGRAMA

##### 8.6.1. Características Físicas

###### 8.6.1.1. Licuefacción:

Las muestras recibidas en el laboratorio se mantienen a una temperatura de 37° C y se dejan licuar durante un mínimo de 10 minutos y un máximo de 30 minutos, desde la obtención de la muestra, excluyendo del estudio aquellas muestras recibidas con posterioridad, igualmente, las muestras que no licuaron completamente después de 30 minutos desde su recogida fueron excluidas del estudio.

La licuefacción de la muestra de semen se valora visualmente:

- Semen no licuado: Forma un gel totalmente coagulado.
- Semen parcialmente licuado: Contiene numerosos pero pequeños coágulos.
- Semen muy licuado: No se observa ningún pequeño coágulo, encontrándose completamente fluido.

#### 8.6.1.2. Color:

Por simple inspección y a temperatura ambiente se evalua el color de la muestra.

El color normal del eyaculado debe ser gris amarillento-opalescente, pero puede variar como reflejo de diversos procesos patológicos, clasificándolos como color orina, color hemático, o color amarillo, ya descritos en la Introducción (Tema 5.4.2).

Todas las muestras que presentaron alteración del color fueron excluidas del estudio.

#### 8.6.1.3. Volumen:

El volumen del eyaculado fue medido con ayuda de una jeringuilla de plástico estéril desechable, expresándolo en mililitros (ml) con una precisión de décimas de ml.

Según el volumen del eyaculado, las muestras se clasificaron en:

- Hipospérmia: Volumen reducido, menos de 2 ml.
- Normospérmia: Volumen normal, de 2 a 6 ml.
- Hiperespérmia: Volumen mayor de 10 ml.

Fueron excluidos del estudio las muestras con hipospérmia marcada (menos de 1 ml) por falta material de muestra para el estudio.

#### 8.6.1.4. Viscosidad:

La viscosidad del eyaculado fue determinada con ayuda de una pipeta Pasteur (0,7 mm de diámetro) considerandola normal cuando se podía verter gota a gota.

Consideramos tres categorías de viscosidad:

- (+) Se puede verter gota a gota el eyaculado.
- (++) Cuando al verterlo, las gotas tienden a formar filamentos pero que se desprenden finalmente, no excediendo la altura de 2 cm.
- (++) Cuando no se puede verter gota a gota, tendiendo a comportarse de manera filante.

Fueron excluidas del estudio aquellas muestras de semen que presentaban hiperviscosidad (+++).

#### 8.1.6.5. pH:

El pH de la muestra se mide con tiras de papel reactivo con un rango de pH de 5 a 10.

Con ayuda de una pipeta Pasteur se vierte una pequeña alicuota de eyaculado sobre el papel reactivo. Despues de 30 segundos, el color de la zona impregnada debe ser uniforme y se compara con la calibración de colores.

El pH normal del eyaculado se considera entre 7,6 y 8,1.

En los casos de pH menor de 7,6 la muestra fue excluida del estudio, ya que dicho pH puede afectar a la vitalidad del espermatozoide.

En los casos de pH mayor de 8,1 se descartaba la presencia de infección por medio del test de Giemsa para determinar y cuantificar la presencia de leucocitos, como se describe más adelante en el apartado 8.6.2.7., y en caso positivo se excluye del estudio.

#### 8.6.1.6. Cristales:

Con ayuda de un tubo estéril de plástico de un sólo uso, por simple inspección visual, al trasluz, se pueden detectar la presencia o ausencia de pequeñas partículas de aspecto cristalino.

El origen de la presencia de cristales en el eyaculado puede ser endógeno o exógeno:

- Origen Endógeno: No tiene valor diagnóstico si su presencia es en pequeñas cantidades.

- Origen Exógeno: Normalmente debido al método de recogida de la muestra, principalmente cristales de talco, por polvos espermicidas.

Las muestras que presentaban gran presencia de cristales o cristales de talco fueron excluidas del estudio.

#### 8.6.2. Características Biológicas

##### 8.6.2.1. Concentración:

La numeración de espermatozoides se hizo con ayuda de la cámara de recuento de Makler que permite la determinación directa de la concentración de espermatozoides sin diluciones previas, expresando el número de espermatozoides en millones ( $10^6$ ) por mililitro (ml), obteniendo el número total de espermatozoides del eyaculado multiplicando la concentración obtenida por el volumen total de la muestra.

##### \* Cámara de recuento de Makler:

La cámara de recuento de Makler fue

diseñada por Makler (1.980) específicamente para las muestras de semen. La cámara en sí consta de dos partes, parte inferior y parte superior:

- Parte inferior: La parte inferior está formada por un anillo plano de metal con dos elevaciones para facilitar su manipulación. En la superficie superior de este anillo hay un disco de cristal y elevándose sobre él hay cuatro columnas de cuarzo que alcanzan exactamente 10 micras de elevación sobre la superficie central del disco de cristal.

-Parte superior: la parte superior está formada por un disco de cristal rodeado por un anillo de metal. En la superficie inferior de este disco de cristal, está marcada una rejilla de  $1 \text{ mm}^2$  de superficie, subdividida en 100 cuadros de  $0,1 \times 0,1 \text{ mm}^2$  cada uno.

Cuando la parte superior de la cámara está sobre la parte inferior, apoyada en los 4 soportes de cuarzo, el espacio delimitado entre las dos superficies en 10 de los pequeños cuadrados de la rejilla marcada en el cristal, es de  $0,001 \text{ mm}^3$  ( $0,1$  millonésima de ml). De esta forma, el número de espermatozoides que contamos en los 10 pequeños cuadrados es el mismo número en millones ( $\text{N} \times 10^6$ ) de espermatozoides que estarán presentes en 1 ml de semen.

\* Preparación de la cámara:

Previa limpieza con agua destilada y secado con papel de seda especial para lentes, se coloca una pequeña gota de semen en el disco central de cristal de la parte inferior de la cámara, evitando la formación de burbujas de aire.

Se coloca la parte superior de la cámara sobre los cuatro soportes de cuarzo, asegurándose con esta maniobra la distribución de la gota de semen a un grosor de 10 micras.

La cámara se coloca bajo el microscopio óptico de contraste de fases con el objetivo de 20X y la pieza ocular de 10X, logrando una magnificación de 200X.

Se cuentan los espermatozoides contenidos sobre 10 cuadrados de la rejilla del cristal de la cámara y se expresan en millones de espermatozoides por unidad de volumen, ml ( $N \times 10^6$  spz/ml).

Si la concentración de espermatozoides de la muestra es muy baja se cuentan los espermatozoides contenidos sobre 100 cuadrados de la rejilla del cristal de la cámara, multiplicando en este caso por 100.000 el número obtenido, para obtener la concentración de espermatozoides por ml.

Tras su uso, la cámara se lava con solución de Armil y agua destilada y se seca

con papel de seda especial para lentes.

Según la concentración o número de espermatozoides de las muestras, las clasificamos en:

- Azoospérmicos: cuando no hay espermatozoides en el eyaculado. Este grupo fue excluido del estudio.
- Oligozoospérmicos: Cuando la concentración de espermatozoides es menor de  $20 \times 10^6 / \text{ml}$ , o menor de  $40 \times 10^6 \text{ spz/eyaculado}$ .
- Normozoospérmicos: Cuando la concentración de espermatozoides es mayor o igual a  $20 \times 10^6 / \text{ml}$ , y mayor o igual a  $40 \times 10^6 \text{ spz/eyaculado}$ .
- Hiperzoospérmicos: Cuando la concentración de espermatozoides es mayor de  $350 \times 10^6 / \text{ml}$ .

#### 8.6.2.2. Movilidad:

La movilidad de los espermatozoides de la muestra se observa rápidamente trás la licuefacción del semen, utilizando la cámara de recuento de Makler, descrita anteriormente (8.6.2.1.), que gracias a su escasa profundidad (10 micras) obliga a los espermatozoides a mantenerse en el plano de enfoque del microscopio, lo que permite observar con mayor precisión el tipo de movimiento. (Makler, 1.987).

Con el microscopio óptico de contraste de fases y una magnificación de 200x, se cuentan un mínimo de 200 espermatozoides y se expresan en porcentaje de formas que presentan cada uno de los tipos de movimiento:

- Inmóviles: ausencia total de movimiento.
- No progresivos: movimiento sin progresión del espermatozoide, del flagelo o de la cabeza.
- Progresivos: el espermatozoide presenta un movimiento de avance.
- Flechantes: el espermatozoide presenta un movimiento hacia adelante, rectilíneo, rápido y vigoroso.

La calidad del movimiento de los espermatozoides de la muestra se determina mediante la observación de la presencia de cabeceo lateral y el grado de movimiento rectilíneo:

\* Cabeceo lateral:

(+) = el espermatozoide avanza sin desplazamiento apreciable de la cabeza.

(++) = el espermatozoide avanza con desplazamiento lateral alternativo de la cabeza de manera apreciable.

(+++) = el espermatozoide se desplaza en su progresión, con grandes oscilaciones laterales de la cabeza.

\* Movimiento rectilíneo:

(++) = El espermatozoide avanza progresivamente en línea recta.

(++) = El espermatozoide avanza con un desplazamiento con giros alternativos.

(+) = El espermatozoide cambia constantemente de dirección o gira describiendo movimientos circulares.

8.6.2.3. Test de Baker: (Rose et al, 1.976)

El test de Baker se aplica en aquellas muestras en los que se observa una disminución en el porcentaje de formas móviles, ya que el defecto de la movilidad podría estar causado por un defecto de fructosa.

\* Medio Baker:

Glucosa	3.0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.46 g
NaCl	0.2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.01 g
Agua destilada hasta	100 ml

\* Método:

- Se mezclan bien a partes iguales una pequeña alicuota de semen con un volumen igual de medio de Baker a 37°C.
- Se pone una gota en un porta objetos y se cubre con un cubre objetos.
- Se observa bajo el microscopio óptico de contraste de fases con 200X de magnificación y si se observa un aumento de la movilidad se solicita un análisis de fructosa de la muestra.

Las muestras que presentaron un defecto de fructosa (Baker +) fueron excluidas del estudio.

8.6.2.4. Vitalidad:

El análisis de la vitalidad de los espermatozoides de la muestra ha sido realizada utilizando las preparaciones previamente teñidas bajo el microscopio óptico de contraste de fases con 400X de magnificación.

La tinción utilizada ha sido la de Eosina-Nigrosina: (Eliasson, 1.977)

- Eosina Y: 1% en dilución acuosa.
- Nigrosina: 10% en dilución acuosa.

\* Método:

- Sobre un porta objetos, previamente desengrasado, se coloca una gota de semen.

- Se añaden dos gotas de Eosina 1% y se mezclan bien durante 20 segundos.

- Se añaden tres gotas de Nigrosina 10% y se mezclan bien durante 10 segundos.

- Se realiza un frotis con la mezcla y se monta con un montante de preparaciones.

Tras la tinción y fijación se observa bajo el microscopio óptico y se realiza un recuento de espermatozoides vivos y muertos. Los espermatozoides teñidos de color violeta son aquellos que han permitido el paso de la eosina a través de la membrana, indicando el deterioro de ésta, siendo pues espermatozoides muertos. Los espermatozoides no teñidos de color son los vivos. Se cuentan un mínimo de 200 espermatozoides y los resultados se expresan en porcentajes.

Fueron excluidos del estudio las muestras con un porcentaje superior al 50% de formas muertas (necrospérmia).

8.6.2.5. Aglutinación:

La aglutinación altera la movilidad de los espermatozoides y es debida a la presencia

de anticuerpos anti-espermatozoides en el plasma seminal.

La aglutinación se observa en fresco, con ayuda de la cámara de recuento de Makler, bajo el microscopio óptico de contraste de fases con 200X de magnificación. Los espermatozoides están unidos uno con otro, clasificándose el tipo de aglutinación según el tipo de unión entre espermatozoides:

- Cabeza con cabeza.
- Pieza intermedia con pieza intermedia.
- Cola con cola.
- Punta de cola con punta de cola.
- Mixtas.

El grado de aglutinación, es decir, la cantidad de espermatozoides que se ven afectados por la aglutinación, se cuantifican en diferentes grados:

- (-) = No se observa aglutinación alguna.
- (+) = Menos de un tercio de los espermatozoides están implicados en la aglutinación.
- (++) = Entre un tercio y dos tercios de los espermatozoides están implicados en la aglutinación.
- (+++) = Más de dos tercios de los espermatozoides están implicados en la aglutinación.  
(En todos los casos sea cual sea el tipo de unión)

No se incluyen en este apartado como aglutinación los espermatozoides adheridos

a partículas de materia o residuos celulares por procesos diferentes (hilos de moco, adherencias de un espermatozoide inmóvil a otro móvil, uniones a otras células, etc.,).

Las muestras que mostraban un grado de aglutinación superior a una (+) fueron excluidas del estudio.

#### 8.6.2.6. Células de la espermatogénesis:

El recuento de células de la espermatogénesis (-espermatoцитas, -espermatoцитos I, -espermatoцитos II, -espermátidas) se hace con la cámara de recuento de Makler, bajo el microscopio óptico de contraste de fases, al mismo tiempo que cuando se hace el recuento de espermatozoides y se expresan en número de células por ml de semen.

#### 8.6.2.7. Células blancas sanguíneas:

El recuento de células blancas sanguíneas se realiza con ayuda de la cámara de recuento de Mackler, bajo el microscopio óptico y se expresan en número de células por ml.

La presencia de leucocitos en semen en pequeñas cantidades es normal, pero un aumento en grandes cantidades (mayor de 5 células blancas sanguíneas por cada 100 espermatozoides), se

debe probablemente a un proceso infeccioso en el tracto genital. Cuando se determinaba una cantidad igual o mayor de leucocitos por ml se preparaba un recuento más exacto por medio de un frotis de la muestra, teñido con Giemsa, y se remite para análisis microbiológicos, no siendo utilizadas las muestras en nuestro estudio.

\* Medio Giemsa:

-Fosfato amortiguador, 0.066 M (pH 6.9):

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  9,1 g/l 320 ml

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  11,9 g/l 400 ml

Ajustando el pH con NaOH y añadiendo agua destilada hasta 1 litro.

- Solución colorante Giemsa:

Romanovski-Giemsa 7 ml

Fosfato amortiguador 160 ml

\* Método:

- Se hace un frotis con una gota de semen sobre un porta objetos, previamente desengrasado.

- Se deja secar al aire.

- Se fija con metanol durante 5 minutos.

- Se lava bien con agua destilada.

- Se tinge con medio Giemsa durante 10-15 minutos.

- Se lava bien con agua destilada.

- Se deja secar al aire.

- Se monta con montante de preparaciones y se cubre con un cubre objetos.

Tras la tinción y fijación se realiza el recuento de leucocitos y espermatozoides bajo el microscopio óptico de contraste de fases con 400X de magnificación, contando hasta un mínimo de 200 células, expresándose en números de leucocitos por 100 espermatozoides. Como se conoce el número total de espermatozoides por ml, se puede estimar el número de leucocitos presentes en 1 ml de semen:

$$C = \frac{N \times S}{100}$$

C = Número de leucocitos por ml.

N = Número de leucocitos contados por 100 spz.

S = Número de spz por ml expresado en millones.

#### 8.7. MORFOLOGIA: ESPERMOCITOGRAMA

El análisis de las características morfológicas de los espermatozoides de las muestras ha sido determinado utilizando las preparaciones, previamente teñidas, bajo el microscopio óptico de contraste de fases con 400X de magnificación.

La tinción utilizada ha sido la de Hematoxilina-Eosina (Barcroft y Cook, 1.984).

\* Hematoxilina de Harris:

Hematoxilina (cristal oscuro)	8 g
Etanol 95%	80 ml
Sulfato amónico alumínico	160 g

Aqua destilada	1600 ml
Oxido mercúrico	6 g

\* Solución ácida-etanol:

Etanol 99,5%	300 ml
ClH concentrado	2,0 ml
Aqua destilada	100 ml

\* Método:

- Se hace un frotis con una gota de semen sobre un porta objetos previamente desengrasado.
- Se deja secar al aire.
- Se fija con metanol durante 3-5 minutos.
- Se lava minuciosamente con agua destilada.
- Se tiñe con hematoxilina de Harris durante 1 minuto.
- Se lava bien en agua destilada.
- Se pone en ácido-alcohol (ClH 1% en etanol 70%) durante 2-3 minutos.
- Se lava bien en agua destilada.
- Se tiñe con eosina (5% en H<sub>2</sub>O) durante 20 segundos.
- Se lava bien en agua destilada.
- Se deja secar al aire.
- Se monta con un montante de preparaciones y se cubre con un cubre objetos.

Tras la tinción y fijación, se realiza el recuento de formas normales y formas anormales bajo el microscopio óptico, contando un mínimo de 200 espermatozoides y los resultados se expresan en porcentajes.

Las formas anormales se determinan de acuerdo con la clasificación propuesta por David et al (1.975) y descrita en otro capítulo. (Tabla 4-1; Tabla 8-3).

Tabla 8-3: Hoja de análisis morfológico de los espermatozoides.

ANALISIS MORFOLOGICO: ESPERMOCITOGRAMA

NOMBRE:

FECHA:

NORMALES	
	Alargada a
	Adelgazada b
	Microcéfalo c
	Macrocéfalo d
	Irregular e
	Duplicada f
	En lisis g
ANORMALES	Restos citopl. h
	Acodado i
FLAGELO	Ausente j
	Corto k
	Enrollado l
	Doble m
Flagelos aislados	
Células espermatogénesis	
Otros elementos	
OBSERVACIONES	

### 8.8. HOS TEST (HIPO-OSMOTIC SWELLING TEST)

#### 8.8.1. Solución hipo-osmótica:

La solución hipo-osmótica se prepara mezclando a partes iguales solución de citrato sódico y solución de fructosa en agua destilada. Ambas soluciones tienen una molaridad de 150 miliosmoles.

##### \* Solución de citrato sódico:

Citrato sódico 2-H <sub>2</sub> O	7.35 g
Agua destilada	1.000 ml

##### \* Solución de fructosa:

Fructosa	13.51 g
Agua destilada	1.000 ml

Esta solución resultante con azúcar y electrolitos permite mantener la integridad funcional del espermatozoide.

#### 8.8.2. Método práctico del HOS-Test: (Jeyendran et al, 1.984)

- Se mezclan 0,1 ml de muestra con 1 ml de solución hipo-osmótica en un tubo estéril de plástico de 3 ml.
- Se incuba durante un mínimo de 30 minutos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.
- Se toma una muestra del tubo con una pipeta Pasteur.
- Se pone una gota en un porta objetos previamente desengrasado y se cubre con un cubre objetos.

- Se deja reposar durante un mínimo de 2 minutos para permitir que todos los espermatozoides se depositen en el fondo y se enfoquen con el microscopio óptico en el mismo plano.
- Se observa la muestra bajo el microscopio óptico de contraste de fases con 400X de magnificación y se cuentan un mínimo de 200 espermatozoides por muestra.

Son HOS (+) los espermatozoides que presenten cambios en la integridad de su membrana, produciéndose un hinchamiento en la cola de mayor o menor grado, y HOS (-) aquellos que no presenten cambios.

El porcentaje de espermatozoides HOS (+) se calcula según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ HOS (+)} = \frac{\text{nº spz hinchados}}{\text{nº spz totales contados}} \times 100$$

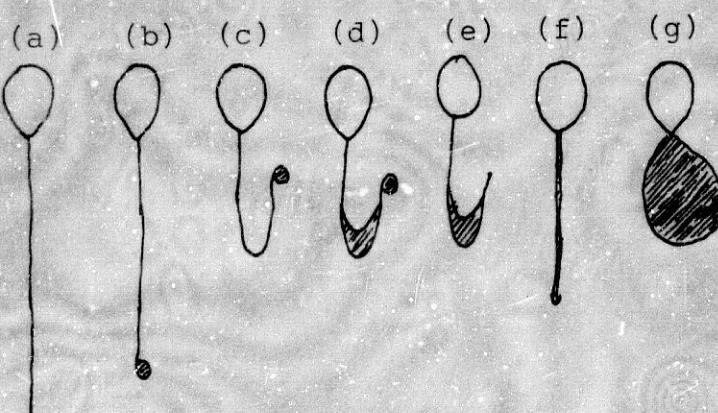
#### 8.8.3. Cambios morfológicos del espermatozoide tras HOS-Test:

Tras la aplicación del HOS-Test, los espermatozoides humanos muestran unos cambios morfológicos típicos, fácilmente identificables bajo el microscopio óptico de contraste de fases.

La respuesta inicial es un pequeño engrosamiento o dilatación de la punta del flagelo o de la unión de la pieza intermedia

y la cola. Posteriormente, las alteraciones estarán caracterizadas por la presencia de un área de hinchamiento en la punta del flagelo (Fig. 8.1 b-d), la cola se encorva (Fig. 8.1 c-d-e), acortamiento y espesamiento de la cola (Fig. 8.1 f), o por un hinchamiento parcial o total del flagelo del espermatozoide (Fig. 8.1 e-g).

Fig. 8.1 Representación esquemática de los cambios morfológicos típicos del espermatozoide humano sometido a una solución hipo-osmótica.  
(HOS-Test). (Jeyendran et al., 1.984).



(a): No hinchado

(b-g): Diferentes tipos de colas hinchadas

#### 8.9. TECNICA DEL SWIM UP

Las muestras de semen incluidas en el estudio fueron sometidas a la técnica del Swim up. (Lopata et al, 1.976)

##### \* Método:

- En un tubo estéril de plástico se mezclan las muestras de semen total con un volumen igual de medio de cultivo Tyrode, para lavado de la muestra.
- Se centrifuga durante 5 minutos a 1.900 rpm
- Se decanta el sobrenadante en otro tubo.
- El precipitado resultante se cubre suavemente con 0,5 ml de medio de cultivo B<sub>2</sub>.
- Se centrifuga durante 20 segundos a 1.900 rpm.
- Se incuba la preparación durante 45 minutos a 37° en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>, para permitir que los espermatozoides más móviles difundan activamente hacia la capa sobrenadante del medio de cultivo.
- Tras el período de incubación se aspira la totalidad del sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur y se introduce en un tubo de plástico de 3 ml y se tapa.
- El precipitado residual se resuspende en 0,5 ml de medio de cultivo Tyrode y con ayuda de una pipeta Pasteur se introduce en otro tubo de plástico de 3 ml y se tapa.

## 8.10. PROTOCOLO OPERATIVO (Tabla 8-4)

En el presente estudio se han considerado cuatro grupos distintos de individuos según las características del espermograma:

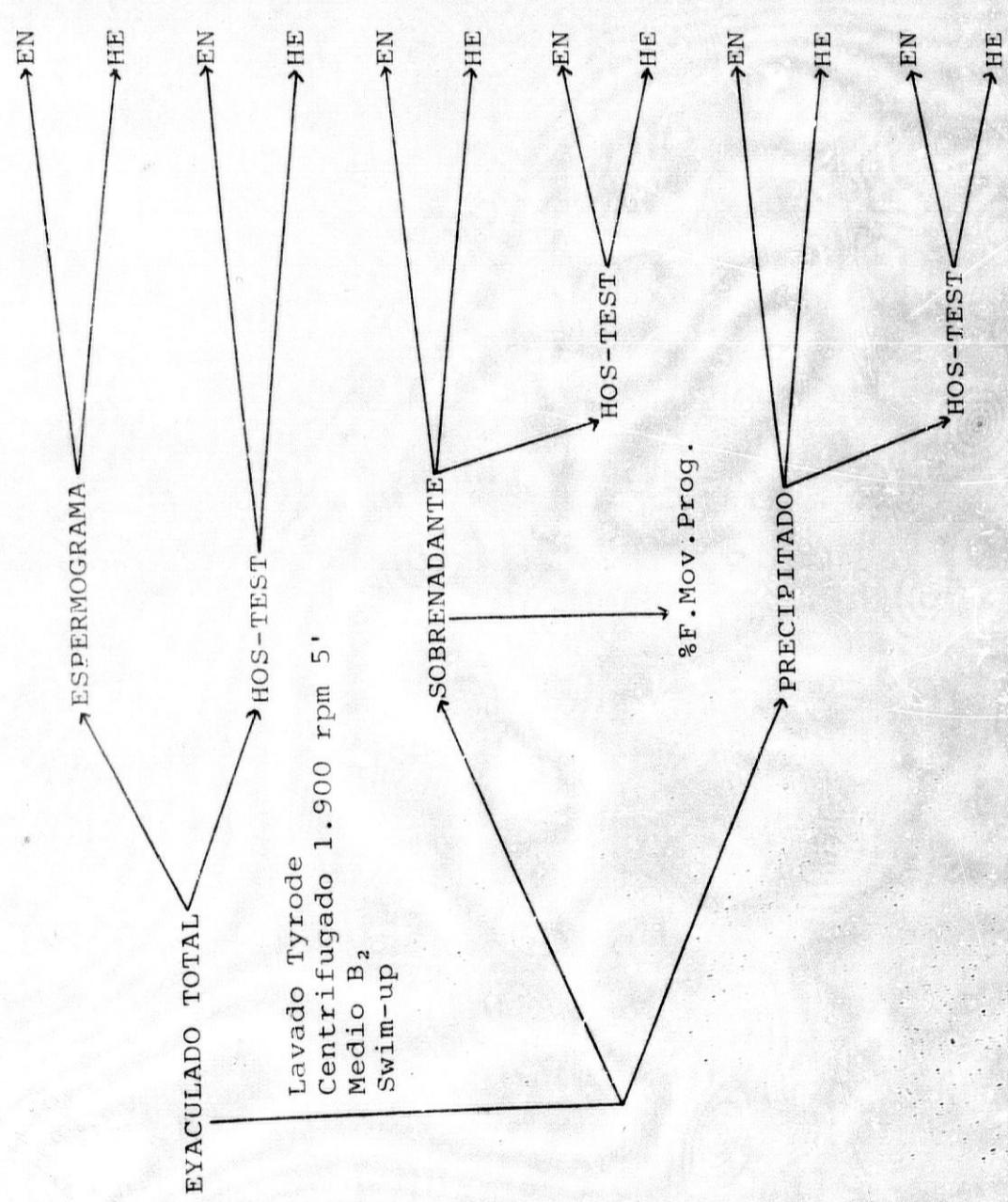
\* Normozoospérmicos: Cuando la Concentración o número de espermatozoides de la muestra es mayor o igual a  $20 \times 10^6/\text{ml}$  y mayor o igual a  $40 \times 10^6 \text{ spz/eyaculado}$ ; Movilidad mayor o igual al 50% de formas móviles (formas a y b; WHO, 1.987); Morfología mayor o igual al 50% de formas normales morfológicamente; Vitalidad mayor o igual al 50% de formas vivas.

\* Astenozoospérmicos Moderados: Cuando tienen una Movilidad menor del 50% y mayor del 20%, siendo el resto de los parámetros seminales normales (Concentración, Morfología, Vitalidad).

\* Oligozoospérmicos Moderados: Cuando tienen una Concentración de espermatozoides menor de  $20 \times 10^6/\text{ml}$  y mayor de  $10 \times 10^6/\text{ml}$ , siendo el resto de los parámetros seminales normales (Movilidad, Morfología, Vitalidad).

\* Oligo-Astenozoospérmicos: Cuando tienen una Concentración de espermatozoides menor de  $20 \times 10^6/\text{ml}$  y mayor de  $10 \times 10^6/\text{ml}$ , y una Movilidad menor del 50% y mayor del 20%, siendo el resto de los parámetros seminales normales (Morfología y Vitalidad).

TABLA 3.4 • Protocolsos experimentales.



Todas las muestras incluidas en el estudio, previa realización del espermograma completo tras la licuefacción y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 8.6. y el estudio morfológico (espermocitograna) como se describe en el apartado 8.7., fueron procesados según el siguiente protocolo operativo:

\* Se toma una alicuota de 0,1 ml del eyaculado con una pipeta Pasteur y se reserva en un tubo de plástico de 3 ml en estufa a 37°C y una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>.

\* Con el resto de la muestra se realizó la técnica del swim-up descrita anteriormente en el apartado 8.9., obteniéndose un Sobrenadante que contiene los espermatozoides móviles y un Precipitado residual que contiene los espermatozoides que no han ascendido a la capa de medio de cultivo sobrenadante.

\* Con este procedimiento obtenemos tres fracciones diferentes de una misma muestra:

1.- Eyaculado: Semen total tras la licuefacción.

2.- Sobrenadante: Fracción de la muestra que contiene los espermatozoides móviles que han difundido a la capa de medio de cultivo sobrenadante tras el período de incubación.

3.- Precipitado: Fracción de la muestra que contiene los espermatozoides que no han difundido en el medio de cultivo sobrenadante.

\* Cada una de las tres fracciones de cada muestra es sometida al siguiente proceso:

1.- Se realizan las siguientes tinciones de cada fracción:

- Hematoxilina-Eosina: Según el método descrito en el apartado 8.7., para la determinación de las formas normales morfológicamente.

- Eosina-Nigrosina: Según el método descrito en el apartado 8.6.2.4., para la determinación de las formas vivas.

2.- Se toma una alicuota de 0,1 ml de cada fracción y se realiza el HOS-test según el procedimiento descrito en el apartado 8.8..

3.- Se cuantan en fresco bajo el microscopio óptico de contraste de fases, con 400X de magnificación, contando un mínimo de 200 espermatozoides HOS (+) y HOS (-), expresando los resultados en porcentajes.

4.- Posteriormente se realizan las siguientes tinciones de cada fracción tras haberlas sometido al HOS-test:

- Hematoxilina-Eosina: según el método descrito en el apartado 8.7., para la determinación de la morfología, pudiendo de esta forma distinguir espermatozoides normales y anormales que han realizado o no el HOS-test. Se observan las muestras bajo el microscopio óptico con 400X de magnifi-

cación, clasificando los espermatozoides en cuatro grupos (Tabla 8-5):

Formas normales HOS (+)  
" anormales HOS (+)  
" normales HOS (-)  
" anormales HOS (-)

- Eosina-Nigrosina: Según el método descrito en el apartado 8.6.2.4., para la determinación de la vitalidad de los espermatozoides, distinguiendo de esta forma espermatozoides viables (espermatozoides que no han permitido el paso de la Eosina a través de su membrana plasmática (Eosina -) ) y espermatozoides no viables (espermatozoides que han permitido el paso de la Eosina a través de su membrana plasmática (Eosina +) ) que hayan realizado o no el HOS-test. Se observan las muestras bajo el microscopio óptico con 400X de magnificación, clasificando los espermatozoides en cuatro grupos (Tabla 8-6):

Formas viables HOS (+)  
" no viables HOS (+)  
" viables HOS (-)  
" no viables HOS (-)

TABLA 8-5: Clasificación de los espermatozoides  
según su morfología y el resultado  
del HOS-test.

	HOS (+)	HOS (-)	
MORFOLOGIA	NORMAL	NORMAL	MORF. NORMAL
NORMAL	HOS (+)	HOS (-)	TOTAL
MORFOLOGIA	ANORMAL	ANORMAL	MORF. ANORMAL
ANORMAL	HOS (+)	HOS (-)	TOTAL
	HOS (+)	HOS (-)	
	TOTAL	TOTAL	

TABLA 8-6: Clasificación de los espermatozoides  
según su vitalidad y el resultado  
del HOS-test.

	HOS (+)	HOS (-)	
VIVOS	VIVOS	VIVOS	VIVOS EOSINA (-)
EOSINA (-)	HOS (+)	HOS (-)	TOTAL
MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS EOSINA (+)
EOSINA (+)	HOS (+)	HOS (-)	TOTAL
	HOS (+)	HOS (-)	
	TOTAL	TOTAL	

### 8.11. METODOS ESTADISTICOS

En este apartado se presentan de forma esquemática los métodos estadísticos que han sido utilizados en el análisis estadístico de los resultados (Martin et al., 1.986).

#### 8.11.1. Cálculo de la Media y la Varianza:

Dada una muestra  $x_1, x_2, \dots, x_n$  de los valores de una población normal, la Media y la Varianza se calculan mediante las siguientes expresiones:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

#### 8.11. Comparación de dos medias de muestras independientes:

- Test de comparación de dos Medias.
- Test de comparación de dos Varianzas.

Sea una variable que se estudia en dos poblaciones diferentes. Sea una muestra  $x_1, x_2, \dots, x_n$  de  $n$  valores de la primera población y sea  $y_1, y_2, \dots, y_m$  de  $m$  valores de la segunda población. Sean  $\bar{x}$ ,  $\bar{y}$ ,  $s_x^2$ ,  $s_y^2$ , las Medias y Varianzas estimadas a partir de dichas muestras y calculadas como se ha indicado anteriormente. Se desea comprobar si el valor medio de la variable en la primera población es igual o no, al valor medio en la segunda población.

El primer paso es ver si las Varianzas son homogéneas (iguales) o no, para ello la cantidad:

$$F_{\text{exp.}} = s_x^2 / s_y^2 \quad (\text{poniendo en el numerador la Varianza mayor})$$

se compara con una cantidad teórica  $F_\alpha$  que se busca en las tablas de Snedecor con  $(n-1, m-1)$  grados de libertad al  $\alpha$  % de error (Tabla A.14 de la referencia II) en donde el error  $\alpha$  es elegido en cada ocasión a conveniencia.

Entonces:

- Si  $F_{\text{exp.}} \leq F_\alpha$  ambas Varianzas son iguales.
- Si  $F_{\text{exp.}} > F_\alpha$  ambas Varianzas son distintas con  $\alpha$  error.

Cuando las Varianzas sean iguales,

calcular:

$$t_{\text{exp.}} = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{s \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}}} \quad \text{con } s^2 = \frac{(n-1)s_x^2 + (m-1)s_y^2}{n+m-2}$$

cantidad que se compara con una cantidad teórica  $t_\alpha$  buscada en la tabla de Student (Tabla A.4 de la referencia II) con  $(n+m-2)$  grados de libertad y el error  $\alpha$  deseado.

Cuando las Varianzas sean distintas,  
calcular entonces:

$$t_{\text{exp.}} = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{\sqrt{\frac{s_x^2}{n} + \frac{s_y^2}{m}}}$$

cantidad que se compara con una teórica:

$$t_\alpha = \frac{t_x \frac{s_x^2}{n} + t_y \frac{s_y^2}{m}}{\frac{s_x^2}{n} + \frac{s_y^2}{m}}$$

en donde  $t_x$  y  $t_y$  se buscan en la misma tabla A.4 de Student con  $(n-1)$  y  $(m-1)$  grados de libertad respectivamente. En ambos casos:

Si  $t_{\text{exp.}} \leq t_\alpha$  -- entonces las medias de ambas poblaciones son iguales.

Si  $t_{\text{exp.}} > t_\alpha$  -- entonces las medias de ambas poblaciones son distintas con un error  $\alpha$ .

Al último test se le denomina test de Cochran (1.967).

#### 8.11.3. Comparación de dos Medias de muestras apareadas:

Si  $(x_{1i}; x_{2i})$ ,  $(i=1, 2, \dots, n)$ , son parejas de valores obtenidos en un mismo individuo  $i$ , calcular  $d_i = x_{1i} - x_{2i}$  en cada individuo y la Media  $\bar{d}$  y la Varianza  $s_d^2$  de los valores así obtenidos. Suponiendo la variable  $d$  normal, calcular:

$$t_{\text{exp.}} = \frac{|\bar{d}|}{\sqrt{\frac{s_d^2}{n}}}$$

y compararla con una  $t(n-1)$  de la distribución de Student. Si hay significación, entonces las Medias de las variables  $x_1$  y  $x_2$  son distintas.

8.11.4. Test de Wilcoxon para muestras apareadas:

Contrasta si la primera población no tiende a dar valores más altos o más bajos que la segunda.

Se calculan las diferencias no nulas entre cada pareja de datos y se asignan rangos a sus valores absolutos. La suma de rangos correspondientes a las diferencias positivas es el estadístico de contraste, frente a valores teóricos tabulados o utilizando una aproximación Normal.

8.11.5. Regresión y Correlación:

La Correlación y Recta de Regresión lineales se calcula mediante las expresiones:

$$\sum x_i y_i = \frac{(\sum x_i)(\sum y_i)}{n}$$

$$b = \frac{(\sum x_i^2)^2}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

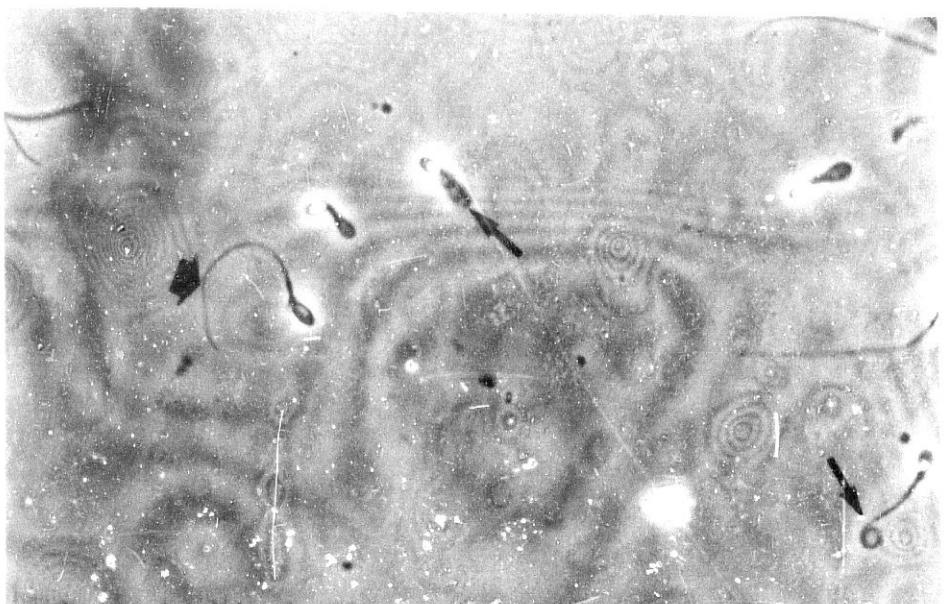
$$\sum x_i y_i = \frac{(\sum x_i)(\sum y_i)}{n}$$

$$r = \sqrt{\frac{(\sum x_i^2)^2 (\sum y_i^2)^2}{(\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n})(\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n})}}$$

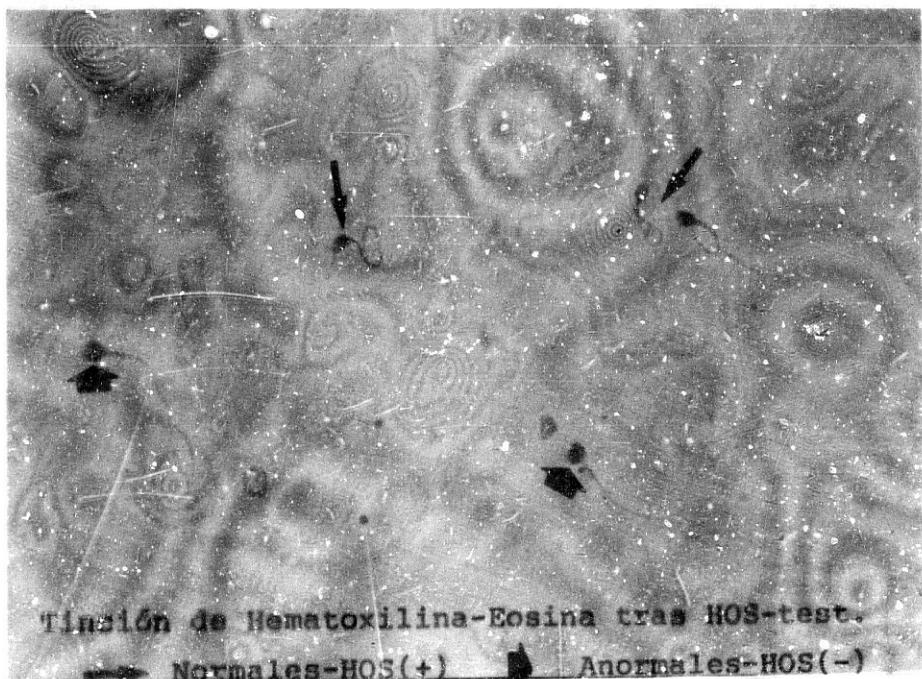
y el contraste de significación para este último coeficiente (de Correlación) se realiza mediante:

$$t_{\text{exp.}} = \sqrt{\frac{(n-2) r^2}{1-r^2}}$$

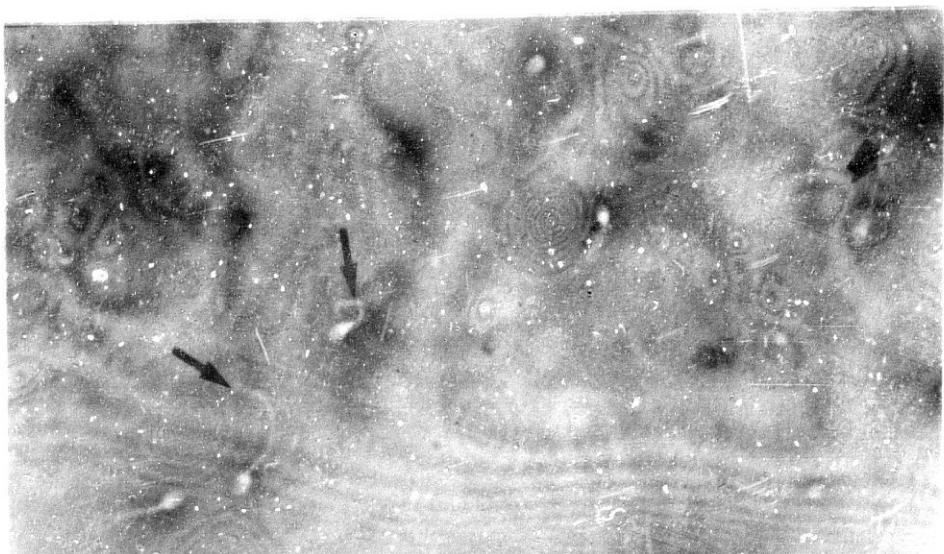
frente a una  $t$  de Student con  $(n-2)$  grados de libertad.



Test de hinchamiento hiposmótico (HOS-test),  
observación en fresco. → HOS(+) ← HOS(-)



Tinción de Hematoxilina-Eosina tras HOS-test.  
→ Normales-HOS(+) ← Anormales-HOS(-)



Tinción de Eosina-Nigrosina tras HOS-Test.  
→ Viables-HOS(+) ← No viables-HOS(-)

**R E S U L T A D O S**

## 9. RESULTADOS

En la Tabla I se muestran los resultados obtenidos, de los diferentes parámetros seminales, tras realizar el espermograma, del eyaculado en los cuatro grupos estudiados: Normozoospérmicos, Oligo-, Asteno-, y Oligo-astenozoospérmicos moderados. Dicha Tabla I ha sido representada gráficamente según la concentración (Gráfica I(a)), movilidad (Gráfica I(b)), vitalidad (Gráfica I(c)), morfología (Gráfica I(d)), y HOS-test (Gráfica I(e)) espermática.

En la Gráfica I(a) se representan los resultados obtenidos en la concentración de espermatozoides en los cuatro grupos estudiados. En función de los criterios aplicados para la separación de los grupos se observa que el grupo de Normozoospérmicos y Astenozoospérmicos moderados, muestran valores normales en la concentración espermática ( $>20 \times 10^6$  spz/ml), mientras que el grupo de Oligo-, y Oligo-astenozoospérmicos moderados presentan valores disminuidos de su concentración ( $p < 0.001$ ).

En la Gráfica I(b) se representan los resultados obtenidos en el porcentaje de la movilidad espermática en los cuatro grupos estudiados y que según los criterios utilizados para la separación de los grupos se observa que el grupo de Normozoospérmicos y Oligozoospérmicos moderados presentan un porcentaje de

formas móviles dentro de los límites de normalidad ( $\geq 50\%$  de formas móviles), aunque al comparar ambos grupos sea menor significativamente en los Oligozoospérmicos moderados ( $p < 0.001$ ). Sin embargo, el grupo de Asteno-, y Oligo-astenozoospérmicos moderados presentan unos valores de formas móviles disminuidos, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos.

En la Gráfica I(c) se representan los resultados obtenidos en el porcentaje de vitalidad de los espermatozoides en los cuatro grupos estudiados, observándose que todos los grupos entran dentro de los límites de normalidad ( $\geq 50\%$  de formas vivas), aunque existan diferencias significativas entre el grupo de Normozoospérmicos y los grupos de Astenozoospérmicos moderados ( $p < 0.01$ ) y Oligozoospérmicos moderados ( $p < 0.05$ ).

En la Gráfica I(d) se representan los resultados obtenidos en el porcentaje de formas morfológicamente normales en los cuatro grupos estudiados, estando todos ellos dentro de los límites de normalidad ( $\geq 50\%$  de formas normales), sin que existan diferencias significativas entre ellos.

En la Gráfica I(e) se representan los resultados obtenidos en el porcentaje de formas HOS-positivas en los cuatro grupos estudiados, encontrándose valores significativamente superiores en el grupo de Normozoospérmicos al ser comparado con los otros tres grupos

( $p < 0.001$ ), no observándose diferencias entre estos tres últimos grupos.

En la Tabla II se muestran el porcentaje de formas morfológicamente normales, el porcentaje de formas HOS-positivo y el porcentaje de formas que presentaron a la vez ambas características (Formas normales y HOS-positivo), en las dos fracciones obtenidas tras el "swim-up", Precipitado y Sobrenadante, observándose unos valores significativamente mayores de los parámetros estudiados en el Sobrenadante respecto al Precipitado ( $p < 0.001$ ). La Gráfica II muestra la representación gráfica de los resultados de la Tabla II.

En la Tabla III se muestran el porcentaje de formas vivas, el porcentaje de formas HOS-test positivo y del porcentaje de formas que presentan a la vez ambas características, es decir formas vivas y HOS-positivo, en las dos fracciones obtenidas tras el "swim-up", Precipitado y Sobrenadante, observándose unos valores significativamente mayores de formas HOS-positivas en el Sobrenadante respecto del Precipitado ( $p < 0.001$ ), no obteniéndose diferencias significativas en el porcentaje de formas vivas y formas vivas-HOS positivo entre ambas fracciones. La representación Gráfica de la Tabla III se

muestra en la Gráfica III.

La Gráfica IV muestra la relación entre el porcentaje de formas morfológicamente normales y el porcentaje de formas HOS-test positivo en el eyaculado de todas las muestras sometidas a nuestro estudio, observándose una correlación positiva, estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ;  $r = 0.450108$ ; Formas HOS-positivo=  $22.7461 + 0.3638 \times$  Formas normales), entre ambos parámetros. Los valores referidos se expresan en la Tabla IV.

La Gráfica V(a) representa los resultados obtenidos en el eyaculado de las muestras estudiadas, al relacionar el porcentaje de formas vivas (Eosina (-)), con el porcentaje de formas HOS-test positivo, observándose una correlación positiva, estadísticamente significativa ( $p < 0.02$ ;  $r = 0.4133$ ; Formas HOS-positivo=  $25.4366 + 0.3103 \times$  Formas vivas), entre ambos parámetros. Los valores referidos se expresan en la Tabla V(a).

La Gráfica V(b) representa los resultados obtenidos en el eyaculado de las muestras estudiadas, al relacionar el porcentaje de

formas vivas tras la realización del HOS (Eosina (-)), con el porcentaje de formas HOS-test positivo, no existiendo correlación estadísticamente significativa entre estos parámetros ( $r=0.110672$ ; N.S.). Los valores representados en esta Gráfica se expresan en la Tabla V(b).

La Gráfica VI recoge la relación entre el porcentaje de formas morfológicamente normales y el porcentaje de formas con resultado positivo en el HOS-test, en el Precipitado de todas las muestras estudiadas, observándose una correlación positiva, estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ;  $r=0.535916$ ; Formas HOS-positivo =  $22.5928 + 0.3763 \times$  Formas Normales) entre ambos parámetros. Los valores representados en esta Gráfica se expresan en la Tabla VI.

La Gráfica VII(a) representa los resultados obtenidos al relacionar el porcentaje de formas vivas (Eosina (-)), con el porcentaje de formas HOS-test positivo en el Precipitado de las muestras estudiadas, observándose una correlación positiva, estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ;  $r=0.4247$ ; Formas HOS-positivo =  $26.2522 + 0.2809 \times$  Formas vivas), entre ambos parámetros. Los valores referidos se expresan en la Tabla VII(a).

En la Gráfica VII(b) se representan los resultados obtenidos al relacionar el porcentaje de formas vivas tras la realización del HOS (Eosina (-)), con el porcentaje de formas HOS-test positivo en el Precipitado de todas las muestras estudiadas, no existiendo correlación estadísticamente significativa entre estos parámetros ( $r=0.221112$ ; N.S.). Los valores representados en la Gráfica VII(b) se expresan en la Tabla VII(b).

La Gráfica VIII expresa la relación entre el porcentaje de formas morfológicamente normales y el porcentaje de formas HOS-test positivo en el Sobrenadante de todas las muestras incluidas en nuestro estudio, observándose una correlación positiva, estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ;  $r=6037$ ; Formas HOS-positivo =  $18.0897 + 0.5505 \times$  Formas normales), entre ambos parámetros. Los valores referidos se expresan en la Tabla VIII.

En la Gráfica IX(a) se representan los resultados obtenidos al relacionar el porcentaje de formas vivas (Eosina (-)) y el porcentaje de formas HOS-test positivas, medidos en el Sobrenadante de las muestras estudiadas, observándose una correlación positiva, estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ;  $r=0.5625$ ; Formas HOS-

positivos = 13.8474 + 0.5007 x Formas Vivas), entre ambos parámetros. Los valores referidos se expresan en la Tabla IX(a).

En la Gráfica IX(b) se representan los resultados obtenidos al relacionar el porcentaje de formas vivas tras la realización del HOS-test (Eosina (-)), con el porcentaje de formas HOS-test positivo en el Sobrenadante de todas las muestras estudiadas, no existiendo correlación estadísticamente significativa entre estos parámetros ( $r=0.1208$ ; N.S.). Los valores representados en la Gráfica se expresan en la Tabla IX(b).

En la Gráfica X se representan los resultados obtenidos al relacionar el porcentaje de formas con movilidad progresiva y el porcentaje de formas HOS-test positivo en el Eyaculado de individuos Normozoospérmicos, observándose una correlación positiva, estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ;  $r=0.70$ ; Formas HOS-positivo =  $9.4208 + 0.6546 \times$  Formas con movilidad progresiva), entre ambos parámetros. Los valores referidos se representan en la Tabla X.

EN la Gráfica XI se representan

los resultados obtenidos al relacionar el porcentaje de formas con movilidad progresiva y el porcentaje de formas HOS-test positivo en el Eyaculado de individuos infértilles (Oígo-, Asteno-, y Oligo-astenozoospérmicos moderados), observándose una correlación positiva, estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ;  $r = 0.6428$ ; Formas HOS-positivo =  $19.1087 + 0.5559 \times$  Formas con movilidad progresiva), entre ambos parámetros. Los valores referidos se expresan en la Tabla XI.

En la Gráfica XII se representan los resultados obtenidos al relacionar el porcentaje de formas con movilidad progresiva y el porcentaje de formas HOS-test positivo en el Eyaculado de todos los individuos, considerando conjuntamente todos los grupos estudiados, Normozoospérmicos, Oígo-, Asteno-, y Oligo-Astenozoospérmicos moderados, observándose una correlación positiva, estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ;  $r = 0.6345$ ; Formas HOS-positivo =  $19.5454 + 0.4694 \times$  Formas con Movilidad progresiva), entre ambos parámetros. Los resultados referidos se representan en la Tabla XIII.

En la Tabla XIII se muestran los resultados obtenidos al relacionar el porcentaje de formas con resultado positivo del HOS-test

con los parámetros estudiados al realizar el análisis del espermograma en el eyaculado de todos los individuos estudiados, no observándose una correlación significativa entre el resultado positivo del HOS-test y concentración, número total de espermatozoides, y movilidad, considerando en este caso el porcentaje de formas móviles, y no únicamente los porcentajes de formas que muestran movilidad progresiva.

En la Tabla XIV se muestran los resultados obtenidos al realizar el HOS-test antes (HOS-eyaculado) y después (HOS-sobrenadante) de la separación de los espermatozoides mediante la técnica de selección de "swim-up" en individuos Normozoospérmicos, Oligo-, Asteno-, y Oligoastenozoospérmicos moderados, observándose que tras el swim-up se obtienen unos niveles más altos en el % de formas HOS-positivas en individuos que no mostraban un defecto de movilidad en su espermograma (Normo- y Oligo).

En la Tabla XV se muestran los resultados de los diferentes parámetros seminales en la población general estudiada en nuestro laboratorio y que fue clasificada en los grupos correspondientes de acuerdo con los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1.987). A dicha población general pertenecen las muestras utilizadas para la realización del presente estudio.

TABLA I

Valores de la Concentración de espermatozoides ( $spz \times 10^6/ml$ ); de la Movilidad (%); de la Vitalidad (%); de la Morfología (%); y del test de Hinchamiento Hipoosmótico (HOS-test) (%); en los grupos de individuos Normozoospérmicos, Astenozoospérmicos Moderados, Oligozoospérmicos Moderados y Oligo-Astenozoospérmicos Moderados, expresados en Media  $\pm$  error standars de la Media ( $x \pm SEM$ ). (Representado en las Gráficas I (a, b, c, d y e)).

TABLA I

	Concentración (spz. $\times 10^6$ /ml)	Movilidad (%)	Vitalidad (%)	Morfología (%)	HOS-Test (+) (%)
Normozoospérmicos (n=26)	108.5 ± 9.28 <sup>ab</sup>	71.3 ± 1.78 <sup>efg</sup>	67.1 ± 2.67 <sup>k1</sup>	59.0 ± 2.01	51.4 ± 2.15 <sup>mno</sup>
Astenozoospérmicos Moderados (n=11)	93.2 ± 13.71 <sup>cd</sup>	37.6 ± 5.46 <sup>fi</sup>	51.4 ± 6.03 <sup>1</sup>	54.0 ± 5.20	30.2 ± 4.66 <sup>n</sup>
Oligozoospérmicos Moderados (n=12)	14.5 ± 2.16 <sup>ac</sup>	59.3 ± 3.39 <sup>eij</sup>	56.5 ± 3.77 <sup>k</sup>	54.8 ± 3.27	33.0 ± 4.32 <sup>m</sup>
Oligo-Astenozoospérmicos Moderados (n=9)	14.2 ± 2.41 <sup>bd</sup>	34.4 ± 7.37 <sup>gj</sup>	57.3 ± 4.16	53.3 ± 3.87	34.4 ± 4.89 <sup>o</sup>

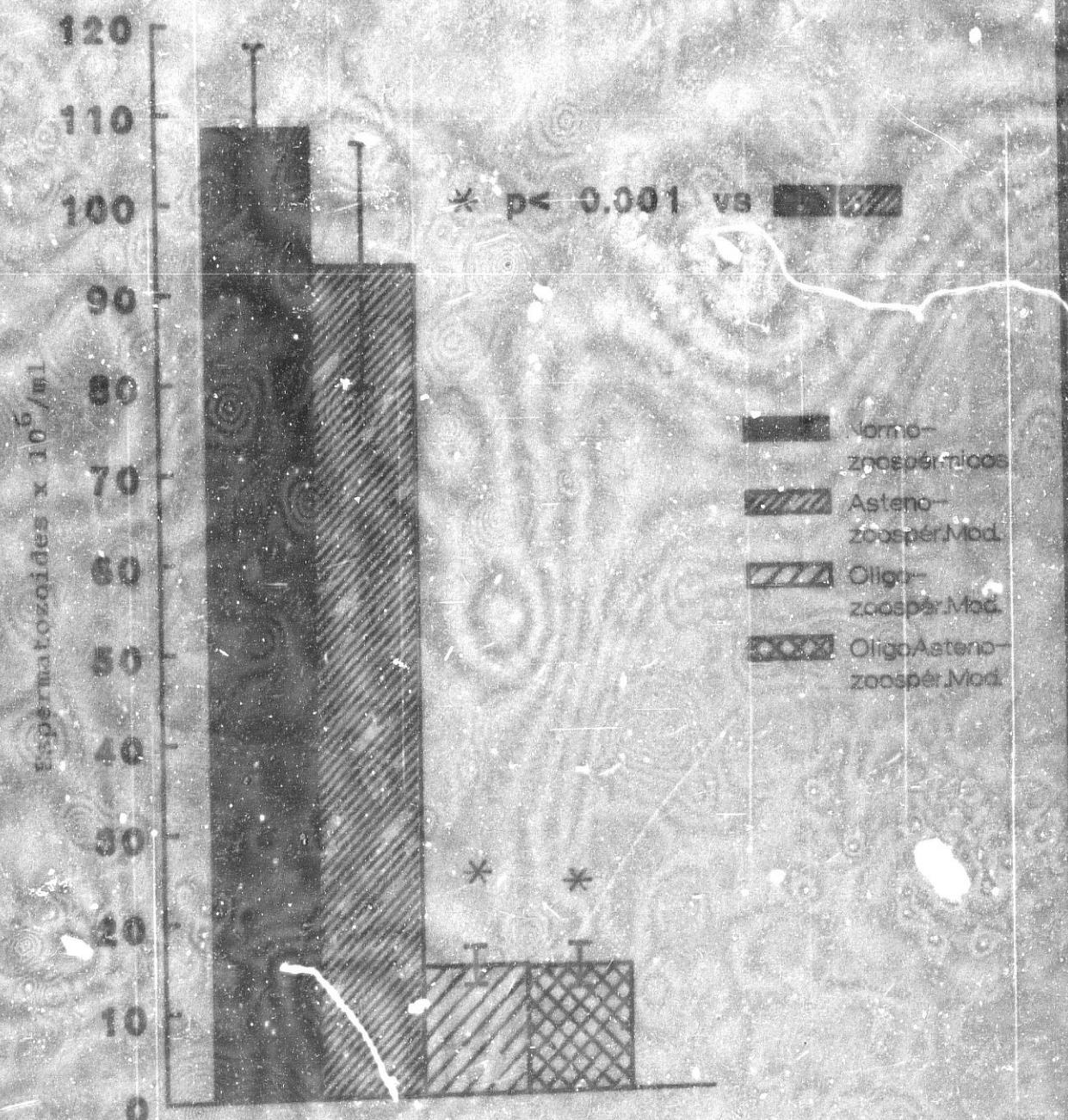
abcdefgmnp: p < 0.001; 1: p < 0.01; k: p < 0.05; ij: p < 0.02

# GRAFICA I

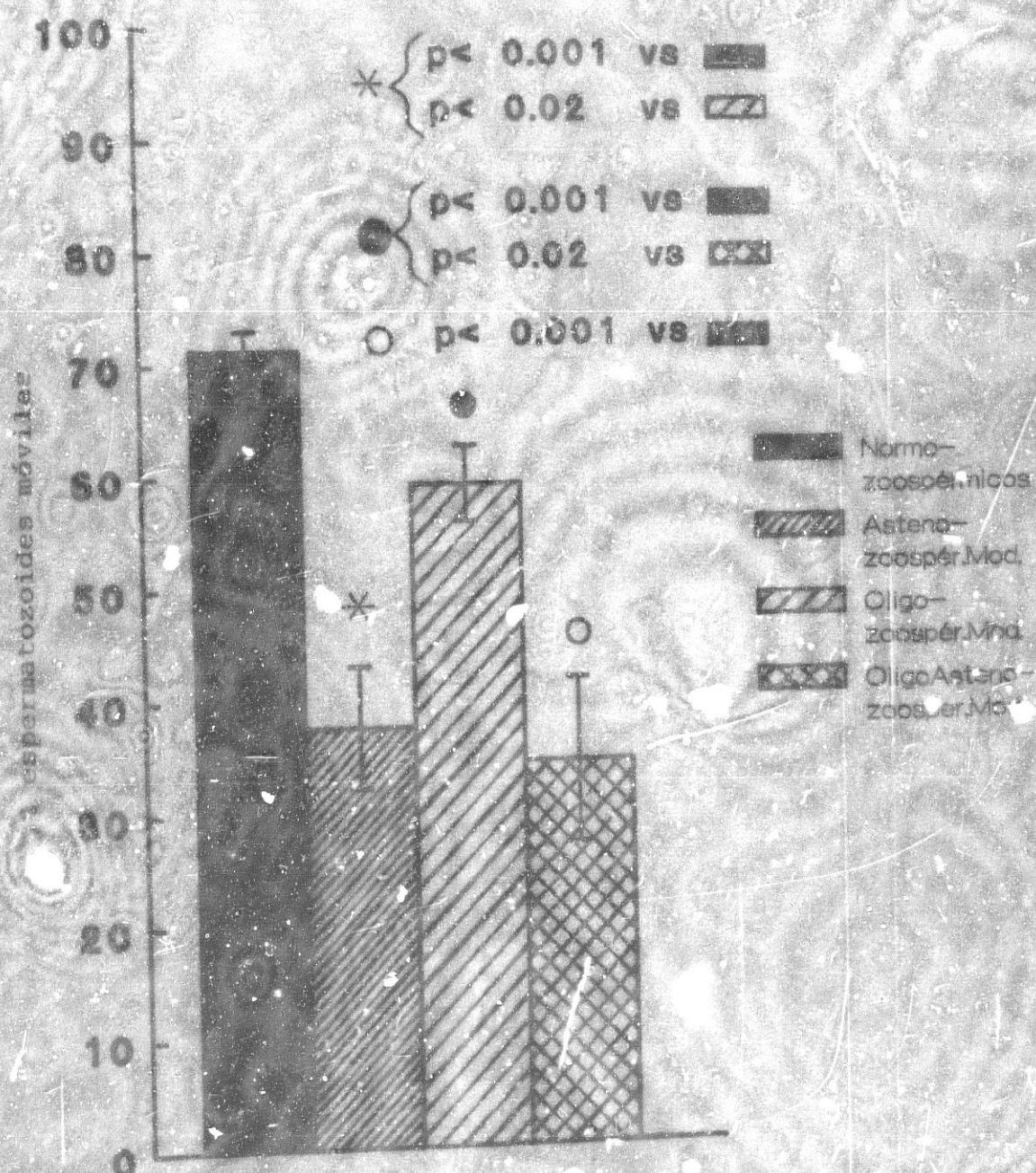
240.



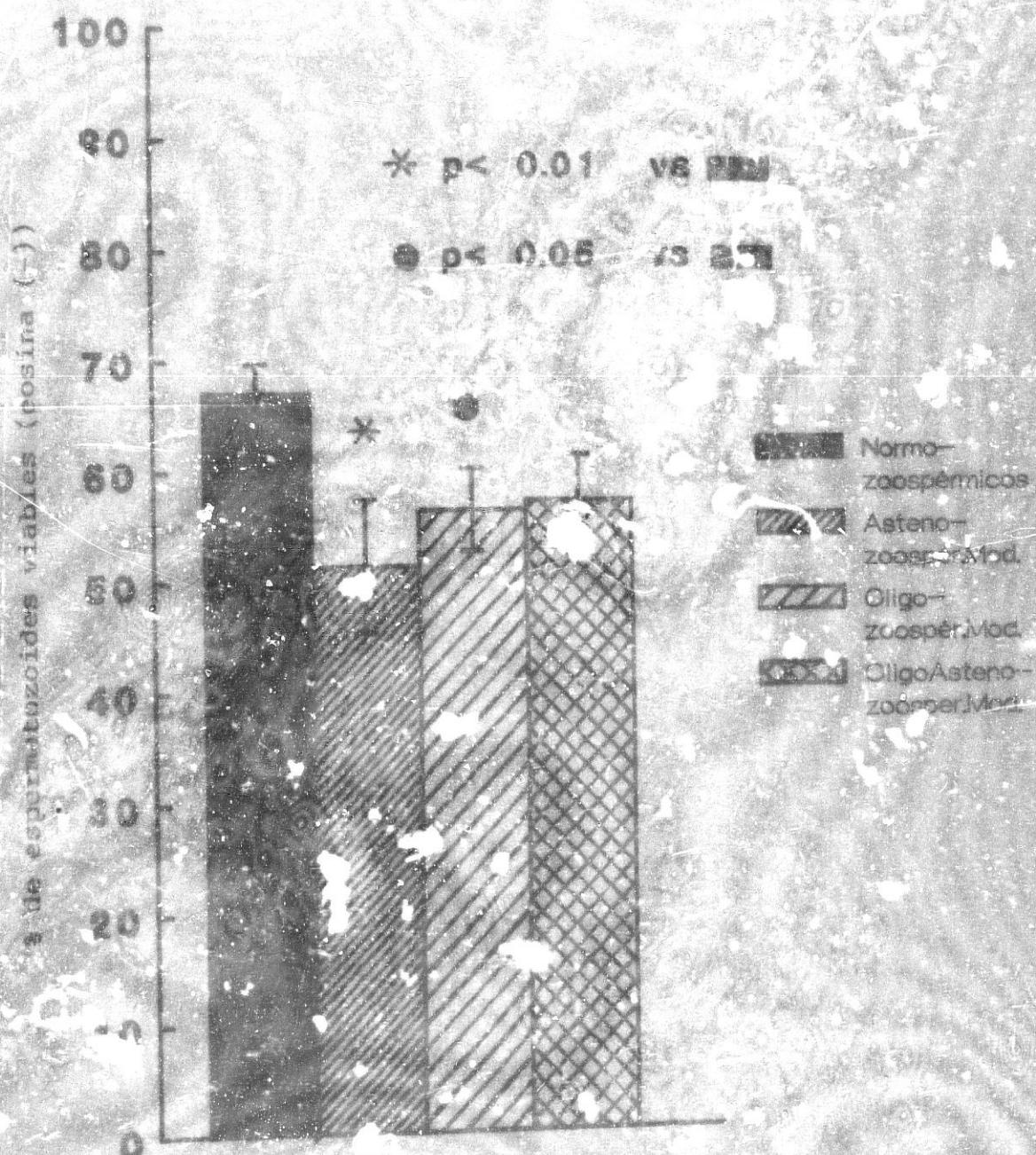
## GRAFICA Ia



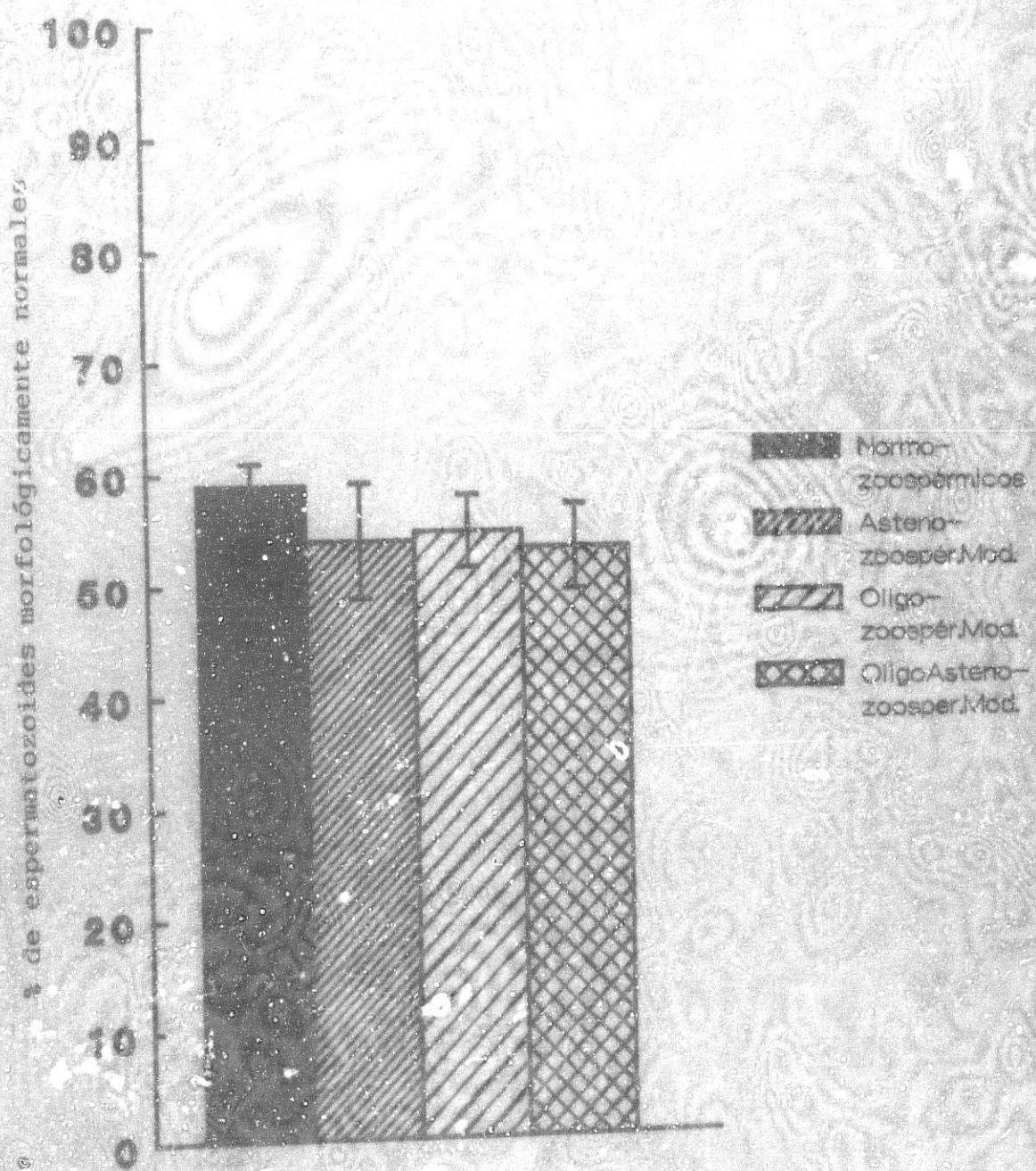
## GRAFICA 1b



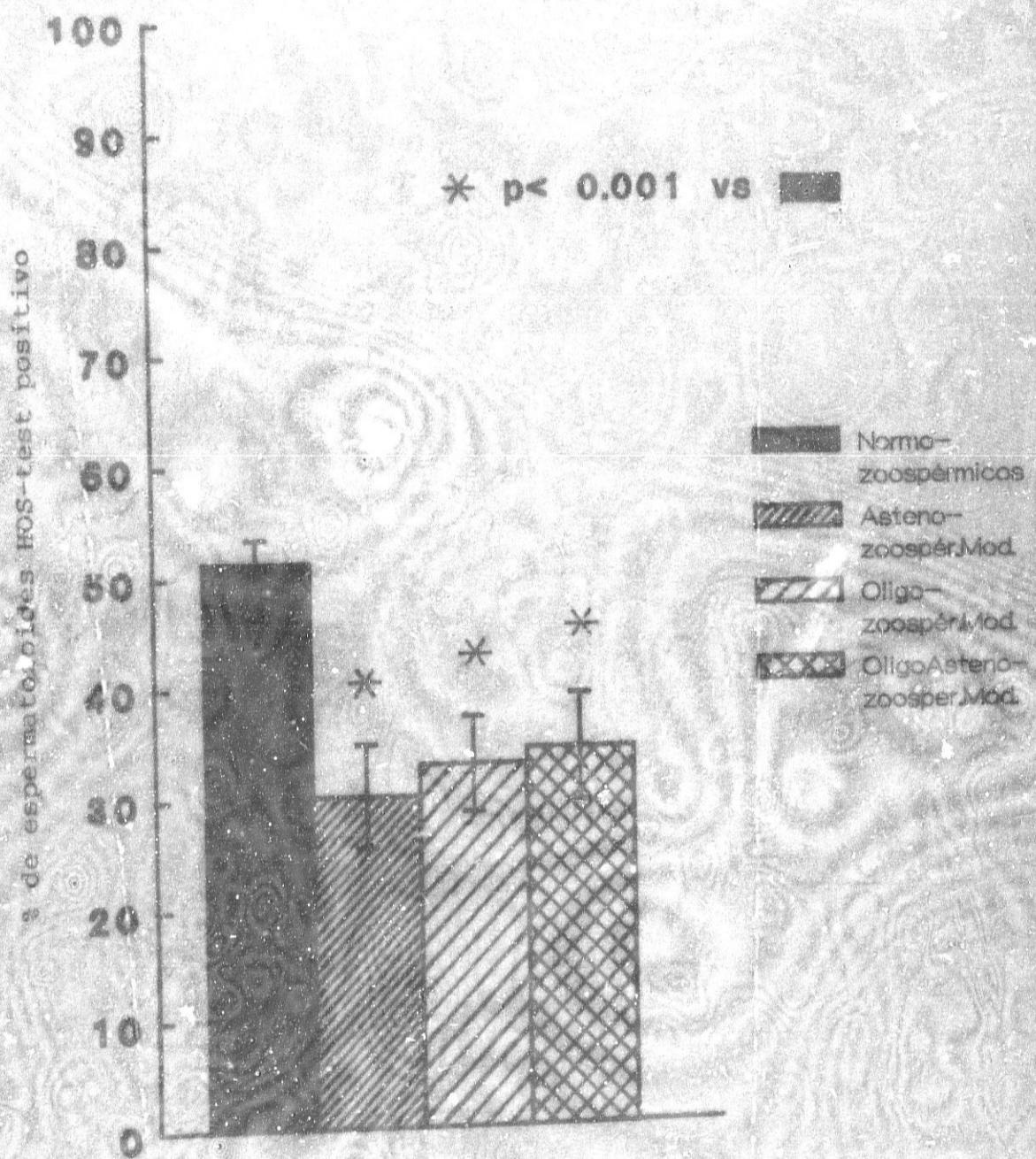
## GRAFICA Ic



## GRAFICA Id



## GRAFICA Ie



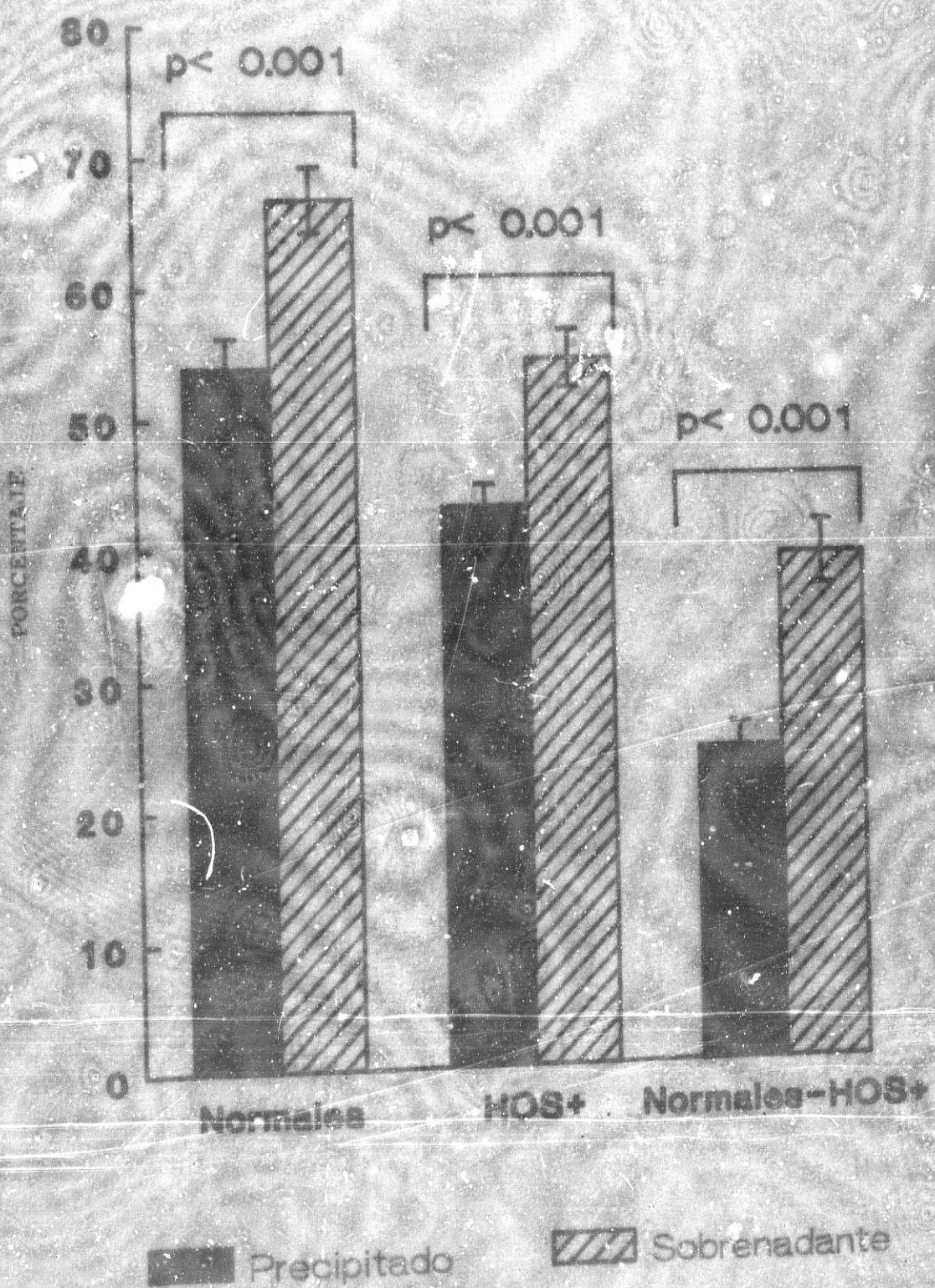
## TABLA II

Resultados del porcentaje de formas con Morfología normal; formas con resultado positivo tras el test de hinchamiento hipoosmótico; y formas con Morfología normal y HOS-test positivo; en el Precipitado y Sobrenadante obtenido tras aplicar el método de separación selectiva de espermatozoides de "swim-up", expresados en Media  $\pm$  error standars de la Media ( $x \pm SEM$ ). (Representado en Gráfica II).

TABLA II

	Precipitado	Sobrenadante	Significación
Formas Normales (%) (n=48)	53.9 ± 2.316	66.8 ± 2.510	p < 0.001
Formas HOS (+) (%) (n=48)	43.2 ± 1.672	54.5 ± 2.235	p < 0.001
F. Normales-HOS (+) (%) (n=48)	24.3 ± 1.899	39.3 ± 2.528	p < 0.001

## GRAFICA II



## TABLA III

Resultados del porcentaje de Vitalidad; Vitalidad tras HOS-test (Eosina (-)); formas con resultado positivo tras el HOS-test; y formas Viables y Hos-test positivo; en el Precipitado y Sobrenadante obtenido tras aplicar el método de separación selectiva de espermatozoides de "swim-up", expresados en Media  $\pm$  error standars de la Media ( $x \pm SEM$ ). (Representado en Gráfica III).

## GRAFICA III



TABLA IV

Correlación entre el porcentaje de formas con Morfología normal y el porcentaje de formas con resultado positivo en el test de hinchamiento hiposmótico en el Ejaculado. (Coeficiente de correlación de Pearson y Recta de Regresión). (Representado en Gráfica IV).

TABLA IV

Morfología F. Normales (%)	Formas HOS (+) (%)
65	48
70	44
61	46
65	40
54	61
58	31
46	15
1	29
15	19
63	43
35	50
47	36
33	28
44	55
56	51
54	14
64	32
66	43
62	53
66	53
67	56
59	59
61	37
32	42
63	53
55	54
67	45
70	55
40	16
62	51
66	46
83	50
81	48
57	70
47	40
61	32

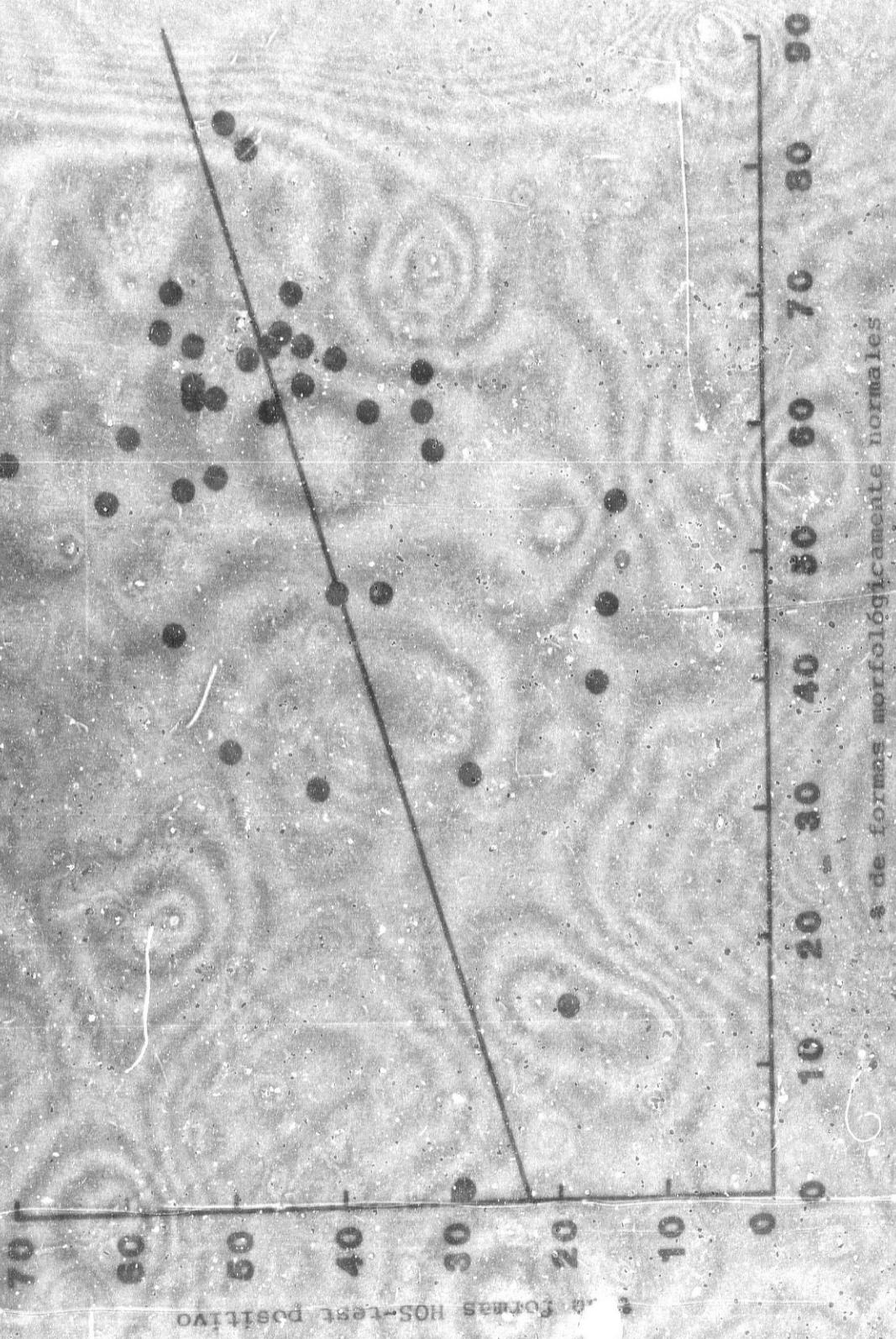
$$r = 0.450108$$

$$p < 0.01$$

$$t_{\text{exp.}} = 2.939 \ (\text{g.l.} = 34)$$

$$\text{F.HOS (+)} = 22.7461 + 0.3638 \times \text{F.Normales}$$

GRAFICA (VACUULADO)



## TABLA V (a)

Correlación entre el porcentaje de formas viables (Eosina (-)) y el porcentaje de formas con resultado positivo en el test de hinchamiento hipo-osmótico en el Eyaculado. (Coeficiente de correlación de Pearson y Recta de Regresión). (Representado en Gráfica V (a)).

TABLA V (a)

Vitalidad F.Vivas (%)	Formas HOS (+) (%)
49	38
59	44
60	46
69	40
52	51
66	31
52	15
35	29
24	19
49	43
26	40
53	36
58	35
55	55
52	51
85	32
59	43
74	53
65	63
77	56
75	59
51	37
86	42
44	53
59	54
74	45
65	51
64	46
86	48
88	70
74	40
58	42

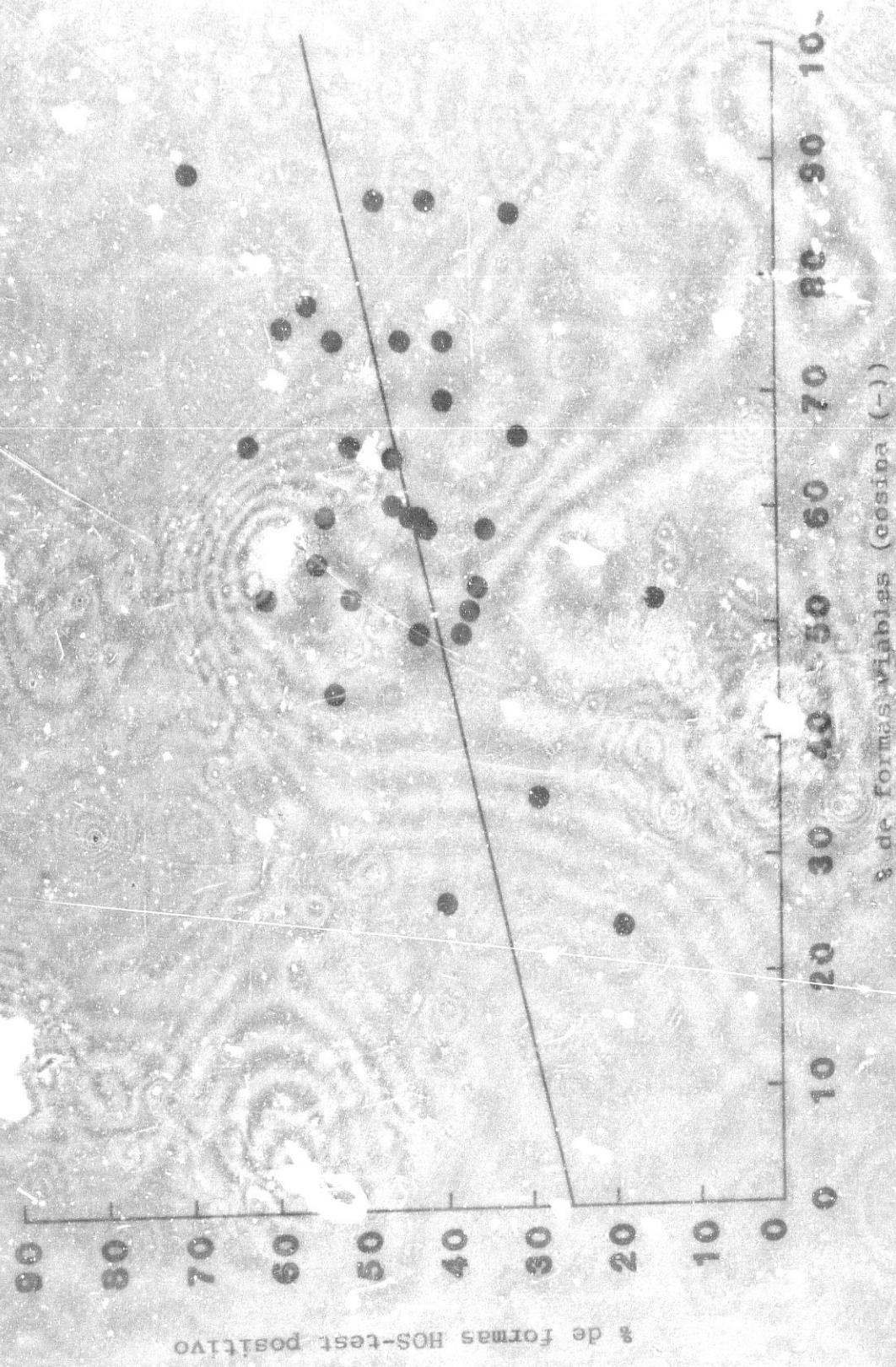
$$r = 0.4133$$

$$p < 0.02$$

$$t_{\text{exp.}} = 2.5675 \text{ (g.l. = 30)}$$

$$F.HOS (+) = 25.4366 + 0.3103 \times F.Vivas$$

## GRAFICA V a (ESTACULADO)



## TABLA V (b)

Correlación entre el porcentaje de formas viables tras HOS-tes<sup>+</sup> (Eosina (-)) y el porcentaje de formas con resultado positivo en el test de hinchamiento hipoosmótico en el Ejaculado. (Coeficiente de correlación de Pearson). (Representado en Gráfica V (b)).

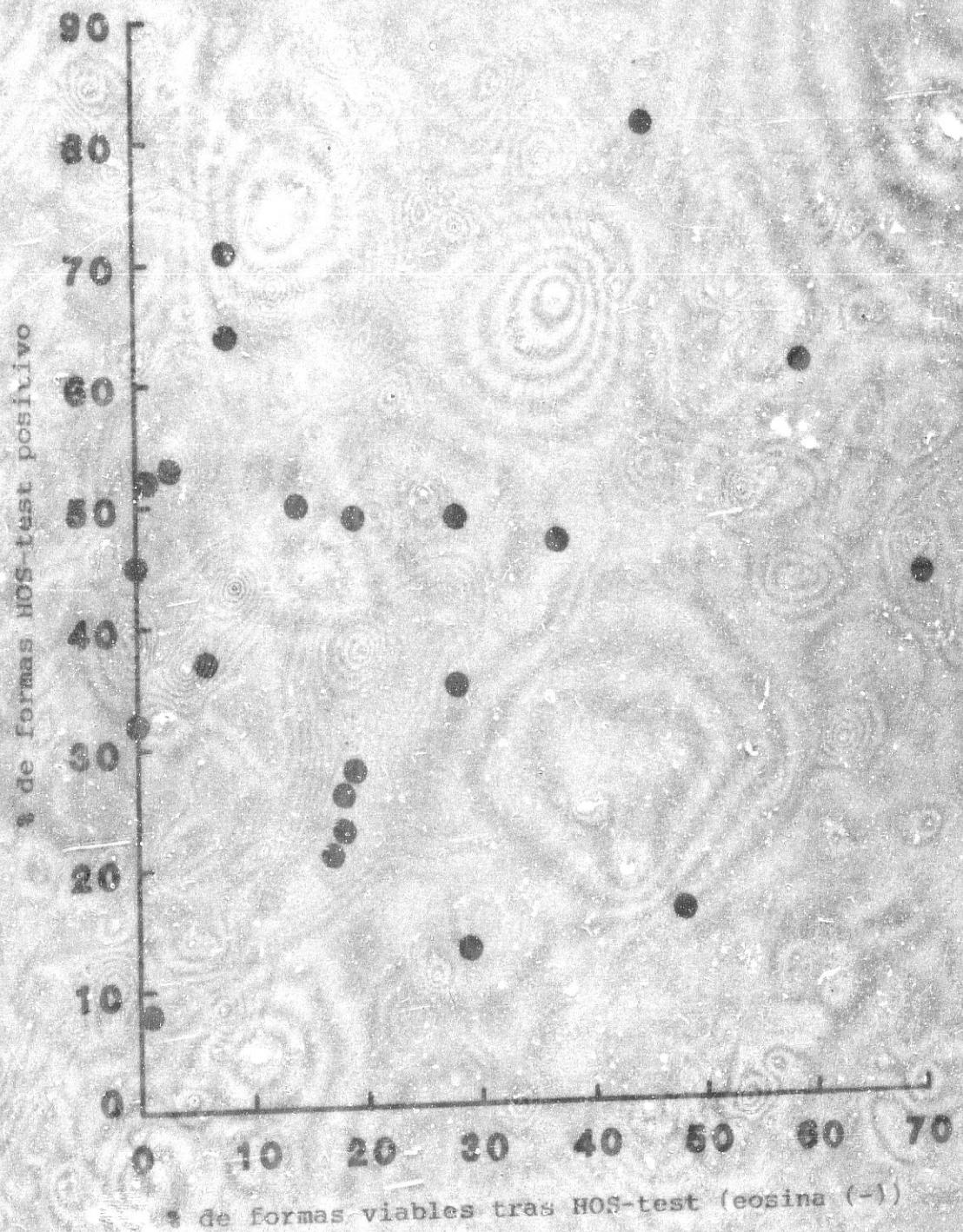
TABLA V (b)

Vitalidad F. Vivas (%)	Formas HOS (+) (%)
48	16
59	62
18	23
70	44
8	64
29	13
18	26
1	8
17	21
73	69
19	49
28	35
37	47
23	49
8	71
19	28
45	82
6	37
14	50
0	32
1	52
3	53
0	45

$r = 0.110672$

N.S.

## GRAFICA V b (EYACULADO)



## TABLA VI

Correlación entre el porcentaje de formas con Morfología normal y el porcentaje de formas con el resultado positivo en el test de hinchamiento hipoosmótico en el Precipitado. (Coeficiente de correlación de Pearson y Recta de Regresión). (Representado en Gráfica VI).

TABLA VI : Precipitado

Morfología F.Normales (%)	Formas HOS (+) (%)
72	54
86	45
69	41
60	54
55	53
54	28
39	20
29	26
17	23
48	62
35	29
32	32
32	39
40	48
50	50
54	37
52	39
58	53
70	46
66	46
61	39
72	32
69	63
58	55
54	33
67	68
26	35
75	50
47	52
49	53
77	49
31	27
67	47
67	40
65	54
45	46
49	39
52	34

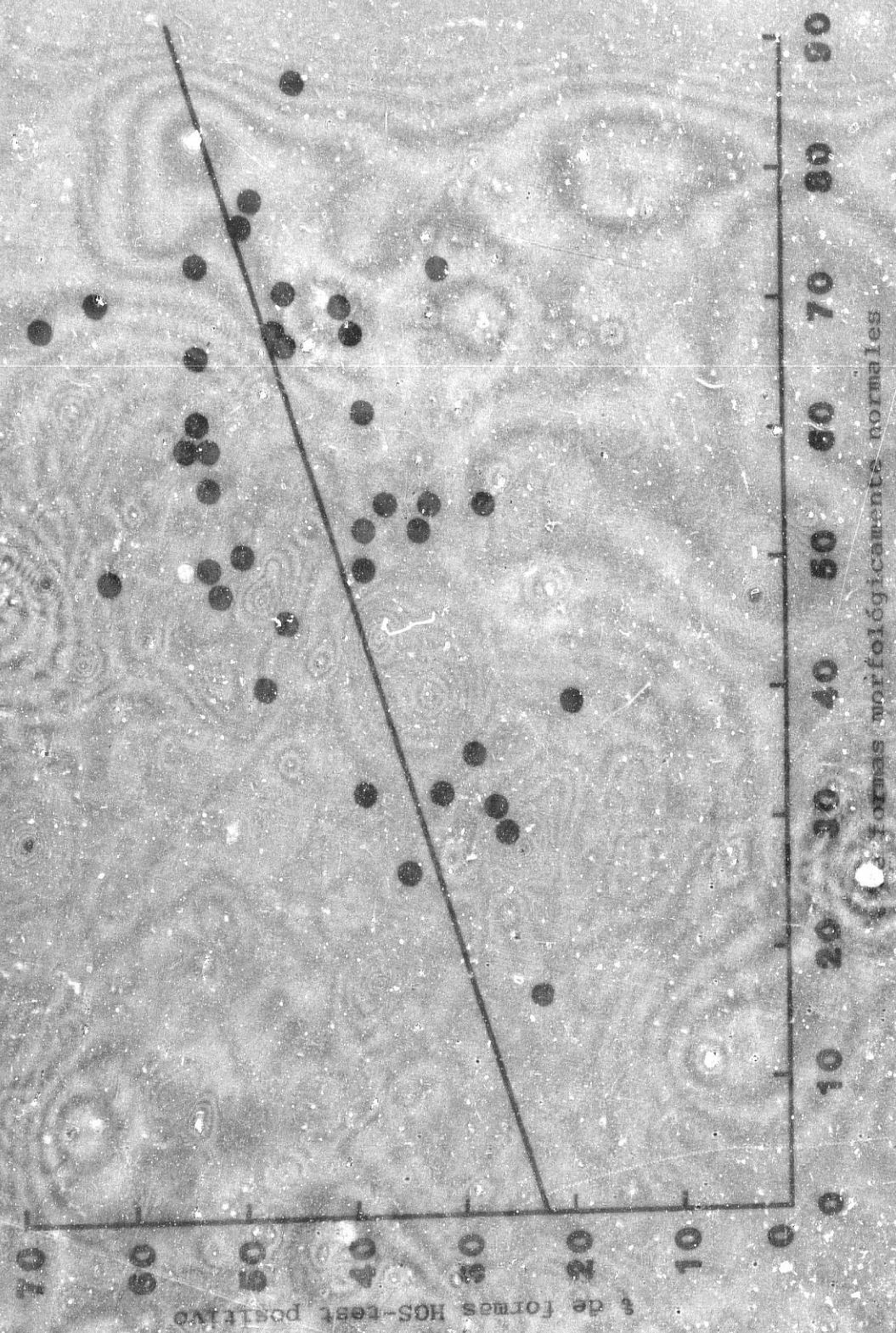
$$r = 0.535916$$

$$p < 0.001$$

$$t_{\text{exp.}} = 3.809 \ (\text{g.l.}=36)$$

$$F.HOS (+) = 22.5928 + 0.3763 \times F.Normales$$

GRÁFICA VI (PRECIPITADO)



Formas morfológicamente normales

TABLA VII (a)

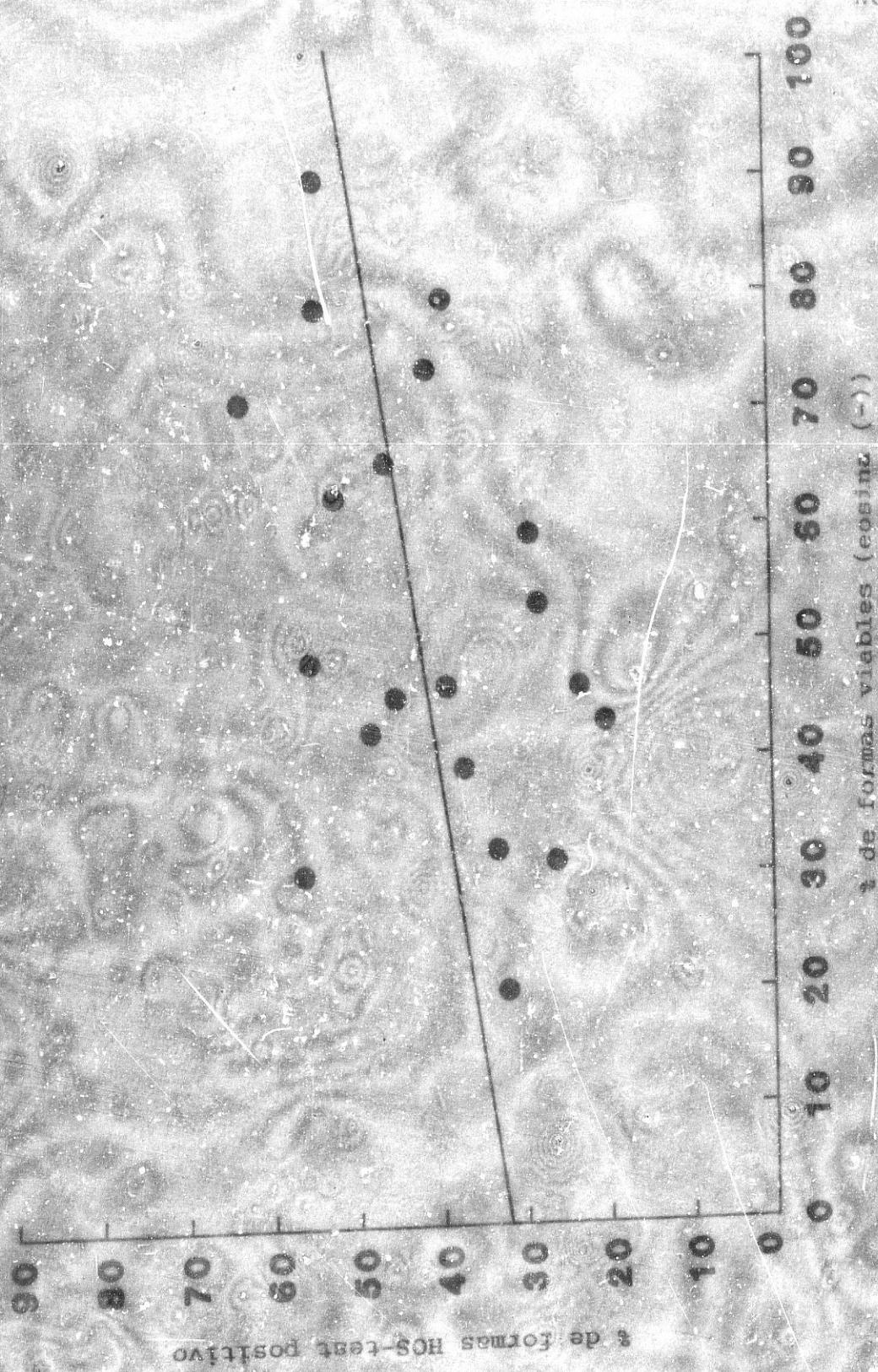
Correlación entre el porcentaje de formas viables (Eosina(-)) y el porcentaje de formas con el resultado positivo en el test de hinchamientos hipo-osmótico en el Precipitado. (Coeficiente de correlación de Pearson y Recta de Regresión). (Representado en Gráfica VII (a)).

TABLA VII (a)

Vitalidad F.Vivas (%)	Formas HOS (+) (%)
78	54
45	45
73	41
89	54
53	28
43	20
31	26
46	23
59	29
46	39
42	48
39	37
79	39
62	52
65	46
30	56
20	32
70	63
48	55
32	33

$r = 0.4247$   
 $p < 0.05$   
 $t_{exp.} = 2.0979$  (g.1.=18)  
 $F.HOS (+) = 26.2522 + 0.2809 \times F.Vivas$

GRÁFICA VII a (PRECIPITADO)



## TABLA VII (b)

Correlación entre el porcentaje de formas viables tras HOS-test (Eosina (-)) y el porcentaje de formas con resultado positivo en el test de hinchamiento hipoosmótico en el Precipitado. (Coeficiente de correlación de Pearson). (Representado en Gráfica VII (b)).

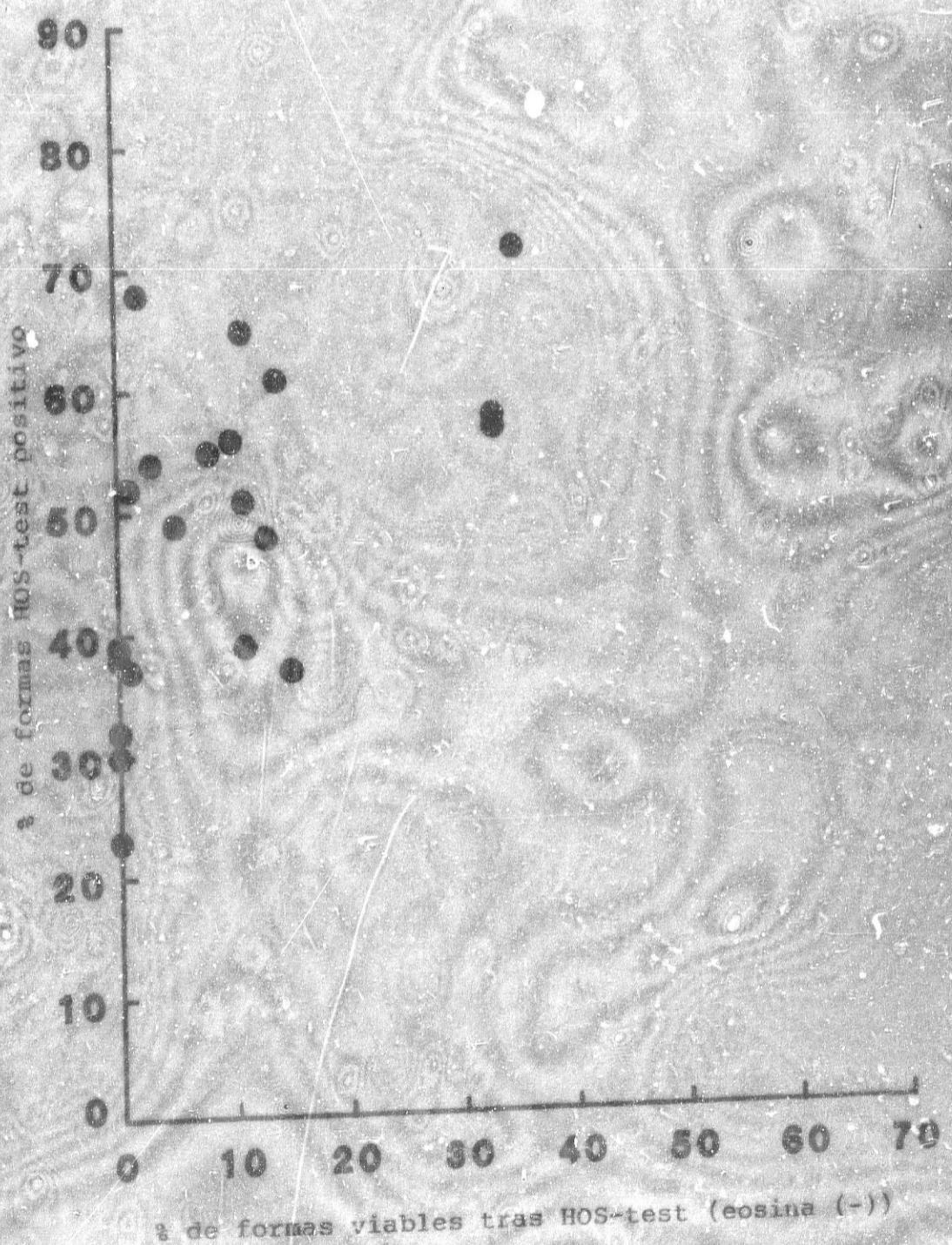
TABLA VII : Precipitado (b)

Vitalidad F.Vivas (%)	Formas HOS (+) (%)
72	54
33	57
10	56
33	58
0	30
15	37
0	32
35	72
14	61
11	65
11	51
5	49
2	68
11	39
29	92
8	55
3	54
0	26
0	39
1	37
13	48
1	52
0	38

$r = 0.221112$

N. S.

## GRAFICA VII b (PRECIPITADO)



## TABLA VIII

Correlación entre el porcentaje de formas con Morfología normal y el porcentaje de formas con resultado positivo en el test de hinchamiento hipoosmótico en el Sobrenadante. (Coeficiente de correlación de Pearson y Recta de Regresión). (Representado en Gráfica VIII).

TABLA VIII : Sobrenadante

Morfología F. Normales (%)	Formas HOS (+) (%)
71	56
83	64
66	60
57	52
82	78
64	32
44	28
29	22
19	30
75	68
44	61
56	61
37	42
47	51
61	53
64	37
75	46
66	58
69	52
81	45
78	62
85	62
79	60
66	61
65	58
87	88
44	22
75	76
72	80
50	70
79	41
84	66
84	62
80	62
91	59
70	59
76	44
60	44

$$r = 0.6037$$

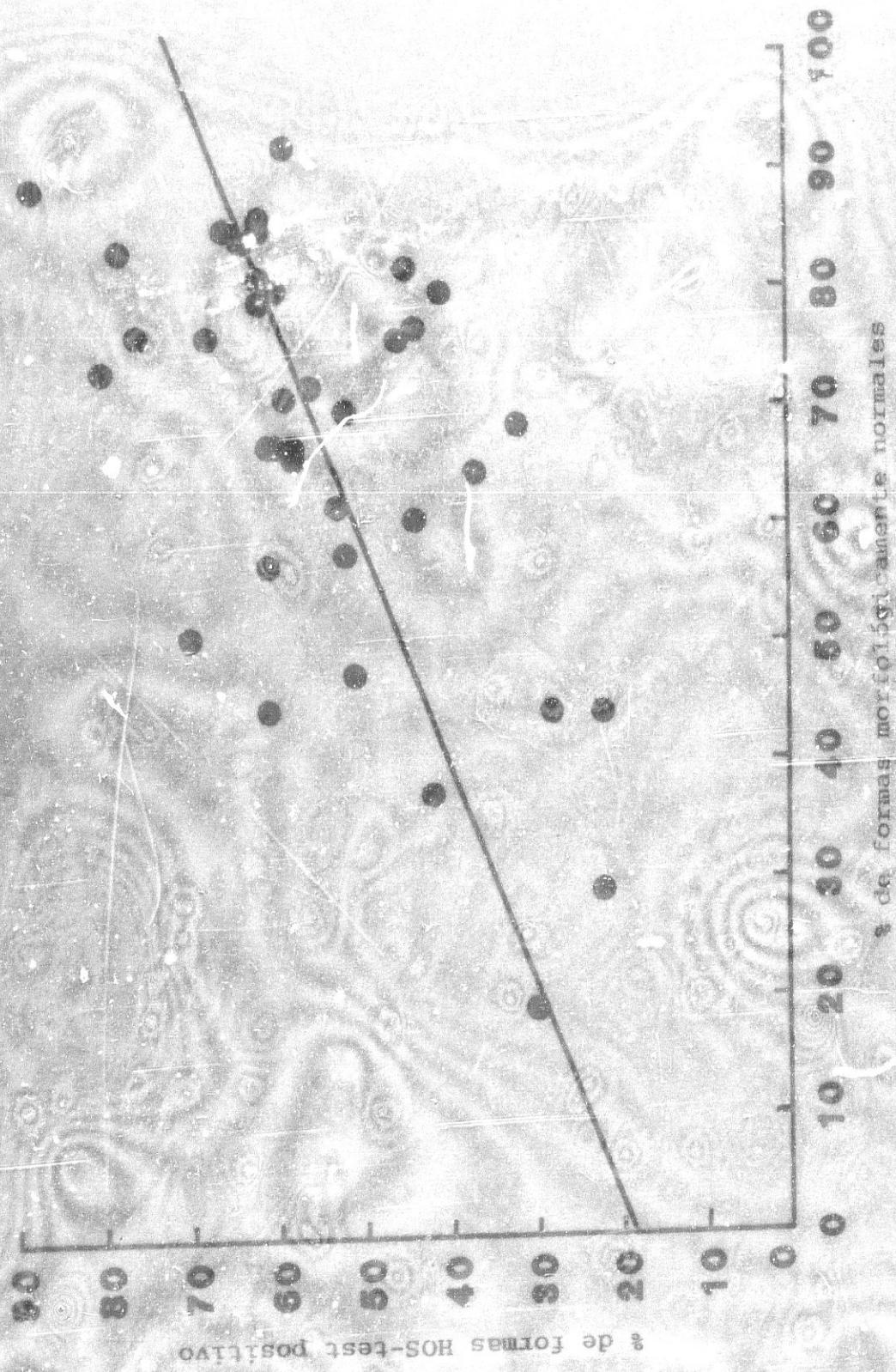
$$p < 0.001$$

$$t_{\text{exp.}} = 4.437 \quad (\text{g.l.} = 36)$$

$$F.HOS (+) = 18.0897 + 0.5505 \times F.\text{Normales}$$

GRAFICA VII (SOBRENDANTE)

272.



## TABLA IX (a)

Correlación entre el porcentaje de formas viables (Eosina(-)) y el porcentaje de formas con resultado positivo en el test de hinchamiento hipo-osmótico en el Sobrenadante. (Coeficiente de correlación de Pearson y Recta de Regresión). (Representado en Gráfica IX (a)).

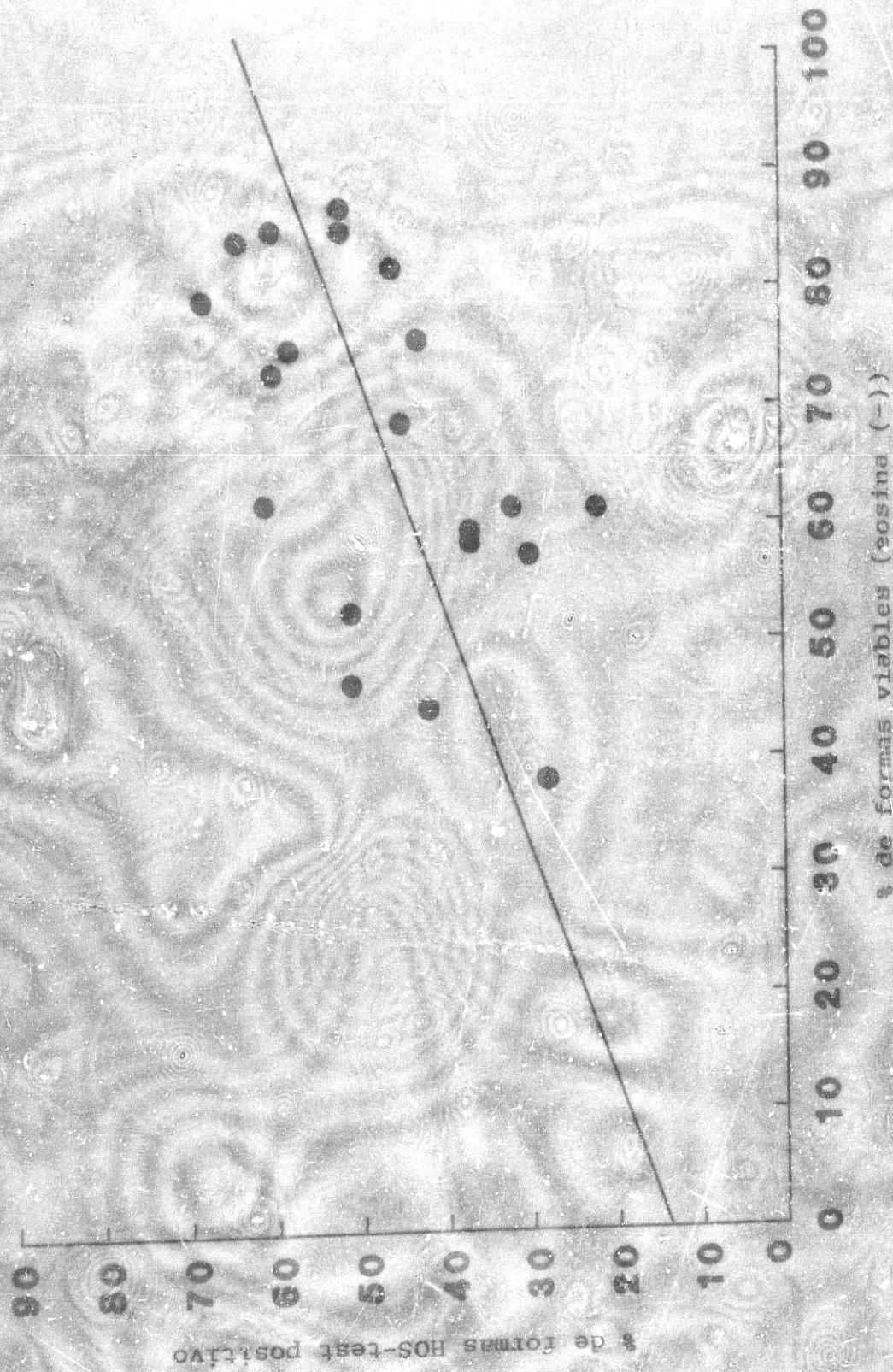
TABLA IX (a): Sobrenadante

Vitalidad F.Vivas (%)	Formas HOS (+) (%)
83	64
84	60
84	52
61	32
38	28
61	22
57	30
78	68
46	51
44	42
52	51
59	37
81	46
74	58
86	52
68	45
72	60
61	61
58	37
75	43

$r = 0.5625$   
 $p < 0.01$   
 $t_{\text{exp.}} = 2.9934 \text{ (g.l.=18)}$   
 $F.HOS (+) = 13.8474 + 0.5007 \times F.Vivas$

GRAFICA IX a (SONDEADANTE)

275.



## TABLA IX (b)

Correlación entre el porcentaje de formas viables tras HOS-test (Eosina (-)) y el porcentaje de formas con resultado positivo en el test de hinchamiento hiposmótico en el Sobrenadante. (Coeficiente de correlación de Pearson). (Representado en Gráfica IX (b)).

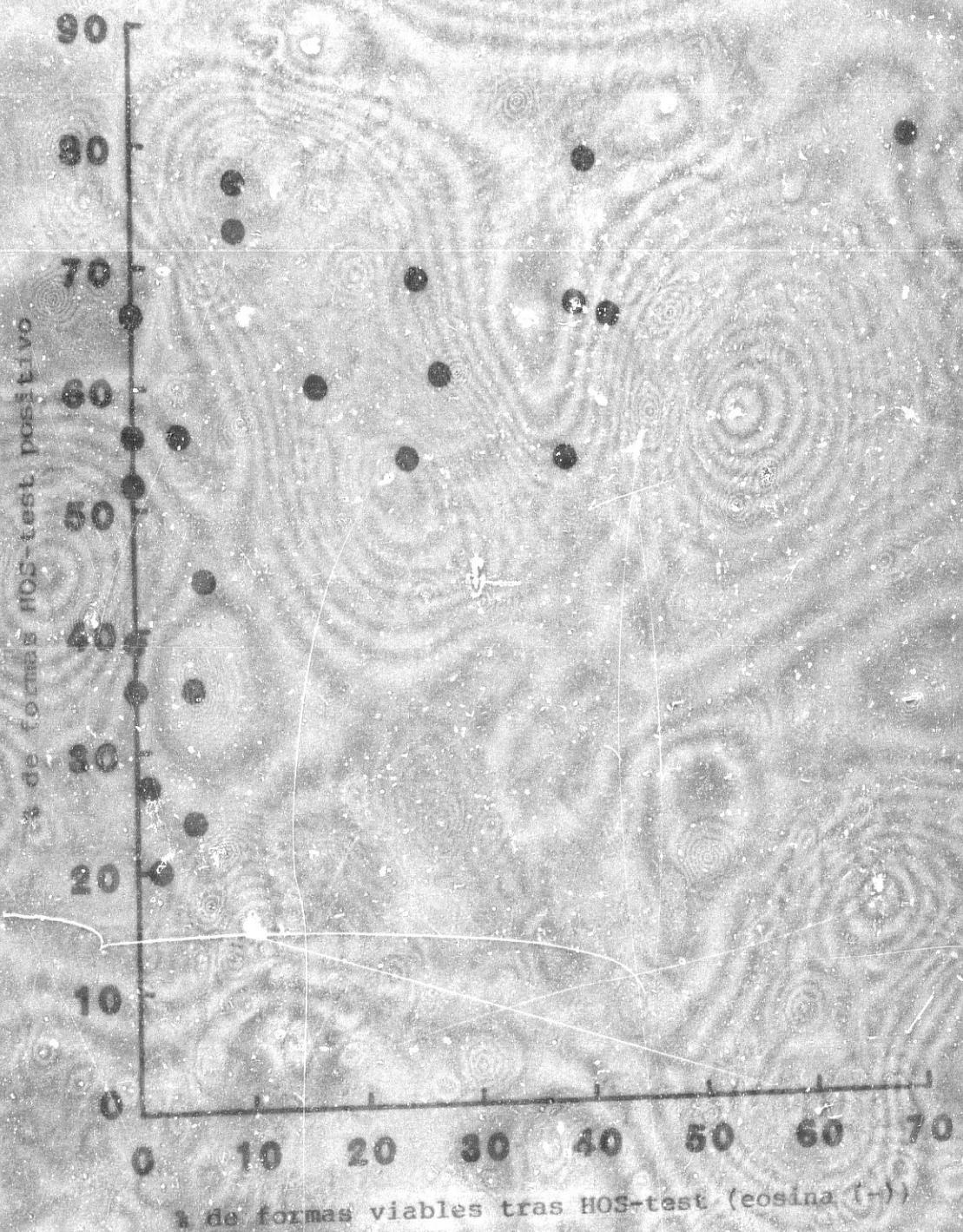
TABLA IX (b): Sobrenadante

277.

Vitalidad F.Vivas (%)	Formas HOS (+) (%)
38	54
27	61
39	67
40	79
0	39
2	20
5	24
69	81
16	60
42	66
1	27
5	35
6	44
0	35
4	56
9	73
24	54
0	52
25	69
0	66
9	77
0	52
0	56

$r = 0.1208$   
N. S.

## GRAFICA IX b (SOBRENADANTE)



## TABLA X

Correlación entre el porcentaje de formas con movilidad progresiva y el porcentaje de formas con el resultado positivo en el test de hinchamiento hipo-osmótico en el Eyaculado de individuos Normozoospérmicos. (Coeficiente de correlación de Pearson y recta de Regresión). (Representado en Gráfica X).

TABLA X : Normozoospérmicos

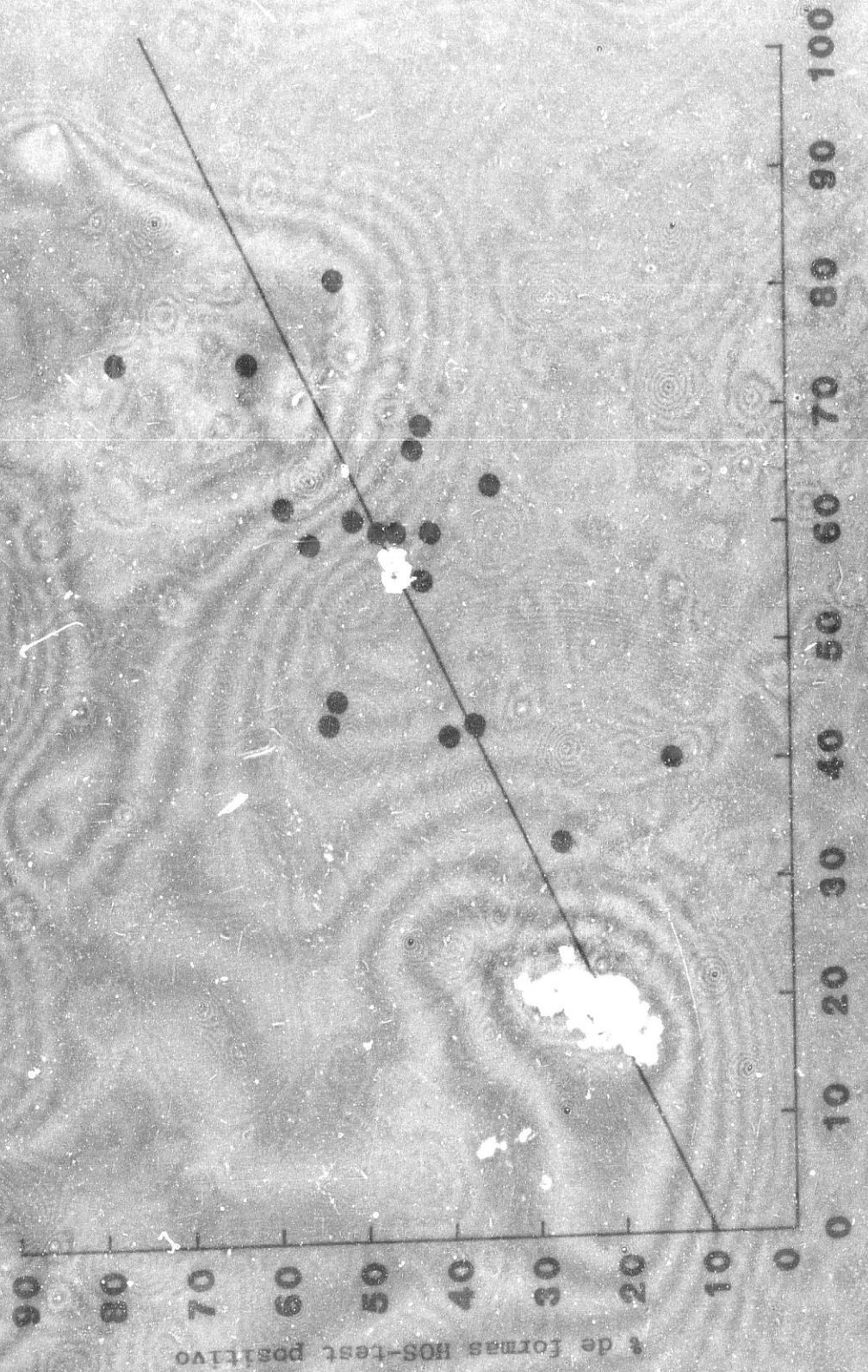
Formas con Mov. Progresivo (%)	Formas HOS (+) (%)
66	44
59	46
68	43
63	35
60	51
55	43
80	53
73	63
58	56
61	59
43	37
73	78
59	48
59	42
33	27
40	14
45	53
43	54
42	40

$r = 0.6070$ $p < 0.01$ $t_{\text{exp.}} = 2.8270 \text{ (g.l.} = 15)$ $F.HOS (+) = 9.4208 + 0.6546 \times F.Mov.Prog.$
--

# GRAFICA X

(MORFOLOGICOS)



281.

## TABLA XI

Correlación entre el porcentaje de formas con movilidad progresiva y el porcentaje de formas con el resultado positivo en el test de hinchamiento hipco-osmótico en el eyaculado de individuos infértilles (Oligo-, Asteno-, y Oligo-astenozoospérmicos moderados). (Coeficiente de correlación de Pearson y Recta de Regresión). (Representado en Gráfica XI).

TABLA XI: Infértils.

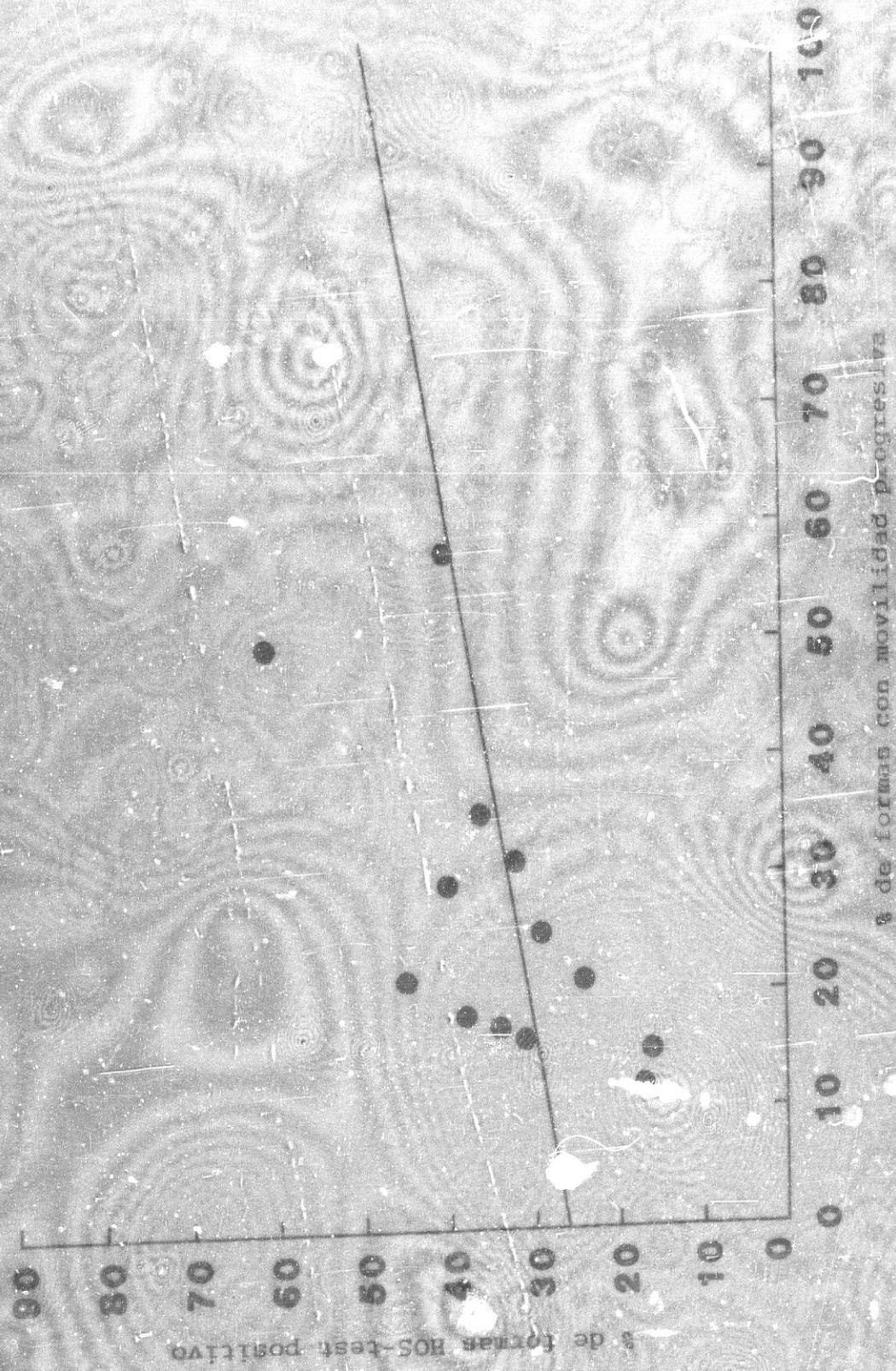
283.

Formas con Mov. Progresivo (%)	Formas HOS (+) (%)
29	40
31	32
21	24
12	17
17	34
21	45
15	16
57	40
49	61
35	36
18	38
16	31
25	29

$r = 0.6428$   
 $p < 0.01$   
 $t_{\text{exp.}} = 3.0255 \text{ (g.l.=11)}$   
 $F.HOS (+) = 19.1087 + 0.5559 \times F.Mov.Prog.$

GRAFICA XI (tafertiles)

284.



## TABLA XII

Correlación entre el porcentaje de formas con movilidad progresiva y el porcentaje de formas con resultado positivo en el test de hinchamiento hipo-osmótico en el eyaculado de todos los individuos estudiados, fértiles e infértilles (Normozoospérmicos, Oligo-, Asteno-, y Oligo-astenozoospérmicos moderados). (Coeficiente de correlación de Pearson y Recta de Regresión). (Representado en Gráfica XII).

TABLA XII

Formas con Mov. Progresivo (%)	Formas HOS (+) (%)
66	44
59	46
68	43
63	35
60	51
55	43
80	53
73	63
58	56
61	59
43	37
73	78
59	48
59	42
33	27
40	14
45	53
43	54
42	40
29	40
35	32
21	24
12	17
17	34
21	45
15	16
57	40
49	61
35	36
25	29
18	38
16	31

$$r = 0.6345$$

$$p < 0.001$$

$$t_{\text{exp.}} = 4.7157 \text{ (g.l.} = 30)$$

$$F.HOS (+) = 19.5454 + 0.4694 \times F.Mov.Prog.$$

GRAFICA XII

287.

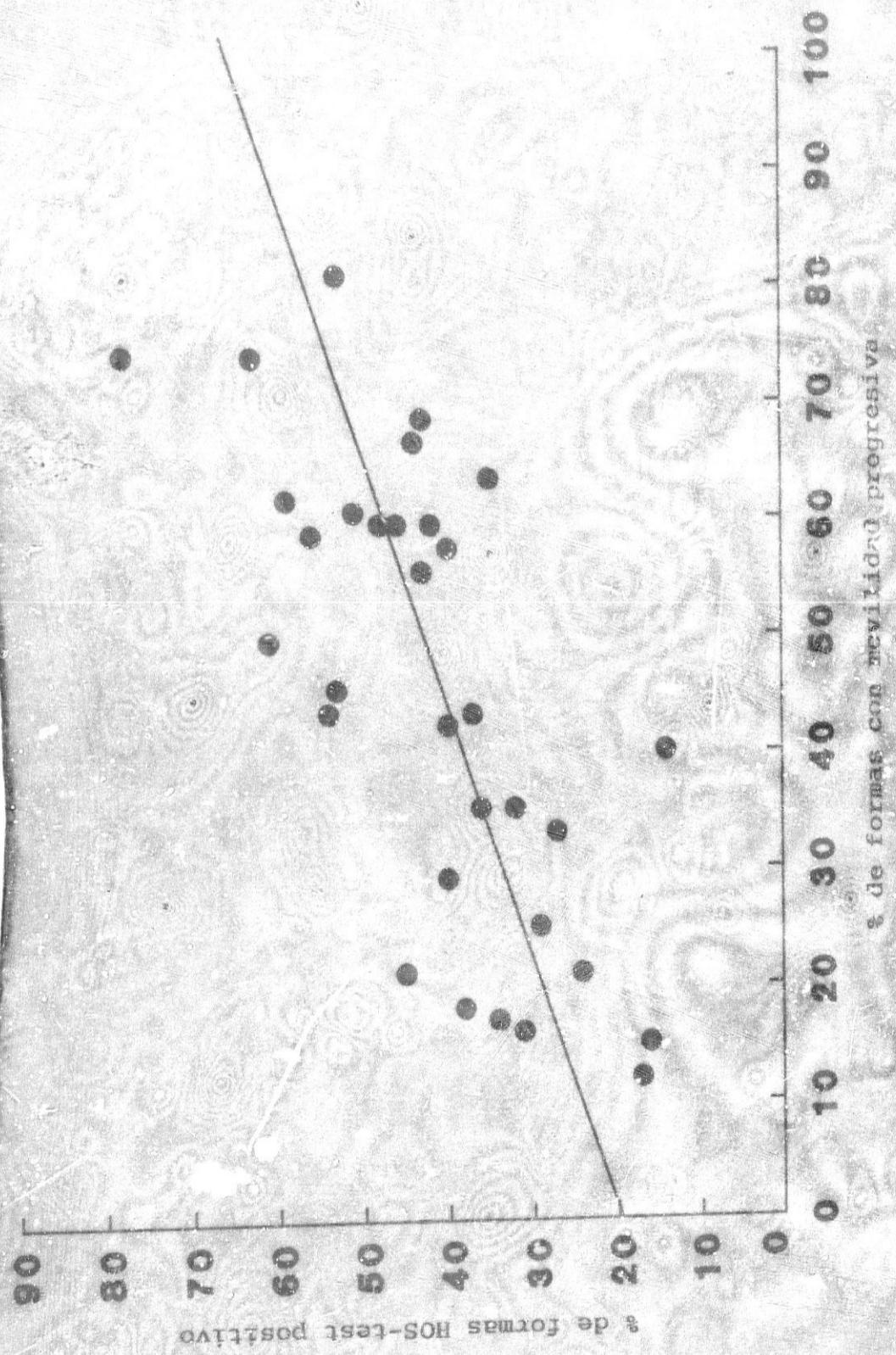


TABLA XIII

Correlación entre el porcentaje de formas con el resultado positivo en el test de hinchamiento hipo-osmótico y los parámetros del espermograma: -concentración ( $spz \times 10^6/ml$ ); -número total de espermatozoides ( $spz \times 10^6/eya$ ); -movilidad (%). (Coeficiente de correlación de Pearson).

TABLA XIII

Concentración (spz. $\times 10^6$ /ml)	Nº total spz. (spz. $\times 10^6$ /eya.)	Movilidad (%)
0.272648	0.217313	0.290885
$t_{exp.}$	1.235	1.325
Significación	N.S.	N.S.

TABLA XIV

Valores del resultado positivo en el test de hinchamiento hipo-osmótico antes (HOS-eyculado) y después (HOS-sobrenadante) de la separación de los espermatozoides mediante la técnica de selección de "swim-up" en individuos Normozoospérmicos, Oligo-, Asteno-, y Oligo-astenozoospérmicos moderados, expresados en Media  $\pm$  error estandar de la Media ( $\bar{x} \pm SEM$ ).

TABLA XIV

	HOS-Eyaculado	HOS-Sobrenadante
Normozoospérmicos (n=26)	51,4 ± 2,1 abc	59,3 ± 3,3 de
Oligozoospér. Mod. (n=12)	33,0 ± 4,3 <sup>a</sup>	57,4 ± 4,0 <sup>fg</sup>
Astenozoospér. Mod. (n=11)	30,2 ± 4,6 <sup>b</sup>	36,7 ± 6,9 <sup>df</sup>
Oligo-astenozoos. Mod. (n= 9)	34,4 ± 4,8 <sup>c</sup>	35,9 ± 1,9 <sup>eg</sup>

a,b,c,e,g: p<0.001; d: p<0.01; f: p<0.02

TABLA XV

Resultados de los valores medios de los parámetros seminales del espermograma:  
- Volumen (ml), - pH, - Concentración (spz  $\times 10^6$ /ml), - Número total de espermatozoides (spz  $\times 10^6$ /eyaculado), - Movilidad (%), - Morfología (%), - Vitalidad (%), obtenidos en nuestro laboratorio en los grupos de referencia Normo-, Asteno-, Oligo-, Oligo-Asteno- y Azoospérmicos, expresados en Media  $\pm$  desviación standars de la Media ( $x \pm SDM$ ).

TABLA XV

Volumen (ml)	pH	Concentración (spz. $\times 10^6$ /ml)	Nº Total spz. (spz. $\times 10^6$ /eya.)	Movilidad (%)	Vitalidad (%)	Morfología (%)
Normozoos- pérmicos. (n=40)	3.14 $\pm$ 1.49	7.80 $\pm$ 0.21	104.8 $\pm$ 57.35	344.2 $\pm$ 181.8	68.2 $\pm$ 10.6	75.9 $\pm$ 9.28
Astenozoos- pérmicos. (n=16)	3.66 $\pm$ 1.20	7.62 $\pm$ 0.39	62.9 $\pm$ 18.99	209.0 $\pm$ 103.55	25.6 $\pm$ 11.47	51.2 $\pm$ 5.31
Oligozoos- pérmicos. (n=28)	3.92 $\pm$ 1.72	7.73 $\pm$ 0.43	7.5 $\pm$ 7.56	32.3 $\pm$ 36.35	53.1 $\pm$ 9.34	53.5 $\pm$ 4.05
Oligo-Asteno- zoospérmicos. (n=34)	4.11 $\pm$ 1.06	7.83 $\pm$ 0.30	9.2 $\pm$ 7.19	40.3 $\pm$ 31.79	23.1 $\pm$ 9.39	54.3 $\pm$ 4.28
Azoospérmicos. (n=15)	3.12 $\pm$ 1.35	7.84 $\pm$ 0.29	-	-	-	-

**DISCUSSION**

## 10. DISCUSION

Los individuos de la población general, estudiados en nuestro laboratorio, fueron clasificados en cinco grupos: Normo-, Oligo-, Asteno-, Oligo-asteno-, y Azoospérmicos según los distintos parámetros del espermograma y de acuerdo a los valores estandard de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1.987) (Tabla XV).

Dentro de esta población general, se ha estudiado una subpoblación de individuos, clasificándolos como:

- Normozoospérmicos
- Oligozoospérmicos moderados
- Astenozoospérmicos moderados
- Oligo-astenozoospérmicos moderados

A los diferentes grupos clasificados se les aplicó el procedimiento experimental. Los resultados de los diferentes parámetros seminales medidos, expresados en la Tabla I, no muestran diferencias significativas a los de la población general (Tabla XV), al comparar cada uno de los diferentes grupos clasificados.

La inclusión en este estudio de los grupos experimentales de individuos Oligo-, Asteno-, y Oligo-astenozoospérmicos moderados, se debe fundamentalmente a las razones siguientes:

\* Al realizar una gráfica representativa de los diferentes parámetros seminales de individuos fértiles e infértilres existe una zona media de solapamiento, constituida por aquellos individuos que, presentando valores normales en cuanto a su numeración y/o movilidad espermática, son estériles, y por el contrario, otros individuos con valores anormales son fértiles (Jeyendran et al., 1.986). Esto impediría el establecimiento de límites perfectamente definidos para cada parámetro seminal, por encima o debajo del cual, pudieramos afirmar la fertilidad o infertilidad del individuo. Siendo aquellas muestras que presentan algún defecto moderado, las que presentarían una mayor dificultad a la hora de predecir su capacidad fertilizante.

\* El procedimiento de selección de espermatozoides utilizado en este estudio, técnica de "swim-up", va a depender por un lado de la concentración inicial de espermatozoides y por otro de la movilidad de los espermatozoides. Una muestra que presente

defectos severos en los parámetros de concentración y/o movilidad, definirían por sí la infertilidad del individuo y antes de ser admitidos en un programa de reproducción asistida (IUI o FIV), tendría que ser sometido a tratamientos generales (previo estudio clínico etiopatogénico).

\* Debido a que el proceso de selección de espermatozoides de "swim-up" se basa precisamente en la movilidad del espermatozoide, que se manifiesta en su capacidad de poder emigrar a la fracción de medio sobrenadante, un defecto severo en la concentración y/o movilidad resultaría en la obtención de un número ínfimo o nulo de espermatozoides seleccionados, lo que impediría el posterior estudio de la muestra.

A pesar del hecho de que hay un gran número de fenómenos bioquímicos asociados a las gónadas masculinas durante la reproducción y que sin un desarrollo satisfactorio, el espermatozoide sería incapaz de fertilizar con éxito al ovocito, no se ha prestado suficiente atención a la química del eyaculado y particularmente a la del espermatozoide, siendo los niveles de Fructosa, Ácido Cítrico, Fosfatasa Acida, L-Carnitina, Potasio, Glicerofosforilcolina y Zinc, los parámetros bioquímicos más indicativos

de la funcionalidad del Sistema Reproductor Masculino.

Una de las propiedades bioquímicas más importantes del espermatozoide es su capacidad de transporte de componentes a través de su membrana, que va a depender de la integridad funcional de la membrana del espermatozoide, siendo este proceso esencial no sólo para la movilidad del espermatozoide, sino también para la inducción de la capacitación y la reacción acrosómica, aspectos fundamentales para la fecundación de ovocitos. Así, cualquier alteración de la permeabilidad de la membrana del espermatozoide, podría influir en dichos procesos y consecuentemente en los procesos de interacción entre el espermatozoide y el ovocito.

Los estudios histológicos del espermatozoide, bien con microscopio óptico o electrónico, sólo nos muestran cuando la membrana está morfológicamente intacta. Igualmente ocurre con las tinciones supravitales (porcentaje de espermatozoides vivos / porcentaje de espermatozoides muertos), que miden la capacidad de la eosina de pasar a través de la membrana del espermatozoide, lo cual únicamente indicaría que dichas membranas están morfológicamente alteradas, debido a posibles daños de la misma o a la muerte del espermatozoide.

Cuando el espermatozoide se expone a condiciones hipo-osmóticas puede reaccionar

de dos formas diferentes:

- Si la membrana del espermatozoide está funcionalmente intacta, ésta va a impedir la salida de las moléculas osmóticamente activas, por lo que el espermatozoide contrarrestará el desequilibrio osmótico captando agua de su entorno. Este flujo de agua aumenta el volumen del espermatozoide y la membrana plasmática se hincha (espermatozoides HOS-test positivo).
- Por el contrario, si la membrana del espermatozoide estuviera funcionalmente o estructuralmente alterada, no podría reaccionar contra el choque hipo-osmótico, dado que tanto el agua como las sustancias osmóticamente activas podrían atravesar la membrana plasmática (espermatozoides HOS-test negativo).

El hinchamiento de la membrana plasmática del espermatozoide sometido a un medio hipo-osmótico, se hace particularmente evidente en la cola del espermatozoide, fácilmente observable bajo microscopio de contraste de fases. Este efecto puede ser debido a que la cola sea especialmente sensible a las condiciones hipo-osmóticas, bien porque esté unida más débilmente a las estructuras subyacentes que la membrana de la cabeza, o bien porque en la cabeza del esperma-

tozoide existe sólo un pequeño compartimento de fluido, de tal forma que no sea observable el aumento de volumen que ocurre con la entrada del agua en el HOS-test.

Podría ocurrir que la membrana de la cabeza y la de la cola del espermatozoide funcionaran independientemente la una de la otra, de ser así, la medida del hinchamiento de la cola, podría no ser indicativo de una actividad funcional normal de la membrana de la cabeza. Evidentemente, la capacitación y posterior fusión del espermatozoide con las envolturas del ovocito, requieren numerosos cambios de membrana en la cabeza del espermatozoide, sin los cuales dichos procesos no podrían llevarse a cabo. Jeyendran et al. (1.984), han encontrado una alta correlación entre estos hechos y la capacidad de la cola para hincharse en solución hipo-osmótica, por lo que el hinchamiento de la cola del espermatozoide indicaría también una funcionalidad normal de la membrana de la cabeza del espermatozoide.

Los porcentajes de formas HOS positivo, obtenidos en nuestros resultados, son ligeramente inferiores a los mostrados por otros autores, probablemente debido al procedimiento operativo, ya que tras la realización del HOS test, los espermatozoides eran fijados y teñidos. Dicha técnica de procesamiento de las muestras podría influir de alguna forma en el resultado del test, aunque el resultado final es proporcional

al resultado obtenido en fresco, que sí se corresponde con los mostrados por otros autores (observaciones personales).

Clasicamente, la concentración y la movilidad espermática, han sido considerados como los mejores parámetros seminales para valorar la fertilidad de un individuo (McLeod y Gold (b), 1.951; McLeod, 1.965), siendo aceptado generalmente por todos los autores los límites inferiores de dichos parámetros (Sherins y Howards, 1.978). No obstante, recientes hallazgos indican que espermatozoides con ausencia de movilidad, por pérdida de los brazos de dyneina o movilidad discinética, son capaces de penetrar ovocitos de hamster desprovistos de zona pelúcida (Aitken et al., 1.983 (b); Williamson et al., 1.984; Morgan et al., 1.986).

Los parámetros medidos por todos los laboratorios al realizar un análisis de semen estandard, incluyen además el volumen, la vitalidad y la morfología. Basandose en estos parámetros se intenta determinar cuando un paciente es fértil o no fértil. Sin embargo, es evidente que estos parámetros pueden ser inadecuados e insuficientes para los propósitos diagnósticos (Blasco, 1.984; Bostolfle et al., 1.984). Así, por ejemplo, existe un porcentaje significativo de hombres que han tenido hijos, aunque su espermograma mostraba una concentración de espermatozoides menor de 20 millones por mililitro de semen, lo que generalmente se considera como indicador

de infertilidad o subfertilidad. Lo mismo parece ocurrir con los demás parámetros seminales estandarizados. Sin embargo, estas conclusiones están basadas en estudios *in vivo*, realizadas en hombres que siendo ya padres, se les ha realizado un análisis de semen, meses o años después de haber engendrado a su último hijo, por lo que los parámetros seminales podrían haber sufrido alguna modificación con el tiempo, no constituyendo un valor real indicativo de su fertilidad.

La funcionalidad de la membrana medida por el HOS-test, constituye un importante parámetro en el proceso de la fertilización según Jeyendran et al. (1.984), que encuentran en el eyaculado una correlación altamente significativa entre el porcentaje de espermatozoides HOS positivo y los índices de capacitación de los mismos y los de fusión con ovocitos de hamster desprovistos de zona pelúcida.

En nuestros resultados se observa una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) en el porcentaje de formas HOS positivo en el eyaculado en pacientes Oligo-, Asteno-, y Oligo-astenozoospérmicos moderados, cuando se comparan con individuos con espermograma normal (Tabla I).

Otros autores obtienen bajos porcentajes de formas HOS positivo en muestras de semen que presentan algún valor anormal en alguno de los parámetros seminales convencionales (Chan et al., 1.985). Por otro lado, se ha obser-

vado que la disminución en la concentración de espermatozoides, está frecuentemente acompañada por otras anomalías que afectan al espermatozoide, perjudicando fuertemente la capacidad de fertilidad del individuo (Aitken et al., 1982).

Nuestros resultados muestran una correlación significativa ( $r=0.6070$ ), entre el porcentaje de formas HOS-test positivo y el porcentaje de formas con movilidad progresiva, en el eyaculado de individuos Normozoospérmicos (Tabla X), lo cual, está de acuerdo con los resultados obtenidos en 1.984 por Jeyendran et al., encontrando en el eyaculado una correlación positiva entre el resultado del HOS-test positivo y el porcentaje de espermatozoides que mostraban movilidad progresiva en individuos con un porcentaje normal de formas móviles. Por otro lado, nuestros resultados también muestran una correlación positiva ( $r=0.6428$ ), entre estos parámetros en el eyaculado de individuos infértilles (Oligo-, Asten-, y Oligo-astenozoospérmicos moderados) (Tabla XI). También hemos encontrado una correlación positiva ( $r=0.6345$ ), entre el porcentaje de formas HOS-test positivo y el porcentaje de formas con movilidad progresiva en el eyaculado al estudiar conjuntamente todos los grupos anteriores (Tabla XII).

La movilidad del espermatozoide depende en parte del transporte de componentes a través de la membrana. Cuando sometemos al espermatozoide a unas condiciones hipo-osmóticas, el agua entra en él para intentar alcanzar el equilibrio osmótico.

co, siendo la cola especialmente sensible a estas condiciones, pudiéndose asumir que la capacidad de la cola del espermatozoide de hincharse en una solución hipo-osmótica es signo de que el transporte de agua ocurre normalmente respetando la integridad y el funcionamiento normal de la membrana del espermatozoide, lo que implica una función de la membrana intacta. El hinchamiento del espermatozoide nos va a indicar la integridad y funcionalidad normal de la membrana plasmática del espermatozoide, mientras que la movilidad del espermatozoide va a depender no sólamente de los fenómenos de membrana, sino que también de otro gran número de funciones bioquímicas (metabolismo espermático, acción microtubular de las fibras de la cola). Así pues, un resultado en el HOS-test disminuido indicaría que la membrana estaría alterada y por tanto la movilidad disminuida; mientras que un resultado positivo elevado en el HOS-test, indicaría una función de membrana normal y la movilidad dependería de otros factores no relacionados con la integridad de la membrana.

Nuestros resultados muestran también una correlación positiva entre el porcentaje de formas morfológicamente normales y el porcentaje de formas con resultado positivo en el HOS-test ( $p < 0.01$ ) (Tabla.- IV); y entre el porcentaje de formas viables (Eosina (-)) y el porcentaje de formas con resultado positivo en el HOS-test ( $p < 0.02$ ) (Tabla.- Va) en el eyaculado de las muestras estudiadas. Sin embargo, no encontramos

una correlación estadísticamente significativa entre el resultado positivo del HOS-test y el resto de parámetros seminales estudiados en el eyaculado de las muestras al realizar el espermograma (concentración; nº total de espermatozoides; y movilidad) (Tabla XIII).

Una meta clave en el estudio de la infertilidad masculina es el desarrollo de técnicas para analizar la calidad de una muestra de semen, que puedan determinar eficazmente la capacidad fecundante del espermatozoide. Actualmente se utilizan la combinación de distintos test y análisis que permiten predecir de forma aproximada, pero no siempre determinante la capacidad de los espermatozoides de un eyaculado para penetrar al ovocito y dar lugar a un embrión viable. El principal problema que hay que afrontar cuando intentamos aplicar un nuevo test para evaluar la fertilidad de una muestra de semen, es determinar de antemano el valor predictivo real de los resultados en lo que basaremos nuestro diagnóstico.

La determinación del porcentaje de formas HOS positivas, obtenidas mediante el HOS-test, es de gran utilidad para separar las muestras fértiles de las infértilas, aunque con algunas dificultades (Chan et al. 1.985), por lo que necesita ser estandarizada antes de su aplicación en la rutina clínica. Van der Ven et al. (1.986), han propuesto un límite del 50-60 % de formas HOS positivas (observaciones

en fresco), por debajo del cual la muestra podría ser considerada infértil o subfértil, aunque un resultado normal, es decir, más del 60% de formas HOS positivas, no debe implicar necesariamente que la muestra es fértil, ya que otros factores pueden influenciar en la capacidad fertilizante del espermatozoide y que no quedan reflejados en el HOS-test.

Así pues, según los resultados obtenidos y considerando las múltiples causas potenciales de la infertilidad masculina, deben de ser considerados el mayor número posible de test, incluido el HOS-test, para así poder analizar todos los aspectos que puedan alterar el potencial fertilizante del espermatozoide humano, lo que permitiría un mejor diagnóstico y tratamiento clínico de la esterilidad masculina.

En el proceso de la fecundación, la función principal del moco cervical es actuar como barrera natural que permita selectivamente el paso de espermatozoides normales de buena movilidad hacia el útero (Perry et al., 1.977). Con el desarrollo de la inseminación artificial intrauterina (IUI) y la fecundación in vitro (FIV), se ha observado que la calidad del espermatozoide es uno de los mayores obstáculos para el éxito de las mismas, haciéndose necesario un perfeccionamiento de las técnicas in vitro de la selección de espermatozoides. Siendo necesario en el caso de individuos con espermograma normozoospérmico y mucho más necesario cuando

se trata de individuos infértilles, con muestras de semen de baja calidad (Oligo-, Asteno-, y Oligo-astenozoospérmicos).

En el presente estudio se examina la calidad de los espermatozoides seleccionados mediante la técnica del "swim-up", de forma similar a la utilizada en los protocolos de IUI y FIV (Lopata et al., 1.976; Aitken et al., 1.983 (a); Barros et al., 1.984; Makler et al., 1.984 (b), 1.984 (b); Wong et al., 1.986), una técnica basada en la movilidad del espermatozoide, el cual puede difundir activamente desde un precipitado hasta una capa superior de medio de cultivo sobrenadante. Obteniéndose una selección de espermatozoides con movilidad progresiva que presentan una mayor estabilidad nuclear (Hurt y Courtot, 1.984), así como una elevada tasa de penetración en el test de hamster (Courtot y Jouannet, 1.985).

Nuestros resultados muestran que la técnica de "swim-up" es efectiva no sólo para separar espermatozoides móviles, sino que además estos son de una alta calidad, ya que se seleccionan un mayor porcentaje de formas con morfología normal y con HOS-test positivo en el sobrenadante, que sería la fracción utilizada en el IUI, que en el precipitado residual o en el eyaculado (Tabla.- II, Gráfica.- II). Efectivamente, Arny y Quagliarello en 1.987, obtienen un 32% de embarazos a término por IUI mediante dicha técnica de selección de espermatozoides, y Vijayakumar

et al. en 1.987), mediante microscopía electrónica observan que la superficie espermática queda inalterada tras el lavado y posterior migración del espermatozoide, obteniéndose formas normales de buena movilidad y con una posible capacidad fertilizante, valorada esta última sólo desde el punto de vista morfológico.

Nuestros resultados muestran una correlación positiva entre formas morfológicamente normales y formas HOS-test positivas, no sólo en el eyaculado ( $r=0.450108$ ;  $p<0.01$ ) (Tabla.-IV), sino que también en las dos fracciones estudiadas tras el "swim-up", precipitado ( $r=0.535916$ ;  $p<0.001$ ) (Tabla VI) y sobrenadante ( $r=0.6037$ ;  $p<0.001$ ) (Tabla VIII). Resultados que coinciden con otros autores (Chan et al., 1.985); sin embargo, Jejedran et al. (1.984), no han encontrado una correlación positiva entre el test de hinchamiento hipo-osmótico y morfología del espermatozoide, observaciones hechas en ambos casos tan sólo en el eyaculado.

Aunque sólo son necesarios un pequeño número de espermatozoides móviles, seleccionados mediante la técnica de "swim-up", para el éxito de la fecundación in vitro (Testart et al., 1.985), sólo se observa fecundación del ovocito en los casos en que las características del semen entraban en los límites de normalidad (Edwards et al., 1.984; García et al., 1.984; Trounson y Wood, 1.984; Belaisch-Allart et al., 1.984). Así pues, los límites de fecundación descienden cuando la concentración de espermato-

zoides y/o los porcentajes de movilidad o morfología normal, disminuyen por debajo de los límites de normalidad (Mahadevan y Trounson, 1.984; Edwards et al., 1.984; Cohen et al., 1.985).

La capacidad fecundante de una muestra de espermatozoides seleccionados a partir de una muestra de semen de individuos infértilles es significativamente menor que la de espermatozoides de individuos con fertilidad probada (Confino et al., 1.986; Aitken y Elton, 1.986 (a), 1.986 (b)). Estas diferencias no pueden explicarse únicamente mediante los test clásicos de estudio de semen (morfología, movilidad, vitalidad), puesto que los valores obtenidos en uno u otro grupo mediante el "swim-up" están dentro de los límites de referencia de un semen normal. Lo que nos sugiere la necesidad de recurrir a otro tipo de pruebas funcionales que nos proporcionen más información sobre otros aspectos que intervienen en el proceso de la fecundación.

La valoración crítica de la morfología del espermatozoide también puede ser utilizada para la predicción y diagnóstico de la infertilidad masculina. Así, Roger et al. en 1.981, basándose en los trabajos de Sherins y Howards en 1.978, observan que la morfología es un factor que influye de forma importante en la fertilidad del individuo, decreciendo el número de formas normales, en aquellos que presentaban problemas de fertilidad.

Existe una correlación positiva entre el porcentaje de formas normales y el índice de penetración de ovocitos de hamster desprovistos de zona pelúcida, inseminados *in vitro* (Rogers et al., 1.983) y el porcentaje de penetración de ovocitos humanos *in vitro* (Mahadevan et al., 1.984; Cohen et al., 1.985), aunque, por otro lado, hay individuos con una aparente buena morfología que son estériles, ya que van a influir otros parámetros como la numeración y la movilidad, sin embargo, cuando hay un predominio de formas anormales se puede pensar que existe una alteración de la función gonadal (Castellani et al., 1.978), que podría ser debida a que exista una disfunción testicular transitoria, causada por la exposición a las drogas o enfermedad (McLeod y Gold, 1.951 (b); Zaneveld y Polakoski, 1.977), o bien debido a daños significativos concurrentes con situaciones de stress, así como a la existencia de varicocele (McLeod, 1.965; Greenberg et al., 1.978) u otros desórdenes andrológicos (Schirren et al., 1.979).

Otro factor importante, puesto de manifiesto por Castellani et al. en 1.978, consistiría en el desarrollo por el espermatozoide de vesículas de Golgi aberrantes, que van a dar origen a un acrosoma anómalo, lo cual puede ser un obstáculo en los mecanismos de penetración del cúmulo y zona pelúcida y posterior fusión con el ovocito.

Efectivamente, los esquemas de clasifi-

cación de la morfología del espermatozoide usados hoy día, desestiman estos tipos de anomalías morfológicas, así como una maduración nuclear espermática anormal (Bisson, 1.981; Jeulin et al., 1.986).

Mediante el sistema de fecundación in vitro es posible correlacionar varios parámetros seminales con la capacidad del espermatozoide para fecundar ovocitos de hamster desprovistos de la zona pelúcida, u ovocitos humanos intactos. Así, el test de hamster puede ser indicativo de la capacidad o incapacidad del espermatozoide para fecundar ovocitos humanos intactos (Gould et al., 1.983), especialmente cuando los parámetros seminales de un eyaculado son anormales (Margaliot et al., 1.985). Sin embargo, el hecho de que espermatozoides capacitados in vitro con capacidad de penetrar ovocitos in vitro presenten una nula o muy reducida tasa de penetración en ovocitos humanos, ovulados de forma natural y en el interior del oviducto (Viriyapanich y Bedford, 1.981), indican que en algunos casos pueden existir diferencias entre la capacitación obtenida in vitro e in vivo.

De este forma, anomalías del espermatozoide que pasan normalmente desapercibidas, podrían ser el origen de bajos índices de penetración en la zona libre del ovocito de hamster (Courtot y Jouannet, 1.985).

Son numerosos los laboratorios que

han realizado exhaustivos estudios comparando la calidad espermática con los resultados obtenidos con la fecundación in vitro (Battin et al., 1.985; Boyers et al., 1.985; Gibbons et al., 1.985; Jeyendran et al., 1.986 (a), 1.986 (b); Van der Ven et al., 1.986). Sin embargo, la mayoría de los investigadores admiten que ninguno de los parámetros seminales estandard actuales, a excepción quizás del número de espermatozoides de buena movilidad, son realmente predictivos de la capacidad fertilizante del espermatozoide. Por otro lado, Jeulin et al. en 1.986, admiten que la morfología espermática (particularmente la morfología acrosomial), la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide, y su velocidad de progresión influyen decisoriamente en el éxito de la fecundación in vitro, aunque no encuentran una buena correlación entre el porcentaje de anomalías acrosomiales y la no fecundación de ovocitos humanos.

Al estudiar las características físicas y funcionales de los espermatozoides obtenidos mediante la técnica de selección de "swim-up", medidas en función de la movilidad y la integridad funcional de la membrana plasmática (HOS-test), realizadas en individuos Normozoospérmicos, Oligo-, Asteno-, y Oligo-astenozoospérmicos moderados, observamos que se seleccionan espermatozoides de mayor calidad en cuanto su movilidad (sobre todo movilidad progresiva) y un mayor porcentaje de formas HOS-test positivo en aquellos grupos que no muestran un defecto de movilidad en su

espermograma (Normo- y Oligo-), teniendo en cuenta que el "swim-up" ha seleccionado los espermatozoides basandose en su calidad de difundir activamente hacia el medio de cultivo sobrenadante. Por el contrario, aquellos grupos que presentaban una movilidad anormal (Asteno-, y Oligoasteno-) no muestran tras el "swim-up" una mejora de la calidad espermática significativa, en función de la integridad funcional de la membrana plasmática (HOS-test) (Tabla XIV) (Palma et al., 1.989). Datos que coinciden con los obtenidos por Vijayakumar et al. en 1.988, que observaron que las características físicas y funcionales de los espermatozoides obtenidos mediante la técnica de "swim-up" en hombres Oligozoospérmicos son comparables a los de los hombres Normo-zoospérmicos.

Hemos encontrado una correlación estadísticamente significativa ( $r=0.4133$ ;  $p<0.02$ ) entre el porcentaje de formas HOS-test positivas y el porcentaje de vitalidad no sólo en el eyaculado (Tabla.- Va), como Jeyendran et al. (1.984) y Schrader et al. (1.986), que encuentran también una correlación positiva entre estos parámetros en el eyaculado, sino que también hemos encontrado una correlación positiva entre el porcentaje de formas HOS-test positivas y el porcentaje de vitalidad en las dos fracciones estudiadas tras el "swim-up", el precipitado ( $r=0.4247$ ;  $p<0.05$ ) (Tabla.- VIIa) y el sobrenadante ( $r=0.5625$ ;  $p<0.01$ ) (Tabla.- IXa), observando un aumento de la correlación en la fracción de sobrenadante

con respecto al eyaculado y el precipitado. Estos parámetros están parcialmente relacionados, por un lado, porque la muerte del espermatozoide produce cambios en la membrana que permiten el paso de la eosina al interior. membranas que probablemente no se hinchen al someterlas a un choque hipo-osmótico, y por otro lado, miden entidades diferentes porque un espermatozoide vivo puede tener una membrana no funcional, incapaz de ajustarse al choque hipo-osmótico, pero todavía capaz de impedir la entrada de la eosina.

Sí embargo, al realizar la tinción supravital de las muestras obtenidas tras la realización del HOS-test, se observa una drástica caída en el porcentaje de formas vivas (Tabla-III), debido probablemente a las alteraciones sufridas por la membrana plasmática del espermatozoide. De esta forma, la interacción de estos dos test enmascaran y dificultan la medida simultánea de ambas características de la membrana, tanto en eyaculado, como en precipitado, y como en el sobreadante de las muestras estudiadas. (Tabla V(b); VII(b); y IX(b) respectivamente).

**CONCLUSIONES**

## 11. CONCLUSIONES.

- 1.- La valoración de la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide medida mediante el test de hinchamiento hiposmótico, es un parámetro fiable y útil para la evaluación de la capacidad fecundante del individuo.
- 2.- El HOS-test es un método sencillo, rápido y económico, siendo recomendable su utilización en la rutina clínica.
- 3.- Los resultados obtenidos en el porcentaje de formas HOS-test positivo en el eyaculado de individuos Normozoospérmicos, son significativamente superiores a los obtenidos en individuos que mostraban alguna anomalía en su espermograma (Oligo-, Asteno-, y Oligo-Asteno-zoospérmicos moderados).
- 4.- El resultado del HOS-test muestra una correlación positiva con el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva, siendo este uno de los principales factores que determinan la capacidad fecundante del espermatozoide.

5.- El HOS-test está correlacionado positivamente con el porcentaje de formas morfológicamente normales, siendo este un parámetro indicativo de la calidad de una muestra de semen.

6.- El resultado del HOS-test muestra un aceptable grado de correlación con el test de viabilidad. Aunque ambos test son dependientes de membrana, miden características diferentes, por un lado el HOS-test mide la integridad funcional de la membrana plasmática, mientras que el test supravital sólo mide si la membrana del espermatozoide está estructuralmente alterada o no.

7.- En el sobrenadante obtenido tras el "swim-up" se observa un aumento significativo en el porcentaje de formas con resultado positivo en el HOS-test, formas con morfología normal y formas viables. Por lo que, el "swim-up" es una técnica efectiva para la separación de espermatozoides de buena calidad para su utilización en los protocolos de fecundación asistida.

8.- El sobrenadante obtenido tras el "swim-up" muestra una mayor calidad espermática, medida esta en función de la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide, en aquellos individuos que no mostraban un defecto de movilidad en su espermograma (Normo-, y Oligozoospérmicos).

9.- El HOS-test es un parámetro seminal de gran utilidad tanto para el diagnóstico de la fertilidad en el hombre, como para la evaluación de los resultados de los métodos de tratamiento de espermatozoides en fecundación asistida, aunque debe ser considerado junto con toda una batería de diferentes test que evalúen todos aquellos aspectos funcionales que contribuyen a la capacidad fecundante del espermatozoide.

**BIBLIOGRAFIA**

## 12. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- ABOUL-AZM (1.979).- Anatomy of the human seminal vesicles and ejaculatory ducts. Arch. Androl. 3, 287-292.
- 2.- ABRAMOVICH DR. (1.974).- Human sexual differentiation: In utero influences. J. Obstet. Gynecol. Brit. Commonw., 81, 448-453.
- 3.- ABRAMOVICH DR., BAKER TG., y NEAL P. (1.974).- Effect of human chorionic gonadotrophin on testosterone secretion by the foetal human testis in organ culture. J. Endocrinol., 60, 179-185.
- 4.- ABRAMOVICH DR., ROWE P. (1.973).- Foetal plasma testosterone levels at mid-pregnancy and at term: relationship to foetal sex. J. Endocrinol., 56, 621-622.
- 5.- ACOTT TS., HOSKINSS DD. (1.978).- Bovine sperm forward motility protein:partial purification and characterization. J. Biol. Chem. 253, 6744-6750.
- 6.- ACOTT TS., HOSKINS DD. (1.983).- Cinematographic analysis of bovine epididymal sperm motility: epididymal maturation and forward motility protein. J. Submicrosc. Cytol. 15, 77-82.
- 7.- ACOTT TS., JOHNSON DT., BRANDT H., HOSKINS DD. (1.979).- Sperm forward motility protein: tissue distribution and species cross reactivity. Biol. Reprod. 20, 247-252.

- 8.- AFZELIUS BA. (1.959).- Electron microscopy of the sperm tail. Results obtained with a new fixative. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**, 269-278.
- 9.- AFZELIUS BA., ELIASSEN R., JOHNSEN O., LINDHOLDER C. (1.975).- Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. *L. Cell. Biol.* **66**, 225-232.
- 10.- AITKEN RJ., BEST FSM., RICHARDSON DW., DJAHAN-BARUCH O., MORTIMER D., TEMPLETON AA., LEES MM. (1.982).- An analysis of semen function in cases of unexplained infertility: conventional criteria, movement characteristics, and fertilizing capacity. *Fertil. Steril.* **38**, 212.
- 11.- AITKEN RJ., ELTON RA. (1.986) (a).- Quantitative analysis of sperm-egg interaction in the zona-free hamster egg penetration test. *Int. Journ. Androl.*, suppl. **6**.
- 12.- AITKEN RJ., ELTON RA. (1.986) (b).- Application of poisson distribution theory oocyte penetration test assess sperm function in cases of asthenozoospermia. *J. Reprod. Fertil.* **77**, 67.
- 13.- AITKEN RJ., ROSS A., LEES M. (1.983) (a).- Analysis of sperm function in Kartagener's syndrome. *Fertil. Steril.* **40**, 696-698.
- 14.- AITKEN RJ., WANG YF., LIN J., BEST F., RICHARDSON DW. (1.983) (b).- The influence of medium

composition, osmolarity and albumin content on the acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa: development of an improved zona-free hamster egg penetration test. Int. Journ. Androl. 6, 180-193.

15.- ALEXANDRE JH., CHEVREL JP., LASSAU JP., HUREAU J. (1.966).- Aspects de la vascularisation aratérielle du testicule humain. C.R. Ass. Anat. 131, 84-89.

16.- ALLEN RD. (1.968).- A reinvestigation of cross-sections of cilia. J. Cell. Biol. 37, 825-831.

17.- AMANN RP., HAY SR., HAMMERSTEDT RH. (1.982).- Yield characteristics, motility and CAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. Biol. Reprod. 27, 723-733.

18.- AMELAR RD. (1.962).- Coagulation, liquefaction and viscosity of human semen. J. Uro. 87, 187-190.

19.- AMIR D., ORTAVANT R. (1.968).- Influence de la fréquence des collectes sur la durée du transit des spermatozoïdes dans le canal épididymaire du bétail. Annls. Biol. anim. Biochim. Biophys. 8, 195-207.

20.- AMMAN RP. (1.981).- A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. J. Androl. 2, 37-58.

- 21.- ARNY M., QUAGLIARELLO J. (1.987).- Semen quality before and after processing by a swim-up method: relationship to outcome of intrauterine insemination. *Fertil. Steril.* **48**, 643-648.
- 22.- BACCETTI B., BURRINI AG., PALLINI V., RENIERI T. (1.981).- Human dynein and sperm pathology. *J. Cell. Biol.* **88**, 102-107.
- 23.- BACCETTI B., PALLINI V., BURRINI AG. (1.976).- The accessory fibers of the sperm tail. *L. Ultrastruct. Res.* **56**, 289-308.
- 24.- BANCROFT J.D., COOK H.C. (1.984).- Manual of histological techniques. Churchill Livingstone. Edinburgh.
- 25.- BARDIN C.W., MUSTO N.A., GUNSAULUS G.L., KOTITE N., CHENG S.L., LARREA F., BECKER R. (1.981).- Extracellular androgen binding proteins. *Ann. Rev. Physiol.* **43**, 189-198.
- 26.- BARR A., MOORE D.J., PAULSEN C.A. (1.971).- Germinal cell line during human spermatogenesis. *J. Reprod. Fert.* **25**, 75-80.
- 27.- BARROS C., GONZALEZ J., HERRERA E. y BUSTOS-OBREGON E. (1.978).- Human sperm penetration into zona free hamster ovocytes as a test to evaluate the sperm fertilizing ability. *Andrologia* **11**, 197-210.

- 28.- BARROS C., VIGIL P., HERRERA E., ARGUELLO B. y WALKER R. (1.984).- Selection of morphologically abnormal sperm by human cervical mucus. Arch. of Androl. **12**, 95-107.
- 29.- BARTOOV B., ELTES F., WEISSENBERG R. y LUNENFELD B. (1.980).- Morphological characterization of abnormal human spermatozoa using transmission electron microscopy. Arch. Androl. **15**, 305-322.
- 30.- BARTOOV B., FICHER J., ELTES F., LANGSAM J. y LUNENFELD B. (1.981).- A comparative morphological analysis of normal human spermatozoa. In: V. Insler, G. Bettendorf: advances in diagnosis and treatment of infertility. Elsevier, North Holland, 355-361.
- 31.- BARTOOV B., ELTES F., LANGSAM J., SNYDER M. y FISHER J. (1.982).- Ultrastructural studies in morphological assessment of human spermatozoa. Int. J. Androl. suppl. **5**, 81-96.
- 32.- BATTIN D., VARGYAS J.M., SATO F., BROWN J. y MARRS R.P. (1.985).- The correlation between in vitro fertilization of human oocytes and semen profile. Fertil. Steril. **44**, 835-838.
- 33.- BAUMGARTEN H.G., HOLSTEI! A.F. y ROSENGREN E. (1.971).- Arrangement, ultrastructure, and adrenergic innervation of smooth musculatura of the ductulé efferentes, ductus epididymis and ductus deferens of man. Z.Zellforsch. **120**, 37-79.

- 34.- BEDFORD J.M. (1.964).- Changes in the electro-phoretic properties of rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. *Nature* **200**, 1.178-1.180.
- 35.- BEDFORD J.M. (1.966).- Development of the fertilising ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit. *Exp. Zoo.* **163**, 319-325.
- 36.- BEDFORD J.M. (1.967) (a).- Effects of duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa from different regions of the rabbit epididymis. *J. Exp. Zool.* **166**, 271-282.
- 37.- BEDFORD J.M. (1.967) (b).- Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit. *J. Exp. Zool.* **163**, 319-329.
- 38.- BEDFORD J.M., CALVIN H. y COOPER G.W. (1.973).- The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J. Reprod. Fert. suppl.* **18**, 199-213.
- 39.- BEDFORD J.M. y RIFKIN J.M. (1.979).- An evolutionary view of the male reproductive tract and sperm maturation in a monotreme mammal the echidna, *tachyglossus aculeatus*. *Am. J. Anat.* **156**, 207-230.
- 40.- BEDFORD J.M. y ZELIKOVSKY G. (1.979).- Viability of spermatozoa in the human ejaculate after vasectomy. *Fert. Steril.* **32**, 460-463.

- 41.- BELAISCH-ALLART J., FRYDMAN R., TESTART (1984)  
In vitro fertilization and embryo transfer  
program in Clamart, France. J. Vitro. Fertil.  
Embryo. Transfer. 1, 5155.
- 42.- BIGGERS J.D., WHITTEN W.K. y WITTINGHAM D.G.  
(1.971).- The culture of mouse embryo in  
vitro. In Daniel J.C. (Ed): "Methods in Mamma-  
lian Embryology". San Francisco. Freeman.  
86-116. pp.
- 43.- BISSON J.P. (1.975).- Ultrastructure de l'acrosome  
dans les spermatozoides à tête irrégulière.  
Bull. Assoc. Anat. 59, 345.
- 44.- BISSON J.P., (1.981).- Apport de la microscopie  
électronique de transmission dans le bilan  
de l'intégrité masculine. In Human Fertility  
factors, Eds. A. Spira, P. Jouannet. INSERM,  
Paris. pp. 107-111.
- 45.- BISSON J.P. y DAVID G. (1.975) (a).- Ultrastruc-  
ture des spermatozoides anormaux. J. Gyn.  
Obstet et Biol. de Reprod. suppl. 17, 36.
- 46.- BISSON J.P. y DAVID G. (1.975) (b).- Anomalies  
morphologiques du spermatozoïde humain 2)  
Etude ultrastructurale. J. Gynecol. Obstet.  
Biol. Reprod. (Paris). 4 suppl. 1, 37-86.
- 47.- BLASCO L. (1.984).- Clinical tests of sperm  
fertilizing ability. Fertil. Steril. 41,  
177-192.

- 48.- BONDIL P., RIGOT J.M. y NGUYEN GUI J.L. (1.986).- Hemodynamique pénienne: mecanismes préalables. Cahiers Sexol. Clin. 12, 73-80.
- 49.- BOOKSTEIN J.J. (1.987).- Production of penile veno-occlusive insufficiency by arterial occlusion in canine model. J. Urol. 137 (6), 1.283-1.287.
- 50.- BOREI J. (1.974).- Les images des voies séminales. Karger S., Paris.
- 51.- BOSTOFTE E., SERUP J. y REBBE H. (1.984).- Interrelations among the characteristics of human semen, and a new system for classification of male infertility. Fertil. Steril. 41, 95-102.
- 52.- BOYERS S.P., TARLATZIS B.C., ZONES E.E., PAN S.B., HANZAR G. y De CHERNEY A.H. (1.985).- Semen parameters and in vitro fertilization (IVF) in couples with idiopathic, male and tubal infertility. Proceedings, 4th World Conference on in vitro Fertilization. Melbourne. Austral.
- 53.- BRANDT H., ACOTT T.S., JOHNSON D.J. y HOSKINS D.D. (1.978).- Evidence for an epididymal origine of bovine sperm forward motility protein. Biol. Reprod. 19, 830-835.
- 54.- BRASSESCO M. (1.987).- III Estudio físico, citomorfológico y bioquímico del eyaculado

(Parte II). Tiempos Médicos: 342, 35-42.

- 55.- BRAY J. (1.955).- The movement of sea urchin spermatozoa. J. Expert. Biol. 32, 775-801.
- 56.- BROKAW C.J. (1.971).- Bend propagation by a sliding filament model for flagella. J. Exper. Biol. 55, 289-304.
- 57.- BROKAW C.J. (1.972).- Computer stimulation of flagellar movement. I. Demonstration of stable bend propagation and bend initiation by the sliding filament modes. Biophys. J. 12, 564-586.
- 58.- BROKAW C.J. (1.979).- Calcium-induced asymmetrical beating of triton-demembranated sea urchin sperm flagella. J. Cell. Biol. 82, 401-411.
- 59.- BROKAW C.J., JOSSLIN R. y BOBROW L. (1.974).- Calcium ion regulation for flagellar beat symmetry in reactivated sea urchin spermatozoa. Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 795-800.
- 60.- BROOKS D.E., HAMILTON D.W. y MALLECK A.H. (1.974).- Carnitine and glyceryl-phosphoryl-choline in the reproductive tract of the male rat. J. of Reprod. and Fertil. 36, 141-160.
- 61.- BROWN-WOODMAN P.D.C., MARLEY P.B., MORRIS S., RODGER J.C. y WHITE I.G. (1.980).- Origin of glycerylphosphorylcholine, inositol, N-acetyl-amino sugar and prostaglandin in human

seminal plasma and their effects on sperm metabolism. Arch. Androl. 4, 149-155.

- 62.- BULGER W.H., MUCCITELLI R.M. y KUPFER D. (1.978).- Interactions of chlorinated hydrocarbon pesticides with 85 estrogenbinding protein in rat testes. Steroids 32, 165-168.
- 63.- BUNGE R.G. y SHERMAN J.K. (1.954).- Liquefaction of human semen by alpha-amylase. Fertil. Steril. 5, 353-356.
- 64.- BUSTOS-OBREGON E., COURT M., FLECHON J.E., MOCHEREAU DE REVIER M.T. y MOLSTEIN A.F. (1.975).- Morphological appraisal of gametogenesis spermatogenetic process in mammals wth particular reference to man. Androl. 7, 141-148.
- 65.- CALVIN H.I. y BEDFORD J.M. (1.971).- Formation of disulfide bouds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. J. Reprod. Fertil. suppl. 13, 65-75.
- 66.- CALVIN H.I. y BEDFORD J.M. (1.974).- Stimulation of actinomycin D-binding to eutherian sperm chromatin by reduction of disulphide bonds. J. Reprod. Fert. 36, 225-229.
- 67.- CASSILLAS E.R. (1.973).- Acumulation of carnitine by bovine spermatozoa during maturation in the epididymis. J. Biol. Chemistry 248, 8.227-33.

- 68.- CASTELLANI L., CHIARA F. y COTELLI F. (1.978).- Fine structure and cytochemistry of the morphogenesis of round-headed human sperm. Arch. Androl. 1, 291-297.
- 69.- CLAVERT A., CRANZ C. y BRUN B. (1.981).- Epididymal vascularisation and microvascularisation. Prog. Reprod. Biol. Vol. 8: 48-57. Karger, Basel.
- 70.- CLERMONT Y. (1.958).- Contractile elements in the limiting membrane of the seminiferous tubules of the rat. Exp. Cell. Res. 15, 438-440.
- 71.- CLERMONT Y. (1.963).- The cycle of the seminiferous epithelium in man. Am. J. Anat. 112, 35-51.
- 72.- CLERMONT Y. (1.969).- Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (*Cecopithecus aethiops*). Am. J. Anat. 126, 57-72.
- 73.- CLERMONT Y. (1.972).- Kinetics of spermatogenesis in mammals; Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol. Rev. 52, 198-236.
- 74.- CLERMONT Y. y ANTER M. (1.973).- Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey *Macaca arctoides*. Am. J. Anat. 136, 153-166.
- 75.- CLERMONT Y. y BUSTOS-OBREGON E. (1.966).- Re-examination of spermatogonial renewal

in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto". Am. J. Anat. 122, 237-248.

- 76.- CLERMONT Y. y HARVEY S.C. (1.965).- Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophisectomized hormone treated albino rat. Endocrinology 76, 80-89.
- 77.- CLERMONT Y. y HERMO L. (1.975).- Spermatogonial stem cells in the albino rat. Am. J. Anat. 142, 159-176.
- 78.- COCHARAM W.G. (1.975).- Comparison the two samples. In: "Statistical methods". The Iowa States University Press 153-157.
- 79.- COHEN J., FEHILLY, C.B., WALTERS, D.E. (1.985).- Prolonged storage of human spermatozoa at room temperature or in a refrigerator. Fertil. Steril. 44 (2), 254-262.
- 80.- COHEN J., WEBER R.F.A., VAN der VIJVER J.C.M. y ZEILMAKER G.H. (1.982).- In vitro fertilizing capacity of human spermatozoa with the use of zona free hamster ova: interassay variation and prognostic value. Fertil. Steril. 37, 565-572.
- 81.- CONCHIE J., FINDLAY J. y LEVYY G.A. (1.959).- Mammalian glicosidases distribution in the body. Biochem. J. 71, 318-325.

- 82.- CONFINO E., FRIBERG J., DUDKIEWICZ A.B. y GLEICHER N. (1.986).- Intrauterine inseminations with washed human spermatozoa. *Fertil. Steril.* **46**, 55-60.
- 83.- CONTI G. (1.952).- L'erection du pénis humain et sus bases morphologico-vasculaires. *Acta Anat. (Basel)* **24**, 217-224.
- 84.- COOPER T.G. y HAMILTON D.W. (1.977).- Observations on destruction of spermatozoa in the cauda epididymidis and proximal vas deferens of nonseasonal male mammals. *Am. J. Anat.* **149**, 93-110.
- 85.- CORNETT L.E. y MEIZEL S. (1.978).- Stimulation of in vitro activation and the acrosome reaction of hamster spermatozoa by catecholamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**, 4.954-4.958.
- 86.- CORVOL P., MICHAUD A., MENARD J., FREIFELD M. y MAHOUDEAU J. (1.975).- Antiandrogenic effect of sprolactones: mechanism of action. *Endocrinology* **57**, 52-59.
- 87.- COSSON M.P., CARRE D., COSSON J. y SARDT C. (1.983).- Calcium mediates sperm chemotaxis in siphonophores. *J. Submicrosc. Cytol.* **15**, 89-94.
- 88.- COURTOT A.M. y JOUANNET P. (1.985).- Zonae-free hamster ovum penetration by human spermatozoa; influence of varios sperm factors. *Reprod. Nutr. Develop.*, **25**, 521-529.

- 89.- CRICH J.P. y JEQUIER A.M. (1.978).- Infertility in men with retrograde ejaculation: The action of urine on sperm motility and a simple method for achieving antegrade ejaculation. *Fertil. Steril.* **30**, 572-576.
- 90.- CROSS B.A. y GROVER T.D. (1.958).- The hypothalamus and seminal emission. *J. Endocr.* **16**, 385-395.
- 91.- CUMMINS J.M. (1.976).- Effects of epididymal occlusion on sperm maturation in the hamster. *J. Exp. Zool.* **197**, 187-190.
- 92.- CUMMINS J.M. (1.982).- Hyperactivated motility patterns of ram spermatozoa recovered from the oviduct of mated ewes. *Gamete Res.* **6**, 53-63.
- 93.- CHAN S.Y.W., FOX E.J., CHANG Ch., TANG L.C.H., TANG G.W.K. y HO P. (1.985).- The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test human sperm analysis, and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay. *Fertil. Steril.* **44** (5), 668-672.
- 94.- CHATEL A., BIGOT H. y DECTOT H. (1.978).- Anatomie radiologique des veines spermatiques: A propos de 152 Phlébographies spermatiques rétrogrades. *J. Chir. (Paris)* **115**, 443-448.
- 95.- CHISTENSEN A.K. (1.975).- Leydig cells. In ro greep, eb astwoop: handbook of physiology, vol. V, sect. 7, chapter 3, American Physiological Society. Washington.

- 96.- DACHEUX J.L. y PAQUIGNOM M. (1.980).- Effects of caffeine on ram and boar spermatozoa: Influence of their stage of maturation and the medium, initiation of progressive motility of testicular spermatozoa. In E. Steinberger et A. Steinberger: Testicular development, structure and function. Raven Press, New York, 513-522. pp.
- 97.- DADOUNE J.P. y FAIN-MAUREL M.A. (1.977).- A routine technique for processing human ejaculate spermatozoa for scanning electron microscopy with special reference to their abnormal forms. Biol. Cellul. 29, 215-218.
- 98.- DAOUST R. y CLERMONT Y. (1.955).- Distribution of nucleic acids in germ cells during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Am. J. Anat. 96, 225-283.
- 99.- DAVID G., BISSON J.P., CZYGLIK F., JOUANNET P. y GERMIGON Cl. (1.975).- Anomalies morphologiques du spermatozoide humain. I.- Proposition pour un système de classification. J. Gyn. Obstet. Biol. Reprod. (Paris) 4 (suppl.1), 17.
- 100.- DAVID G., BISSON J.P., JOUANNET P., CZYGLIK F., GERNIGON G., ALEXANDRE C. y GILBERT-DREYFUS A. (1.972).- Les tératospermies. In C thibault: les stérilité du mâle. Acquisitions récentes. Paris, Masson.
- 101.- DAVID G., JOUANNET P., MARTIN-BOYCE A., SPIRE A. y SCHWARTZ D. (1.979).- Sperm counts in fertile and infertile men. Fertil. Steril. 31, 453-455.

- 102.- DAVIS B.K. (1.981).- Timing of fertilization in mammals: Sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **78** (12), 7.560-7.564.
- 103.- DE LAMIRANDE E., BARDIN C.W. y GAGNON C. (1.983).- Aprotinin and a seminal plasma factor inhibit the motility of demembranated reactivated rabbit spermatozoa. Biol. Reprod. **28**, 788-796.
- 104.- DE LAMIRANDE E. y GAGNON C. (1.983).- Aprotinin and a seminal plasma factor provide two new tools to study the regulation of sperm motility. J. Submicrosc. Cytol. **15**, 83-87.
- 105.- DERRICK F.C. y DAHLBERG B. (1.976).- Male genital tract infections and sperm viability. In ESE Hafez: Human semen and fertility regulation in men. Mosby, Saint-Louis, 389-397. pp.
- 106.- DIEZ D'AUS R.C. y MURPHY B.E.P. (1.974).- Androgens in the human fetus. J. Steroid Biochem **5**, 207-210.
- 107.- DORRINGTON J.H., FRITZ I.B. y ARMSTRONG D.T. (1.978).- Steroidogenesis by granulosa and Sertoli cells. Inter. Nat. J. Androl. **1**, (suppl. 2), 53-64.
- 108.- DREVIUS L. (1.972).- The permeability of bull spermatozoa to water, polyhydroalcohols

and univalent anions upon the kinetic activity of spermatozoa and sperm models. J. Reprod. Fert. 28, 41-54.

109.- DYM M. (1.973).- The fine structure of the monkey (Macaca) Sertoli cel and its role in maintaining the blood testis barrier. Anat. Rec. 175, 639-656.

110.- DYM M. y FAWCETT D.W. (1.971).- Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes and spermatids joined by intercellular bridgers in mammalian spermatogenesis. Bio. Reprod. 4, 195-215.

111.- DYSOM ALMB. y ORGEBIN-CRIST M.C. (1.973).- Effects of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. Endocrinology 93, 391-402.

112.- EDWARDS R., FISHEL, S., COHEN, J. (1.984).- Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. J.Vitro Fertil. Embryo Transfer, 1, 323.

113.- ELIASSON R. (1.959).- Studies on prostaglandin, occurrence and formation and biological action. Acta Physiologica Scandinavica 46, (suppl. 158), 1-73.

114.- ELIASSON R. (1.965).- Effect of frequent

- ejaculations on the composition of the human seminal plasma. J. Reprod. Fertil. **9**, 331-335.
- 115.- ELIASSON R. (1.971).- Standards for investigation of human semen. Androl. **3**, 49-64.
- 116.- ELIASSON R. (1.973).- Parameters of male fertility. In ESE Haferz, Human reproduction, conception and contraception, Harper et Row, New York, 39-51. pp.
- 117.- ELIASSON R. (1.977).- Supravital staining of human spermatozoa. Fertil. Steril. **28**, 1.257.
- 118.- ELIASSON R. (1.981).- Analysis of semen. In The testis, ed. H. Burger and D. de Kretser: The testis. Raven Press. New York. 381-399.pp.
- 119.- ELIASSON R. y LINDHOLME C. (1.971).- Zinc in human seminal plasma. Androl. **3**, 147-153.
- 120.- ERWING L. y BROWN B.C. (1.977).- Testicular steroidogenesis. In AS Johnson, WR Gomes: The testis IV Academic Press, New York, pp239-287
- 121.- ESCALIER D. y BISSON J.P. (1.980).- Quantitative ultrastructural modifications in human spermatozoa after freezing. In G. David. WS Price: Human artificial insemination and semen preservation. Plenum Press. New York. 107-122.
- 122.- FARRE MARTI J.M. (1.985).- Bases psicofisiológicas de la conducta sexual. En Curso sobre

temas andrológicos. Ed. José Luis Arrondo, 317-392. Pamplona.

123.- FAWCETT D.W. (1.956).- The fine structure of chromosomes in meiotic prophase of vertebrate spermotocytes. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 403-406.

124.- FAWCETT D.W. (1.975).- Ultrastructure and function of the Sertoli cell. In DW Hamilton et Ro Greep: Hamdbook of Physiology, Endocrinology V. Physiological Society, Washington, 21-55. pp.

125.- FAWCETT D.W. y Phillips D.M. (1.969).- Observations on the release of spermatozoa and on changes in the head during passage through the epididymis. J. Reprod. Fertil. 6, 405-418.

126.- FAWCETT D.W. y PORTER K.R. (1.952).- Study of the fine structure of ciliated apithelial cells with the electron microscope. Anat. Rec. 113, 539.

127.- FEIG L.A., BELLVE A.R., ERICK SON N.H. y KLAGSBURN M. (1.980).- Sertoli cells contain a mitogenic polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 4.774-4.778.

128.- FENEUX D. (1.985).- Sperm factors and human in vitro fertilization failure. Proceedings, 4th World Conference on in vitro Fertilization. Melbourne, Australia.

- 129.- FAWCETT D.W., ITO S. y SLAUTTERBACK D.L. (1.959).- The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5, 453-460.
- 130.- FITZPATRICK T.J. (1.982).- The penile inter-communication venous vascular system. *J. Urol.* 127, 1.099-1.100.
- 131.- FLECHON J.E. y DUBOIS M.P. (1.975).- Localisation immunocytochimique de la hyaluronidase dans les spermatozoïdes de mammifères domestiques. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 280.
- 132.- FLECHON J.E. y HAFEZ E.S. (1.976).- Scanning electron microscopy of human spermatozoa. IN E.S. Hafez: Human semen and fertility regulation in men. Mosby. St-Louis, 76-82. pp.
- 133.- FLICKINGER C.J. y FAWCETT D.W. (1.967).- The junctional specializations of Sertoli cells in the seminiferous epithelium. *Anst. Rec.* 158, 207-222.
- 134.- FOREST M.G., DE PERETTI E., LECOQ A., CADILLON E., ZABOT M.T. y THOULON J.M. (1.980).- Concentration of 14 steroide hormones in human amniotic fluid of micropregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51, 816-822.
- 135.- FOURNIER-DELPECH S., COLAS G., COUROT M. y ORTAVANT R. (1.977).- Observations on the

motility and fertilizing ability of ram epididymal spermatozoa. Annls. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 17, 987-990.

- 136.- FOURNIER G.R., SUENEMANN K.P., LUE T.F. y TANAGHO E.A. (1.986).- Mechanism of venous occlusion during canine penile erection: an anatomia demostation. J. Urol. 137, 163-172.
- 137.- FRANCHIMONT P. y CHANNING C. (1.981).- Intragonadal reguiation of reproduction. Academic Press. Londres. New York.
- 138.- FRANCHIMONT P., CHARI S., HAGELSTEIN M.T. y DURAISWAMI S. (1.975).- Existencie of a follicle stimulating hormone inhibitory factor "inhibin" in bull seminal plasma. Nature 257, 402-404.
- 139.- FRANCHIMONT P., VERSTRAELEN-PROYARD J., HAZEE-HAGELSTEIN M.T., RENARD C.H., DEMOULIN A. BOURGUIGNON J.P. y HUSTIN J. (1.979).- Inhibin: from concept to reality. Vitam. Horm. 37, 243-302.
- 140.- FREUND M. (1.966).- Standards for the rating of human sperm morphology. Int. J. Fertil. 11-197. pp.
- 141.- FREUND M. (1.968).- Semen analysis. In SJ Behrman. RW Kistner Progress in infertility. Brown, Little. Boston. 593-627. pp.
- 142.- FREUND M. (1.982).- Interrelationship among

the characteristics of human semen and factors affecting semen specimen quality. J. Reprod. Fertil. 4, 143-159.

143.- FREUND M. y PETERSON R.N. (1.976).- Semen evaluation and fertilizy regulation in men. Mosby, ST.Louis. 344-354.pp.

144.- FRONZO D., SIVIERI R., GALLO G., ANDRIOLI S., ANGELI A. y CERESA F. (1.977).- Effect of a prolactin inhibitor on libido, sexual potency and sex hormone in men witha mild hyperprolactinemia, oligospermia and/or impotence. Acta Endocrinol. (Copenh.), 85 (212), 142-149.

145.- GARBENS D.L., LUST W.D., FIRST N.L. y LARDY H.A. (1.971).- Effects of phosphodiesterase inhibitors and ciclic nucleotides on sperm respiration and motility. Biochem. 10, 1.825-1.851.

146.- GARBERS D.L., WATKINS H.D., HANSBROUGH J.R., SMITH A. y MISONO K.S. (1.982).- The amino acid sequence and chemical synthesis of speract and of speract analogues. J. Biol. Chem. 257, 2.734-2.737.

147.- GARCIA J., ACOSTA A., ANDREWS M.C., JONES G.S., JONES H.W., MANTZAVINOS T., MAYER J., MAC DOWELL J., SANDOW B., VEECK L., WHIVLEY T., WILIKES C. y WRIGHT G. (1.984).- In vitro fertilization in Norfolk, Virginia, 1.980-1.983. J. In vitro, Fertil. Embryo Trans. 1, 24-28.

- 148.- GIBBONS I.R. (1.963).- Studies on the protein components of cilia from *tetrahymena pyriformis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **50**, 1.002-1.010.
- 149.- GIBBONS I.R. (1.981).- Cilia and flagella of Eukaryotes. J. Cell Biol. **91**, 107-124.
- 150.- GIBBONS B. H. y GIBBONS I.R. (1.976).- Funcional recombination of dynein, whith demembranated sea urchin sperm partially extracted with kci. Biochem. Biophys. Res. Commun. **73**, 1-6.
- 151.- GIBBONS I.R. y GRIMSTONE A.U. (1.960).- On flagellar structure of certain flagellates. J. Biophys. Biochem. Cytol. **7**, 697-716.
- 152.- GIBBONS W., LIPSHULTZ L., HIRSCH I., DODSON M., POINDEXTER A., LOTZE E., WOODWARD R., YOUNG R., GRUNNERT G., ROWE G., GITLIN S., EATON N. y FINDLEY W. (1.985).- The significance of abnormal male factor parameters in IVF/ET. Proceedings, 4th World Conference on in vitro Fertilization. Merbourne. Australia.
- 153.- GIL VERNET S. (1.953).- Biología y patología de la próstata. Paz-Montalvo, Madrid.
- 154.- GINER J., MERINO G., LUNA J. y AZNAR R. (1.974).- Evaluation of the Sinus-Huhner post-coital test in fertile couples. Fertil. Steril. **25**. 145-148.
- 155.- GLEZERMAN M. y BARTOOV B. (1.984).- In V

insler, B Lunenfeld: Infertility male and female. Churchill Luvingstone. Londres.

156.- GLEZERMAN M. y LUNENFELD B. (1.976).- Zür therapie der männlichen anorgasmicne. Ein Fallbericht. Akta Derm. 2, 167-172.

157.- GOLDSTEIN A.M.B., MORROW J.W. y MEEHAN J.P. (1.984).- Special microanatomical features surronuding the intracorpora cavernosa nerves and th. r probable function during erection. J. Urol. 132, 44-56.

158.- GONDOS B. (1.977).- Testicular development. In ad Johnson, WR Gomes: The testis, Vol. IV Academic Press, New York. 1-27. pp.

159.- COTTERER G., GINSBERG D., SHULMAN T., BANKS J. y WILLIAMS-ASHMAN H.G. (1.955).- Enzymatic coagulation of semen. Nature 176, 1.209-1.211.

160.- GOULD J.E., OVERSTREET J.W., YANAGIMACHI H., YANAGIMACHI R., KATZ D.F. y HANSON F.W. (1.983).- What functions of the sperm cell arc measured by in vitro fertilization of zona-free hamster eggs?. Fertil. Steril. 40, 344-352.

161.- GRAY'S ANATOMY (1.973).- The testes, p 1.338, 35th edition. Johnston, T., B. WHILLIS J. (eds). Longmans, Green and Co.

162.- GREENBERG S.H., LEPSCHULTZ L.I. y WEIN A.J.

- (1.978).- Experience with 425 subfertile male patients. J. Urol. 119, 507-510.
- 163.- GUERIN J.F., CZYBA J.C., PERRIN P. y ROLLET J. (1.981) (a).- Les obstruction congenitales ou aquises de l'epididyme humain: Etude de la mobilite des spermatozoides en amont de l'obstruction. Bulletin de l'association des anatomistes. 65, 297-306.
- 164.- GUERIN J.F., ROLLET J., PERRIN P., MENEZO Y., ORGIAZZ A. y CZYBA J.C. (1.981) (b).- Enzymes in the seminal plasma from azoospermic men: correlation with the origin of their azoospermia. Fertil. Steril. 36, 368-372.
- 165.- GUNSLAS G.L., MUSTO N.A. y BARDIN C.W. (1.980). Bi-directional release of a Sertoli cell product, androgen binding protein, into the blood and seminiferous tubule. In Steinberger A. Steinberger E.: Testicular development, structure and function. Raven Press. New York. 291-298.pp.
- 166.- HAMILTON D.W. (1.972).- The mammalian epididymis In Balin, H. y Glasser S. (eds). Reproductive Biology. Excerpta Medica. Amsterdam. 268-337. pp.
- 167.- HANADA A. y CHANG M.C. (1.972).- Penetration of zona-free eggs by spermatozoa of different species. Biol. Reprod. 6, 300-309.
- 168.- HANSBROUGH J.R. y GARBERS D.L. (a)(1.981).-

Speract, purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. J. Biol. Chem. 256, 1.447-1.452.

169.- HANSBROUGH J.R. y GARBERS D.L. (1.981) (b).-

Sodium dependent activation of sea urchin spermatozoa by speract and monensin. J. Biol. Chem. 256, 2.235-2.241.

170.- HANSON F.W., OVERSTREET J.W. y KATZ D.F.

(1.982).- A study of the relationship of motile sperm numbers in cervical mucus 48 hours after artificial insemination with subsequent fertility. Am. J. Obst. Gynecol. 143, 85-90. pp

171.- HANSSON V. y DJOSELAND O. (1.972).- Preliminary characterization of the  $5\alpha$ -dihidrotestosterone binding protein in the epididymal cytosol fraction. In vivo studies. Acta Endocrinol. (Copenh). 71, 614-624.

172.- HANSSON V., DJOSELAND O., REVSCHE E., ATTRAMADAL A. y TORGERSON O. (1.973).- An androgen binding protein in the testis cytosol fraction of adult rats: comparison with the androgen binding protein in the epididymis. Steroids. 21, 457-474.

173.- HANSSON V., TRYGSTAD O., FRENCH F.S., TINDALL D.J., WEDDINGTON S., PETRUSZ P., NAYFEH S.N. y RITZEN E.M. (1.974).- Androgen transport and receptor mechanisms in testis and epididymis.

Nature 250, 387-391.

174.- HELLER C.G. y CLERMONT Y. (1.963).- Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. Science 140, 180-186.

175.- HEUCHEL V., SCHWARTZ D. y PRICE W. (1.981).- Within subject variability and the importance of abstinence period for sperm connt, semen volume and prefreeze and post thaw motility. Andrologia 13, 479-485.

176.- HINRICHSEN M.J. y BLAQUIER J.A. (1.980).- Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. J. Reprod. Fert. 60, 291-294.

177.- HINTON B.T., BROOKS D.E., DOTT H.M. y SETCHELL B.P. (1.981).- Effects of carnitine and some related compounds on the motility of rat spermatozoa from the caput epididymidis. J. Reprod. Fer. 61, 59-64.

178.- HINTON B.T., DOTT H.M. y SETCHELL B.P. (1.979). Measurement of the motility of rat spermatozoa collected by micropuncture from the testis and from different regions along the epididymis. J. Reprod. Fer. 55, 167-172.

179.- HIRSCHHAUSSER C. y ELIASSON R. (1.972).- Origin and possible function of muramidase (lysozyme) in human seminal plasma. Life Sciences 11, 149-154.

- 180.- HOFFER A.P., HAMILTON D.W. y FAWCETT D.W. (1.975).- Phagocytosis of spermatozoa by the epithelial cells of the ductuli efferentes after epididymal obstruction in the rat. J. Reprod. Fer. **44**, 1-9.
- 181.- HOFFMANN-BERLING H. (1.955).- Geisselmodelle and adenosintriphosphate. Buichum. Biophys. Acta. **16**, 146-154.
- 182.- HOLSTEIN A.F. (1.978).- Spermatophagy in the seminiferous tubules and excurrent duct of the testis in rhesus monkey and in man. Androl. **10**, 331-352.
- 183.- HOLSTEIN A.F. y ROOSEN RUNGE E. (1.981).- Atlas of human spermaogenesis. Grosse Verlag. Berlin. 195-219. pp.
- 184.- HOLWILL M.E.J. (1.977).- Some biophysical aspects of ciliary and flagellar motility. Adv. Microb. Physiol. **16**, 1-48.
- 185.- HOPPE P.C. (1.975).- Fertilizing ability of mouse sperm from different epididymal regions and after washing and centrifugation. J. Exp. Zool. **192**, 219-222.
- 186.- HOSKINS D.D., STEPHENS D.T. y HALL M.L. (1.974). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and protein kinase levels in developing bovine spermatozoa. J. Reprod. Fer. **37**, 131-133.

- 187.- HUHTANIENI I.T., IKONEN M. y VIHKO R. (1.970).- Presence of testosterone and other neutral esteroids in human fetal restes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 4, 715-720.
- 188.- HUNT W.L. y NICCLSON N. (1.972).- Studies on semen from rabbits injerted with  $^3$ H-thymidine and treated with prostaglandius E<sub>2</sub> and F<sub>2 $\alpha$</sub> . Fertil. Steril. 23, 763-768.
- 189.- HURET J.L. y COURTOT A.M. (1.984).- Effect of migration and capacitation on the nuclear stability of human sperm. Arch.Androl.13,147-152.
- 190.- HWANG P., GUYDA H. y FRIESEN H.G.(1.972).- Purification of human prolactin. J.Biol.Chem.247, 1955-6
- 191.- IQBAL M., SHIVADI S., VIJAYASARATHY S. y BELARAM P. (1.980).- Synthetic peptides as chemoattractants for bull espermatozoa, structure activity correlations. Biochem. Biophys. Res. Commun., 96, 235-242.
- 192.- JARDIN A., DJEDJEMADY A. y RICHARD F. (1.982).- Retentissement des uropathies et de leur traitement sur l'erection. Sémin. Uro. Nérol. Pitié-Salpêtrieré.8, 51-66.
- 193.- JEQUIER A.M. y CRICH J.P. (1.986).- In Semen analysis. A practical guide. Blackwell Scientific Publications. Ed.: Osney Mead, Oxford.
- 194.- JEULIN C., FENEUX D., SERRES C., JOUANNET P., GUILLET-ROSSO F., BELAISCH-ALLART J., FRYDMAN R., y TESTART J. (1.986).- Sperm factors related to failure of human in vitro fertilization. J. Reprod. Fert. 76, 735-744.

- 194.- JEYENDRAN R.S., VAN DER VEN H.H., PEREZ-PELAEZ M., CRABO B.G. y ZANEVELD L.J. (1.984).- Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* **70**, 219-228.
- 195.- JEYENDRAN R.S., PEREZ-PELAEZ M., VAN DER VEN H.H., AL-HASANI S. y RANA N. (1.986) (a).- Evaluation of acrosome on Papanicolaou stained sperm and its relationship to the in vitro fertilizing capacity of human spermatozoa. *Arch. Androl.* **16**, 119-123.
- 196.- JEYENDRAN R.S., SCHRADER S.M., VAN DER VEN H.H., BURG J., PEREZ-PELAEZ M., AL-HASANI S. y ZANEVELD L.J.D. (1.986) (b).- Association of the in vitro fertilizing capacity of human spermatozoa with sperm morphology as assessed by three classification systems. *Human Reprod.* **1**, 305-308.
- 197.- JOHNSON L. (1.982).- A reevaluation of daily sperm output of men. *Fertil. Steril.* **37**, 811-816.
- 198.- JONES R.C. (1.971).- Studies on the structure of the head of boar spermatozoa from the epididymis. *J. Reprod. Fert. suppl.* **13**, 51-64.
- 199.- JOUANNET P. (1.983).- Fertilité et age. *Contrac. Fertil. Sexueal.* **11**, 911-914.

- 200.- JOUANNET P. y DAVID G. (1.978).- Evolution of the properties of semen immediately following vasectomy. *Fertil. Steril.* **29**, 435-441.
- 201.- JOUANNET P., DUCOT B., SOUMAH A., SPIRA A., FENEUX D. y ALBERT M. (1.981) (a).- les caractéristiques du sperme des hommes feconds et inféconds. In A. Spira, P. Jouannet: les facteurs de la fertilité humaine. INSERM Vol. 103, 73-90.pp.
- 202.- JOUANNET P., CZYGLIK F., DAVID G., MAYAUX M.J., SPIRA A., COSCATO M.L. y SCHWARTZ D. (1.981) (b).- Study of a group of 484 fertile men. Part I: Distribution of semen characteristics. *Int. J. Androl.* **4**, 440-449.
- 203.- JUDD H.L., ROBINSON J.D., YOUNG P.E. y JONES O.W. (1.976).- Amniotic fluid testosterone levels in mid-pregnancy. *Obstet. Gynecol.* **48**, 690-692.
- 204.- KLEIN H.J. (1.985).- El espermograma. Temas Monográficos Boehringer Mannheim. 3, 21-25.
- 205.- KNIGHT T.W. (1.974) (a).- A qualitative study of factors affecting the contraction of the epididymis and ductus deferens of the ram. *J. Reprod. Fert.* **40**, 19-29.
- 206.- KNIGHT T.W. (1.974) (b).- The effect of oxytocin and adrenaline on the semen output of rams. *J. Reprod. Fert.* **39**, 329-336.

- 207.- KOEFOED-JOHNSEN H.H. (1.961).- Om epididymis funktion. I. Spermiernes passage-hastighed geunem epididymis. Annual Report. The Royal Veterinary and Agricultural College, Sterility Research Institute, Copenhagen.
208. KORMANO M. y NORDMARK L. (1.977).- Angiography of the testicular artery. Acta Radiol. Diagnosis. 6, 625-633.
- 209.- KORMANO M. y REIJONEN K. (1.976).- Microvascular structure of the human epididymis. Am. J. Anat. 145, 23-32.
- 210.- KRANE R.J., y SIROKY M.B. (1.981).- Neurophysiology of erection. Urol.Clin.N.Amer. 1,91-102.
- 211.- KRAUSE W. (1.978).- Prolaktinspiegel im serum bei patienten mit der serpamtose. Hautarzt, 29, 77-79.
- 212.- KREMER J. y JAGER S. (1.981).- Tests for the investigations of sperm-cervical mucus inter-action. In A. Spira, P. Jouannet: Les facteurs de la fertilité humaine. INSERM, Paris, pp 229-241.
- 213.- KVIST U. (1.980).- Sperm nuclear chromatin decondensation ability. An in vitro study on ejaculated human spermatozoa. Acta. Phisiol. Scand. 109, suppl. 486, 1-24.
- 214.- KVIST U. (1.983).- Chromatin descondensation

ability of the human spermatozoon. In J. Andre: The sperm cell. Martinus Nijhoff. La Hague. 227-230.pp.

- 215.- LACROIX M., SMITH F. y FRITZ I.B. (1.977).- Secretion of plasminogen activator by Sertoli cell-enriched cultures. Molec. Cell. Endocrinol. 9, 227-236.
- 216.- LANGLAIS J., ZOLLINGER M., PLANTE L., CHAPDELAINE E., BLEAU G. y ROBERTS K.D. (1.981).- Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support or a hypothesis for the mechanism of capacitation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (12), 7.266-7.270.
- 217.- LAUTH E. (1.830).- Mémoire sur le testicule humain. Mem. Soc. Hist. Nat. Vol. 1: 1-42. Strasbourg-Paris.
- 218.- LEBLOND C.P. y CLERMONT Y. (1.952) (a).- Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Ann. N. Y. Acad. Sci. 55, 548-573.
- 219.- LEBLOND C.P. y CLERMONT Y. (1.959) (b).- Spermatogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "periodid acid-fuchsin sulfurous acid" technique. Am. J. Anat. 90, 167-215.
- 220.- LEINONEN P., BOLTON N. y VIHKO R. (1.982).- Human testicular LH receptors: correlations

with circulating gonadotropins and testicular steroid secretion. Int. J. Androl. 5, 145-157.

221.- LEWIS U.J., SINGH R.N.P., SINHA Y.N. y LAAN W.P. VAN DER. (1.971).- Electrophoretic evidence of human prolactin. J. Clin. Endocrinol. Metab. 33, 153-157.

222.- LINDEMANN C.B. (1.978).- A cAMP-induced increase in the motility of demembranated bull sperm models. Cell., 13, 9-18.

223.- LINO B.F., BRADEN A.W.H., TURNBULL K.E. (1.967). Fate of unejaculated spermatozoa. Nature 213, 594-595.

224.- LOPATA A., PATULLO M.J., CHANG A. y JAMES B. (1.976).- A method for collecting motile spermatozoa from human semen. Fertil. Steril. 27, 677-683.

225.- LUE T.F., TAKAMURA T., SCHMIDT R.A. et als. (1.983).- Hemodynamics of erection in the monkey. J. Urol. 130, 1.237-1.241.

226.- LUNENFELD B. (1.984).- Infertilité masculine. In P. Mauvais-Jarvis, R. Struk-Ware et F. Labrie: Medicine de la Reproduction Masculine. Eds. G. Schaison, P. Bouchard, J. Mahoudeau et F. Labrie. Université de Montréal Presses. Flammarion Médecine-Sciences Paris. 385-403.

227.- LUNENFELD B., BEREZIN M., SACK J., THEODOR

R., BEER R. y WEISSENBERG R. (1.982) (a).- Gonadotropic therapy in men with gonadotropic insufficiency. Results, tolerance and follow-up of children fathered by these patients. Excerpta Medica. Amsterdam.

- 228.- LUNENFELD B., ESHKOL A. y GLEZERMAN M. (1.982) (b).- Male climacteric. In K. Branhauer, J. Frick: Handbook of urology, disturbances of male infertility. 16<sup>a</sup> edit. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 421-432.pp.
- 229.- LUNENFELD B. y GLEZERMAN M. (1.981).- Diagnose und therapie maennlicher fertilitaets-stoerungen. Grosse Verlag. Berlin.
- 230.- LUNQUIST F. (1.949).- Aspects of the biochemistry of human semen. Acta Phisiol. Sca. 19, 7-105.
- 231.- MAC LEOD J. y GOLD R.Z. (1.951) (a).- The male factor in fertility and infertility. II spermatozoon counts in 1.000 men of known fertility and in 1.000 cases of infertile marriage. J. Urol. 66, 436-449.
- 232.- MAC LEOD J. y GOLD R.Z. (1.951) (b).- The male factor in fertility and infertility III. An analysis of motile antivity in the spermatozoa of 1.000 fertile men and 1.000 men in infertile marriage. Fertil. Steril. 2, 187-204.

- 233.- MAHADEVAN M.M. y TROUNSON A.O. (1.984).- The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 42, 400-405.
- 234.- MAKLER A. (1.980).- The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil. Steril.* 33, 337-338.
- 235.- MAKLER A. (1.987).- A new chamber for rapid sperm count and motility estimation. *Fertil. Steril.* 30, 313.
- 236.- MAKLER A., MURILLO O., HUSZAR G., TARLATZIS B., DE CHARNEY A. y NAFTOLIN F. (1.984) (a).- Improved techniques for collecting motile spermatozoa from human semen I. A self-migratory method. *Int. J. Androl.* 7, 62-70.
- 237.- MAKLER A., MURILLO O., HUSZAR G., TARLATZIS B., DE CHARNEY A. y NAFTOLIN F. (1.984) (b).- Improved techniques for separating motile spermatozoa from human semen II. An atraumatic centrifugation method. *Int. J. Androl.* 7, 71-78.
- 238.- MARGALIOTH E.J., LANFER N., LEWIN A., NAVOT D., RABINOWITZ R., KISSELEVITZ R. y SCHENKER J.G. (1.985).- Correlation between the zona free hamster ova sperm penetration assay and oocyte cleavage in human in vitro fertilization. Proceedings, 4th World Conference on in vitro Fertilization. Melbourne. Australia.

239.- MANEELY R.B. (1.959).- Epididymal structure and function. A historical and critical review. Acta Zool. **40**, 1-21.

240.- MANN T. (1.974).- Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. J. Reprod. Fert. **37**, 179-188.

241.- MANN T. (1.975).- Biochemistry of semen. In D.W. Hamilton, R.O. Greep: Handbook of Physiology, section 7. Endocrinology Vol. V, Male reproductive system. American Physiological Society. Washington. 461-471 pp.

242.- MANN T. y LUTWAK-MANN C. (1.981).- Male reproductive function and semen. Springer Verlag. Berlin.

243.- MANTON I. y CLARKE B. (1.952).- An electro microscopid study of the spermatozoid of sphagnum. J. Exper. Bot. **3**, 265-289.

244.- MARTIN R.H., LIN C.C., BALKAN W. y BURNS K. (1.982).- Direct chromosomal analysis of human spermatozoa: preliminary results from 18 normal men. Am. J. Hum. Genet. **34**, 459-468.

245.- MARTI ANDRES A., LUNA DEL CASTILLO J.D., SANCHEZ CANTALEJO E. y BOLAÑOS CARMONA M.J. (1.986).- Bioestadística. Fotocopias Luz Granada.

- 246.- McCOMBER D. y SANDERS M.D. (1.929).- The spermatozoa count. N. Eng. J. Med. **200**, 981-986.
- 247.- MC CULLAGH D.R. (1.932).- Dual endocrine activity of testes. Science, **76**, 19-20.
- 248.- MEARES J.R.E.M. (1.979).- Influence of infections of the male accessory glands on secretory function sperm viability and fertility. In E. Spring Mills, ESE Hafez: Accessory glands of the male reproductive tract. Ann. Arbor. Science. 139-174. pp.
- 249.- MEISTRICH M.L., HUGHES T.J. y BRUCE W.R. (1.975).- Alteration of epididymal sperm transport and maturation in mice by oestrogen and testosterone. Nature **258**, 145-147.
- 250.- MEIZEL S., LUI C.W., WORKING P.K. y MRSNY R.J. (1.980).- Taurine and hypotaurine: Their effects on motility and the acrosome reaction of hamster sperm in vitro and their presence in sperm and reproductive tract fluids of several mammals. Develop. Growth and Differ. **22**, 483-494.
- 251.- MENARD R.H., LORIAUX D.L., BARTTER F.C. y GILLETTE J.R. (1.978).- The effect of administration of spironolactone on the concentration of plasma testosterone, estradiol and cortisone in male dogs. Steroids **31**, 771-776.
- 252.- MIEUSSEST R., BUJAN L., MONDINAT C., MANSAT A., PONTONNIER F. y GRANDJEAN H. (1.987).-

Association de scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile men.  
Fertil. Steril. **48** (6), 1.006-1.011.

253.- MILLER R.L. y BROKAW C. (1.970).- Chemotactic turning behaviour of tubularia spermatozoa.  
J. Exper. Biol. **52**, 699-706.

254.- MOENCH G.L. y HOLT H. (1.937).- Sperm morphology in relation to fertility. Amer. J. Obstet. Gynec. **22**, 199.

255.- MOHRI M. y OGAWA K. (1.975).- Tubulin and dynein in spermatozoon mobility in the functional anatomy of the spermatozoon. Ed. Björn. A. Pergamon Press.

256.- MOHRI H. y YANAGIMACHI R. (1.980).- Characteristics of motor apparatus in testicular, epididymal and ejaculated spermatozoa. Exper. Cell. Res. **127**, 191-196.

257.- MONESI V. (1.965).- Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse. Exp. Cell. Res. **39**, 197-224.

258.- MONTSERRAT ORRI V., MOROTE ROBLES J., PALOU REDORTA J. y SOLER ROSELLO D. (1.987).- Alteraciones del seminograma tras torsion testicular aguda unilateral. Comunicación preliminar. Actas Urol. Esp. Vol. XI (5), 373-476.

259.- MOON K.H. y BUNGE R.G. (1.971).- Seminal

fructose as an indicator of androgen activity: critical analysis. Invest. Urol. 8, 373-377.

260.- MORALES C. y CLERMONT Y. (1.982).- Evolution of Sertoli cell processes invading the cytoplasm of rat spermatids. Anat. Rec. 203, 233-244.

261.- MORGAN A.I., GUAY A.T y TULCHINSKY D. (1.986).- Normal penetration of hamster ova by human spermatozoa with dyskinetic motility. Fertil. Steril. 45, 735-736.

262.- MORISAWA M. y OKUNO M. (1.982).- Cyclic AMP induces maturation of trout sperm axoneme to initiale motility. Nature 295, 703-704.

263.- MORTIMER D., COURTOT A.M., GIOVANGRANDI Y. y JEULIN C. (1.983).- Do capacitatel human spermatozoa show an "activated" pattern of mogility. In J. Andre: The sperm cell. Martinus Nijhoff. La Hague. 349-352. pp.

264.- MORTIMER D., TEMPLETON A.A., LENTON E.A. y COLEMAN R.A. (1.983).- Annual patterns of human sperm production and semen quality. Arch. Androl. 10, 1-5.

265.- MORTON B.E., SAGADRACA R. y FRASER C. (1.978).- Sperm motility within the mammalian epididymis: species variation and correlation with free calcium levels in epididymal plasma. Fertil. Steril. 29, 695-698.

- 266.- MOSES M. (1.968).- The synaptonenal complex.  
Am. Rev. Genet. 2, 263-412.
- 267.- MRSNY R.J., MAXMAN L. y MEIZEL S. (1.979).-  
Taurine maintains and stimulates motility  
of hamster sperm during capacitation in vitro.  
J. Exper. Zool. 210, 123-128.
- 268.- MURATORI G. (1.953).- Ulteriori osservazione  
sui movimenti del canale dell'epididimo. Boll.  
Coc. Ital. Biol. Sper. 29, 1.026.
- 269.- NAIK U.K., JOSHI U.M y SHETH A.R. (1.980).-  
Long-term effects of vasectomy on prostatic  
function in men. J. Reprod. Fert. 58, 289-293.
- 270.- NARAYAN P., AMPLOTAZ K. y GONZALES R. (1.981).-  
Varicocele and male subfertility. Fertil.  
Steril. 36, 92-101.
- 271.- NELSON C.M.K. y BUNGE R.G. (1.974).- Semen  
analysis: evidence for changin parameters  
of male fertility potencial. Fertil. Steril.  
25, 503-507.
- 272.- NELSON L., YOUNG M.J. y GARDNER M.E. (1.980).-  
Sperm motility and calcium trasnport: a neuro-  
chemically controlled process. Life Sci.  
26, 1.739-1.749.
- 273.- NIEMI M. y KORMANO M. (1.965).- Cyclical  
changes in and significance of lipids and  
acid phosphstase activity in the seminiferous

tubules of the rat testis. Anat. Rec. 151, 159-164.

- 274.- NIESCHLAG E., LAMMERS U., FREISCHEM L.W., LANGER K. y WIXKINGS E.J. (1.982).- Reproductive function in young fathers and grand fathers. J. Clin. Endocrinol. Metab. 55, 676-681.
- 275.- OLSON G.E. y SAMMONS D.W. (1.980).- Structural chemistry of outer dense fibers of rat sperm. Biol. Reprod. 22, 319-332.
- 276.- ORGEBIN-CRIST M.C. (1.962).- Recherches expérimentales sur la durée de passage des spermatozoides dans l'épididyme du taureau. Annls. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 2, 51-108.
- 277.- ORGEBIN-CRIST M.C. (1.967) (a).- Sperm maturation in rabbit epididymis. Nature 216, 816-818.
- 278.- ORGEBIN-CRIST M.C. (1.967) (b).- Maturation des spermatozoides dans l'épididyme chez le lapin: pouvoir fécondant et mortalité embryonnaire chez des lapines, inséminées avec du sperme épididymaire. Annls Biol. Anim. Biochim. Biophys. 7, 373-389.
- 279.- ORGEBIN-CRIST M.C., DANZO B.J. y DAVIES J. (1.975).- Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. In R.O. Greep et D.W. Hamilton: Handbook of Physiology Endocrinology. Williams et Wilkins, Baltimore. 319-338.pp.

- 280.- ORGEBIN-CRIST M.C. y JAHAD N. (1.979).- The Maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture: stimulation by epididymal citoplasmic extracts. Biol. Reprod. 21, 511-515.
- 281.- ORGEBIN-CRIST M.C., JAHAD N. y HOFFMAN L.H. (1.976).- The effects of testosterone, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, 3- $\alpha$ -androstanediol, and 3- $\beta$ -androstenediol on the maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture. Cell. Tiss. Res. 167, 515-525.
- 282.- ORGENIN-CRIST M.C. y TICHENOR P. (1.973).- Effect of testosterone on sperm maturation in vitro. Nature, London. 245, 328-329.
- 283.- ORTAVANT R. (1.953).- Existence d'une phase critique dans la maturation epididymaire des spermatotöides de bélier et des de taureau. C. R. Soc. Biol. 147, 1.552-1.556.
- 284.- ORTAVANT R. (1.959).- Le cycle spermatogénétique chez le bélier. Ann. Zootech. 8, 183-322.
- 285.- OVERSTREET J.W. (1.981).- Evaluation of sperm function by tests of sperm ovum interaction in vitro. In A. Spira, P. Jouannet: Les facteurs de la fertilité humaine. INSERM, Paris. 263-280. pp.
- 286.- OVERSTREET J.W. y HEMBREE W.C. (1.976).- Penetration of the zona pellucida of non living human ovocytes by human spermatozoa

in vitro. Fertil. Steril. 27, 815-831.

- 287.- PALMA A., MENDOZA C., LOPEZ J.J. y CARRERAS A. (1.989).- HOS-test antes y después del "swim-up", en individuos normo-, oligo-, asteno-, y oligoastenozoospérmicos. IV Congreso Nacional de Andrología. Vol. 36 (4). Madrid. Endocrinología 154.
- 288.- PARVINEN M. (1.982).- Regulation of the seminiferous epithelium. Endocr. Rev. 3, 404-417.
- 289.- PARVINEN M. y VANHA-PERTTULA T. (1.972).- Identification and enzyme quantitation of the stages of the seminiferous epithelial wave in the rat. Anat. Rec. 174, 435-450.
- 290.- PAUFLER S.K. y FOOTE R.H. (1.969).- Aperm retention and resortion in sexually active rabbits. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131, 1.179-1.182.
- 291.- PAULOK A. (1.974).- Development of the penetration activity of mouse epididymal spermatozoa in vivo and in vitro. J. Reprod. Fert. 36, 203-205.
- 292.- PAYNE A.H., DOWNING J.R. y WONG K.L. (1.980).- Luteinising hormone receptors and testosterone synthesis in two distinct populations of Leydig cells. Endocrinology 106, 1.424-1.429.

- 293.- PAZ G.F., KPLAN R., YEDWA G., HOMONNAI Z.T. y KRAICER P.F. (1.978).- The effect of caffeine on rat epididymal spermatozoa, motility, metabolism and fertilizing capacity. *Intl. J. Androl.* 1, 145-152.
- 294.- PEDERSEN H. (1.969).- Ultrastructure of ejaculated human sperm. *Z. Zellforsch.* 94, 542-554.
- 295.- PELLINIEMI L.J., DYM M., CRIGLER J.F., RETIK A.B., y FAWCETT D.W. (1.980).- Development of Leyding cells in human fetuses and in patients with androgen insensitivity. In A. Steinberger, E. Steinberger: *Testicular development, structure and function*. Raven Press. New York. pp.49-54.
- 296.- PELLINIEMI L.J. y NIEMI M. (1.969).- Fine structure of the human foetal testis. *Z. Zellforsch.* 99, 507-522.
- 297.- PERLAULT S.D. y ROGERS B.J. (1.982).- Capacitation pattern of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 38, 258-260.
- 298.- PERRY G., GLEZERMAN M. e INSLER V. (1.977).- Selective filtration of abnormal spermatozoa by the cervical mucus in vitro. In: V. Insler, G. Bettendorf. Ed. *The interine cervix in reproduction*. Stuttgart Georg Thieme Publis Hers, pp 118-122.
299. PHADKE A.M. (1.964).- Fate of spermatozoa in cases of obstructive azoospermia and after ligation of vas deferens in man. *J. Reprod.*

Fert. 7, 1-12.

- 300.- PHILLIPS D.M. (1.972).- Comparative analysis of mammalian sperm motility. J. Cell. Biol. 53, 561-573.
- 301.- PHILLIPS D.M. (1.984).- Problems in the analysis of mammalian fertilization in: "ultrastructure of reproduction". J. Van Blerkom and P.M. Motta. Eds. Martinus Nijhoff Publishers, Boston. 166-175. pp.
- 302.- PRINS G.S. y ZANEVELD L.J.D. (1.979).- Distribution of spermatozoa in the rabbit vas deferens. Biol. Reprod. 21, 181-185.
- 303.- RAJFER S. y WAKSH P.C. (1.977).- Hormonal regulation of testicular descent. Presented at the 72nd annual meeting of the American Urological Association. Chicago.
- 304.- RAMBOURG A., CLERMONT Y. y HERMO L. (1.979).- Three-dimensional architecture of the Golgi apparatus in Sertoli cells of the rat. Am. J. Anat. 154, 455-476.
- 305.- REYES F.I., BORODITSKY R.S. lk WINTER J.S.D. y FAIMAN C. (1.974).- Studies on human sexual development II. Fetal and maternal serum gonadotropin and sex steroid concentrations. J. Clin. Endocrinol. Metab. 38, 612-617.

- 306.- REYES F.I., WINTER J.S.D. y FAIMAN C. (1.973).- Studies on human sexual development. I.Fetal gonadal and adrenal sex steroids. J. Clin. Endocrinol. Metab. 37, 74-78.
- 307.- RICHARDSON D.W. y SHORT R.V. (1.978).- Tiem of ousef of sperm production in boys. J. Biol. Soc. Sci. suppl. 5, 15-25.
- 308.- RIKMENSPOEL R., VANHERPEN G. y EISKYOUT P. (1.961).- Cinematographic observation of the movements of bull sperm cell. Phys. Med. Biol. 5, 167-181.
- 309.- RISLEY P.S. y TURBYFILL C. (1.957).- Studies in vivo of the contractile bahavior of the epididymis. Anat. Rec. 128, 607-608.
- 310.- RITZEN E.M., DOBBINS M.C., TINDALL D.J., FRENCH F.S. y NAYFEH S.N. (1.973).- Characterization of an androgen-binding protein (ABP) in rat testis and epididymis. Steroids. 21, 593-607.
- 311.- RITZAN E.M., NAYFEH S.N., FRENCH F.S. y DOBBINS M.C. (1.971).- Demonstration of androgen binding components in rat epididymis cytosol and comparison with binging components in prostate and other tissues. Endocrinology 89, 143-151.
- 312.- ROGERS B.J. (1.981).- Factors affecting mammalian in vitro fertilization. In: Bioregulators

of reproduction. Academic Press. 459-486.

- 313.- ROGERS J.B., BENTWOOD B.J., VAN CAMPEN H., HELMBRECHT G., SODERDAHL D. y HALE R.W. (1.983). Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity. *J. Androl.* **4**, 119-125.
- 314.- ROGERS B.J., PERREAULT S.D., BENTWOOD B.J., McCARVILLE C., HALE R.W. y SODERDAHL D.W. (1.983).- Variability in the human-hamster in vitro assay for fertility evaluation. *Fertil. Steril.* **39**, 204-211.
- 315.- ROSE N.R., HJORT T., RUMKE P., HARPER M.J.K. y VYAZOV O. (1.976).- Techniques for the detection of iso- and auto-antibodies to human spermatozoa. *Cli. Exper. Immuno.* **23**, 175-179.
- 316.- ROSE L.I., UNDERWOOD R.H., NEWMARD S.R., KIRCH E.S. y WILLIAMS G.H. (1.977).- Pathophysiology of spironolactoneinduced gynecomastia. *Ann. Int. Med.* **87**, 398-403.
- 317.- ROWLEY M.J., TESHIMA F. y HELLER C.G. (1.970).- Duration of transif of spermatozoa through the human male ductula system. *Fertil. Steril.* **21**, 390-395.
- 318.- RUDAK E., JACOBS P.A. y YANAGINACHI R. (1.978).- Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* **274**, 911-913.

319.- RUSSELL L.D. (1.977).- Desmosme-like junctions between Sertoli cells and germ cells in the rat testis. Am. J. Anat. **148**, 301-312.

320.- SAINT POL P., HAUW Y. y HERMAND E. (1.981).- Etude statistique des paramètres du sperme. Résultats comparatifs de la variabilité intra-individuelle. In A. Spira, P. Jouannet: Les facteurs de la fertilité humaine. INSERM. Paris. **103**, 64-72.

321.- SALE W.S. y GIBBONS I.R. (1.979).- Study of the dynein cross-bridge cycle in sea urchin sperm flagella. J. Cell. Biol. **82**, 291-298.

322.- SATIR P. (1.961).- Scientific American. 45.

323.- SATIR P. (1.968).- Studies on cilia. III. Further studies en the cilium tip and a "sliding filament" model of ciliary motility. J. Cell. Biol. **39**, 77-94.

324.- SCHIRREN C., LAUDAHN G., HEINZE I., HARTMAN E. y RICHTER E. (1.979).- Correlation studies of morphological and biochemical parameters in human ejaculate in various andrological disorders. Andrologia **11**, 397-401.

325.- SCHMIDT J.A. y ECKERT R. ( 976).- Calcium couples flagellar reversal to photostimulation in chlamydomonas reinhardtii. Nature **262**, 713-715.

- 326.- SCHRADER S.M., PLATEK S.F., ZANEVELD L.J.D.  
PEREZ-PELAEZ M. y JEYENDRAN R.S. (1.986).-  
Sperm viability: A comparason of analvtical  
methods. *Andrologia* 18, 530-538.
- 327.- SCHWARTZ D., LAPLANCHE A., JOUANNET P. y  
DAVID G. (1.979).- Wityin subject variability  
of human semen in regard to sperm count,  
vlume, total number of spermatozoa and leugh  
of abstinence. *J. Reprod. Fert.* 57, 391-395.
- 328.- SHERINS R.J. y HOWARDS S.S. (1.978).- Male  
infertility. In Haruell, Harrison, Eds. Camp-  
bell's Urology. 715-776.
- 329.- SCHWARTZ D., MAYAUX M.J., SPIRA A., MOSCATO  
M.L., JOUANNET P., CZYGLIK F. y DAVID G.  
(1.983).- Semen characteristics as a funcion  
of age in 833 fertile men. *Fertil. Steril.*  
39, 530-535.
- 330.- SEETHLAKSHMI L. y STEINBERGER A. (1.983).-  
Effect of cryptorchidism and orchidopexy  
on inhibin secretion by rat Sertoli cells.  
*J. Androl.* 4, 131-135.
- 331.- SEGAL S., POLISHUK W." y BEI-DAVID M. (1.976).-  
Hyperprolactinemic male infertility. *Fertil.*  
*Steril.* 27, 1.425-1.431.
- 332.- SERRES C., ESCLIER D. y DAVID G. (1.983).-  
Influence of the human sperm flagellum with  
stereological a lysis of the leughts of

the dense fibres. Biol. Cel. **49**, 153-162.

333.- SETCHELL B.P., DAVIES R.V. y MAIN S.J. (1.977).- Inhibin. In A.D. Johnson et W.R. Gomez: The testis, Vol. IV. Academic Press, New York, San Francisco, London. 189-238.pp.

334.- SHINGYOJI C., MURAKAMI A. y TAKAHASHI K. (1.977).- Local reaction f tritonextr cted flagella by iontophoretic application of ATP. Nature, **265**, 269-270.

335.- SIITERI P.K. y WILSON J.D. (1.974).- Testosterone formacion and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. J. Clin. Endocrinol. Metab. **38**, 113-125.

336.- SINOWATZ F., WROBEL K.H., SINOWATZ S. y KUGLER P. (1.979).- Ultrastructural evidence por pi gocytosis of spermatozoa in the bovine rete testis and testicular straight tubes. J. Reprod. Fert. . 1-4.

37.- SKINNER J.D. y ROWSON L.E.A. (1.968).- Effects of testosterone injected unilaterally down the vas deferens an the accessory glands of the ram. J. Endocrinol. **42**, 355-356.

338.- SKINNER M.K. y GRISWOLD M.D. (1.980).- Sertoli cells synthesize and secrete a insferrin-like protein. J. Biol. Chem. **255**, 9.523-9.525.

339.- SMITH K.D., RODRIGUEA-RIGAU L.J. y STEINBERGER

E. (1.977).- Relation between indices of semen analysis and pregnancy rate in infertile couples. Fertil. Steril. 28, 1.314-1.319.

340.- SOUFIR J.C. (1.984).- Le testicule exocrine: exploration biochimique du sperme humain. In: P. Mauvais-Jarvis, R. Ststruk-Ware y F. Labrie: Medicine de la Reproduction Masculine. Eds. G.Schaison, P.Bouchard, J.Mahoudeau et F. Labrie. Univ. de Montreal Press. Flammarion Médecina-Sciences Paris. 69-83. pp.

341.- SOUFIR J.C., JOUANNET P., MARSON J. y SOUMAH A. (1.983).- Reversible inhibition of sperm production and gonadotrophin secretion in men following combine oral medroxyprogesterone acetate and percutaneous testoterone treatment. Acta Endocrinol. 102, 625-632.

342.- SOUFIR J.C., MARSON J. y JOUANNET P. (1.981).- Free L-carnitine in human seminal plasma. Int. J. Androl. 4, 388-397.

343.- SOUPART P. y STRONG P.A. (1.974).- Ultrastructural observations on human cocytes fertilized in vitro. Fertil. Steri. 25, 11-44.

344.- STEINBERGER A. y STEINBERGER E. (1.976).- Secretion of an FSH-inhibiting factor by cultured Sertoli cells. Endocrinol. 99, 918-921.

345.- STEINBERGER E. v STEINBERGER A. (1.975).- Spermatogenic function of the testis. In

DW Hamilton et RO Greep: Handbook of Physiology,  
Endocrinology V. American Physiological Society  
Washington. 1-19. pp.

- 346.- STEPHENS R.E. (1.970).- Isolation of nexin,  
the linkage protein responsible for the maintenance  
of the 9-fold configuration of flagellar  
axoemes. Biol. Bull. 139, 438.
- 347.- STEPHENS D.T., ACOTT T.S. y HOSKINS D.D.  
(1.981).- A cautionary note on the determination  
of forward motility protein activity with  
bovine epididymal spermatozoa. Biol. Reprod.  
25, 945-949.
- 348.- SUMMERS K.E. y GIBBONS I.R. (1.973).- Effects  
of trypsin digestion on flagellar structures  
and their relations ship to motility. J.  
Cell. Biol. 58, 618-629.
- 349.- SUZUKI F. y NAGANO T. (1.980).- Epididymal  
maturation of rat spermatozoa studied by  
thin sectining and freeze-fracture. Biol.  
Reprod. 22, 1.219-1.231.
- 350.- SUZUKI N., NOMURA K., OHTAKE H. e ISAKA S.  
(1.981).- Purification and the primary structure  
of sperm activating peptides from the gelly  
co at of sea urchin eggs. Biochem. Biophys.  
Res. Commun. 99.
- 351.- SWIERSTRA E.E. (1.968).- A comparison of sperma-  
tozoa production and spermatozoa output of

yorkshire and lacombe boars. J. Reprod. Fert. 17, 459-469.

352.- TABOR H. y TABOR C.W. (1.964).- Spermidine, spermine and related amines. Pharmacological Review 16, 245-300.

353.- TAKAGI S., YOSHIDA T., TSUBATA K., OZAKI H., FUJII T.K., NOMURA Y. y SAWADA M. (1.977).- Sex differences in fetal gonadotropins and androgens. J. Steroid. Biochem. 8, 609-620.

354.- TALBOT P. y CHACON R.S. (1.981).- A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. J. Exp. Zool. 215, 201-208.

355.- TALO A., JAAKKOLA U.M. y MARKKULA-VIITANEN M. (1.979).- Spontaneous electrical activity of the rat epididymis in vitro. J. Reprod. Fert. 57, 423-429.

356.- TANG X.M., LALLI M.F. y CLERMONT Y. (1.982).- Cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermatogenesis in the rat. Am. J. Anat. 163, 283-294.

357.- TAPANAINEN J., KELLOKUMPU-LEHTINEN P., PELLINIEMI L. y HUHTANIEMI I. (1.981).- Age-related changes in endogenous steroids of human fetal testis during early and midpregnancy. J. Clin. Endocrinol. Metab. 52, 98-102.

- 358.- TASH J.S. y MEANS A.R. (1.982).- Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm cyclic adenosine monophosphate and calcium. Biol. Reprod. **26**, 745-763.
- 359.- TEMPLETON A.A. y MORTIMER D. (1.982).- The development of a clinical of sperm migration to the site of fertilization. Fertil. Steril. **37**, 410-415.
- 360.- TERQUEM A. y DADOUNE J.P. (1.983).- Aniline blue staining of human spermatozoon chromatin. Evaluation of nuclear maturation. In J. Andre: The sperm cell. Martinus Nijhoff, La Hague. pp 249-252.
- 361.- TESH J.M. y GLOVER T.D. (1.969).- Ageing of rabbit spermatozoa in the male tract and its effect on fertility. J. Reprod. Fert. **20**, 287-297.
- 362.- TESTART J., BELISCH-ALLART J., MAZOUT A., GUILLET-RONO F. y FRYDMAN R. (1.985).- Actual methods and results in an IVF and ET program. In R. Rolland, E.V. Van Hall, S.G. Hillier, K. P. McNatty, y J. Schoemaker (ed.) Gamete quality and Fertility Regulation. Elsevier, Amsterdam. pp 271-280.
- 363.- TJOA W.S., SMOLENSKY M.H., HSI B.P., STEINBERGER E. y SMITH K.D. (1.982).- Circannual rhythm in human sperm count revealed by serially independent sampling. Fertil. Steril. **38**, 454-459.

- 364.- TROUNSON A. y WOOD C. (1.984).- In vitro fertilization results, 1.979-1.982, at Monash University. *J. Vitro Fertil Embryo Transf* 1, 4.247.
- 365.- TUDORIN T. y BOURMER H. (1.983).- The hemodynamics of erection at the level of the penis and its local deterioration. *J. Urol.* 129, 741-745.
- 366.- TULLOCH S. (1.952).- Considerations of sterility in the male. *Edinburgh Med. J.* 59, 29-35.
- 367.- TURNER T.T. (1.979).- On the epididymis and its function. *Investigative Urology* 16, 311-321.
- 368.- URY R.L. (1.977).- Stress and infertility. In A.T.K. Cockett, R.L. Urri: *Male infertility* Grune et Stratton, New York, San Francisco, Londres, pp 145-151.
- 369.- USSELMAN M.C., ROSSIGNOL D.P., LENNARZ W.J. y CONE R.A. (1.982).- Rat cauda epididymal fluid is a mucus. *Biol. Reprod. Suppl.* 1, 28, 134.
- 370.- VAN DER VEN H.H., JEYENDRAN R.S., AL-HASANI S., PEREZ-PELAEZ M., DIEDRICH K. y ZANEVELD L.J.D. (1.986).- Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (Hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilization. *J. Androl.* 7, 190-196.

- 371.- VAN LEEUWENHOEK A. (1.677).- Observationes de natis e semine genitali animalculis. Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol) 12, 1.040-1.042.
- 372.- VAN WELKENHUYZEN P. (1.966).- La motilite du canal déferent. Acta Urol. Belg. 34, 385-466.
- 373.- VERNON R.G., KOPEC B. y FRITZ I.B. (1.973).- Studies on the distributions of the high affinity testosterone binding protein in rat testis seminiferous tubules. J. Endocrinol. 57, 11 (abstr.).
- 374.- VERNON R.G., KOPEC B. y FRITZ I.B. (1.974).- Observations on the binding of androgens by rat testis seminiferous tubules and testis extracts. Mole. Cell. Endocrinol. 1, 167-187.
- 375.- VIJAYAKUMAN R., SALEH W. y FAKIH H. (1.988).- Physical and functional characteristics of swim-up spermatozoa from Normozoospermic and Oligozoospermic men. In The American Fertility Society. Annual Meeting. 5 (abstr.).
- 376.- VIJAYAKUMAR R., NDUBISI B., PRIEN S., DE LEÓN F. y HEINE W. (1.987).- Scanning Electron Microscopic evaluation of human spermatozoa subjected to sperm wash and swim-up. Andrologia 19 (5), 551-553.
- 377.- VIRIYAPANICH P. y BEDFORD J.M. (1.981).- The fertilization performance in vivo of rabbit spermatozoa capacitated in vitro.

J. Exp. Zool. 216, 169-174.

- 378.- VOGLEMAYR J.K. (1.974).- Alpha-cholorhydrin-induced changes in the distribution of free myo-inositol and prostaglandin F<sub>2</sub> and synthesis of phosphatidyl-inositol in the rat epididymis. Biology of Reproduction 2, 593-600.
- 379.- WAITES G.M.H. (1.977).- Fluid secretion. In A.D. Johnson et W.R. Gomes: The testis, Vol IV. Academic Press. New York, San Francisco, London, pp 91-124.
- 380.- WAKELING A.E. y VISEK W.J. (1.973).- Insecticide inhibition of 5-dihydrotestosterone binding in the rat ventral prostate. Science 181, 659-665.
- 381.- WALT H. y HEDINGER O.C. (1.983).- Motile components in spermatids as related to transport spermatids. Andrologia 15, 34-39.
- 382.- WARNER F.D. y MITCHELL D.R. (1.978).- Structural conformation of ciliary dynein arms and the generation of sliding forces in tetrahymena cilia. J. Cell. Biol. 76, 261-277.
- 383.- WARNE F.D. y SATIK P. (1.974).- The structural basis of ciliary bend formation. J. Cell. Biol. 63, 35-63.
- 384.- WARNE G.L., FAIMAN C., REYES F.I. y WINTER J.S.D. (1.977).- Studies on human sexual

development. V. Concentrations of testosterone, 17-hydroxypregesterone and progesterone in human amniotic fluid throughout gestation. J. Clin. Endocrinol. Metab. 44, 934-938.

385.- WAGNER G. (1.984).- Vascular mechanisms involved in human erection. Inter. Angiology, Vol. 3, 3, 221-228.

386.- WESPES E. (1.987) (a).- Penile deep drosal veins cushions anf erection. Bristsh J. Uro. 60, 2, 174-178.

387.- WESPES E. (1.987) (b).- Impuissance orgánique masculine. Rapport présenté an 52º Congrés de la S. Belge d'urologie. Acta Urología Bélgica, vol. 55, 2, 143-330.

388.- WESPEW E. y SCHULMAN C.C. (1.986).- Role hemodynamique de l'albuginee dans l'erection, en VI cursos de Andrología para Postgraduados. pp 199-206. Barcelona.

389.- W.H.O. SPECIAL PROGRAMME OF RESEARCH, DEVELOPMENT AND RESEARCH TRAINING IN HUMAN REPRODUCTION (1.980).- Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Press concern, Singapore. 1<sup>a</sup> ed.

390.- W.H.O. SPECIAL PROGRAMME OF RESEARCH, DEVELOPMENT AND RESEARCH TRAINING IN HUMAN REPRODUCTION (1.987).- Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge Univ. 2<sup>a</sup> ed.

- 391.- WILLIAMSON R.A., KOEHLER J.K., SMITH W.D.  
y KARP L.E. (1.984).- Entry of immotile spermatozoa into zona-free hamster ova. Gamete.  
Res. 10, 319-325.
- 392.- WOLF D.P. (1.985).- Semen assessment in IVF.  
Proceedings, 4th World Conference en In vitro fertiñozation. Melbourne. Australia.
- 393.- WONG P.C., BALMACEDA J.P., BLANCO J.D..  
GIBBS R.S. y ASCH R. (1.986). Sperm washing  
and "swim-up" technique using antibiotics  
removes microbes from human semen. Fertil.  
Steril. 45, (1), 97-100.
- 394.- WRIGHT W.W., MUSTO N.A., MATHER J.R. y BARDIN  
C.W. (1.981).- Sertoli cells secrete both  
testis-specific and serum proteins. Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA. 78, 7.565-7.569.
- 399.- WRIGHT W.W., PARVINEN M., MUSTO N.A., GUNSAULUS  
G.L., PHILLIPS D.M., MATHER J.P. y BARDIN  
C.W. (1.983).- Identification of stage-specific  
proteins synthesized by rat seminiferous  
tubules.. Biol. Reprod. 28, 257-265.
- 400.- WYKER R. y HOWARDS S.S. (1.977).- Micropuncture  
studies of the motility of rete testis and  
epididymal spermatozoa. Fertil. Steril. 28,  
108-112.
- 401.- YANAGIMACHI R., YANAGIMACHI H. y ROGERS B.J.  
(1.976).- The use of zona free animal ora

as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa.  
Biol. Reprod. **15**, 471-476.

402.- YATES C.A., TROUNSON A. y DE KRETSEN D.M. (1.985).- Fertilization rates of male infertility patients in IVF. Proceedings, 4th World Conference on in vitro fertilization. Melbourne. Australia.

403.- ZANEVESD L.J.D. y POLAKOSKI K.L. (1.977).- Collection and physical examination of the ejaculate. In Hafez ESE, ed Techniques of human andrology. Elsevier, North-Holland. Biomedical Press. pp 147-171.

404.- ZAMBONI L., ZEMJANIS R. y STEFANINI M. (1.971).- The fine structure of monkey and human spermatozoa. Anat. Rev. **169**, 129-154.

405.- ZAVOS P.M. (1.985).- Seminal parameters of ejaculates collected from oligospermic and normospermic patients via masturbation and at intercourse with the use of silastic seminal fluid collection device. Fertil. Steril. **44**, 517-520.

406.- ZUKERMAN Z., RODRIGUEZ-RIGAU J., SMITH K.D. y STEINBERGER E. (1.977).- Frequency distribution of sperm counts in fertile and infertile males. Fertil. Steril. **28**, 1.310-1.313