

Efecto de la temperatura de incubación y adición de glicerol sobre la preservación del acrosoma en espermatozoides humanos

Mariana Deppe,* Carol Orloff,* Gisela Salinas,* Daniela Bravo,* Raúl Sánchez**

* Centro de Biotecnología en Reproducción. ** Departamentos de Ciencias Básicas y Ciencias Preclínicas. Facultad de Medicina. Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Effect of temperature incubation and glycerol addition on the acrosome preservation in human spermatozoa

ABSTRACT

Cooling of mammalian sperms to 5 °C and subsequent heating to 30 °C causes alterations in the integrity of the plasma membrane producing acrosome disruption. This capacity of induction of acrosome reaction (AR) has allowed to evaluate this process *in vitro*, and has been correlated with induction of AR by follicular fluid and the percentage of *in vitro* fertilization. In this study, the time necessary to induce AR at 4 °C, the need of the increment in temperature to 37 °C, and the effect of glycerol to prevent the AR were evaluated. The sperms were selected by the Migration –Sedimentation technique, incubated in HTF and 1M glycerol at 4 °C and 20 °C for 1, 3, and 18 hours and then for 3 hours at 37°C. The AR was determined by triple stain technique. Spermatozoa incubated by 18 hours at 4 °C increased the AR from 4.0% in the control (TO, post sperm selection) to 14.0% ($p < 0.05$). The subsequent incubation for 3 hours at 37 °C increased AR to 37.5% ($p < 0.01$ compared with 4 °C). The addition of 1M glycerol did not revert this effect. Our study confirms that the induction of AR with low temperatures requires long periods of incubation and a temperature increment to 37 °C. In addition, it is proposed that glycerol is not adequate for preservation of human spermatozoa at low temperature.

Key words. Human spermatozoa. Cryopreservation. Low temperature. Acrosome reaction. Sperm function test. Glycerol.

RESUMEN

En espermatozoides de mamífero el enfriamiento a 5 °C y posterior aumento de la temperatura a 30 °C causan modificaciones en la integridad de la membrana plasmática que conllevan a una prematura reacción de acrosoma (RA) en parte de la población espermática. Esta capacidad de inducción de RA de la baja temperatura ha permitido evaluar este proceso *in vitro*, correlacionándose con la inducción de RA producida por fluido folicular y los porcentajes de fecundación *in vitro*. En este estudio se evaluó el tiempo necesario para inducir RA a 4 °C, la necesidad del incremento de la temperatura a 37 °C y el efecto del crioprotector glicerol para prevenir la RA. Para ello, a través del método de Migración-Sedimentación, se obtuvieron espermatozoides que fueron incubados en medio de cultivo (HTF) con y sin glicerol 1M a 4 °C y 20 °C por una, tres y 18 horas, y luego tres horas a 37 °C. La RA fue determinada por triple tinción en 100 espermatozoides viables. El aumento de la RA se obtuvo solamente en los espermatozoides incubados por 18 horas a 4 °C (14% RA, $p < 0.05$ comparado con 4% de RA del control post-selección espermática), la que se incrementó con la posterior incubación por tres horas a 37 °C (37.5% RA, $p < 0.01$, comparado con 4 °C). La adición de glicerol 1M no revirtió este efecto. Este estudio confirma que la inducción de RA con bajas temperaturas requiere de tiempos prolongados de incubación a 4 °C y el máximo de RA se obtiene con el incremento de la temperatura a 37 °C. Asimismo, se evidencia que la función criopreservante del glicerol no sería adecuada para la preservación de espermatozoides humanos a bajas temperaturas.

Palabras clave. Espermatozoide humano. Crioconservación. Reacción de acrosoma. Función espermática. Test de función. Glicerol.

INTRODUCCIÓN

El proceso de reacción de acrosoma (RA) es un evento de exocitosis que involucra la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa y la formación de vesículas entre ambas membranas, lo que permite la liberación del contenido acrosomal y la exposición de la membrana acrosomal interna.^{1,2} Este proceso es esencial en la fecundación, ya que solamente espermatozoides que completan la RA al unirse a la zona pelúcida pueden traspasarla y fusionarse a la membrana plasmática del ovocito.

Tanto la capacitación como la RA pueden ser inducidas en condiciones artificiales (*in vitro*) con Test-Yolk buffer,³ adición de albúmina,⁴ zona pelúcida,⁵ fluido folicular,⁶ calcio ionóforo,⁷ prolongados tiempos de incubación,⁸ incubación a bajas temperaturas⁹ y medios hipertónicos,¹⁰ entre otros. La inducción de RA es utilizada como test para evaluar la función del espermatozoide, ya que se correlaciona con los resultados de la fecundación *in vitro*.¹¹ El método más simple para realizar esta evaluación es el inducir cambios de temperatura en el medio de incubación de los espermatozoides. El mantener a los espermatozoides a 4 °C por 20 horas y elevar la temperatura a 37 °C implica cambios en la fluidez de membrana,¹² eventos asociados a la capacitación y la reacción de acrosoma. Este efecto provoca pérdida del acrosoma y podría ser utilizado para evaluar crioprotectores en su capacidad de preservar el acrosoma. Para validar esta aplicación, el presente estudio evaluó el tiempo necesario para inducir RA a 4 °C, la necesidad del incremento de la temperatura a 37 °C y el efecto del crioprotector habitualmente utilizado, glicerol, sobre la preservación del acrosoma.

MATERIAL Y MÉTODOS

Previo consulta y aprobación por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, mediante consentimiento informado se seleccionaron entre los estudiantes de nuestra Universidad los donantes para este estudio, excluyéndose de él los sujetos que tuvieran historia de enfermedades previas y enfermedades de transmisión sexual.

Colección del semen

El semen se obtuvo de tres donantes, recolectado por masturbación con cinco días de abstinencia sexual, en recipiente de plástico desechable y licuado

por 30 minutos a 37 °C. El análisis seminal se realizó según los criterios de la OMS.¹³ Para cada uno de los cuatro ensayos realizados se utilizaron muestras con un volumen superior a 2 mL, concentración superior a 40 x 10⁶ espermatozoides/mL y morfología normal igual o superior a 50%.

Preparación de espermatozoides

El medio de cultivo utilizado fue HTF (fluido tubárico humano),¹⁴ suplementado con 1 mg/mL de albúmina humana (Dade Behring, Marburg, Alemania). La separación de los espermatozoides del plasma seminal se realizó con el método de Migración-Sedimentación (MS). Después de una hora de incubación a 37 °C se obtuvieron espermatozoides móviles y la concentración fue ajustada a 1.5 x 10⁶ espermatozoides/mL.

Adición del agente criopreservante (glicerol)

Posterior al método de selección espermática y con el propósito de evaluar al glicerol en la preservación del estado acrosomal, se prepararon dos suspensiones espermáticas, una de ellas conteniendo 1 M de glicerol (Sigma G-6279, St Louis, USA). Para lo cual fue preparada previamente una solución de glicerol al 2 molar con medio HTF y agregada en partes iguales al volumen de suspensión espermática para obtener una concentración final en la muestra de 1 M de glicerol.

Periodos y temperaturas de incubación

Alícuotas de 500 µL de suspensión espermática (con y sin glicerol) fueron incubadas a 4 °C y 20 °C por 1, 3 y 18 horas, al finalizar cada tiempo se adicionó una incubación por tres horas a 37 °C en estufa de cultivo sin CO₂. Concluido el periodo de incubación a 4 °C y 20 °C, y posterior a las tres horas de incubación a 37 °C fueron procesadas alícuotas de cada suspensión espermática para la evaluación de la RA por técnica de triple tinción.¹⁵ Una muestra después del método de selección espermática fue utilizada como control inicial (tiempo cero, T0). Las incubaciones realizadas a 20 °C correspondieron al control de temperatura para cada uno de los tratamientos (con y sin glicerol) y los diferentes tiempos de incubación (con y sin incubación adicional a 37 °C por tres horas). La incubación adicional a 37 °C por tres horas se realizó para evaluar la necesidad del cambio de temperatura en la inducción de RA a bajas temperaturas.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico fue utilizada la prueba de análisis de la varianza (ANOVA) para datos no paramétricos y el test de comparación múltiple de Tukey. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos y los promedios fueron expresados con $\pm$ ESM (error estándar de la media).

RESULTADOS

En las muestras incubadas a la hora y tres horas con o sin glicerol a 4 °C y 20 °C, no se produjo variación en los porcentajes de RA, previo o posterior a las tres horas de incubación adicional a 37 °C.

Efecto de la temperatura de incubación e incubación adicional sobre el estado acrosomal, en espermatozoides incubados por 18 horas sin glicerol

En el cuadro 1 son presentados los resultados obtenidos en los espermatozoides incubados sin glicerol durante 18 horas a 4 °C y 20 °C. Como control se evaluó la RA inicial (T0) posterior al método de selección espermática correspondiendo a $4.0\% \pm 1.08$. En los espermatozoides incubados por 18 horas (T18) a 4 °C sin glicerol, se observó un aumento significativo en el porcentaje de RA en relación al T0 ($14.0\% \pm 1.79$) ($p < 0.05$), produciéndose un nuevo incremento de la RA con la incubación adicional de tres horas a 37 °C. (T18+3)($37.5\% \pm 6.61$), siendo este incremento significativo en relación con el T0 ($p < 0.001$) y a la muestra sin incubación adicional ($p < 0.01$) (Figura 1). Estas mismas muestras incubadas a 20 °C (control de temperatura) no presentaron un aumento significativo en comparación al T0, siendo el porcentaje de RA de 8.5 ± 3.01 , sin embargo, la incubación adicional de tres horas a 37 °C incrementó la RA a $13.7\% \pm 4.66$, siendo este incremento significativo respecto al T0 ($p < 0.05$) y a la muestra sin incubación adicional ($p < 0.05$) (Figura 1). Los porcentajes de RA en los espermatozoides incubados a 4 °C y posterior incubación a 37 °C por tres horas fueron significativamente mayores a los observados en las muestras incubadas en las mismas condiciones a 20 °C ($p < 0.01$) (Figura 1).

Efecto de la temperatura de incubación e incubación adicional sobre el estado acrosomal, en espermatozoides incubados por 18 horas con glicerol

Los resultados obtenidos en las muestras de espermatozoides incubados con glicerol por 18 horas a

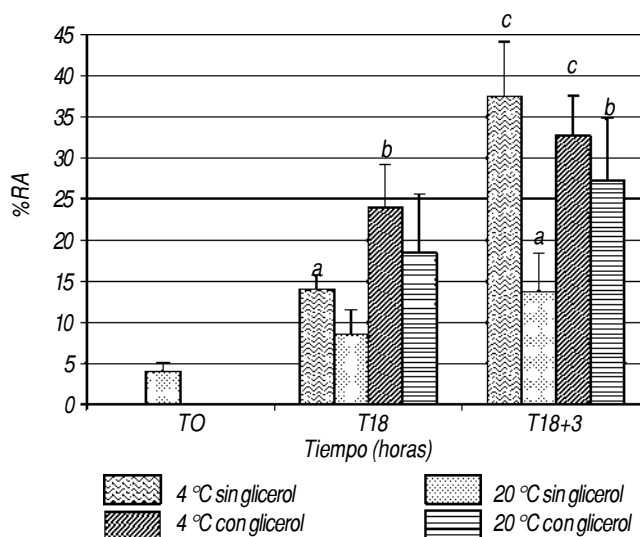


Figura 1. Reacción de acrosoma (RA) en espermatozoides humanos post-selección espermática (T0) e incubados a 4 °C y 20 °C, con y sin adición de glicerol en el medio de cultivo, durante 18 horas (T18) y 18 horas más incubación adicional por tres horas a 37 °C (T18+3). El porcentaje de RA fue determinado con la triple tinción. Los resultados son expresados como promedio $\pm$ error estándar (EE), $n = 4$. ^a $p < 0.05$ respecto al T0. ^b $p < 0.01$ respecto al T0. ^c $p < 0.001$ respecto al T0.

Cuadro 1. Porcentajes de RA en espermatozoides post-selección espermática (T0) e incubados sin glicerol a 18 horas, sin (T18) y con (T18+3) incubación adicional a 37 °C por tres horas.

Tiempos de incubación	Temperatura de incubación	RA(%) $\pm$ EE
T0	-	4.0 $\pm$ 1.08
T18	4 °C	14.0 $\pm$ 1.79*
T18+3	4 °C	37.5 $\pm$ 6.61**
T18	20 °C	8.5 $\pm$ 3.01
T18+3	20 °C	13.7 $\pm$ 4.66*

Valores son promedios $\pm$ error estándar (EE)

* indica diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al T0.

** indica diferencia significativa ($p < 0.001$) respecto al T0.

Cuadro 2. Porcentajes de RA en espermatozoides post-selección espermática (T0) y espermatozoides incubados con glicerol a 18 horas, sin (T18) y con (T18+3) incubación adicional a 37 °C por tres horas.

Tiempos de incubación	Temperatura de incubación	RA(%) $\pm$ EE
T0	-	4.0 $\pm$ 1.08
T18	4 °C	24.0 $\pm$ 5.24*
T18+3	4 °C	32.7 $\pm$ 4.85**
T18	20 °C	18.5 $\pm$ 7.12
T18+3	20 °C	27.2 $\pm$ 7.55*

Valores son promedios $\pm$ error estándar (EE).

* indica diferencia significativa ($p < 0.01$) respecto al T0.

** indica diferencia significativa ($p < 0.001$) respecto al T0.

4 °C y 20 °C son mostrados en el cuadro 2. En las muestras incubadas con glicerol durante 18 horas a 4 °C no hubo inhibición en la inducción de RA, presentando un aumento significativo del porcentaje de RA en relación con el T0 ($24.0\% \pm 5.24$ y 4.0 ± 1.08 , respectivamente, $p < 0.01$) (Figura 1). La RA también se incrementó a $32.7\% \pm 4.85$ posterior a las tres horas de incubación a 37 °C, siendo este incremento significativo respecto al T0 ($p < 0.001$), pero no respecto a la misma muestra sin incubación adicional. En el control a 20 °C con glicerol se observó un aumento en el porcentaje de RA ($18.5\% \pm 7.12$) con respecto al T0, no siendo éste significativo, al contrario, con la incubación adicional por tres horas a 37 °C este porcentaje incrementó a 27.2 ± 7.55 , siendo significativo respecto al T0 ($p < 0.01$) (Figura 1). Sin embargo, este aumento en el porcentaje de RA no fue significativo con respecto a las muestras que no fueron adicionalmente incubadas por tres horas a 37 °C en estufa de cultivo ($18.5\% \pm 7.12$) (Figura 1).

Efecto de la adición de glicerol sobre el estado acrosomal en espermatozoides humanos

En el cuadro 3 son mostrados los porcentajes de RA observados en las muestras incubadas por 18 horas a 4 °C y 20 °C, con y sin incubación adicional a 37 °C por tres horas, con respecto al efecto de la adición a éstas de glicerol, apreciando un aumento significativo ($p < 0.05$) en el porcentaje de RA en las muestras incubadas con glicerol a 4 °C (24.0 ± 5.24) y 20 °C (18.5 ± 7.12) sin incubación adicional por tres horas, respecto a las mismas sin adición del criopreservante (14.0 ± 1.79 y 8.5 ± 3.01 , respectivamente). Con la incubación adicional a 37 °C por tres horas en las muestras incubadas previamente a 4 °C, la adición de glicerol no presentó diferencias

significativas respecto a este parámetro en relación con las mismas sin glicerol, no así en las incubadas a 20 °C, donde la presencia del criopreservante mostró un aumento significativo en la RA ($p < 0.05$), respecto a las mismas muestras incubadas en ausencia del criopreservante ($27.2\% \pm 7.55$ y $13.7\% \pm 4.66$, respectivamente).

DISCUSIÓN

En la evaluación de la función espermática, espermatozoides que presentan alteración para experimentar el proceso de RA, son incapaces de penetrar la zona pelúcida.¹⁶ Al respecto, pacientes con acrosoma anormal o con defectuosa RA, han sido reportados como subfértiles.¹⁷ La inducibilidad de RA puede ser correlacionada con la penetración del espermatozoide a la zona pelúcida,¹⁸ entregando una valiosa información en la evaluación de la esterilidad en el varón.¹⁹ Tanto inductores fisiológicos de RA como el fluido folicular y no fisiológicos como la incubación a bajas temperaturas, han sido descritos como predictores de la fecundación *in vitro*,²⁰ evidenciando la utilidad de la inducción de RA a bajas temperaturas con fines diagnósticos,¹¹ además de ser un método factible de realizar en laboratorios clínicos.

Los resultados obtenidos en este estudio reflejan que durante la incubación de espermatozoides por una y tres horas a 4 °C y 20 °C no se observan diferencias significativas respecto al T0. Al contrario, en las incubaciones durante 18 horas a 4 °C es posible observar un aumento significativo en el porcentaje de RA respecto al T0, no observándose el mismo efecto en los espermatozoides incubados durante el mismo tiempo a 20 °C. El porcentaje de RA se incrementa aún más con una incubación adicional por tres horas a 37 °C en estufa de cultivo, obteniéndose una RA máxima de la población espermática incubada previamente a bajas temperaturas (4 °C). Este efecto de

Cuadro 3. Porcentajes de RA, en espermatozoides incubados a 4 °C y 20 °C con y sin glicerol, durante 18 horas, sin (T18) y con (T18+3) incubación adicional a 37 °C por tres horas.

Tiempos de incubación	Temperatura de incubación [°C]	RA(%) $\pm$ EE	
		(-) Glicerol	(+) Glicerol
T18	4	14.0 ± 1.79	$24.0 \pm 5.24^*$
T18	20	8.5 ± 3.01	$18.5 \pm 7.12^*$
T18+3	4	37.5 ± 6.61	32.7 ± 4.85
T18+3	20	13.7 ± 4.66	$27.2 \pm 7.55^*$

Valores son promedios $\pm$ error estándar (EE).

* indica diferencia significativa ($p < 0.05$), en el porcentaje de RA observado en los espermatozoides incubados con glicerol, respecto a las mismas muestras incubados sin el criopreservante.

RA máximo no se logra con la sola incubación de los espermatozoides por periodos prolongados de tiempo a 20 °C, aunque se adicione el incremento de temperatura a 37 °C, siendo necesaria la incubación previa a bajas temperaturas. Estas observaciones reflejan que la inducción de RA a bajas temperaturas requiere de una incubación adicional a 37 °C por tres horas. Tanto la incubación de espermatozoides por periodos prolongados⁸ y la incubación de éstos a bajas temperaturas⁹ han sido descritas como inductores de capacitación y RA. Al respecto, en espermatozoides humanos incubados a 37 °C por 18 horas se observa una RA inducida por fluido folicular significativamente mayor que los incubados a 20 °C por este mismo periodo, incluso la preincubación de espermatozoides a 20 °C seguida de una exposición a 37 °C activa eventos relacionados a la capacitación aumentando la inducibilidad de la RA.²¹ Esto concuerda con nuestras observaciones, donde la incubación de espermatozoides humanos por 18 horas a 20 °C no presentó un incremento significativo respecto al T0, pero con la incubación adicional a 37 °C por tres horas se observó un aumento significativo de este parámetro.

En este estudio se evaluaron periodos de incubación convencionales de tres y 18 de incubación, a pesar que periodos intermedios no fueron considerados, nuestros resultados confirman estudios previos, que describen un aumento significativo en la lectura de RA entre el grupo de espermatozoides humanos incubados por 24 horas a 4 °C con incubación adicional por 3 horas a 37 °C en comparación al T0 y su control a 20 °C.²² Por tanto, se deben utilizar tiempos prolongados para la inducción de RA a bajas temperaturas, y la adición de una incubación de tres horas a 37 °C, con el objetivo de lograr la mayor inductibilidad de RA.

Por otra parte, la incubación de espermatozoides con adición de glicerol 1M en el medio de cultivo no revirtió significativamente el porcentaje de RA obtenido en las muestras incubadas sin el criopreservante, observándose esta situación tanto a los 4 °C como a los 20 °C. Más aún un efecto contrario fue observado, esto basado en que las muestras incubadas con glicerol presentaron un incremento en los porcentajes de RA, respecto a las mismas incubadas sin el criopreservante. El análisis de varios agentes criopreservantes, entre ellos el glicerol, sobre los efectos de la temperatura en relación con la permeabilidad de la membrana plasmática, demostró que el glicerol no presenta buena permeabilidad a la membrana en relación con otros criopreservantes, que presentan mayor rapidez de penetración y difusión.²³ Esto podría

explicar que el uso de glicerol en el medio de cultivo de espermatozoides humanos sometidos a inducción de RA a bajas temperaturas (4 °C) no fue efectivo para prevenir este proceso, no siendo efectivo para inhibir eventos de fusión de membrana involucrados en el proceso de RA. La efectividad de un criopreservante para inhibir eventos de fusión se correlaciona directamente con la interacción que éstos puedan tener con los fosfolípidos de las membranas manteniendo la fluidez bilaminar de la membrana. Estudios realizados con diferentes carbohidratos tales como trealosa, maltosa, fructuosa, sucrosa, glucosa y glicerol, entre otros, revelan que el glicerol sería el menos efectivo en la inhibición de fusión de membranas.²⁴ Estos antecedentes, junto con las observaciones de este estudio, evidencian que la función criopreservante del glicerol no es adecuada para técnicas de preservación a bajas temperaturas con posteriores incubaciones a 37 °C en espermatozoides humanos, debido a que no protege al acrosoma de los cambios de temperatura a que es sometido durante estos procesos, pudiendo similar situación reflejarse en el proceso de congelación y descongelación, donde los espermatozoides son sometidos a cambios de temperatura. Este simple test de inducción de reacción de acrosoma por baja temperatura demostró, además, ser adecuado para evaluar criopreservantes en cuanto a la conservación del acrosoma, y podría ser utilizado en los centros de congelación de semen humano como control de calidad previo al uso de los diferentes medios criopreservantes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, FONDECYT, Santiago, Chile, Proyecto No. 1010729-2001.

REFERENCIAS

1. Langlais J, Roberts KD. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res* 1985; 12: 183-224.
2. Meizel S. The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. *Biol Rev* 1984; 59: 125- 57.
3. Yang YS, Rojas F, Stone S. Acrosome reaction of human spermatozoa in zona - free hamster egg penetration test. *Fertil Steril* 1988; 50: 954-9.
4. Cohen J, Webber RF, Van der Vijver JCM, Zeilmaker GH. *In vitro* fertilizing capacity of human spermatozoa with the use of zona - free hamster ova: interassay variation and prognostic value. *Fertil Steril* 1982; 37: 565-72.
5. Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW. Induction of acrosome reaction by the human zona pellucida. *Biol Reprod* 1988; 38: 235-44.

6. Suarez S, Wolf DP, Meizel S. Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res* 1986; 14: 107-21.
7. Aitken RJ, Ross A, Hargreave T, Richardson O, Best F. Analysis of human sperm function following exposure to ionophore A 23187. *J Androl* 1984; 5: 321-9.
8. Gould JE, Overstreet JW, Yanagimachi H, Yanagimachi R, Katz DF, Hnason W. What functions of the sperm cell are measured by in vitro fertilization of zone - free hamster egg? *Fertil Steril* 1983; 40: 344-52.
9. Sanchez R, Toepfer-Petersen E, Aitken RJ, Schill WB. A new method for evaluation of the acrosome reaction in viable human spermatozoa. *Andrologia* 1991; 23: 197-203.
10. Pelikian S, Mimouni P. Comparative study of the kinetics of the acrosome reaction and survival of human spermatozoa in various media. *Int J Androl* 1988; 11: 465-72.
11. Henkel R, Müller C, Miska W, Gips H, Schill WB. Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1993; 8: 2128-32.
12. Canvin AT, Buhr MM. Effect of temperature on the fluidity of boar sperm membranes. *J Reprod Fert* 1989; 85: 533-40.
13. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen - cervical mucus interaction. Cambridge University Press, London - New York - Melbourne; 1992.
14. Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 1985; 44: 493-8.
15. Talbot P, Chacon RS. A triple - stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J Exp Zool* 1981; 215: 201-8.
16. Henkel R, Muller C, Miska W. Induction of acrosome reaction by low temperature is comparable to physiological induction by human follicular fluid. *Andrologia* 1998; 3: 159-61.
17. Schill WB, Töpfer-Petersen E, Heissler E. The sperm acrosome: function and clinical aspects. *Hum Reprod* 1988; 3: 139-45.
18. Liu DY, Baker, GHW. Relationship between the zona pellucida (ZP) and ionophore A23187 -induced acrosome reaction and the ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm-ZP binding. *Fertil Steril* 1996; 66: 312-5.
19. Zeginiadou T, Papadimas J, Mantalenakis S. Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance. *Andrologia* 2000; 32: 335-43.
20. Calvo L, Vantman D, Banks SM, Tezon J, Koukoulis GS, Dannison L, Sherings RJ. Follicular fluid-induced acrosome reaction distinguishes a subgroup of men with unexplained infertility not identified by semen analysis. *Fertil Steril* 1989; 52: 1048-54.
21. Marin-Briggiler CI, Tezon JG, Miranda PV, Vazquez-Levin MH. Effect of incubating human sperm at room temperature on capacitation-related events. *Fertil Steril* 2002; 77: 252-9.
22. Sanchez R, Schill WB. Influence of incubation time/temperature on acrosome reaction/sperm penetration assay. *Arch Androl* 1991; 27: 35-42.
23. Gilmore JA, Liu J, Woods EJ, Peter AT, Critser JK. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod* 2000; 15: 335-43.
24. Womersley C, Uster PS, Rudolph AS, Crowe JH. Inhibition of dehydration-induce fusion between liposomal membranes by carbohydrates as measured by fluorescence energy transfer. *Cryobiol* 1986; 23: 245-55.

Reimpresos:

Dr. Raúl Sánchez G

Facultad de Medicina

Universidad de La Frontera

Francisco Salazar 01145, Temuco, Chile.

Fax: 45/ 325600

Correo electrónico: rsanchez@ufro.cl

Recibido el 3 de julio de 2003.

Aceptado el 2 de abril de 2004.