

Nuevos enfoques en el estudio y diagnóstico de la infertilidad masculina. Aportaciones de la investigación básica al conocimiento de la función espermática

Mayel Chirinos^{a,*}, Pedro Caballero Campo^{b,*}, María Dolores Martín Rodrigo^b, María Elena González González^a, Fernando Larrea^a, Rocío Núñez Calonge^b y Pedro Caballero Peregrín^b

^aDepartamento de Biología de la Reproducción. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México D.F. México.

^bLaboratorio de Andrología. Unidad de Reproducción Humana. Clínica Tambre. Madrid. España.

RESUMEN

En años recientes se ha observado en el ámbito mundial un aumento en la incidencia de problemas de fertilidad, especialmente en los países desarrollados. Las causas de infertilidad pueden ser diversas pero se estima que en aproximadamente la mitad de los casos está involucrado el factor masculino, a pesar de lo cual la investigación en materia de diagnóstico y tratamiento de la infertilidad en el varón ha avanzado poco. Una de las etapas más importantes de la fecundación la constituye el reconocimiento de la zona pelúcida (ZP) por el espermatozoide, ya que la ZP actúa como una barrera entre el gameto masculino y el femenino. La interacción entre el espermatozoide y la ZP está mediada por receptores específicos, capaces de inducir la reacción acrosómica o exocitosis acrosomal en el espermatozoide, e iniciar el proceso de penetración de la ZP que culmina con la fusión con el ovocito. Por lo tanto, alteraciones en el mecanismo de reconocimiento de esta estructura por parte del espermatozoide impedirían la formación del cigoto. Estudiar esta etapa de la fecundación podría ser de gran relevancia para ayudar al clínico a seleccionar el tratamiento más adecuado a cada pareja infértil. No obstante, la dificultad para obtener ZP humana nativa para su estudio ha limitado los avances de esta área de la investigación en medicina de la reproducción. En esta revisión se resumen los esfuerzos realizados hasta ahora para diagnosticar disfunciones en el reconocimiento entre el espermatozoide y la ZP en humanos, así como los nuevos enfoques que se están empleando para estudiar y comprender esta importante etapa de la fecundación.

Palabras clave: Infertilidad. Factor masculino. Reproducción humana. Zona pelúcida.

ABSTRACT

New perspectives in the study and diagnosis of male infertility. Contributions of basic research to knowledge of sperm function

Higher incidence of infertility problems has been observed in recent years, specially in developed countries. The infertility causes may be diverse, but it is estimated that approximately half of the cases are related to male factor. However, basic and applied research on male infertility did not generate much interest. One of the key stages in the fertility process is related to the sperm zona pellucida (ZP) recognition, ZP acts as a barrier between the male and female gamete. The interaction between sperm and ZP is mediated by specific receptors. They are capable of inducing acrosome reaction or acrosomal exocytosis on sperm cells, and to start the ZP penetration process which culminates with oocyte fusion. Therefore, defects on sperm recognizing this structure may inhibited zygote formation. To study this stage of the fertilization process may help the clinician choosing the most accurate treatment for the infertile couple. Nevertheless, difficulties to obtain native ZP have limited the advances in this specific area of research in reproductive medicine. In this review, we summarize, up to date, the efforts realized towards the diagnosis of the malfunctions in the recognition between human sperm and the ZP, including the new approaches focus on studying and understanding this key stage on the fertilization process.

Key words: Infertility. Male factor. Human reproduction. Zona pellucida.

*Estos autores han contribuido por igual en este artículo.

Correspondencia: Dr. P. Caballero Campo.
Unidad de Reproducción Humana. Clínica Tambre.
Tambre, 8. 28002 Madrid. España.
Correo electrónico: caballero campo@clinicatambre.com

INTRODUCCIÓN

La infertilidad es un problema de salud que actualmente afecta del 10 al 15% de las parejas en edad reproductiva en el mundo; donde aproximadamente el 50% de los casos presenta alteraciones de la función reproductiva del varón como su causa primaria o en combinación con problemas de la pareja femenina¹.

En los últimos 30-50 años ha aumentado la incidencia de problemas de infertilidad masculina, la cual se ha manifestado principalmente como una disminución de la cuenta espermática en la población y un aumento de la incidencia de ciertas anomalías del desarrollo, como hipospadias y criptorquidia. Muchos son los causantes que se han postulado como responsables de este detrimento en el éxito reproductor, entre los cuales se cuentan el aumento del promedio de la edad reproductora, factores ambientales y el estrés².

En España, aunque todavía no hay estudios epidemiológicos de infertilidad realizados mediante encuestas, se estima que aproximadamente el 15% de las parejas que desean tener un hijo no puede satisfacer su deseo reproductor³, lo que implica una incidencia de parejas infértiles superior a 600.000, y cada año se presentan más de 3.000 nuevos casos. Del total de parejas infértiles, aproximadamente un 40% es por causa femenina, un 40% por causa masculina y el 20% restante se considera de causa mixta, o esterilidad de origen desconocido (EOD).

A pesar de la alta incidencia de problemas de fertilidad en el varón, poco se conoce acerca de la naturaleza de las disfunciones en el espermatozoide humano⁴. El estudio de la función espermática, incluido el nivel molecular dentro de la reproducción del varón, lo que algunos autores denominan "espermología", es un campo de investigación básica que fue relegado a un segundo plano durante la década de los noventa. El éxito de algunas técnicas de reproducción asistida como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), donde sólo se requiere de un espermatozoide para ser introducido directamente en el citoplasma del ovocito y formar así un cigoto, contribuyó a solventar un elevado número de casos de infertilidad sin necesidad de impulsar la investigación básica y clínica del campo. Sin embargo, el uso indiscriminado de esta técnica se comienza a cuestionar. Desde el punto de vista biomédico, hasta la fecha no hay un criterio mejor que la valoración morfológica del embriólogo para la selección del espermatozoide que hay que emplear. Sin embargo, se desconocen las consecuencias a largo plazo de un uso abusivo de la ICSI, y finalmente, cabe mencionar que parejas sin diagnóstico de infertilidad preciso (EOD), pero tratadas con ensayos de fecundación *in vitro* (FIV)/ICSI, siguen

sin quedar gestantes, aunque en algunos casos mejore el diagnóstico (fallo de fecundación). Por otro lado, el factor económico y el coste que para las parejas y para la sociedad representa el uso de estas técnicas, hace necesario un mejor conocimiento de los mecanismos implicados en determinadas causas de infertilidad.

La infertilidad o subfertilidad masculina es un problema común con una etiología compleja. Habitualmente el diagnóstico del varón infértil se basa en la realización de un seminograma, que consiste en un estudio descriptivo de la calidad del semen donde, fundamentalmente, se evalúan el número de espermatozoides presentes en el eyaculado, su movilidad y su morfología. Mediante esta prueba es posible detectar disfunciones asociadas con una baja concentración de espermatozoides (oligozoospermia), con una baja movilidad espermática (astenozoospermia) o con una abundancia de morfología anormal (teratozoospermia), si bien es relativamente frecuente encontrar una alteración simultánea de las 3 variables (oligoastenoteratozoospermia). Hasta ahora, parece que la variable morfométrica con mejor valor predictivo de fertilidad es la presencia de una alta proporción de espermatozoides con morfología normal en el semen⁵. Sin embargo, el potencial diagnóstico del seminograma descriptivo es limitado ya que muchos varones infértiles presentan valores normales en la evaluación espermática, y con los métodos diagnósticos disponibles en la actualidad no resulta posible encontrar la causa de su disfunción. En estos casos se infiere que el problema es de origen molecular, por lo que para atender de manera adecuada a estos pacientes ha sido necesario impulsar el desarrollo de nuevas aproximaciones diagnósticas que permitan evaluar la función espermática y detectar la raíz de estos problemas. Para ello, se han desarrollado ensayos *in vitro* que evalúan diferentes variables asociadas al buen funcionamiento espermático, como la integridad del ADN nuclear y mitocondrial, la capacidad de penetrar el moco cervical o de fusionarse con el ovocito, con valores predictivos variables.

INTERACCIÓN ENTRE EL ESPERMATOZOIDE Y LA ZONA PELÚCIDA: ETAPA CRÍTICA DURANTE LA FECUNDACIÓN

La capacidad reproductiva del varón adulto está condicionada por la espermatogénesis, la cual permite la producción continuada de un número adecuado de gametos masculinos funcionalmente competentes. Las alteraciones de este proceso dan cuenta de gran parte de los casos de infertilidad masculina. En este sentido, los avances científicos de mayor interés co-

responden a los avances diagnósticos de la genética clínica (FISH con espermatozoides) y la posibilidad de conseguir la maduración de células germinales en modelos experimentales (cultivos de células precursoras espermáticas).

Además de la espermatogénesis, hay otros mecanismos implicados en la adquisición de la capacidad fecundante por un espermatozoide que son igualmente importantes y escasamente conocidos, como la capacitación espermática y los eventos previos a la fusión con el ovocito. Una de las etapas más importantes durante la fecundación la constituye el reconocimiento y penetración de la zona pelúcida (ZP), la cual es la matriz extracelular que rodea al ovocito. Para que la fusión de gametos tenga lugar, es indispensable que el espermatozoide sea capaz de atravesar dicha matriz, para finalmente alcanzar la membrana plasmática del huevo. El reconocimiento de la ZP por el espermatozoide está mediado por receptores específicos capaces de inducir cambios en el espermatozoide que lo habilitan para penetrar esta estructura. En vista de que el reconocimiento de la ZP por los espermatozoides es un paso crucial para la formación del cigoto, alteraciones de este proceso podrían ser limitantes del éxito de la fertilización, y algunas investigaciones apuntan a que este tipo de disfunciones es relativamente común. Por ejemplo, un estudio ha demostrado que en individuos oligozoospermicos hay una alta incidencia de defectos en la interacción espermatozoide-ZP⁶. Además, hay evidencia de que la causa principal del fracaso en los procedimientos de FIV realizados en las clínicas de reproducción asistida es la presencia de alteraciones en el espermatozoide que limitan su capacidad para reconocer y penetrar esta estructura⁷. Por otra parte, se considera que los análisis de unión de espermatozoides a la ZP tienen el mayor valor predictivo de éxito de la fertilización de todas las pruebas disponibles en las clínicas de reproducción asistida, si bien más del 75% de los espermatozoides de una muestra de semen proveniente de un varón fértil y sano no es capaz de unirse a la ZP⁸. Todo esto sugiere que hay una población considerable de varones que presenta infertilidad como consecuencia de una disminución en la cantidad de espermatozoides en el semen capaz de interactuar con la ZP, que requiere de un apropiado diagnóstico y tratamiento.

MECANISMO DE PENETRACIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA POR EL ESPERMATOZOIDE Y MOLÉCULAS INVOLUCRADAS

Para poder detectar defectos en la interacción entre el espermatozoide y la ZP es necesario comprender la

secuencia de eventos que ocurre durante la fecundación. Antes de que la fusión de gametos ocurra, el espermatozoide debe pasar por un proceso de maduración en el tracto femenino que lo habilita para fertilizar, proceso conocido como capacitación. En éste está implicada la aparición de la hiperactivación de la movilidad espermática, un tipo de movilidad vigorosa y no progresiva que está regulada por sustancias secretadas o presentes en el tracto reproductor femenino⁹⁻¹¹. Paralelamente, el espermatozoide adquiere su máxima capacidad de fecundación. Posteriormente, cuando el espermatozoide alcanza la ZP, el reconocimiento de esta estructura desencadena la reacción acrosomal, que es un episodio excitotóxico que permite la liberación al medio extracelular de enzimas contenidas en el acrosoma del espermatozoide, las cuales son necesarias para la digestión y penetración de la ZP¹². Si bien se ha observado que este fenómeno puede ser inducido por otras moléculas (como la progesterona), la adecuada estimulación de la reacción acrosomal por parte de ligandos ubicados en la ZP permite que las enzimas liberadas actúen sobre el sustrato indicado para que el espermatozoide pueda finalmente alcanzar el ovocito^{13,14}. Tanto la movilidad espermática como la reacción acrosómica son indispensables para la correcta fecundación del ovocito.

Además de su participación durante el proceso de exocitosis acrosomal, la ZP cumple otras funciones importantes, como bloquear la entrada de otros espermatozoides al espacio perivitelino, evitando la polispermia, y proteger al embrión hasta el momento de la implantación en el útero. A pesar de las múltiples funciones que cumple, la ZP en humanos está conformada básicamente por 4 proteínas, conocidas como ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4¹⁵. Estas proteínas se caracterizan por estar altamente glucosiladas y presentar un elevado grado de homología, tanto entre ellas como con las proteínas ZP de otras especies, lo que ha llevado a identificar y caracterizar familias de proteínas cuya nomenclatura se ha revisado recientemente¹⁶. Los carbohidratos son responsables de la elevada heterogeneidad observada en las proteínas ZP y se han implicado en el mecanismo de reconocimiento de la ZP por el espermatozoide en otras especies. En ratones, la bioactividad de la ZP3 como receptora del espermatozoide se ha atribuido a la presencia de residuos de α 1-3-galactosa en el extremo carboxilo terminal de la proteína¹⁷ y a la presencia de N-acetilglucosamina¹⁸. Sin embargo, estos resultados obtenidos in vitro se contradicen con otros provenientes de estudios in vivo con ratones *knockout*, donde se ha encontrado que ratones hembra carentes de la enzima glicosiltransferasa, necesaria para glucosilar residuos

terminales con α 1-3-galactosa, son fértiles¹⁹. De igual modo, ratones macho privados del receptor putativo para la N-acetilglucosamina en la superficie del espermatozoide son capaces de fecundar²⁰. En todo caso, hay evidencia de que el esqueleto peptídico es esencial para el reconocimiento espermático de la ZP, ya que al expresar proteínas de la ZP de primates en bacterias (donde las proteínas no se glucosilan), éstas han demostrado su capacidad de unirse a espermatozoides de la misma especie²¹.

La ZP del ratón ha sido el modelo más utilizado para el estudio de la estructura de la ZP y su papel en el reconocimiento por el gameto masculino²². Sin embargo, a pesar de la alta homología de las proteínas que conforman la ZP, se ha observado que posee características específicas para cada especie. Por ejemplo, mientras que en ratones hay numerosas evidencias que indican que la proteína ZP3 es el receptor espermático capaz de inducir la reacción acrosomal del espermatozoide^{13,23}, en conejo se ha demostrado que la ZP4 recombinante (r55) se une a la superficie anterior del acrosoma y que anticuerpos contra esta proteína inhiben la unión espermática²⁴, y en el cerdo se ha visto que la ZP4 (ZPB) se une al espermatozoide formando un complejo con la proteína ZP3 (ZPC)²⁵. En vista de la complejidad observada en el mecanismo de unión entre el espermatozoide y la ZP y sus variantes según la especie analizada, no es posible extrapolar al humano los resultados observados en otros mamíferos. Sin embargo, el estudio de los mecanismos de reconocimiento entre el espermatozoide y la ZP en humanos se ha enfrentado a una limitante, derivada de la dificultad de obtener material biológico para la realización de estudios básicos y clínicos con las posibles implicaciones éticas y legales derivadas de su uso para investigación. Como resultado de ello, pocos son los estudios acerca de la estructura y funcionamiento de la ZP realizados en humanos y ha sido necesario el desarrollo e implantación de modelos biológicos alternativos adecuadamente validados para su estudio.

El advenimiento de nuevas metodologías en biología molecular ha abierto la posibilidad de diseñar nuevas estrategias experimentales para el estudio y caracterización funcional de las proteínas que constituyen la ZP humana. Así, estas proteínas se han clonado y expresado en diferentes sistemas de expresión con el objeto de estudiar su bioactividad sobre el espermatozoide. De este modo, se ha visto que la ZP3 humana recombinante expresada en células de ovario de hámster chino (CHO) es capaz de inducir la reacción acrosomal e iniciar el proceso de fusión del espermatozoide con ovocitos de hámster²⁶, si bien la misma proteína expresada en la línea celular 293T no tiene

actividad biológica sobre el espermatozoide²⁷. De igual modo, hay evidencias que sugieren que la proteína ZP4 humana recombinante es capaz de unirse al espermatozoide y desencadenar la exocitosis acrosomal^{28,29}. Por otra parte, se ha observado que anticuerpos contra la región aminoterminal de la ZP2 (ZPA) humana inhiben la unión de espermatozoides humanos a la ZP nativa homóloga³⁰. Todo lo anterior sugiere la existencia de varios ligandos en la ZP para diferentes receptores espermáticos, los cuales aún no se han identificado plenamente y se desconoce el papel que cada uno jugaría durante la fertilización. Algunas de las moléculas espermáticas identificadas capaces de unirse a la ZP son la p66 de origen epididimal³¹, la SLLP1 intraacrosomal³² y el antígeno de fertilización FA-1³³. Un estudio acerca del receptor de glicina del espermatozoide (GlyR) ha determinado que tiene la habilidad de unirse a la ZP3 humana recombinante y que ambas moléculas participan durante la reacción acrosomal inducida por la ZP³⁴, pero para la mayoría de las moléculas espermáticas analizadas se desconoce su contraparte en la superficie de la ZP. De todo esto se concluye que la investigación acerca de los mecanismos que regulan la interacción espermatozoide-ZP en humanos ha avanzado poco, y sin embargo sus posibles implicaciones para comprender las etapas tempranas de la fertilización son innumerables, conocimiento que además es esencial para el desarrollo de metodología diagnóstica para el varón infértil así como para la implementación de tratamientos más apropiados para asistirlo. Además, a este respecto hay que considerar que las técnicas de reproducción asistida son generalmente costosas y la correcta canalización hacia una técnica u otra repercutiría en beneficios económicos tangibles para los pacientes y, en última instancia, la sociedad. Por lo tanto, las clínicas de reproducción asistida requieren de una prueba que les permita diagnosticar las enfermedades relacionadas con el reconocimiento espermatozoide-ZP de una forma sencilla y confiable.

MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFERTILIDAD MASCULINA DERIVADA DE DISFUNCIONES EN EL ESPERMATOZOIDE PARA RECONOCER LA ZONA PELÚCIDA

Hasta ahora, la metodología que se ha empleado más comúnmente para estudiar la capacidad de una muestra de semen de unirse a la ZP, y diagnosticar defectos en este proceso, ha sido el ensayo de hemizona, donde a partir de un ovocito se recupera la ZP, que se divide en 2 mitades (hemizonas): una para incubar con una muestra de semen-problema, y otra con una muestra de semen-control, con el objeto de tener una

medida relativa de la habilidad de los espermatozoides-problema de unirse a la ZP³⁵. Este ensayo ha sido de gran utilidad en innumerables estudios, pero ha caído en desuso debido a la laboriosidad de la técnica y a la limitada disponibilidad de ZP nativa para su realización. Por esta razón, en los últimos años investigadores en todo el mundo han intentado desarrollar nuevos métodos que permitieran diagnosticar de una manera más sencilla las deficiencias de una muestra de semen para interactuar con la ZP. Para ello se evalúa alguno de los episodios necesarios para la culminación de esta etapa de la fertilización (unión, reacción acrosomal o penetración de la ZP) o varios de ellos al mismo tiempo. Cabe destacar algunas de las técnicas desarrolladas con el objeto de obtener el máximo aprovechamiento de las ZP nativas disponibles, como la prueba de inducción de la reacción acrosomal con ZP solubilizada (ZIAR)³⁶, para la cual se puede emplear hasta un cuarto de ZP por muestra, pero aún requiere del uso de un micromanipulador y destreza en técnicas sofisticadas. Sin embargo, todos los ensayos que requieren de la obtención de ZP nativa tienen el inconveniente del limitado acceso a este recurso. Además, la idoneidad del uso de ZP nativa en ensayos de unión de espermatozoides es motivo de controversia, ya que generalmente se obtienen a partir de ovocitos inmaduros o embriones que no se desarrollan adecuadamente luego de ensayos de FIV y se ha descrito que hay diferencias entre las proteínas de la ZP provenientes de estas 2 fuentes³⁷. Antes de usar este material, no es posible hacer un control de calidad para determinar si las ZP son defectuosas y, por ende, responsables del fracaso de los ensayos de unión. Todo lo anterior ha impedido que este tipo de pruebas se instauraran como ensayos de rutina clínica y, por consiguiente, los casos de infertilidad ocasionados por problemas de reconocimiento entre la ZP y el espermatozoide, aún hoy, contribuyen al abultado grupo de parejas infértiles sin diagnóstico.

En la actualidad, las investigaciones se inclinan más hacia el empleo de proteínas recombinantes de la ZP como sondas para estudiar la respuesta de los espermatozoides a éstas. La principal ventaja de emplear proteínas ZP recombinantes es la posibilidad de obtener grandes cantidades de proteína, del orden de miligramos, lo que es equivalente a la extracción de la ZP de 200.000 ovocitos. Sin embargo, es imprescindible determinar la bioactividad de las proteínas recombinantes sobre espermatozoides de varones fértiles, ya que los diferentes sistemas de expresión que hay dan lugar a proteínas con diferencias sutiles, pero que pueden ser cruciales para la función que deben cumplir. Para evaluar su actividad sobre las diferentes etapas de la interacción espermatozoide-ZP se han empleado di-

versos abordajes experimentales, llevando a cabo incubaciones en fase sólida o líquida y detectando la respuesta espermática mediante la evaluación directa o indirecta de los efectos de estas proteínas sobre el espermatozoide. Por ejemplo, distintos estudios han utilizado la ZP3 humana expresada en células CHO, para evaluar su efecto sobre la reacción acrosomal en fase líquida, y se ha encontrado que es capaz de inducir la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados de manera equivalente al ensayo de ZIAR³⁸. Si bien el peso molecular de la ZP3 expresada en estas células es inferior al observado en la proteína nativa, a causa de diferencias en el patrón de glucosilación, se ha demostrado que esas discrepancias no influyen en la capacidad de reconocimiento de esta molécula por parte de la superficie del espermatozoide²⁶.

Sin embargo, el deseo de desarrollar pruebas diagnósticas que sean rápidas, confiables y de bajo coste están llevando a los científicos a emplear otras aproximaciones. Por ejemplo, se han empleado sistemas de transcripción y traducción simultánea sobre perlas de agarosa para sintetizar ZP3 humana y usarlas en ensayos de unión de espermatozoides³⁹, lo que sugiere que es posible el desarrollo de un método diagnóstico en fase sólida para evaluar la capacidad fecundante de una muestra de semen basado en su habilidad para unirse a proteínas de la ZP. Los ensayos de unión en fase sólida constituyen un sistema prometedor para la evaluación de la capacidad de unión de espermatozoides a proteínas recombinantes de la ZP, ya que permiten asociar un marcador cuantificable al complejo espermatozoide-ZP.

PERSPECTIVAS

La interacción entre el espermatozoide y la ZP ha sido motivo de estudio desde hace algunos años, debido principalmente al papel fundamental de este episodio para que el proceso de fertilización sea exitoso. Sin embargo, el conocimiento de los sucesos que ocurren en esta etapa de la unión de gametos en el humano es escaso, debido a la dificultad para obtener suficiente ZP nativas para su estudio. Estudiar e identificar las moléculas involucradas en el reconocimiento entre la ZP y el espermatozoide en humanos repercutiría en un mejor conocimiento del fenómeno de la fertilización, cuyo valor desde un enfoque básico es indiscutible. Pero además, estos estudios pueden abrir la puerta para el diagnóstico y tratamiento de alteraciones que afectan el proceso reproductivo en el humano que en la actualidad se desconocen.

Gracias al uso de proteínas ZP humanas recombinantes, que se pueden producir en grandes canti-

dades, ahora es posible hacer estudios exhaustivos acerca de esta estructura y su función en el reconocimiento de gametos. Además, se pueden utilizar para la identificación de los receptores espermáticos correspondientes, información que podría ser de provecho tanto para la comprensión y diagnóstico de algunas enfermedades reproductivas, como para el desarrollo de nuevas aproximaciones en el desarrollo de anticonceptivos. El grado y tipo de glucosilación que se produce en las proteínas recombinantes difiere según el tipo celular utilizado para su expresión, razón por la cual es esencial la selección de un sistema adecuado, caracterizar los productos de expresión y determinar la actividad biológica de las proteínas obtenidas, tras lo cual se puede dar luz verde a su uso para el diseño y estandarización de pruebas diagnósticas.

Desarrollar la metodología para estudiar la unión de espermatozoides a proteínas recombinantes de la ZP permitiría tener una medida del reconocimiento de los espermatozoides por diferentes proteínas, para asistir a un sector de la población masculina que tiene infertilidad y que, actualmente, no es diagnosticada ni tratada adecuadamente.

Bibliografía

- Turek PJ. Practical approaches to the diagnosis and management of male infertility. *Nat Clin Pract Urol*. 2005;2:226-38.
- Pasqualotto FF, Lucon AM, Sobreiro BP, Pasqualotto EB, Arap S. Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2004;59:375-82.
- Caballero P, Núñez-Calonge R. Epidemiología de la infertilidad. Actualidad en Reproducción. 1992;1:6-20.
- Barratt CL, Publicover SJ. Interaction between sperm and zona pellucida in male fertility. *Lancet*. 2001;358:1660-2.
- Liu DY, Baker HW. Evaluation and assessment of semen for IVF/ICSI. *Asian J Androl*. 2002;4:281-5.
- Liu DY, Baker HW. High frequency of defective sperm-zona pellucida interaction in oligozoospermic infertile men. *Hum Reprod*. 2004;19:228-33.
- Liu DY, Baker HW. Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 2000;15:702-8.
- Liu DY, Garrett C, Baker HW. Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. *Hum Reprod*. 2003;18:2382-9.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. En: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press; 1994. p. 2 v.
- Suárez SS. Hyperactivated motility in sperm. *J Androl*. 1996;17:331-5.
- Smith TT. The modulation of sperm function by the oviductal epithelium. *Biol Reprod*. 1998;58:1102-4.
- Gerton GL. Function of the sperm acrosome. En: Hardy DM, editor. *Fertilization*. San Diego: Academic Press; 2002. p. 265-302.
- Bleil JD, Wassarman PM. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol*. 1983;95:317-24.
- Saling PM, Sowinski J, Storey BT. An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucidae in vitro: sequential relationship to the acrosome reaction. *J Exp Zool*. 1979;209:229-38.
- Lefevre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, et al. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod*. 2004;19:1580-6.
- Conner SJ, Lefevre L, Hughes DC, Barratt CLR. Cracking the egg: increased complexity in the zona pellucida. *Hum Reprod*. 2005;20:1148-52.
- Bleil JD, Wassarman PM. Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:6778-2.
- Miller DJ, Macek MB, Shur BD. Complementarity between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature*. 1992;357:589-3.
- Thall AD, Maly P, Lowe JB. Oocyte Gal alpha 1,3Gal epitopes implicated in sperm adhesion to the zona pellucida glycoprotein ZP3 are not required for fertilization in the mouse. *J Biol Chem*. 1995;270:21437-40.
- Lu Q, Shur BD. Sperm from beta 1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly. *Development*. 1997;124:4121-31.
- Gahlay GK, Srivastava N, Govind CK, Gupta SK. Primate recombinant zona pellucida proteins expressed in *Escherichia coli* bind to spermatozoa. *J Reprod Immunol*. 2002;53:67-77.
- Rankin T, Talbot P, Lee E, Dean J. Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development*. 1999;126:3847-55.
- Bleil JD, Wassarman PM. Structure and function of the zona pellucida; identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol*. 1980;76:185-202.
- Prasad SV, Wilkins B, Skinner SM, Dunbar BS. Evaluating zona pellucida structure and function using antibodies to rabbit 55 kDa ZP protein expressed in baculovirus expression system. *Mol Reprod Dev*. 1996;43:519-29.
- Yurewicz EC, Sacco AG, Gupta SK, Xu N, Gage DA. Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J Biol Chem*. 1998;273:7488-94.
- Van Duin M, Polman JE, de Breet IT, van Ginneken K, Bunschoten H, Grootenhuis A, et al. Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. *Biol Reprod*. 1994;51:607-17.
- Martic M, Moses EK, Adams TE, Liu DY, Gook DA, Garrett C, et al. Recombinant human zona pellucida proteins ZP1, ZP2 and ZP3 co-expressed in a human cell line. *Asian J Androl*. 2004;6:3-13.
- Caballero-Campo P, Chirinos M, Fan XJ, González-González ME, Galicia-Chavarría M, Larrea F, et al. Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function. *Biol Reprod*. 2006;74:760-8.
- Chakravarty S, Suraj K, Gupta SK. Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in capacitated spermatozoa in addition to zona pellucida glycoprotein-C. *Mol Hum Reprod*. 2005;11:365-72.
- Tsubamoto H, Hasegawa A, Nakata Y, Naito S, Yamasaki N, Koyama K. Expression of recombinant human zona pellucida protein 2 and its binding capacity to spermatozoa. *Biol Reprod*. 1999;61:1649-54.
- Lasserre A, González-Echeverría F, Moules C, Tezón JG, Miranda PV, Vázquez-Levin MH. Identification of human sperm proteins involved in the interaction with homologous zona pellucida. *Fertil Steril*. 2003;79 Suppl 3:1606-15.
- Mandal A, Klotz KL, Shetty J, Jayes FL, Wolkowicz MJ, Bolling LC, et al. SLLP1, A unique, intra-acrosomal, non-bacteriolytic, c lysozyme-like protein of human spermatozoa. *Biol Reprod*. 2003;68:1525-37.
- Kadam AL, Fateh M, Naz RK. Fertilization antigen (FA-1) completely blocks human sperm binding to human zona pellucida: FA-1 antigen may be a sperm receptor for zona pellucida in humans. *J Reprod Immunol*. 1995;29:19-30.
- Bray C, Son JH, Kumar P, Harris JD, Meizel S. A role for the human sperm glycine receptor/Cl(-) channel in the acrosome reaction initiated by recombinant ZP3. *Biol Reprod*. 2002;66:91-7.
- Burkman LJ, Coddington CC, Franken DR, Krugen TF, Rosenwaks Z, Hogen GD. The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil Steril*. 1988;49:688-97.

36. Franken DR, Bastiaan HS, Oehninger SC. Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: validation of a microassay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellucida. *J Assist Reprod Genet.* 2000;17: 156-61.
37. Bercegeay S, Jean M, Lucas H, Barriere P. Composition of human zona pellucida as revealed by SDS-PAGE after silver staining. *Mol Reprod Dev.* 1995;41:355-9.
38. Brewis IA, Clayton R, Barratt CL, Hornby DPJ, Moore HDM. Recombinant human zona pellucida glycoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 1996;2:583-9.
39. Whitmarsh AJ, Woolnough MJ, Moore HD, Hornby DP, Barratt CLR. Biological activity of recombinant human ZP3 produced in vitro: potential for a sperm function test. *Mol Hum Reprod.* 1996;2:911-9.