
PREMIO GINECOLOGÍA PROF. DR. ARMANDO MENDIZABAL ACCESIT

DISTRIBUCIÓN NORMAL Y PATOLÓGICA DE LA TECA PERINUCLEAR DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS EN HUMANOS

Constanza Branzini¹, Alejandro Español¹, Hernán Elena, Héctor Chemes², Vanesa Rawe¹.

¹-CEGyR; ²-CEDIE, Buenos Aires

RESÚMEN Y PALABRAS CLAVES

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la distribución de la Teca Perinuclear (TP) y acrosoma (A) en células germinales y espermatozoides de hombres normales y con globozoospermia, para lo cual realizamos ensayos de Inmunocitoquímica y Microscopía Electrónica a fin de determinar la distribución de dichas estructuras.

Observamos que los espermatozoides de eyaculado de hombres normales presentan la distribución esperada de la TP y A, mientras que aquéllos con globozoospermia mostraron ausencia o falta de asociación de TP y A con el núcleo, perdiéndose estas estructuras con el cuerpo residual.

En base a estos resultados podemos concluir que la ausencia de TP y A en pacientes con globozoospermia es probablemente debida a la falta de asociación de estas estructuras con el núcleo (de la espermátide), y a su pérdida con el cuerpo residual al final de la espermiogénesis. Estos resultados sugieren que las proteínas de la TP funcionarían como anclaje entre el acrosoma y el núcleo.

Espermatogénesis, globozoospermia, espermatozoides, infertilidad, acrosoma, teca perinuclear, activación oocitaria, ICSI

INTRODUCCIÓN

La biogénesis normal del acrosoma (A) en mamíferos ocurre durante la espermiogénesis, y está dada por el producto de proteínas y enzimas derivadas del Aparato de Golgi. En las espermátides tempranas la vesícula acrosomal está asociada al Aparato de Golgi, y se aproxima a la porción apical del núcleo anclándose en la envoltura nuclear. Mientras se condensa la cromatina, el núcleo se elonga, quedando el A del espermatozoide maduro cubriendo los 2/3 anteriores de la superficie nuclear (Ramalho-Santos y col., 2001; Chemes y Rawe, 2003; Rawe y col., 2004). En pacientes con globozoospermia, la pérdida del A está asociado con anomalías en la Teca Perinuclear (TP), cubierta de citoesqueleto del núcleo espermático que consiste en tres regiones morfológicamente diferentes: la capa subacrosomal (SAR), intercalada entre la membrana interna acrosomal y la envoltura nuclear; la TP del segmento ecuatorial, entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa; y por último la vaina postacrosomal (PAS) localizada entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear, extendiéndose distalmente desde el segmento ecuatorial (Sutovsky y col., 2003). La TP mayormente contribuye al modelado

y arquitectura de la cabeza del espermatozoide durante la espermiogénesis (Oko y Cleremont, 1998) y provee una estructura protectora rígida para el núcleo espermático durante la maduración del espermatozoide y la fecundación. Se cree que la TP tiene asociadas moléculas de señalización, que durante el proceso de fecundación son importantes para disparar la activación oocitaria y el consecuente desarrollo embrionario temprano (Sutovsky y col., 2003).

La globozoospermia es una patología sistémica, es decir, muestra un patrón muy homogéneo de defectos presentes en la mayoría de los espermatozoides (Chemes 2000). Los pacientes con globozoospermia exhiben anormalidades en la membrana nuclear y desórdenes de condensación de la cromatina. Esta patología está caracterizada por la completa ausencia del A, que en ciertas ocasiones se acompaña de anormalidades estructurales en la pieza media y defectos en la compactación de la cromatina. Existen dos tipos de globozoospermia descritos por Singh (1992): el tipo I, está caracterizado por la pérdida completa del A y sus enzimas, siendo estos espermatozoides incapaces de penetrar la zona pelúcida (ZP) dando lugar a una infertilidad primaria; el tipo II presenta una pequeña vesícula acrosomal que cubre a un núcleo cónico rodeado por gotas citoplasmáticas (Vicari y col., 2002).

Aunque el espermatozoide con cabeza redonda (Tipo I) no puede penetrar la zona pelúcida del oocito (Weissenberg y col., 1983; Von Bernhardt y col., 1990), se han reportado algunos casos de embarazo luego de un ICSI con espermatozoides de estas características (Trokoudes y col., 1995; Rybouchkin y col., 1997; Stone y col., 2000). Sin embargo, la tasa de fecundación es pobre (Battaglia y col., 1997; Edirisinghe y col., 1998) siendo atribuida a la falta de capacidad del espermatozoide de activar al oocito. Escalier (1990) trabajando con espermatozoides humanos de cabeza redonda con ausencia de A demostró, mediante ensayos de inmunocitoquímica (ICQ), la ausencia de TP y calicin en los mismos.

En este trabajo estudiamos la distribución de la TP y A en espermatozoides de eyaculado de hombres fértiles (normales) y pacientes con patología acrosomal (globozoospermia parcial). El estudio se completa con la observación de células germinales testiculares provenientes de pacientes con azoospermia obstructiva (con espermatogénesis completa) y un paciente globozoospermico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de células de la espermatogénesis testicular

Las muestras testiculares se disgregaron con pinzas de disección en H-HTF (Human Tubal

Fluid con Hepes) suplementado con 0,5 mg/ml de colagenasa tipo IA. Luego de 45 min. a 37°C se logró el aislamiento de los túbulos seminíferos individuales.

A continuación se dejó decantar los túbulos seminíferos, se retiró el sobrenadante y se agregó una solución de H-HTF suplementado con 1mg/ml de DNasa II y 0,25 mg/ml de tripsina. Se incubó durante 45 min a 37 °C para lograr el aislamiento de las células germinales desde el interior de los túbulos seminíferos. Posteriormente se agregó inhibidor de tripsina tipo I-S (0,25 mg/ml), se centrifugó la muestra a 500G durante 10 min. y se resuspendió en H-HTF.

Obtención de espermatozoides de eyaculado

La muestra de semen se obtuvo por masturbación, con una abstinencia sexual de 2 a 5 días, y obtenida como máximo una hora antes de su entrega en el laboratorio en un recipiente estéril. Se tomó la muestra de semen y se realizó un lavado de la muestra agregando igual volumen de PBS. A continuación, la muestra se centrifugó a 500 G durante 5 min. y el precipitado fue resuspendido en PBS, de manera tal que se obtuvo una concentración de 20×10^6 de espermatozoides por mililitro.

Inmunocitoquímica

Las células de la espermatogénesis y espermatozoides maduros se depositaron en cubreobjetos cubiertos con poli-lisina (2mg/ml), y se dejaron reposar a temperatura ambiente logrando la adhesión del material al cubreobjeto. Para la fijación de la muestra, se tomó el cubreobjeto cubierto con las células de la espermatogénesis y se lo colocó a temperatura ambiente durante 40 min, dentro de un pozo de una placa de 6 pozos que contenía PBS + 2% de formalina. Para la permeabilización, se retiró el medio y se agregó PBS + 1% de Tritón X-100 por 40 min. Posteriormente, se retiró el medio y se agregó solución de bloqueo [PBS + 0,3% de albúmina bovina (BSA) + 1% de suero fetal bovino + 0,05% de gentamicina] durante una hora a 37°C o, alternativamente, se los puede incubar a 4°C hasta el día siguiente, momento en el que se inicia el procesamiento por ICQ (ver luego).

Para comenzar la incubación con los anticuerpos de interés, se colocó el cubreobjetos (con las células adheridas, fijadas y permeabilizadas) en una cámara húmeda y se agregó 200ml del anticuerpo primario en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron lavados con PBS + 0,1% de Tritón X-100 y se agregó el anticuerpo secundario correspondiente (AlexaFluor 488 o 568) resuspendido en solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Para la

visualización del ADN se realizaron 4 lavados con PBS + 0,1% de Tritón X-100 y se incubó el preparado durante 25 min. con Hoechst 33342 a 37°C. Los cubreobjetos con la muestra ya lista a ser visualizada, fueron montados en portaobjetos de vidrio con medio Vectashield para retardar el fotoenvejecimiento. Los espermatozoides y las células germinales testiculares fueron visualizados con microscopio de epifluorescencia.

Como controles, se realizaron preincubaciones de los anticuerpos primarios por una hora con sus correspondientes antígenos o se incubaron los anticuerpos secundarios en ausencia de los primarios.

Los estudios de inmunocitoquímica se realizaron por inmunofluorescencia, con el uso de los siguientes anticuerpos primarios usados a diferentes diluciones determinadas experimentalmente:

- **TP427** (anti- teca perinuclear) anticuerpo policlonal de conejo (Dr. Richard Oko)
- **Alfa tubulinas acetiladas** anticuerpo monoclonal de ratón (Sigma T-6793)
- **Alfa y Beta tubulinas** anticuerpo policlonal de oveja (Cytoskeleton # ATN 02)
- **Acrosina** anticuerpo monoclonal de ratón (Biosonda AMC-ACRO-C5F10-AS, Chile).

Las imágenes obtenidas fueron procesadas con Adobe Photoshop 7.0.

Microscopía electrónica

Las muestras de semen fueron procesadas luego de su licuefacción, aproximadamente 30 minutos luego de la eyaculación. El semen fue diluido 1:3 en buffer fosfato 0.1 M, pH 7,4 y centrifugado a 1500 RPM por 10 minutos. Luego de la centrifugación se decantó el sobrenadante y el pellet formado, que contiene los espermatozoides, fue fijado en glutaraldehído al 3 % en el mismo buffer fosfato, a 4 °C, por 3 horas. A continuación, luego de dos lavados en buffer los pellets de espermatozoides fueron postfijados en tetraóxido de osmio al 1,3%, a 4°C por 3 horas, luego de las cuales se realizaron dos lavados con buffer. Posteriormente las muestras fueron deshidratadas en una serie de alcohol etílico creciente hasta el grado anhidro, seguidos por óxido de propileno e inclusión en Epon Araldita. Los bloques fueron cortados en un ultramicrotomo RMC automático, con navaja de diamante en secciones de 70-90 nm, teñidos con citrato de plomo y nitrato de uranilo, y observados y fotografiados en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 109. Las fotos fueron escaneadas y procesadas con Adobe Photoshop 7.0.

RESULTADOS

La globozoospermia se caracteriza por la presencia de espermatozoides de cabeza redonda, con pérdida de A y enzimas acrosomales (Singh, 1992). La Figura 1 muestra diferentes células testiculares aisladas de pacientes con espermatogénesis completa (azoospermia obstructiva) analizadas mediante el empleo de los anticuerpos específicos anti alfa y beta tubulinas (marcación de microtúbulos de la manchete y flagelo), y anti acrosina para evidenciar la presencia del A. Durante la espermiogénesis temprana, los gránulos proacrosómicos se desarrollan dentro de las vesículas del Aparato de Golgi que se aproximan al núcleo para formar el gránulo acrosómico (Figura 1A). Posteriormente, el gránulo acrosómico se extiende sobre el núcleo formando el capuchón acrosomal (Figura 1B-D). Durante el principio de la elongación de las espermátides, el Aparato de Golgi que hasta ese momento estaba asociado al A, comienza a migrar hacia el polo opuesto de la célula de manera caudal. En el estadio de espermátides elongadas, el A está completamente formado (Figura 1E-F) y los microtúbulos ya están organizados en el polo opuesto al A formando la manchete. En la Figura 1G puede observarse un espermatozoide maduro con su A ya formado en la región apical de la cabeza.

La Figura 2 muestra diferentes células testiculares aisladas de un paciente diagnosticado con globozoospermia, analizadas por inmunocitoquímica mediante el uso de los anticuerpos anteriormente mencionados (Ver Materiales y Métodos; TP427, anti alfa/beta tubulinas y anti acrosina). Las imágenes obtenidas al microscopio de epifluorescencia se superpusieron con las mismas imágenes tomadas con microscopía de contraste de fase para el análisis de la morfología celular. Se observa la presencia de TP y acrosina en células germinales durante los primeros estadios de la espermatogénesis. En la Figura 2A se observa el núcleo de la espermátide redonda interaccionando con la vesícula acrosomal. La señal de acrosina en este caso tiene menor tamaño en comparación con los hombres fértiles (hipoplasia acrosomal, comparar con Figura 1E-G). En la Figura 2B puede observarse que el A no está asociado al núcleo de la espermátide.

También se puede apreciar una espermátide elongada que no perdió su A, y proteínas de la TP asociadas a la manchete (Figura 2C). En el estadio de espermátides elongadas, se observa a las proteínas de la TP migrando junto con la manchete durante la formación del cuerpo residual (Figuras 2 C-E). En la Figura 2F, se observa la estructura de un A totalmente disociado de la

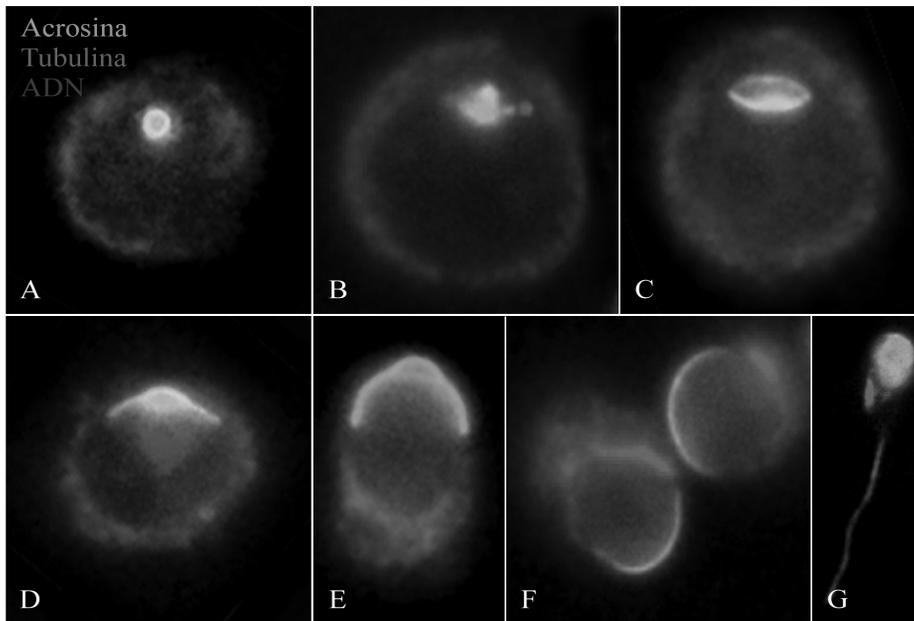


Figura 1. Panel de ICQ de biopsia de hombres normales. Localización de Acrosina (verde) durante los diferentes estadios de la espermatogénesis en humanos. (A) Gránulo acrosomal en espermátide temprana (Fase Golgi). (B) Espermátide redonda temprana, se observan gránulos acrosomales dentro de las vesículas del Aparato de Golgi. (C) Se muestra la señal de acrosina cercana al núcleo (ADN en azul). (D) Espermátide tardía (Fase capuchón). (E) Durante la espermatogénesis se puede observar la vesícula acrosomal formando un capuchón sobre el núcleo, el acrosoma extendiéndose por la región apical de la célula, momento que coincide con la elongación de la espermátide (Fase acrosomal). (F) Espermátides elongada con avanzado grado de condensación de cromatina y (G) Espermatozoide maduro con el acrosoma totalmente desarrollado. (Aumento 100X)

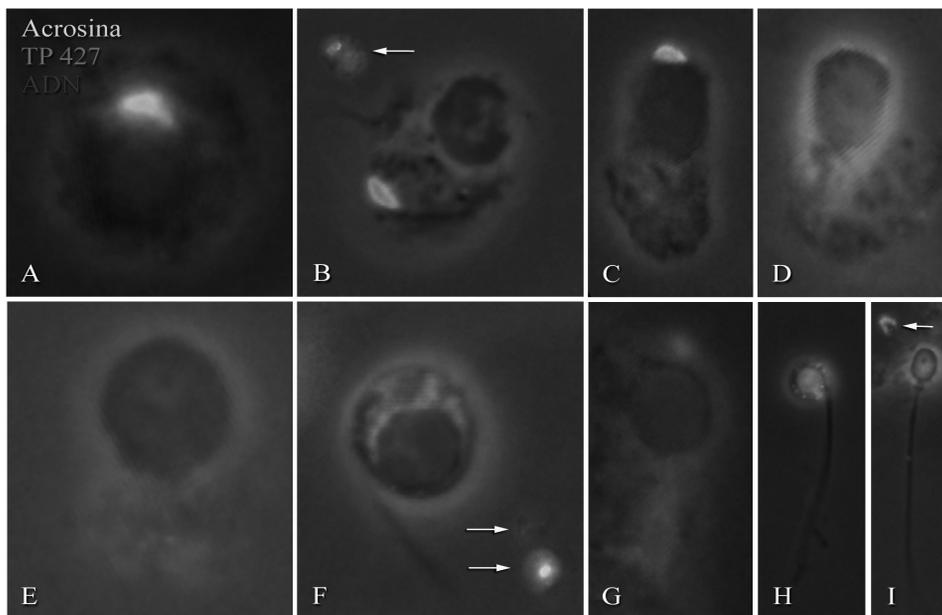


Figura 2. Panel de ICQ de biopsia del paciente con globozoospermia. Localización de TP (TP427 rojo), y acrosina (verde). Las imágenes del microscopio de epifluorescencia se superpusieron con las imágenes de contraste de fase para el análisis de la morfología celular. En la Figura 2A se observa el núcleo de la espermátide redonda asociado al acrosoma. En la Figura 2B, se puede observar al acrosoma (A, verde) disociado del núcleo de la espermátide y restos de TP (rojo, flecha), mientras que en la Figura 2C observamos una espermátide elongada con un acrosoma hipoplásico. En este caso, se observan proteínas de la TP migrando junto con la manchete de microtúbulos (rojo). Durante la formación del cuerpo residual, en las Figuras 2 C-E se observan espermátides elongadas con microtúbulos de la manchete y proteínas de la TP asociadas. En la Figura 2F, se presenta una espermátide redonda con restos de TP y acrosoma disociado (flecha). En la Figura 2G puede observarse proteínas de la TP en el cuerpo residual y un pequeño acrosoma en la región apical. En este caso la condensación de la cromatina es incompleta observándose la formación de un núcleo esférico. En la Figura 2H se observan espermatozoides maduros con la cabeza redonda y ausencia de acrosoma o con el mismo vesiculizado alrededor del núcleo. En estos espermatozoides maduros tampoco se observa presencia de TP. En la Figura 2I se pudo evidenciar la presencia de una estructura tipo acrosoma disociado (flecha) en un espermatozoide ya maduro. (Aumento 100X)

espermátide, indicando que posiblemente se desasocie de la porción apical del núcleo durante la espermatogénesis por la falta de la TP. En la Figura 2G la proteína 427 de la TP se encuentra en el cuerpo residual. En este caso, la espermátide contiene un pequeño A en la región apical. En la mayoría de los estadios observados, la condensación de la cromatina es parcial, formándose un núcleo esférico. Los espermatozoides maduros de estos pacientes tienen la cabeza redondeada y presentan ausencia o hipoplasia acrosomal marcada (evidenciada por la ausencia o escasez de acrosina). Al mismo tiempo, se

observó la presencia ectópica de la TP en la mayoría de las células analizadas (Figura 2H). En general se puede afirmar que la muestra patológica testicular contiene un abundante número de estructuras celulares aisladas con marcación positiva para acrosina y TP (ver flecha en 2I).

El estudio ultraestructural evidencia espermatozoides y espermátides en maduración avanzada con serios defectos de la génesis o topografía acrosomal (Figura 3). Los núcleos espermáticos fueron redondeados u ovalados, observándose en algunos de ellos serios defectos de la compactación

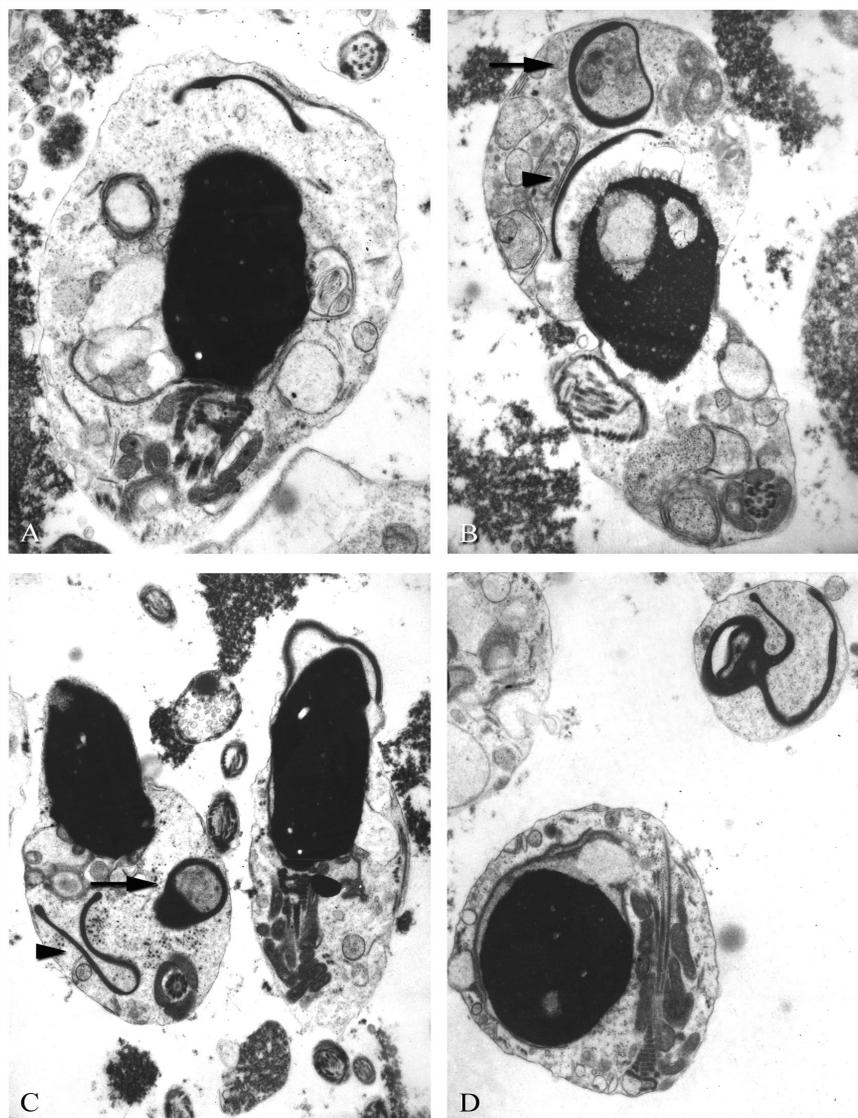


Figura 3: Microscopía electrónica de espermátides maduras y espermatozoides con defectos acrosomales. En 3A se observa un núcleo ovalado con buena compactación de la cromatina y un acrosoma muy pequeño y desprendido, alejado del polo apical del núcleo. Una situación similar se presenta en 3B, pero aquí la cromatina tiene serios defectos de la compactación y presenta dos áreas de rarefacción de aspecto "vacuolar". En este caso el acrosoma está representado por dos estructuras, una de pequeño tamaño, algo alejada del núcleo (punta de flecha) y otro anular (flecha), completamente desprendido. En 3C el espermatozoide de la izquierda presenta un acrosoma completamente disociado del núcleo y migrando al polo caudal (cabeza de flecha), acompañado asimismo por una estructura acrosomal anular (flecha), mientras que el espermatozoide hacia la derecha evidencia un acrosoma hipoplásico y parcialmente desprendido. La figura 3D evidencia un globocito con un resto citoplásmico que remeda un acrosoma rudimentario y hacia la parte superior de la figura un cuerpo residual, sin núcleo, que contiene un acrosoma desvinculado de su espermátide de origen.

cromatínica, con áreas de rarefacción de la misma (Figura 3B). Los A se encontraron presentes, de tamaño pequeño y formas atípicas, frecuentemente desprendidos del núcleo, o bien muy alejados del mismo en el citoplasma residual (Figura 3C), o completamente separados en cuerpos residuales pequeños (Figura 3D). En ningún caso se observaron A normalmente desarrollados.

En las Figuras 4A, A' y A'' observamos la morfología de espermatozoides de eyaculado de hombres normales, mientras que en las Figuras 4B y B' se observan espermatozoides de eyaculado de pacientes con globozoospermia.

Como cabe esperar, en espermatozoides de eyaculado de hombres fértiles (Figura 4A) se puede observar la presencia de TP en la porción subacrosomal y ecuatorial. En la misma Figura, también se observa la presencia de A mediante el empleo de anticuerpos anti-acrosina. En la Figura 4A' observamos el detalle de la localización específica de la TP en la región apical de la cabeza del espermatozoide, mientras que en la Figura 4A'' se aprecia el A perfectamente formado en la región apical de la cabeza del espermatozoide.

En los espermatozoides de eyaculado del paciente con globozoospermia (Figura 4B), se evidencia la presencia de la TP sólo en el citoplasma de las células inmaduras y en los restos citoplasmáticos de los espermatozoides maduros. A diferencia del panel 4A, la ausencia de TP y A es evidente en la gran mayoría de las células analizadas. La imagen al microscopio de contraste de fase muestra de manera panorámica la morfología de la cabeza de los espermatozoides redonda (inserto 4A arriba a la derecha). En la misma puede apreciarse una cabeza perfectamente esférica y flagelos normales. Luego de la cuantificación de 500 espermatozoides, se determinó que el 89,9% de ellos tiene una morfología redonda de la cabeza (globocitos). Sólo el 10% de los espermatozoides tienen una morfología aparentemente conservada (ver punta de flecha en inserto). En la Figura 4B', se detalla el recuadro de la Figura 4B, en el cual se observa presencia de la TP en las células inmaduras presentes en el eyaculado y una estructura acrosómica disociada (flecha).

CONCLUSIÓN

El presente estudio fue realizado con el fin de caracterizar mediante las técnicas de ICQ y microscopía electrónica (ME) los componentes celulares del espermatozoide, específicamente la TP, el A y el ADN. Nuestro interés también se centró en la comparación de las estructuras espermáticas de hombres normales con las de pacientes con globozoospermia, analizando las alteraciones

espermáticas de estos últimos. La inmunofluorescencia es una técnica valiosa para el estudio de estas estructuras espermáticas, y la ME permite obtener información sobre la organización subcelular de las organelas. La combinación de estas técnicas, nos permitió obtener diferentes aproximaciones esenciales para un correcto diagnóstico y un mayor entendimiento de la patología estudiada. El uso de la epifluorescencia aplicada a la patología espermática humana, nos ha permitido el estudio de la espermatogénesis completa en biopsias testiculares humanas y en eyaculados de hombres normales y con patologías espermáticas, en las cuales, la disposición tridimensional de los componentes celulares fue la característica distintiva. Actualmente no se han reportado trabajos de ICQ con biopsias testiculares humanas de pacientes globozoospermicos. Los pocos trabajos de ICQ publicados relacionados con la espermatogénesis y la biogénesis del A y de la TP se han focalizado únicamente en ratas (Longo y col., 1987; Longo y Cook, 1991), en toros (Longo y col., 1987; Longo y Cook, 1991; Oko y Maravei, 1994; Oko y Maravei, 1995; Sutovsky y col., 2003) y en eyaculados humanos (Escalier, 1990).

En nuestro estudio pudimos observar la biogénesis del A durante la espermatogénesis normal, evento que es también muy poco observado en la literatura. En la espermatogénesis temprana, los gránulos proacrosómicos se desarrollan dentro de las vesículas del Aparato de Golgi, que se aproximan al núcleo para formar el gránulo acrosómico que luego se extiende sobre el núcleo formando el capuchón acrosomal. El Aparato de Golgi comienza a migrar entonces hacia el polo opuesto de la célula, caudalmente durante el inicio de la elongación de las espermátides. En las espermátides elongadas, el A está completamente formado y los microtúbulos migran hacia el polo opuesto del A eliminándose con el cuerpo residual. De esta forma se originan espermatozoides maduros con A en la región apical de la cabeza, estructura fundamental para la penetración del oocito. En los resultados obtenidos del paciente con globozoospermia, determinamos que el 89,9% de los espermatozoides de la muestra tenía una morfología redonda de la cabeza (globocitos) y sólo el 10% de los espermatozoides de la muestra presenta una morfología aparentemente conservada (punta de flecha), sugiriendo que la biogénesis del A y de la TP está severamente afectada. Se observó la presencia de TP y acrosina en las células germinales durante los primeros estadios de la espermatogénesis evidenciándose una hipoplasia acrosomal, y

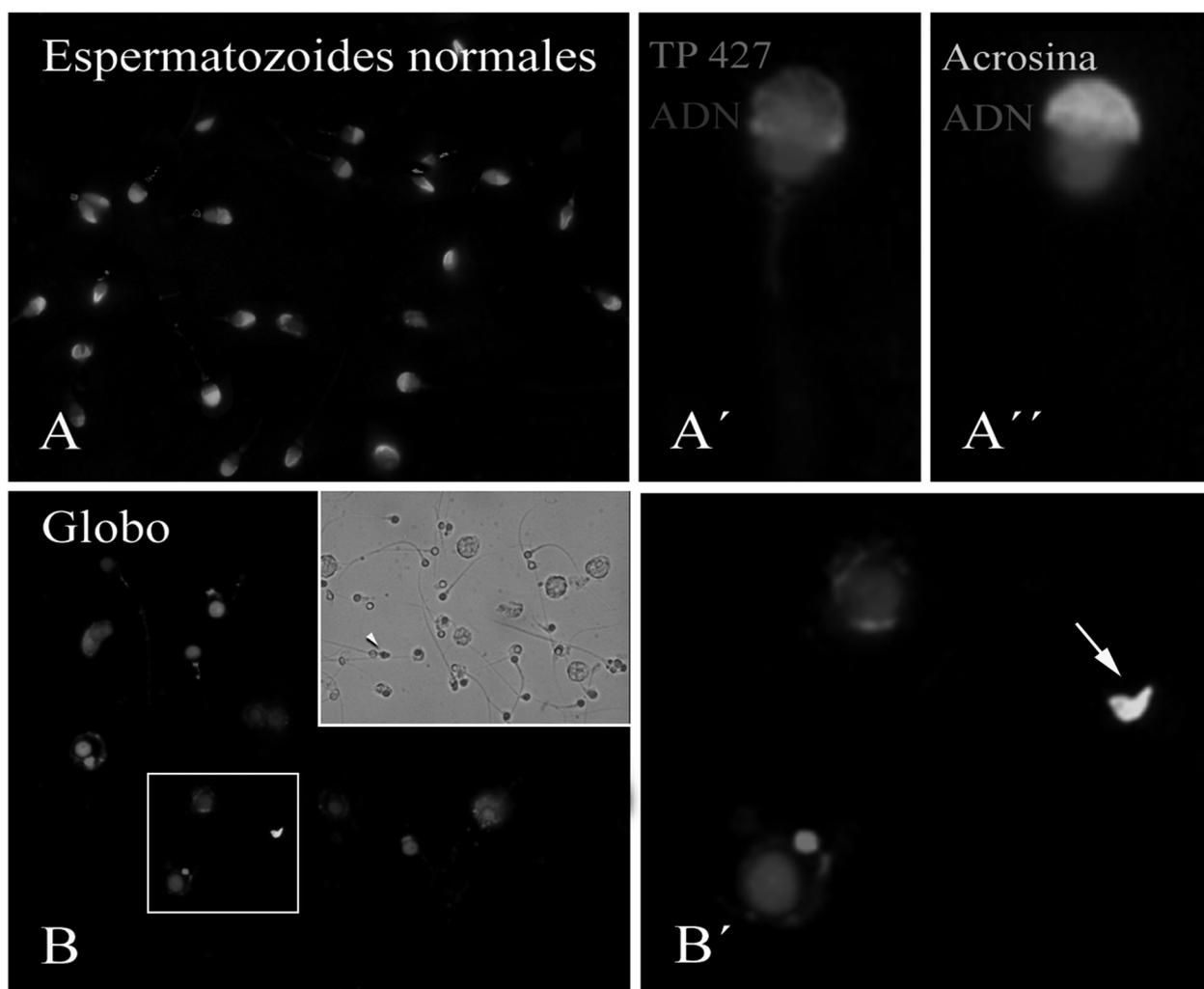


Figura 4. Morfología de espermatozoides de hombres normales y paciente con globozoospermia provenientes de eyaculado. En la Figura 4A se observa la localización de la TP (rojo), formando la capa subacrosomal en espermatozoides normales. También se observa la presencia del acrosoma mediante el empleo de anticuerpos anti-acrosina (verde) y el ADN en azul. En la Figura 4A' se observa la localización específica de la TP en la región apical de la cabeza del espermatozoides; capa subacrosomal, región ecuatorial y capa post-acrosomal. Al estudiar el acrosoma en estos espermatozoides puede apreciarse al mismo completamente formado en la región apical de la cabeza (Figura 4A''). En la imagen de la ICQ de espermatozoides de eyaculado del paciente con globozoospermia (Figura 4B) se evidencia la ausencia de la TP en la posición esperada (comparar con 4A'). En el inserto se observa una imagen del microscopio óptico que muestra la morfología de la cabeza de los espermatozoides de eyaculado del paciente globozoospermico. En la Figura 4B' se detalla el recuadro de la Figura 4B, en el cual se observa la presencia de TP en espermátides redondas y una estructura tipo acrosoma disociado (Aumento 60X y 100X).

pudiéndose también observar que el A se separa del núcleo de la espermátide. Posteriormente, en las espermátides elongadas que todavía no perdieron su A, se ven proteínas de la TP migrando junto con la manchete durante la formación del cuerpo residual. También observamos A disociados en la muestra de la biopsia testicular y en eyaculado, indicando que el A posiblemente se disocie durante la espermatogénesis por causa de la pérdida de la TP. Las proteínas de la TP podrían tener una función en la estabilización de las membranas en la región ecuatorial, previniendo la vesiculización durante la reacción acrosomal. La TP es una

estructura clave para la función de moldeado de la cabeza del espermatozoides, y está involucrada en la asociación estable entre la membrana nuclear y la membrana interna acrosomal o con la membrana plasmática. Sin embargo, el mecanismo involucrado en la asociación de proteínas con la TP aún no se conoce. Una de las características de las proteínas de la TP podría relacionarse con la interacción proteína-proteína, funcionando como "cemento" entre el núcleo y el A. En este caso, las proteínas de la TP estarían anclando el A al núcleo, otorgando una adecuada diferenciación estructural y una estructura protectora rígida para

el núcleo espermático durante la maduración del espermatozoide y la fecundación. Estas proteínas de la TP estarían contribuyendo con moléculas de señalización durante el proceso de fecundación, importantes para disparar la activación oocitaria y el desarrollo embrionario temprano (Sutovsky y col., 2003).

La microscopía de epifluorescencia fue una herramienta de gran valor, particularmente luego del estudio de estos patrones en el espermatozoide entero, y la ME proveyó una herramienta clave en el estudio de la organización ultraestructural.

El estudio ultraestructural confirmó las serias alteraciones en el tamaño y ubicación acrosomal, con ausencia del mismo en muchos espermatozoides maduros. Si bien en algunos casos comunicados de globozoospermia el mecanismo sería la falta de desarrollo del A por una falla del Aparato de Golgi de formarlo, en el caso que nos ocupa pareciera ser que la falta de A se origina por una falla del Aparato de Golgi de la espermátide de colocarse en el polo cefálico del núcleo y desarrollar allí un A normal, como lo demuestran nuestras observaciones de A bien desarrollados observados en ubicaciones alejadas del núcleo, libres en el citoplasma residual que es separado del espermatozoide poco antes de la espermiación (Chemes 2000, Chemes y Rawe, 2003). Estas alteraciones muy posiblemente se deben a las anormalidades de desarrollo de la teca perinuclear, que normalmente funcionaría como un elemento de anclaje del acrosoma sobre la membrana nuclear.

Es de hacer notar que cuando se producen estas alteraciones pueden resultar no solo globocitos sin A o con A pequeño, sino formas ovaladas, con relativa conservación de la forma de la cabeza, pero desprovistas de A y TP. Esta posibilidad es de particular importancia cuando se seleccionan espermatozoides para microinyección, ya que la forma ovalada de la cabeza no garantiza la presencia de A y TP. Esta situación debe alertar a quien selecciona los espermatozoides para microinyección, pues la presencia del A y la TP no sólo es necesaria para la penetración en el ovocito (no importante en el caso del ICSI pues la penetración se asegura por la microinyección), sino porque estas estructuras son necesarias para una normal activación oocitaria. Es posible que las fallas de ICSI comunicadas en casos de patologías acrosomales se deban a una anormal activación del ovocito por las razones antes expuestas.

Agradecimientos

Especial agradecimientos al Dr. Peter Sutovsky (EEUU) y Dr. Richard Oko (Canadá)

por la constante contribución intelectual y entrega de anticuerpos anti teca perinuclear. A los médicos del Staff de CEGyR y al Dr. Brugo Olmedo por su curiosidad para el estudio del material.

REFERENCIAS

1. Battaglia DE, Koehler JK, Klein NA, Tucker MJ. "Failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection using round-headed sperm". *Fertil Steril* 1997;68(1):118-22
2. Chemes HE, Rawe VY. "Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men". *Hum Reprod Update* 2003;9(5):405-28
3. Chemes HE. "Phenotypes of sperm pathology: genetic and acquired forms in infertile men". *J Androl* 2000;21(6):799-808
4. Edirisinghe WR, Murch AR, Junk SM, Yovich JL. "Cytogenetic analysis of unfertilized oocytes following intracytoplasmic sperm injection using spermatozoa from a globozoospermic man". *Hum Reprod* 1998;13(11):3094-8
5. Escalier D. "Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round-headed human spermatozoa". *Int J Dev Biol* 1990;34(2):287-97
6. Longo FJ, Cook S. "Formation of the perinuclear theca in spermatozoa of diverse mammalian species: relationship of the manchette and multiple band polypeptides". *Mol Reprod Dev* 1991;28(4):380-93
7. Longo FJ, Krohne G, Franke WW. "Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements". *J Cell Biol* 1987;105(3):1105-20
8. Oko R, Maravei D. "Protein composition of the perinuclear theca of bull spermatozoa". *Biol Reprod* 1994;50(5):1000-14
9. Oko R, Maravei D. "Distribution and possible role of perinuclear theca proteins during bovine spermiogenesis". *Microsc Res Tech* 1995;32(6):520-32
10. Oko R., Clermont Y. "Spermiogenesis". In Knobil E, Neil JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction*. 1998;(Vol IV):602-9
11. Ramalho-Santos J, Moreno RD, Wessel GM, Chan EK, Schatten G. "Membrane trafficking machinery components associated with the mammalian acrosome during spermiogenesis". *Exp Cell Res* 2001;267(1):45-60
12. Rawe VY, Payne C, Navara C, Schatten G. "WAVE1 intranuclear trafficking is essential for

- genomic and cytoskeletal dynamics during fertilization: cell-cycle-dependent shuttling between M-phase and interphase nuclei". *Dev Biol* 2004;276(2):253-67
13. Rybouchkin AV, Van der Straeten F, Quatacker J, De Sutter P, Dhont M. "Fertilization and pregnancy after assisted oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection in a case of round-headed sperm associated with deficient oocyte activation capacity". *Fertil Steril* 1997;68(6):1144-7
 14. Singh G. "Ultrastructural features of round-headed human spermatozoa". *Int J Fertil* 1992;37(2):99-102
 15. Stone S, O'Mahony F, Khalaf Y, Tylor A, Braude P. "A normal livebirth after intracytoplasmic sperm injection for globozoospermia without assisted oocyte activation." *Hum Reprod* 2000;15:139-41
 16. Sutovsky P, Manandhar G, Wu A, Oko R. "Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microsc Res Tech* 2003;61(4):362-78
 17. Trokoudes KM, Danos N, Kalogirou L, Vlachou R, Lysiotis T, Georghiades N, Leries S, Kyriacou K. "Pregnancy with spermatozoa from a globozoospermic man after intracytoplasmic sperm injection treatment". *Hum Reprod* 1995;10(4):880-2
 18. Vicari E, Perdichizzi A, De Palma A, Burrello N, D'Agata R, Calogero AE. "Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities: case report". *Hum Reprod* 2002;17(8):2128-33
 19. Von Bernhardt R, de Ioannes AE, Blanco LP, Herrera E, Bustos-Obregon E, Vigil P. "Round-headed spermatozoa: a model to study the role of the acrosome in early events of gamete interaction". *Androl* 1990;22(1):12-20
 20. Weissenberg R, Eshkol A, Rudak E, Lunenfeld B. "Inability of round acrosomeless human spermatozoa to penetrate zona-free hamster ova". *Arch Androl* 1983;11(2):167-9