

Rol de las Vesículas Seminales en la Infertilidad Masculina

GUSTAVO F. GONZALES*

RESUMEN

El presente estudio se ha diseñado para determinar la existencia de alguna asociación entre la respuesta de la testosterona sérica al estímulo con citrato de clomifeno y la consecuente respuesta de las vesículas seminales. Igualmente se ha propuesto determinar alguna asociación entre la respuesta de las vesículas seminales y la movilidad espermática, la viscosidad seminal y la estabilidad de la cromatina. Se han estudiado 42 varones que asistieron al Laboratorio ya sea porque ellos o sus esposas eran infértiles, y en quienes se les realizó la prueba del citrato de clomifeno. La fructosa corregida verdadera se constituyó en mejor marcador de la función de las vesículas seminales que la medición de la fructosa corregida o de la fructosa seminal. La principal causa de hipofunción de las vesículas seminales fue la leucocitospermia y/o la historia de enfermedad de transmisión sexual (ETS); en menor porcentaje se observa como causa al hipoandrogenismo. Las prevalencias de hiperviscosidad seminal, astenozoospermia, e hiperestabilidad de la cromatina espermática post SDS+EDTA fueron reducidas significativamente después del tratamiento con citrato de clomifeno, siempre y cuando hay respuesta de las vesículas seminales al estímulo androgénico. En conclusión, la hipofunción de las vesículas seminales cumple un rol importante en la infertilidad masculina, y el citrato de clomifeno puede emplearse en estos casos tanto como prueba diagnóstica, como para el tratamiento.

Palabras Claves: Hipofunción de vesículas seminales, testosterona, clomifeno, fructosa corregida verdadera, astenozoospermia.

ABSTRACT

The present study has been designed to determine any association between serum testosterone response to clomiphene citrate and the subsequent response of the seminal vesicles. Furthermore, it has been proposed to determine any association between seminal vesicles response and sperm motility, seminal viscosity, and sperm chromatin stability in semen. There were studied 42 male partners in infertile couples attending the Andrology laboratory because they or their wives were infertile, whose received clomiphene citrate two tablets a day during five days. True corrected seminal fructose was the best marker of seminal vesicles function than corrected seminal fructose or seminal fructose. Main cause of hypofunction of the seminal vesicles was leucocytospermia and/or history of sexual transmitted diseases (STD); in minor magnitude was observed hypoandrogenism as cause of hypofunction of the seminal vesicles. Prevalence of high semen viscosity, asthenozoospermia, and high sperm chromatin stability after SDS+EDTA were significantly reduced after clomiphene citrate treatment only when seminal vesicles were responsive to androgen stimulation. In conclusion, hypofunction of the seminal vesicles has important role determining male infertility, and clomiphene citrate may be used in these cases as diagnosis as well as therapeutic tools.

Key words: Hypofunction of the seminal vesicles, testosterone, clomiphene, true corrected fructose, asthenozoospermia.

INTRODUCCION

En casi la mitad de los casos de infertilidad, el varón es el responsable^(17,18). En un estudio multicéntrico realizado por la OMS, en el 48.8% de los casos de infertilidad masculina no se encuentra causa demostrable de la infertilidad⁽⁵²⁾, que viene a resultar el reflejo de la carencia relativa de conocimiento de la fisiología y patología del tracto reproductivo masculino.

Las causas de la infertilidad varían de población en pobla-

ción⁽¹¹⁾. En América latina las causas más frecuentes de infertilidad masculina las constituyen: las causas no demostrables (41%), varicocele (13%) e infección de las glándulas sexuales accesorias (12%). Comparando diferentes poblaciones del mundo, las infecciones como causa de infertilidad masculina resultan ser más prevalentes en América Latina (12%) que en África (11%), países desarrollados (7%), y Asia (3%)⁽¹¹⁾.

Nuestro centro desde hace 20 años se encuentra abocado al estudio de las causas de la infertilidad masculina, particularmente

*Departamento de Ciencias Fisiológicas e Instituto de Investigaciones de la Altura, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Apartado Postal 1843. Lima, Perú.

en nuestra población. Así, se ha podido demostrar que la hiperserotoninemia es una causa de infertilidad masculina^(19,27), y que el varicocele se asocia a infertilidad cuando concomitantemente presenta hiperserotoninemia⁽³¹⁾. Posteriormente describimos a la hipoprolactinemia como causa de infertilidad masculina⁽³⁰⁾. La hipoprolactinemia se asocia a un conteo de espermatozoides normal o disminuido, movilidad de espermatozoides disminuida, nivel de testosterona sérica normal-bajo o bajo, y consistencia seminal (viscosidad) aumentada⁽²⁰⁾.

En nuestro medio se ha encontrado igualmente que la mayor causa de infertilidad (51%) es debida a la disminución en la movilidad de los espermatozoides⁽²¹⁾. Por lo general, la movilidad espermática se va adquiriendo por el pasaje de los espermatozoides a través del tracto reproductivo masculino, y principalmente en los minutos posteriores a la eyaculación. Esta menor movilidad de los espermatozoides puede ser secundaria a la presencia de un proceso inflamatorio del tracto reproductivo masculino, el cual se encontró en el 43% de los casos⁽²¹⁾.

El bicarbonato, la prolactina, el potasio y las prostaglandinas presentes en las vesículas seminales han sido sindicados como los responsables de la movilidad espermática^(6,22,26,49,56).

En el pasado no se ha evaluado apropiadamente la función de las vesículas seminales debido a que la determinación de la fructosa seminal, que es la que se usa en casi todos los laboratorios del mundo, como marcador de la función de las vesículas seminales, no resulta ser el parámetro más adecuado, debido principalmente al hecho de que la concentración de fructosa seminal correlaciona de manera inversamente proporcional con el conteo de espermatozoides^(22,26,51). A nuestro conocimiento no existe asociación entre la función de las vesículas seminales y la producción de espermatozoides.

Además, la asociación inversa entre el conteo de espermatozoides y la concentración de fructosa seminal puede ser explicada por la fructólisis o consumo de fructosa por los espermatozoides eyaculados durante el periodo en que se encuentran en el frasco de laboratorio antes de ser procesado. Así, las muestras oligozoospermicas metabolizan menos fructosa que las normozoospermicas, consecuentemente al momento de medir la fructosa en el laboratorio, la concentración de fructosa seminal será mayor en los oligozoospermicos que en los normozoospermicos^(22,25,26,51). Por lo tanto la asociación entre el conteo de espermatozoides y la fructosa sería un artefacto y no una real asociación biológica.

Para corregir este factor de interferencia se desarrolló un método simple que consiste en multiplicar el logaritmo del conteo de espermatozoides por la concentración de fructosa, y al valor que resulta se le denomina "Fructosa Corregida"^(26,29,32,33,35). Los niveles de fructosa corregida seminal en varones con líquido seminal normal se relacionan con la movilidad de los espermatozoides⁽²⁶⁾. Así, los sujetos con menores niveles de fructosa corregida seminal tienen menor movilidad de los espermatozoides⁽²⁹⁾. Los sujetos con astenozoospermia tienen de manera asociada niveles disminuidos de fructosa corregida^(26,35). Del mismo modo, se han encontrado niveles bajos de fructosa seminal corregida en varones con concentraciones bajas de testosterona^(23,26), y en aquellos con proceso obstructivo del tracto

reproductivo⁽²⁹⁾. El hecho de que la concentración de prolactina seminal, otro producto de las vesículas seminales, está significativamente reducida en varones con niveles disminuidos de fructosa corregida seminal⁽²⁸⁾ es sugestivo de que la fructosa corregida se relaciona a la función de las vesículas seminales.

La hipofunción de las vesículas seminales ha sido asociada también a la leucocitospermia^(29,32), hipoandrogenismo leve⁽²⁴⁾, a la hiperviscosidad seminal^(33,34) y a la hiperestabilidad de la cromatina⁽³⁵⁾. Estos estudios sin embargo, revelan una correlación entre estas variables pero no necesariamente una asociación causa-efecto. En tal sentido, es necesario demostrar una asociación causa-efecto entre la función de las vesículas seminales y la función espermática. Esto puede realizarse provocando una estimulación de las vesículas seminales y observando una respuesta en las variables de interés (movilidad espermática, viscosidad seminal, y estabilidad de la cromatina espermática). Lo anterior es necesario pues permite establecer un rol para las vesículas seminales en la infertilidad, y las posibilidades de tratamiento.

Las vesículas seminales responden al estímulo androgénico, por lo que el uso de sustancias que favorezcan un incremento endógeno de la testosterona puede favorecer la función de las vesículas seminales. El citrato de clomifeno es un estrógeno débil que antagoniza la acción de los esteroides endógenos inhibiendo la retroalimentación negativa a nivel hipotalámico, favoreciendo de esta manera la síntesis y secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Esta a su vez favorece la síntesis y secreción de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona foliculo estimulante (FSH) por parte de las células basófilas de la adenohipófisis⁽⁵⁴⁾.

La LH actúa sobre las células de Leydig en el testículo favoreciendo la síntesis y secreción de testosterona. Esta testosterona ingresa a las células de las vesículas seminales y en su interior debe transformarse, por acción de la 5 alfa reductasa, en 5-dihidrotestosterona (5-DHT). La 5-DHT sería la hormona que estimularía la síntesis y secreción de los productos de las vesículas seminales.

Si bien la hipofunción de las vesículas seminales medida por niveles bajos de fructosa corregida seminal ha sido consistentemente asociada a la astenozoospermia^(26,28,32,35), y que cuando se evalúan muestras normales, se observa correlación entre la concentración de fructosa corregida seminal y la movilidad de los espermatozoides⁽²⁶⁾; sin embargo cuando se evalúan muestras de astenozoospermicos no se encuentra correlación entre la movilidad espermática y la concentración de fructosa corregida seminal⁽³⁵⁾.

En el líquido seminal se encuentran tanto espermatozoides móviles como inmóviles. Se ha demostrado que la concentración de fructosa seminal correlaciona negativamente con los espermatozoides móviles, sugiriendo que son los espermatozoides móviles los que consumen la fructosa^(44,51). Lo anterior puede deberse al hecho de que los espermatozoides de pobre movilidad no consumen la fructosa⁽⁵¹⁾, por lo que al incluir en el cálculo de la fructosa corregida a espermatozoides de poca movilidad o inmóviles estaríamos sobre-estimando el valor verdadero de la fructosa corregida. Por ello en el presente estudio

se calculará la "fructosa corregida verdadera" en base a la multiplicación de la concentración de fructosa seminal por el logaritmo de la concentración de espermatozoides móviles, y se determinará su relación con la movilidad de los espermatozoides, la viscosidad seminal y la estabilidad de la cromatina espermática, en condiciones basales y en respuesta al citrato de clomifeno.

MATERIALES Y METODOS

El estudio tiene un diseño experimental prospectivo donde cada sujeto es su propio control. Se han estudiado 42 varones que asistieron al Laboratorio de Andrología en el Instituto de Investigaciones de la Altura, Lima, ya sea porque ellos o sus esposas eran infértiles, y en quienes se les aplicó la prueba del citrato de clomifeno. La edad promedio de los sujetos fue de 34.57 ± 5.22 años (media \pm desviación estándar). El 71.67% de los sujetos tenían infertilidad primaria y 28.33% infertilidad secundaria. Del total de sujetos estudiados, el 56.52% tuvieron historia de enfermedad de transmisión sexual o de infección de glándulas sexuales accesorias.

Los sujetos participantes del estudio no recibieron ninguna medicación en los tres meses previos a la prueba de estimulación con citrato de clomifeno. Todos los sujetos incluidos en el estudio recibieron por vía oral dos tabletas de 50 mg cada una de citrato de clomifeno (Genozym®, Argentia, Argentina) en dosis única cada día por un total de cinco días. Esta dosis es la usual utilizada para la evaluación de la reserva hormonal testicular⁽⁵³⁾.

Muestras sanguíneas y seminales y Medición hormonal

Análisis Sanguíneo

Las muestras de sangre y de semen se obtuvieron antes de empezar el tratamiento y un día después de concluido el mismo. Las muestras de semen fueron colectadas por masturbación después de una abstinencia sexual de tres días, tanto para la muestra basal como para la obtenida posterior al término del tratamiento. La sangre fue obtenida de la vena de la flexura del codo en un volumen de 10 ml. La muestra de sangre venosa fue centrifugada a 3000 RPM durante 10 minutos y el suero fue separado y guardado en alícuotas hasta el momento de las determinaciones hormonales.

Las determinaciones de hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) fueron realizadas por radioinmunoensayo utilizando reactivos proveídos por el Programa de Reproducción Humana de la Organización Mundial de la Salud. Estos reactivos utilizan como marcador radioactivo, a la hormona marcada con iodo-125. El rango normal para LH y FSH en varones es de 1.2 a 5.0 mUI/ml. El coeficiente de variación intraensayo para LH es de 3.49%, y para FSH de 4.05%. La sensibilidad del ensayo para LH es de 0.25 mUI/ml y para FSH de 0.20 mUI/ml⁽¹⁵⁾.

La testosterona sérica total y libre fueron medidas por radioinmunoensayo (RIA). La testosterona marcada con iodo-125 es utilizada como marcador radioactivo. El ensayo se realizó utilizando kits comerciales (Diagnostic Products Co, Los Angeles, CA, USA). Todas las muestras fueron analizadas en un mismo

ensayo para evitar la variación inter-ensayo. El coeficiente de variación intra-ensayo para T total fue de 4.6%, y para T libre de 3.8%. El rango normal para la testosterona sérica total en nuestro laboratorio es de 3-10 ng/mL⁽³⁰⁾, y para testosterona libre de 16-50 pg/ml. La sensibilidad del método para testosterona total es de 0.04 ng/ml y para testosterona libre de 0.15 pg/ml⁽¹⁵⁾.

Se considera como respuesta normal al citrato de clomifeno cuando los niveles de testosterona sérica total se incrementan sobre 1 ng/ml del valor basal previo (Gonzales y col, 1998). Varones con valores de T total sérica menor de 3 ng/ml o de T libre menor de 16 pg/ml son considerados como portadores de hipoandrogenismo.

Análisis Seminal

Las muestras seminales son mantenidas en reposo en el laboratorio durante 30 minutos para permitir que ocurra la licuefacción.

La viscosidad seminal se mide aplicando una punta de pipeta sobre el líquido seminal de acuerdo a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud⁽⁵⁸⁾. Si el líquido seminal se eleva como un hilo en una longitud menor o igual a 2 cm se considera como normal; en caso contrario se define como muestra de consistencia aumentada o hiperviscosidad.

El volumen del eyaculado, la movilidad de los espermatozoides, la morfología de los espermatozoides, y la concentración de espermatozoides fueron analizados de acuerdo a las guías recomendadas por la Organización Mundial de la Salud⁽⁵⁸⁾. La integridad funcional de la membrana se evaluó a través de la prueba hipo-osmótica utilizando la técnica descrita por Jeyendran y col⁽⁴¹⁾. La hipospermia se define cuando el volumen seminal es igual o menor de 2 cc.

Los leucocitos son medidos en semen en fresco con el método de la peroxidasa utilizando azul de ortotoluidina de acuerdo a las guías sugeridas por OMS⁽⁵⁸⁾. Se define la leucocitospermia cuando el conteo de neutrófilos peroxidasa positiva es mayor de un millón/ml.

La movilidad de los espermatozoides fue definida en cuatro grados:

- Grado 3, si el espermatozoide tiene un movimiento lineal progresivo y rápido.
- Grado 2, si el espermatozoide tiene un movimiento lineal lento u ondulado, o un movimiento no lineal.
- Grado 1, para el movimiento in situ, no progresivo; y
- Grado 0, para el espermatozoide inmóvil.

Para el cálculo de la concentración de espermatozoides móviles se multiplica la concentración de espermatozoides por el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva (grado 2+3).

La astenozoospermia se define cuando las muestras seminales muestran <50% de espermatozoides con movilidad progresiva (grado 2+3) y <25% de espermatozoides con movilidad lineal progresiva y rápida (grado 3). Con esta definición se ha calculado

la prevalencia de astenozoospermia antes y después del tratamiento con clomifeno.

La oligozoospermia se define cuando la concentración de espermatozoides es menor de 20 millones/ml. La polizoospermia se define cuando la concentración de espermatozoides es mayor de 250 millones/ml.

La teratozoospermia cuando el porcentaje de espermatozoides de morfología normal es menor de 50%.

Determinación de la Fructosa Seminal

La fructosa ha sido medida en semen por espectrofotometría usando el método del resorcinol.

La fructosa corregida es calculada multiplicando el logaritmo de la concentración de espermatozoides por la concentración de fructosa seminal tal como ha sido descrito previamente⁽³²⁾. El rango normal de fructosa corregida es de 3.0-8 mg fructosa/10⁶ espermatozoides/mL⁽³⁶⁾.

La fructosa corregida verdadera es calculada multiplicando el logaritmo de la concentración de espermatozoides móviles grado 2+3 por la concentración de fructosa seminal. El rango normal de la fructosa corregida verdadera es de 3.0-8.0 mg fructosa/10⁶ espermatozoides móviles/mL. Sobre la base de los resultados se calculó la prevalencia de sujetos con niveles disminuidos de fructosa (<1.2 mg/ml), fructosa corregida (<3.0 mg fructosa/10⁶ espermatozoides/mL), y fructosa corregida verdadera (<3.0 mg fructosa/10⁶ espermatozoides móviles/mL) antes y al final del tratamiento con clomifeno.

Estabilidad de la Cromatina Espermiática

Las muestras seminales fueron analizadas 30 minutos después de la eyaculación. Se colocan en cada uno de tres tubos Falcon (5 mL) (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ), 20 μ l de semen fresco. Al primer tubo (tubo control), se le agrega 180 μ l de buffer borato 0.05 M, pH 9.0; al segundo tubo (tubo SDS), se le agrega 180 μ l SDS (1% sodio dodecil sulfato en buffer borato 0.05 M, PH 9.0); y al tercer tubo (tubo SDS y EDTA), se le agrega 180 μ l SDS conteniendo 6 mM EDTA. Las tres preparaciones se incubaron por 60 minutos en un baño de agua a 37°C^(7,9,43).

La decondensación fue detenida por la adición de 200 μ l de 2.5% de glutaraldehído en 0.05 M de buffer borato, a pH 9.0, por 10 minutos. Después se toma una gota de 30 μ l de cada tubo (control, SDS, y SDS + EDTA) y se coloca separadamente en cada una de tres láminas de vidrio, y después de ser secadas, se fijan los frotices en metanol por 5 minutos y coloreadas con Giemsa por 40 minutos^(34,35).

Las muestras fueron observadas en un microscopio compuesto a una magnificación de x1000 usando aceite de inmersión. En cada lámina de vidrio son contados 100 espermatozoides, los cuales son clasificados como estable (grado 0), moderadamente hinchado (grado 1) y grandemente hinchado (grado 2). Los datos son presentados como porcentajes.

Se considera que hay hiperestabilidad de la cromatina

cuando el porcentaje de espermatozoides estables (grado 0) después de SDS + EDTA fue $\geq 30\%$ ⁽³⁸⁾. Se define como respuesta normal al citrato de clomifeno cuando la diferencia del porcentaje de espermatozoides grado 0 con SDS+EDTA antes y después del tratamiento con citrato de clomifeno fue de una reducción de 5 unidades porcentuales (Valores que están por encima del percentil 75 para la respuesta de los espermatozoides grado 0 antes y después del tratamiento con clomifeno)^(35,36).

ANALISIS ESTADISTICO

Los datos han sido ingresados en un programa de base de datos (FoxPro2) y analizados usando el paquete estadístico STATA (version 3.1) para PC (Stata Corporation, 702 University Drive East, College Station, TX).

Las diferencias entre prevalencias de la población con función normal de las vesículas seminales y aquella con hipofunción de las vesículas seminales se realizó mediante la prueba z para diferencias de dos proporciones.

Para el caso de datos cuantitativos, se ha analizado previamente la homogeneidad de varianzas usando la Prueba de Bartlett. Si las varianzas fueron homogéneas se utilizó la prueba paramétrica de análisis de varianza de una vía, y la diferencia estadística entre pares de medias se realizó usando la prueba de Scheffe. Si las varianzas no fueron homogéneas se utilizó la prueba de rangos de Wilcoxon.

Se ha utilizado el análisis multivariado para determinar el efecto de diferentes variables independientes sobre la probabilidad de respuesta de la movilidad de los espermatozoides, porcentaje de espermatozoides estables frente al SDS+EDTA, y de la fructosa corregida verdadera, al citrato de clomifeno.

Se ha usado el análisis de regresión logística para determinar el efecto independiente de la edad cronológica, y los parámetros seminales sobre la probabilidad de tener o no tener respuesta al clomifeno. Se usó la función de máxima probabilidad para estimar el modelo. Se crearon modelos multivariados, y se seleccionó aquel modelo con mayor coeficiente de determinación (R²). Se considera que una diferencia es significativa cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

Prevalencia de hipofunción de las vesículas seminales de acuerdo a diferentes marcadores

La prevalencia de hipofunción de las vesículas seminales es significativamente mayor utilizando como marcador la fructosa corregida verdadera; esto es, calculado en base a la concentración de espermatozoides móviles. La menor prevalencia de hipofunción de las vesículas seminales se obtiene cuando se usa la fructosa seminal no corregida (Cuadro 1). La prevalencia de astenozoospermia en la muestra estudiada fue del 42.85% (18/42). La fructosa corregida verdadera tiene mayor capacidad de discriminar la astenozoospermia (66.67%). La

Tabla 1: PREVALENCIA DE HIPOFUNCION DE LAS VESICULAS SEMINALES BASADA EN DIFERENTES MARCADORES, Y PREVALENCIA DE HIPOFUNCION DE VESICULAS SEMINALES EN ASTENOZOOSPERMIA

Marcador de función de vesículas seminales	Prevalencia de hipofunción de vesículas seminales	Prevalencia de hipofunción de vesículas seminales en astenozoospermia
Fructosa seminal mg/ml	4/42 (9.5)	1/18 (5.55)
Fructosa corregida seminal mg/mlx 10 ⁶ spz/ml	17/42 (40.5)*	8/18 (44.44)
Fructosa corregida seminal verdadera mg/mlx 10 ⁶ spz/ml	20/42 (47.6)*	12/18 (66.67)*,**

+P<0.01 con respecto a la prevalencia obtenida cuando se utiliza fructosa como marcador de la función de las vesículas seminales.
 **P<0.05 con respecto a la prevalencia obtenida cuando se utiliza fructosa corregida como marcador de las vesículas seminales.

hipofunción de las vesículas seminales basada en la medición de la fructosa seminal, se detecta en 1 de las 18 astenozoospermias (5.55%).

De 4 sujetos con niveles disminuídos de fructosa seminal (<1.2 mg/ml), sólo 1 tenía asociada la astenozoospermia (25.00%). De 17 sujetos con fructosa corregida seminal disminuída (<3.0 mg/ml x millón espermatozoides/ml), 8 presentaron astenozoospermia de manera asociada (47.09%). De 20 sujetos con fructosa corregida verdadera seminal disminuída (<3.0 mg/ml x millón de espermatozoides móviles/ml), 12 presentaron concomitantemente astenozoospermia (60.00%).

En el cuadro 2 se observan las diferentes ecuaciones de regresión obtenidas al correlacionar el porcentaje de espermatozoides muy móviles (grado 3) con cada uno de los marcadores de función de las vesículas seminales: la fructosa, la fructosa corregida y la fructosa corregida verdadera. Se encontró correlación significativa sólo cuando se relacionó el porcentaje de espermatozoides muy móviles con la fructosa corregida verdadera seminal ($r=0.36$; $p:0.012$). Al correlacionar la concentración de espermatozoides móviles con cada uno de los marcadores de función de las vesículas seminales, con los tres marcadores utilizados, sólo la fructosa corregida verdadera correlacionó con la concentración de espermatozoides móviles ($r=0.45$; $p:0.0015$).

Características seminales y hormonales de los varones según la función de las vesículas seminales

En base a los resultados obtenidos en los cuadros 1 y 2, de aquí en adelante, la función de las vesículas seminales se evalúa mediante la medición de la fructosa corregida verdadera seminal. Los varones con hipofunción de las vesículas seminales presentan en mayor proporción que los controles, hiperviscosidad seminal, hipospermia (volumen seminal disminuído), astenozoospermia, hiperestabilidad de la cromatina espermática frente al SDS+EDTA, y leucocitospermia. En estos sujetos es también más prevalente el hipoandrogenismo (Cuadro 3).

Entre las causas de hipofunción de las vesículas seminales, se puede observar que en la población en estudio con hipofunción de las vesículas seminales es más prevalente la leucocitospermia (63.6%) que el hipoandrogenismo (20%).

Respuesta al citrato de clomifeno

Los niveles de LH (4.30 ± 2.33 vs 6.80 ± 3.78 mUI/ml), FSH (5.02 ± 3.22 vs 6.99 ± 3.62 mUI/ml), testosterona total (5.96 ± 1.92 vs 8.18 ± 4.86 ng/ml) y T libre (30.3 ± 8.1 vs 35.4 ± 8.6 pg/ml) en suero se incrementan significativamente después del tratamiento con el clomifeno.

Tabla 2: ECUACIONES DE REGRESION ENTRE EL PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDEOS MUY MOVILES Y MARCADORES DE LA FUNCION DE LAS VESICULAS SEMINALES Y ENTRE LA CONCENTRACION DE ESPERMATOZOIDEOS MUY MOVILES Y MARCADORES DE LA FUNCION DE LAS VESICULAS SEMINALES

Porcentaje de espermatozoides muy móviles	Marcador de las vesículas seminales	Intercepto	Coef. de regresión	R ²	P
Regresión 1	Fructosa	2.49	-0.001	-0.0004	0.89
Regresión 2	Fructosa corregida	3.77	0.012	0.01	0.44
Regresión 3	Fructosa corregida verdadera	1.81	0.044	0.13	0.01
Concentración de espermatozoides muy móviles	Marcador de las vesículas seminales	Intercepto	Coef. de regresión	R ²	P
Regresión 1	Fructosa	67.98	-4.46	0.006	0.58
Regresión 2	Fructosa corregida	28.78	6.78	0.05	0.10
Regresión 3	Fructosa corregida verdadera	20.38	11.39	0.20	0.001

Tabla 3: PREVALENCIA DE ANOMALIAS SEMINALES Y DE HIPOANDROGENISMO EN VARONES QUE ACUDEN A UN SERVICIO DE INFERTILIDAD CLASIFICADOS DE ACUERDO A LA FUNCION DE LAS VESICULAS SEMINALES

Patología	Función normal de las vesículas seminales	Hipofunción de las vesículas seminales	Valor Z	P
Hipospermia	3/22 (13.6)	8/20 (40.0)	4.20	0.0001
Hiperviscosidad seminal	3/22 (13.6)	6/20 (30.0)	2.81	0.0025
Astenozoospermia	5/22 (22.7)	13/20 (65.0)	6.02	0.0001
Leucocitospermia	1/10 (10.0)	7/11 (63.6)	7.76	0.0001
Hiperestabilidad de la cromatina espermática	3/22 (13.6)	8/19 (42.1)	4.47	0.0001
Hipoandrogenismo	1/22 (4.0)	4/20 (20.0)	2.17	0.0015

El tratamiento durante cinco días con clomifeno reduce significativamente la prevalencia de hiperviscosidad (de 26.3% a 16.4%; $p < 0.05$), astenozoospermia pura (de 37.5% a 6.2%; $p < 0.001$), e hiperestabilidad de la cromatina (de 27.5% a 12.5%; $p < 0.01$). La espermaglutinación (de 6.4% a 4.2%), la teratozoospermia (de 37.7% a 28.9%) y la prueba hipo-osmótica anormal (26.1% a 19.6%) no revierten por el tratamiento con citrato de clomifeno (P :NS).

El análisis del porcentaje de espermatozoides muy móviles en las muestras con viscosidad normal ($36.02 \pm 1.85\%$; media desviación estandar, $n=28$) y anormal ($30.12 \pm 0.77\%$, $n=11$), no muestra diferencia significativa (P :NS); sin embargo cuando se analiza el porcentaje de astenozoospermicos en cada uno de los grupos se encuentra que en las muestras con viscosidad aumentada hay 63.6% de astenozoospermicos, un valor significativamente mayor ($Z=3.86$; $P < 0.001$) al observado en muestras con viscosidad normal, donde sólo se observan 35.7% de astenozoospermia.

En el análisis multivariado controlando una serie de variables seminales se puede mostrar que existe un aumento en el porcentaje de espermatozoides muy móviles (Grado 3) en respuesta al citrato de clomifeno, cuando es mayor el pH seminal y la fructosa corregida verdadera seminal basal y cuando es menor el porcentaje de espermatozoides muy móviles basal (Cuadro 4). Igualmente el análisis multivariado permite demostrar que el clomifeno puede disminuir el porcentaje de espermatozoides estables frente al SDS+EDTA cuando la testosterona total basal, la fructosa corregida verdadera seminal y la fosfatasa ácida seminal son altas en concentración (Cuadro 5).

En el Cuadro 6, se muestra el análisis de regresión logística para la probabilidad de ausencia de respuesta de la hiperviscosidad seminal ante el tratamiento con citrato de clomifeno, controlando diversas variables independientes. La baja concentración de testosterona total basal y la baja concentración basal de fructosa corregida verdadera seminal predicen la falta de respuesta de la viscosidad seminal al citrato de clomifeno.

Tabla 4: ANALISIS MULTIVARIADO DE LA RESPUESTA DE LA MOVILIDAD DE ESPERMATOZOIDES GRADO 3 AL ESTIMULO CON CLOMIFENO EN VARONES QUE ACUDEN A UN SERVICIO DE INFERTILIDAD

Variable dependiente: Movilidad grado 3 (post-clomifeno-basal)	Coefficiente de regresión	Error estandar	P
Volumen seminal basal	1.21	1.28	0.35
Consistencia seminal basal	-2.65	4.00	0.51
Conc. Espermatozoides basal	0.01	0.02	0.85
Testosterona total basal	1.09	1.02	0.29
Fructosa corregida verdadera basal	2.50	0.75	0.002
PH seminal basal	16.99	8.15	0.045
% espermatozoides muy móviles basal	- 0.41	0.09	0.0001
Constante	- 127.73	62.24	0.048

La variable dependiente es movilidad espermática grado 3 (post-clomifeno-basal).
Número de observaciones = 41. $R^2 = 0.44$; $P < 0.0028$

Tabla 5: ANALISIS MULTIVARIADO DE ESPERMATOZOIDES ESTABLES FRENTE AL SDS+EDTA AL ESTIMULO CON CITRATO DE CLOMIFENO EN VARONES QUE ACUDEN A UN SERVICIO DE INFERTILIDAD

Variable dependiente: % espermatozoides estables (post-clomifeno-basal)	Coefficiente de regresión	Error estandar	P
Edad	0.58	0.34	0.11
Conc. Espermatozoides basal	0.01	0.02	0.70
Testosterona total basal	-2.69	0.97	0.010
Fructosa corregida verdadera basal	-1.39	0.76	0.078
Fosfatasa ácida seminal basal	-0.01	0.01	0.068
Constante	7.05	16.17	0.666

La variable dependiente es % de espermatozoides estables frente al SDS+EDTA (post-clomifeno-basal).
Número de observaciones = 41. $R^2 = 0.44$; $p = 0.0044$

Tabla 6: ANALISIS DE REGRESION LOGISTICA PARA LA PROBABILIDAD ESTIMADA DE UNA AUSENCIA DE RESPUESTA DESPUES DEL TRATAMIENTO CON CITRATO DE CLOMIFENO EN VARONES CON HIPERVISCOSIDAD SEMINAL

Variable	OR±ES	Valor P
Edad cronológica (años)	0.95±0.12	0.69
% espermatozoides muy móviles	0.99±0.03	0.65
Testosterona total basal	0.27±0.14	0.01
Testosterona total post clomifeno	1.88±0.80	0.14
Fructosa corregida verdadera basal	0.57±0.18	0.06
Fosfatasa ácida basal	1.00±0.00	0.21
PH seminal basal	0.31±0.90	0.69
Historia de ETS	1.00±0.33	0.99

OR: Odds Ratio (Razón de probabilidades). ES: Error estandar. ETS: Enfermedad de transmisión sexual.
R²=0.45; P: 0.0110; n=33.

Respuesta de las glándulas sexuales accesorias al citrato de clomifeno

La prevalencia de hipofunción de las vesículas seminales se reduce significativamente después del tratamiento con citrato de clomifeno de 42.9% a 26.2% (Z=2.49; p<0.01).

El 35.7% de los sujetos estudiados incrementaron los niveles de fructosa corregida verdadera después del tratamiento con el citrato de clomifeno. De los sujetos que aumentan los niveles de testosterona sérica post-clomifeno sólo el 40% incrementaron los niveles de fructosa corregida verdadera seminal.

En los sujetos que incrementan la función de las vesículas seminales post-clomifeno se observa una reducción significativa en la prevalencia de hiperviscosidad seminal (de 42.8% a 21.4%; p<0.001), astenozoospermia (50.0% a 28.6%; p<0.002) e hiperestabilidad de la cromatina espermática frente al SDS+EDTA (de 40.0% a 13.3%; p<0.0001). En los sujetos que no incrementan la función de las vesículas seminales post-clomifeno no se modifica la prevalencia de hiperviscosidad seminal, astenozoospermia, y de hiperestabilidad de la cromatina espermática (datos no mostrados).

DISCUSION

Marcador de la función de las vesículas seminales

Los resultados del presente estudio revelan la importancia de las vesículas seminales en la infertilidad masculina, tal como ha sido descrito previamente^(27,32,33,36). Hasta la década pasada el marcador que se utilizaba para medir la función de las vesículas seminales era la concentración de la fructosa seminal. La medición de fructosa por ser relativamente rápida y poco costosa es utilizada de manera amplia en la mayoría de los países del mundo, particularmente en países en vías de desarrollo que no pueden implementar técnicas más costosas⁽⁵¹⁾.

La fructosa seminal varía inversamente con el conteo de espermatozoides^(25,26,51). Esta diferencia es debida a la utilización de fructosa por los espermatozoides eyaculados⁽⁵¹⁾. En un intento de corregir este efecto del conteo de espermatozoides, es que se calculó la fructosa corregida, que consiste en multiplicar el logaritmo de la concentración de espermatozoides por la de fructosa. Así, se pudo apreciar que la fructosa corregida

correlacionaba de manera lineal y directa con la movilidad de los espermatozoides, cuando la movilidad era normal^(25,26). Sin embargo, cuando se estudian muestras patológicas, particularmente astenospérmicas, la relación del porcentaje de espermatozoides móviles con la fructosa corregida desaparece⁽⁵¹⁾.

Rajalakshmi y col.⁽⁵¹⁾ han demostrado que la tasa de utilización de fructosa es baja cuando la movilidad de los espermatozoides es pobre. Esto sugiere que la fructosa es utilizada mayormente por los espermatozoides móviles, por lo que la corrección de la fructosa debe calcularse en base a la concentración de espermatozoides móviles. Al valor obtenido después del cálculo basado en la concentración de espermatozoides móviles se le denomina "fructosa corregida verdadera".

Utilizando la fructosa como marcador de las vesículas seminales se detecta hipofunción de las glándulas sólo en el 9.5% de los casos; con la fructosa corregida se detecta 40.5% de casos de hipofunción de las vesículas seminales, en tanto que con la fructosa corregida verdadera se detecta 47.6% de casos de hipofunción de las vesículas seminales. De los tres marcadores utilizados, la fructosa corregida verdadera discrimina mejor los casos de astenozoospermia. Así, con la fructosa seminal como marcador de las vesículas seminales sólo se pueden detectar como asociado a hipofunción de las vesículas seminales a 1 de los 18 casos de astenozoospermia, mientras que con la medición de la fructosa corregida verdadera es posible asociar 12 de los 18 casos de astenozoospermia.

El hecho de que la concentración de la fructosa corregida verdadera y no la de fructosa, ni la de fructosa corregida correlacionan con el porcentaje de espermatozoides móviles y con la concentración de espermatozoides móviles refuerzan la idea de que la fructosa corregida verdadera es mejor marcador de las vesículas seminales que la concentración de fructosa corregida o que la concentración de fructosa no corregida. De acuerdo a lo anterior es recomendable la utilización de la fructosa corregida verdadera seminal como marcador de la función de las vesículas seminales.

Causas de la hipofunción de las vesículas seminales

La hipofunción de las vesículas seminales puede deberse a una insuficiente estimulación o a una alteración a nivel de la

secreción de sus productos. La falla en la estimulación puede deberse a la presencia de hipoandrogenismo o falla en los receptores androgénicos⁽²³⁾. La falla en la excreción puede deberse a procesos obstructivos, donde la mayor causa es por procesos inflamatorios post-infecciosos^(28,32). En el presente estudio, la principal causa de hipofunción de las vesículas seminales fue la leucocitospermia. En efecto, el 63.6% de casos con hipofunción de las vesículas seminales presenta leucocitospermia, en tanto que sólo el 20% de los casos de hipofunción de las vesículas seminales presentan hipoandrogenismo.

Cates y col⁽¹¹⁾ en un estudio multicéntrico encontraron que en América Latina, la infección de las glándulas sexuales accesorias es una importante causa de infertilidad masculina. Azarian y col.⁽³⁾ en Armenia encuentran que la infección de las glándulas sexuales accesorias es la segunda causa de infertilidad masculina después de la falla testicular primaria. Gonzales⁽¹⁸⁾ en otro hospital público de Lima demuestra leucocitospermia en el 43% de los varones que acuden al servicio de infertilidad. En el presente estudio se encuentra una prevalencia de 38%, lo cual indica que los procesos inflamatorios del tracto reproductivo continúan siendo una causa importante de infertilidad en nuestro medio.

Los leucocitos seminales pueden alterar la función espermática a través de la producción de especies reactivas del oxígeno⁽⁴⁷⁾; ésto sin embargo constituiría un efecto agudo. La infertilidad masculina probablemente se establezca como consecuencia de un proceso inflamatorio crónico o como efecto de la secuela del proceso inflamatorio.

La historia de ETS es igualmente de importancia como patognomónico de infertilidad masculina producida por infecciones en las glándulas sexuales accesorias^(39,52). En nuestro estudio 56.52% de los varones estudiados tuvieron historia de ETS o enfermedad asociada a procesos obstructivos del tracto reproductivo masculino como gonorrea, hepatitis, TBC⁽³⁹⁾.

Las vesículas seminales son órganos efectores del estímulo androgénico⁽¹²⁾, y la actividad secretoria de estas glándulas es una medida de la acción de la testosterona en el tejido epitelial⁽²⁾. Las vesículas seminales poseen actividad 5 alfa reductasa que favorece el metabolismo de testosterona a la molécula activa dihidrotestosterona⁽⁴⁸⁾. Es así que se ha podido demostrar una relación entre los niveles de testosterona sérica y la función de las vesículas seminales⁽²³⁾.

En el presente estudio se ha demostrado que los varones que tienen niveles de testosterona sérica basal por debajo de lo normal presentan niveles menores de fructosa corregida verdadera que aquellos varones con niveles normales de testosterona sérica. El hipoandrogenismo si bien no es tan frecuente como causa de infertilidad masculina en los diferentes estudios realizados⁽⁵²⁾, cuando se presenta se asocia a hipofunción de las vesículas seminales, tal como ha sido demostrado en el presente estudio.

Efectos de la hipofunción de las vesículas seminales

Viscosidad seminal

La incidencia de hiperviscosidad seminal in vitro varía de 11.3%⁽⁵⁷⁾ a 29.4%⁽³⁷⁾. En el presente estudio se ha demostrado una incidencia de 22%. Existen resultados conflictivos en relación al efecto de la hiperviscosidad seminal sobre la función del espermatozoide. Algunos autores muestran que la hiperviscosidad seminal afecta la movilidad de los espermatozoides^(1,33,34). En el presente estudio no se ha encontrado diferencias en relación a la presencia de hiperviscosidad seminal y el porcentaje de espermatozoides muy móviles; sin embargo cuando se analiza la prevalencia de astenozoospermia se encuentra que en las muestras con hiperviscosidad, el 63.6% son astenozoospermicos, en tanto que las muestras normales sólo el 35.7% (p<0.001) lo son. Se ha demostrado que la hiperviscosidad se asocia a la hipofunción de las vesículas seminales⁽³³⁾, y probablemente a través de esta disfunción es que se afecte la fertilidad.

Aquellos sujetos que responden al citrato de clomifeno aumentando la función de las vesículas seminales son los que revierten la hiperviscosidad seminal; en tanto que ninguno de los siete sujetos con hiperviscosidad seminal al inicio de estudio y que no respondieron sus vesículas seminales al citrato de clomifeno revirtieron la hiperviscosidad seminal, sugiriendo una relación causa-efecto entre la función de las vesículas seminales y la viscosidad seminal.

El análisis de regresión logística igualmente revela que el tener bajos niveles de fructosa corregida verdadera basal o bajos niveles de testosterona sérica basal son predictores de una falta de respuesta para revertir la viscosidad seminal frente al citrato de clomifeno. Esto probablemente esté asociado a procesos obstructivos en las vesículas seminales, o a la ausencia de respuesta de las células de Leydig al citrato de clomifeno.

MOVILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES

Los espermatozoides que son liberados a la luz de los túbulos seminíferos son inmóviles, por lo que son incapaces de fertilizar. Los espermatozoides presentes en la cabeza del epidídimo son todavía inmóviles, y conforme se encuentren en las partes más distales del epidídimo van adquiriendo su capacidad para la movilidad progresiva⁽⁴⁵⁾. Los espermatozoides adquieren su mayor movilidad progresiva después de la eyaculación. Con la eyaculación, los espermatozoides se mezclan con las sustancias secretadas por las vesículas seminales, que son liberadas en la última fracción de la eyaculación.

Una de las características funcionales de las vesículas seminales es que sus productos de secreción como el bicarbonato⁽⁴⁹⁾, la prolactina⁽⁵⁶⁾ y las prostaglandinas⁽⁶⁾ estimulan la movilidad de los espermatozoides, y que la hipofunción de las vesículas seminales consistentemente se asocia a astenozoospermia^(26,28,29,32,35).

La hipofunción de las vesículas seminales puede deberse a una deficiente estimulación androgénica o a un proceso obstructivo a nivel de los conductos excretorios de las vesículas seminales. El proceso obstructivo es debido principalmente a la presencia de un proceso inflamatorio⁽²⁹⁾. Tal como se ha demostrado en el presente estudio la principal causa de hipofunción de las vesículas seminales en la población evaluada fue la leucocitospermia y/o historia de ETS.

El presente trabajo también demuestra que los varones con bajos niveles de testosterona sérica tienen también una menor movilidad de los espermatozoides, tal como ha sido demostrado en anterior estudio^(23,26).

ESTABILIDAD DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA

El eyaculado de varones fértiles contiene espermatozoides en diferentes grados de estabilidad nuclear⁽⁵⁾. Cuando los espermatozoides de estos varones fértiles son expuestos a un detergente como el sodio dodecil sulfato (SDS), se mantiene en alto porcentaje (893%) la estabilidad de la cromatina nuclear⁽¹⁰⁾.

La inestabilidad de la cromatina espermática ha sido identificada como causa de infertilidad masculina^(13,14,32,42,50). Normalmente, la descondensación de la cromatina espermática y el hinchamiento del núcleo ocurre cuando el espermatozoide ha penetrado el citoplasma del oocito⁽⁵⁹⁾; si la descondensación ocurre antes de este proceso se presenta la infertilidad⁽⁴⁾.

La cromatina nuclear en el espermatozoide es altamente condensada debido a las uniones S-S entre sus unidades de histona⁽⁴⁶⁾. La ruptura de estos enlaces se puede producir in vitro cuando se incuban espermatozoides con sodio dodecil sulfato y el ácido etileno diamino tetra acético (EDTA). El EDTA actúa sobre el zinc que está unida a los tioles removiéndolos y dejando libre a los tioles, los que favorecen la descondensación^(38,55). El núcleo de los espermatozoides al momento de la eyaculación capta una cantidad apreciable de zinc⁽⁸⁾, que estabiliza la estructura cuaternaria de la cromatina espermática⁽⁴⁰⁾.

Cuando el espermatozoide penetra el oocito se activan los tioles endógenos los cuales rompen los puentes sulfhidrilo y favorecen la descondensación de la cromatina. Es de esperar, que si el espermatozoide penetra el oocito y no ocurre la descondensación de la cromatina espermática se presente la infertilidad. Los estudios en nuestro laboratorio ha permitido identificar la existencia de hiperestabilidad de la cromatina, y se

ha asociado a esta situación como una causa también de infertilidad masculina^(15,36). Gopalkrishnan y col⁽¹⁸⁾ han demostrado que los sujetos con hiperestabilidad de la cromatina frente al SDS+EDTA no lograron fertilizar los oocitos en una programa de fertilización in vitro, lo que demuestra la importancia de esta patología como causa de infertilidad masculina.

RESPUESTA AL CLOMIFENO

Los datos del presente estudio demuestran que el citrato de clomifeno produce un incremento significativo en los niveles de LH, FSH, testosterona total y testosterona libre. En nuestro grupo de estudio, el 11.9% de los varones no respondieron al citrato de clomifeno con un incremento en los niveles de testosterona sérica. El hallazgo de que no todos los sujetos respondieron al citrato de clomifeno aumentando los niveles de testosterona sérica por encima del basal, está en concordancia con dos reportes previos^(23,53). Es importante anotar que el 100% de los varones que no respondieron al citrato de clomifeno tuvieron niveles basales de testosterona sérica dentro de los límites normales.

La movilidad de los espermatozoides no mejora después del tratamiento con clomifeno en la población global del presente estudio, pero si en aquellos que aumentan la función de las vesículas seminales como efecto del tratamiento con el citrato de clomifeno. Se ha sugerido que la testosterona tiene un efecto sobre la movilidad de los espermatozoides⁽¹⁶⁾. Los resultados de nuestro estudio demuestran que este efecto no es directo sino mediado a través de secreciones de las vesículas seminales, entre otras.

En efecto, el análisis multivariado realizado para evaluar la respuesta de la movilidad de los espermatozoides en función del estímulo con el clomifeno demuestra que la movilidad mejora como una función del valor de la fructosa corregida verdadera y no de la testosterona por se.

En resumen los resultados del presente estudio demuestran que la fructosa corregida verdadera es un buen marcador de la función de las vesículas seminales, y que la hipofunción de las vesículas seminales se asocia a hiperviscosidad seminal, astenozoospermia, e hiperestabilidad de la cromatina espermática. El citrato de clomifeno es un adecuado fármaco tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de la hipofunción de las vesículas seminales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amelar RD. Coagulation, liquefaction and viscosity of human semen. *J Urol* 1962; 87: 187-190.
2. Aumuller G, Riva A. Morphology and functions of the human seminal vesicle. *Andrologia* 1992; 24: 183-196.
3. Azarian HP, Drampian TS, Tatevosian LA. Main causes and frequency of male infertility in infertile couples. En: *Diagnosis and treatment of infertility*. PJ Rowe y EM Vikhlyayeva (Ed). Toronto:Hans Huner Publishers. 1988; 111-116.
4. Bedford JM. Oocyte structure and the design and function of the sperm head in eutherian mammals. In: Andre J, editor. *The Sperm Cell*. London: Academic Press, 1983:75-89.
5. Bedford JM, Bent MJ, Calvin H. Variations in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa. *J Reprod Fert* 1973;33: 19-29.
6. Bendvold E, Svanborg K, Eneroth P, Gottlieb C, Bygdeman M.

- The natural variations in prostaglandins concentrations in human seminal fluid and its relation to sperm quality. *Fertil Steril* 1984; 41: 743-747.
7. Bjorndahl L, Kvist U. Influence of seminal vesicular fluid on zinc content in human sperm chromatin. *Int J Androl* 1990;13:232-7.
 8. Bjorndahl L, Kjellberg S, Roomans GM, Kvist U. The human sperm nucleus takes up zinc at ejaculation. *Int J Androl* 1986; 9:77-80.
 9. Bjorndahl L, Kjellberg S, Kvist U. Ejaculatory sequence in men with low sperm chromatin-zinc. *Int J Andrology* 1991;14:174-8
 10. Blazak WF, Overstreet JW. Instability of nuclear chromatin in the ejaculated spermatozoa of fertile men. *J Reprod Fert* 1982;65:331-9.
 11. Cates W, Farley TMM, Rowe PJ. Patterns of infertility in the developed and developing worlds. En: *Diagnosis and treatment of infertility*. PJ Rowe y EM Vikhlyeva (Ed). Toronto:Hans Huner Publishers. 1988; 57-67
 12. Coffey DS. Androgen action and sex accessory tissues. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill J (eds). New York: Raven Press. 1988: 753-836.
 13. Eliasson R., Engqvist AM. Chromatin stability of human spermatozoa in relation to male fertility. *Intern J Androl Suppl*. 1980;3:73-4.
 14. Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varotto A. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Intern J Androl* 1992;15:330-7.
 15. García J, Góñez C, Gonzales GF, Villena A. Niveles de testosterona sérica y seminal en respuesta al citrato de clomifeno en varones que acuden a un centro de infertilidad. *Rev Per. Endocrinol. Metab*. 1997;3:95-101.
 16. Gerhard I, Lenhard HK, Eggert-Kruse W, Runnebaum B. Hormone load tests in infertile male patients. *Arch. Androl*. 1991; 27:129-148.
 17. Gonzales GF. Infertilidad En: *Manual de Diagnóstico y Manejo de la Pareja Infértil*. Gonzales GF (ed). Ediciones IIA:Lima. 1991.
 18. Gonzales GF. Infertilidad. En: *Andrología. Fertilidad e Infertilidad*. Gonzales GF (ed). Ediciones IIA:Lima. 1992:131-148.
 19. Gonzales GF. Rol de la serotonina en la infertilidad masculina. Tesis Doctoral. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 1985
 20. Gonzales GF. Contribución al conocimiento de la fisiología reproductiva masculina. En: *Andrología. Fertilidad e Infertilidad*. Gonzales GF (ed). Ediciones IIA:Lima. 1992a: 113-127.
 21. Gonzales GF. Infecciones en el tracto reproductivo masculino. En: *Andrología. Fertilidad e Infertilidad*. Gonzales GF (ed). Ediciones IIA:Lima. 1992b: 149-163.
 22. Gonzales GF. Functional structure and ultrastructure of seminal vesicles. *Arch Androl* 1989; 22:1-14.
 23. Gonzales GF. Test for androgen activity at the male reproductive tract in infertile men. *Arch Androl* 1994; 32: 235-242.
 24. Gonzales GF. Corrected seminal fructose test. *Arch Androl* 1994a; 33: 17-22
 25. Gonzales GF, García-Hjarles MA, Napuri R, Coyotupa J. Corrected seminal fructose levels: A new method of seminal quality evaluation. *Acta Med Peruana* 1986; 13:31-40.
 26. Gonzales GF, García-Hjarles M, Napuri R. Corrected seminal fructose levels: An index of the secretory activity of the seminal vesicles. *Arch Androl*. 1988;21:135-142
 27. Gonzales GF, García-Hjarles MA, Napuri R, Coyotupa J. Blood serotonin levels and male infertility. *Archives of Andrology*. 1989; 22:85-90.
 28. Gonzales GF, García-Hjarles MA, Velásquez G, Coyotupa J. Seminal prolactin and its relationship to sperm motility in men. *Fertility and Sterility* 1989;51: 498-503.
 29. Gonzales GF, García-Hjarles M, Gutierrez R, Guerra-García R. The secretory activity of the seminal vesicles and its relationship with sperm motility: Effects of the infections in the male reproductive tract. *Inter J Androl* 1989a;12:286-94.
 30. Gonzales GF, Velásquez G, García-Hjarles MA. Hypoprolactinemia as related to seminal quality and serum testosterone. *Archives of Andrology*. 1989c; 23: 259-266.
 31. Gonzales GF, García MA. Blood/seminal serotonin levels in infertile men with varicocele. *Archives of Andrology*. 1990; 24: 193-199.
 32. Gonzales GF, Kortebeani G, Mazzolli AB. Leukocytospermia and function of the seminal vesicles on seminal quality. *Fertil Steril* 1992;57:1058-65.
 33. Gonzales GF, Kortebeani G, Mazzolli AB. Hyperviscosity and hypofunction of the seminal vesicles. *Arch Androl* 1993; 30: 63-68
 34. Gonzales GF, Sánchez A. High sperm chromatin stability in semen with high viscosity. *Arch Androl* 1994;32:31-5.
 35. Gonzales GF, Villena A. Influence of low corrected seminal fructose levels on sperm chromatin stability in semen from men attending an infertility service. *Fertil Steril* 1997; 67: 763-768.
 36. Gonzales GF, Salirrosas A, Torres D, Sánchez A, Villena A. Use of clomiphene citrate in the treatment of men with high sperm chromatin stability. *Fertil Steril* 1998; 69:1109-1115.
 37. Gonzalez-Estrella J, Coney P-J, Ostash K, Karabinus D. Dithiothreitol effects on the viscosity and quality of human semen. *Fertil Steril* 1994; 62: 1238-1243.
 38. Gopalkrishnan K, Hinduja IN, Anand Kumar TC. In vitro decondensation of nuclear chromatin of human spermatozoa: assessing fertilizing potential. *Arch. Androl*. 1991; 27:43-50.
 39. Harrison RF. The role of infection in infertility. En: *Diagnosis and treatment of infertility*. PJ Rowe y EM Vikhlyeva (Ed). Toronto:Hans Huner Publishers. 1988; 81-92.
 40. Huret JL. Nuclear chromatin decondensation of human sperm. *Arch Androl* 1986;16:97-109.
 41. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Pérez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm characteristics. *J Reprod Fert* 1984;70:219-28.
 42. Kjellberg S, Bjorndahl L, Kvist U. Sperm chromatin stability and zinc binding properties in semen from men in barren unions. *Int J Androl* 1992;15:103-13.
 43. Kvist U, Kjellberg S, Bjorndahl L, Soufir JC, Arver S. Seminal fluid from men with agenesis of the Wolffian ducts: zinc-binding properties and effects on sperm chromatin stability. *Int J Androl* 1990;13:245-52.
 44. Lewis-Jones DI, Aird IA, Biljan MM, Kingsland CR. Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma. *Hum Reprod* 1996; 11:2465-2467.
 45. Majumder GC, Dey CS, Haldar S, Barua M. Biochemical

- parameters of initiation and regulation of sperm motility. *Arch. Androl.* 1990; 24:287-303.
46. Marushige Y, Marushige K. Properties of chromatin isolated from bull spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1974; 340:498-508.
47. Mazzilli F, Rossi T, Marchesini M, Ronconi C, Dondero F. Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. *Fertil. Steril* 1994; 62:862-868.
48. Nieschlag E, Freischem CW. Androgen therapy in hypogonadism and infertility. En: Bain J, Schill W, Schwarzstein L, editors. *Treatment of male infertility*. Berlin:Springer, 1982;103-115.
49. Okamura N, Tajima Y, Ishikawa H, y col. Lowered levels of bicarbonate in seminal plasma cause the poor sperm motility in human infertile patients. *Fertil Steril* 1986; 45: 265-272.
50. Pasteur X, Laget BAP, Jourlin M, Laurent LJ. *in vitro* decondensation of the human spermatozoon nucleus and image analysis. Quantitative data on the kinetics of *in vitro* decondensation of the human spermatozoon nucleus. *Acta Eur Fertil* 1984;15:478-86.
51. Rajalakshmi M, Sharma RS, David GFX, Kapur MM. Seminal fructose in normal and infertile men. *Contraception* 1989; 39: 299-306.
52. Rowe PJ, Farley TMM. The standardized investigation of the infertile couple. En: *Diagnosis and treatment of infertility*. PJ Rowe y EM Vikhlyeva (Ed). Toronto:Hans Huner Publishers. 1988; 15-40
53. Schellen AM. Clomiphene citrate in the treatment of male infertility. En: Bain J, Schill W, Schwarzstein L., editors. *Treatment of male infertility*. Berlin:Springer, 1982; 33-44.
54. Tenover JS, Matsumoto AM, Plymate SR, Bremmer WJ. The effects of aging in normal men on bioavailable testosterone and luteinizing hormone secretion: response to clomiphene citrate. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 1118-1126.
55. Vallee BL, Williams R, Coleman IT. Nitrogen and sulphur of the active centre of carboxypeptidase. *Nature* 1961; 190:633-634.
56. Velásquez.-Ramírez A, Vilar-Rojas C, Hicks JJ. Similar effects of prolactin and dbcAMP upon spermatozoa metabolism. *Int J Androl* 1980; 3:23-31.
57. Wilson VB, Bunge RG. Infertility and semen non-liquefaction. *J Urol* 1975; 113: 509-510.
58. World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*, 2nd ed. Cambridge, UK: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1987.
59. Yanagimachi R. Fertilizing capacity of human spermatozoa. In: Spera G, de Kretser DM, editors. *Morphological basis of Human Reproductive Function*. New York and London: Plenum Press, 1987:175-86.