

ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF SPERM NECK IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC INFERTILITY

Skowronek F.^{a,b}, Casanova G.^b, Alciaturi J.^a, Capurro A.^c, Montes JM.^d, Sapiro R.^{a*}

^aLaboratorio de Biología Molecular de la Reproducción, Facultad de Medicina-UDELAR. Montevideo, Uruguay.

^bDepartamento de Biología Celular y Molecular-Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión, Facultad de Ciencias. Montevideo, Uruguay.

^cUnidad de Reproducción Humana, Hospital Pereira-Rossell. Montevideo, Uruguay.

^dFertilab Montevideo, Uruguay.

*Corresponding author, E-mail: rsapiro@fmed.edu.uy, phone: 924 34 14 int.3551, Fax: (598 2) 924 34 14 int. 3505

Recibido: Julio 2010. Aprobado: Agosto 2010.

Publicado: Noviembre 2010.

ABSTRACT

To assess the marital infertility causes, it is estimated that male factor is responsible in at least the 50% of the cases. The functional competence of sperm appears to be directly related to the morphology of the gametes. Particularly the normal structure of the sperm's neck components seems to be crucial for successful fertilization and embryogenesis. In the past few years, the use of different techniques of assisted reproduction as a treatment for male infertility has increased. In these techniques, alterations in the neck components could determine the failure of therapy. In spite of this, the subcellular details of sperm necks have been poorly studied.

The aim of this study was to analyze comparatively the ultrastructural characteristics of the sperm's necks in fertile and infertile men.

The sperm obtained from semen samples was analyzed by photonic and transmission electron microscopy (TEM). The study of the sperm sections revealed different alterations of the neck (total disruption of components, reduced implantation zone, misalignment, headless necks, proximal centriole and dense columns altered) both in patients and in controls. These changes were observed more frequently in infertile men. Neither of the described malformations was observed in a unique and repetitive way. Studies by TEM could guide the choice of specific techniques for the diagnosis of infertility, contributing to the selection of more appropriate assisted reproduction treatment.

Keywords: infertility, male factor, sperm neck, ultrastructural alterations.

ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE CUELLOS ESPERMÁTICOS EN PACIENTES CON INFERTILIDAD IDIOPÁTICA

RESUMEN

Se estima que del factor masculino es responsable de la infertilidad conyugal en aproximadamente un 50% de los casos. Conjuntamente, se acepta que la capacidad fecundante de los espermatozoides se encuentra directamente relacionada con su integridad morfológica. En particular la conformación normal de las estructuras presentes a nivel del cuello, parece ser indispensable para lograr una fecundación y embriogénesis exitosa. En los últimos años se ha incrementado el uso de distintas técnicas de reproducción asistida, como tratamiento de la infertilidad de causa masculina. En las mismas, alteraciones a nivel del cuello y sus componentes, podrían determinar el fracaso de la terapéutica. A pesar de lo mencionado, los detalles subcelulares de los cuellos espermáticos han sido poco estudiados.

El objetivo del presente trabajo fue analizar comparativamente, las características ultraestructurales de los cuellos de espermatozoides, en hombres fértiles e infértiles.

Los espermatozoides obtenidos de muestras de semen se analizaron mediante microscopía óptica y electrónica de transmisión (MET). Las secciones espermáticas analizadas revelaron diversas alteraciones del cuello (desorganización total de los componentes, zona de implantación reducida, desalineación, centriolo proximal y columnas densas alterados, cuellos acéfalos), tanto en pacientes como en controles. Dichas alteraciones se observaron con mayor frecuencia en los hombres infértiles. Ninguna de las malformaciones descritas se observó en forma única y repetitiva. Los estudios mediante MET podrían orientar en la elección de técnicas más específicas para el diagnóstico etiológico de la infertilidad, contribuyendo a la selección del tratamiento de reproducción asistida más adecuado.

Palabras claves: infertilidad, factor masculino, cuello espermático, alteraciones ultraestructurales.

INTRODUCCIÓN

La infertilidad conyugal se define como la dificultad para lograr el embarazo cuando se lo busca por un período de doce meses o más, con una frecuencia coital de por lo menos dos veces semanales [1]. Al evaluar los posibles orígenes de la misma, se ha estimado que un 30% de las causas corresponden al factor masculino por sí solo. En un 20% adicional los factores masculinos se combinan con causas de origen femenino. Teniendo en cuenta estos datos, la importancia del factor masculino en la infertilidad conyugal asciende a 50 % o más [2].

Si bien se describen numerosas causas de infertilidad en el varón, en la mayoría de los casos no es posible identificar una causa específica de la misma [2]. Esta situación se cataloga como infertilidad idiopática.

La morfología espermática analizada mediante microscopía óptica y empleando criterios estrictos es el parámetro que mejor se correlaciona con la capacidad fecundante del espermatozoide, tanto *in vivo* como *in vitro*[3-4]. Esto se corrobora a nivel ultraestructural, donde la capacidad fecundante parece estar directamente relacionada con la integridad de la morfología del gameto [5-6]. Por consiguiente, el análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), es útil a la hora de evaluar con precisión la calidad de los espermatozoides y poder inferir las causas de algunas patologías que conducen a la infertilidad [5, 7-10]. En este sentido, existen un gran número de trabajos donde se analiza la estructura subcelular de muestras de semen proveniente de pacientes con trastornos de la fertilidad [5, 8, 11-14]. Se han descrito alteraciones en las características de la cabeza espermática [15-20], del acrosoma [16, 21] y del citoesqueleto flagelar [22-25] que predominan en pacientes infértiles. Es clara la importancia de que dichas estructuras estén exitosamente conformadas a la hora de alcanzar al óvulo y fecundarlo. Sin embargo, la región del cuello no les va en zaga. Si bien, en hombres normales, se conocen las características ultraestructurales de esta región del gameto masculino [26-28], poco se

sabe acerca de la conformación subcelular de la misma en espermatozoides de pacientes infértiles.

Clásicamente se describen en el espermatozoide humano, dos organelos insertos a nivel del cuello espermático, los cuales constituyen la pieza de conexión. Dichos organelos, ubicados entre el axonema flagelar y la lámina basal que reviste la fosa de implantación nuclear, están representados por un esqueleto proteico (formado por el capitel y nueve columnas densas) y dos centríolos [26-27]. Durante el proceso de espermiogénesis, en la fase de maduración, los centríolos migran a la región opuesta a la zona de formación del acrosoma. El centríolo distal origina el flagelo espermático y desaparece casi completamente en el espermatozoide maduro [27].

Durante el proceso de fecundación, el espermatozoide humano aporta, además del material genético, el centríolo proximal localizado a nivel del cuello. Éste es necesario para la formación del huso mitótico, clave en el desarrollo de las sucesivas divisiones del cigoto durante la segmentación [18].

La integridad de las estructuras presentes a nivel del cuello del espermatozoide, parece ser esencial para que el gameto masculino logre concretar su fin, transfiriendo al óvulo su caudal genético [29].

En los últimos 30 años, se han desarrollado esfuerzos en aras de subsanar algunos de los inconvenientes característicos de los trastornos de la fertilidad. La inyección intracitoplásmica del espermatozoide (ICSI), es uno de los métodos cuya práctica se ha incrementado en el tratamiento de la infertilidad de causa masculina [30-32]. Sin embargo, la presencia de alteraciones a nivel del cuello y más específicamente en la conformación de los centríolos, podría ser determinante en el fracaso de la terapéutica [17, 33].

A pesar de lo mencionado, los detalles subcelulares de los cuellos espermáticos han sido poco estudiados. El presente trabajo aborda el análisis de la anatomía ultraestructural de los cuellos espermáticos de pacientes infértiles. Los hallazgos son analizados en relación con

los provenientes de un grupo control, integrado por hombres donantes fértiles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

La población de estudio se integró por 32 individuos que consultaron en la Unidad de Reproducción Humana del Hospital Pereira Rossell entre Octubre 2005 y Mayo 2009. Dichos individuos se clasificaron como pacientes infértiles (n=22) y controles sanos (n=10).

El grupo de pacientes estuvo conformado por hombres entre 21 y 43 años de edad, los cuales fueron catalogados como portadores de infertilidad idiopática. Se descartaron los integrantes de aquellas parejas con evidencia de factor femenino. Ninguno de ellos tenía hijos propios en el momento del estudio.

Los criterios de inclusión de los controles se centraron en la paternidad de por lo menos un hijo sano. -

Recolección y análisis de las muestras de semen

Las muestras de semen fueron recolectadas en el Laboratorio de Biología de la Reproducción, en Facultad de Medicina de la Universidad de la República en Montevideo – Uruguay. Dichas muestras se obtuvieron por masturbación luego de un período de abstinencia sexual de por lo menos 48 horas.

Una vez obtenida la muestra y alcanzada la licuefacción de la misma, se analizaron los parámetros físicos y químicos del semen (volumen, color, viscosidad, pH), y se realizó el recuento espermático y el estudio de motilidad siguiendo los criterios propuestos por la OMS [34]. Dichos parámetros fueron evaluados utilizando cámaras de conteo (microcell counting Chambers – Conception Technologies, San Diego, California).

El análisis de la morfología espermática se basó en los criterios estrictos de Tygerberg [35]. Se realizaron extendidos de semen en láminas fijadas con Karnoy y teñidas posteriormente con la técnica de Shorr (IVD: In Vitro Diagnostic Medical Device Merck KGaA,

Germany). Se evaluó y clasificó la morfología de cien espermatozoides por lámina, los cuales fueron observados en un microscopio de campo claro Nikon Eclipse E-200, con un objetivo de inmersión de 100X.

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Luego de la licuefacción del semen, parte de la muestra fue procesada para MET. Los espermatozoides se separaron por centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos. Las células precipitadas se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0,1 M (pH 7,4) y glutaraldehído 2.5%, a 4°C, durante toda la noche. Posteriormente la muestra se postfijó en tetróxido de osmio al 1% durante una hora, se deshidrató en alcoholes de concentración creciente y se embebió en Araldita.

Luego de la polimerización, se obtuvieron cortes semifinos (300-500 nm) y ultrafinos (50-70 nm) utilizando un ultramicrotomo RMC MT-X con cuchilla de diamante DIATOME. Los cortes ultrafinos fueron contrastados con una solución acuosa de acetato de uranilo a saturación y citrato de plomo. Las muestras se analizaron en un MET JEOL JEM-1010 operando a 80-kV. La captura de imágenes se realizó con una cámara digital Hamamatsu C-4742-95. Las mismas fueron procesadas, analizadas y archivadas. Todas las secciones seleccionadas para este estudio fueron fotografiadas y cuantificadas.

Criterios de clasificación de los cuellos espermáticos

La evaluación de la morfología del cuello se realizó considerando aquellas secciones en las cuales los componentes observados permitiesen catalogarlos como cuellos espermáticos normales o aberrantes. Fueron descartadas las imágenes en las que el nivel de realización del corte, no permitió hacer un diagnóstico claro. -

El análisis subcelular de los cuellos espermáticos se basó en las características descriptas por Fawcett [27][28]. Se

consideraron normales aquellos cuellos espermáticos con una correcta organización y disposición de los componentes de la pieza de conexión, además de una normal relación con la fosa de implantación y el axonema (ver resultados y figura 1). Las alteraciones encontradas se clasificaron en ocho grupos. Cuando en un cuello coexistieron anomalías de más de un componente, se tomó en cuenta para su clasificación la alteración más evidente.

El recuento de las mismas se expresó como porcentaje del total de cuellos espermáticos analizados. -

Análisis de datos

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Sigma Stats. La distribución de frecuencias en las características ultraestructurales se analizó con el test de Chi². Las características clínicas y del espermiograma de pacientes y controles se analizaron utilizando la prueba t de Student. Las diferencias se consideraron significativas con un P<0.05. El test Mann-Whitney Rank Sum se utilizó para variables que mostraron una desviación de la distribución normal.

Normas éticas.

El protocolo de trabajo fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de Facultad de Medicina, Montevideo – Uruguay. Se solicitó a cada participante, la firma de un consentimiento informado, previo a la entrega de la muestra de semen.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características del semen

El promedio y rango de edad de los hombres estudiados, así como los datos del semen de ambos grupos, se detallan en la tabla I. -

La edad de los pacientes y de los controles analizados fue similar. La media del recuento espermático fue significativamente mayor en los hombres fértiles (154±45 millones/ml vs. 51.5±15 millones/ml p< 0.05)

presentando un mayor rango de dispersión para los hombres fértiles que para los pacientes.

El análisis morfológico realizado mediante microscopía óptica y utilizando criterios estrictos [3, 36], mostró que los hombres sanos, presentaron una media significativamente mayor (24±2.1% vs. 5.8±1.0% correspondiente a los hombres infértiles).

Con relación a la motilidad espermática no se observaron, en promedio, diferencias significativas entre ambos grupos (27.1 ±4.3% para los controles fértiles vs 18.4±5.1 para los pacientes). -

La heterogeneidad en los valores del semen, coincidió con lo reportado previamente [37-38] tanto para hombres fértiles como infértiles y parece ser una característica de la especie humana.

Tabla I. Edad y características espermáticas al microscopio óptico. (* p < 0.05)

	Hombres fértiles		Hombres infértiles	
	media±eem	rango	media±eem	rango
Edad	37±6	25- 42	34±5	27- 44
Recuento (millones/ml) referencia > 20	154.0±45	12- 450	51.1±15*	1- 209
Morfología (% de formas normales) referencia > 14	24.0±2.1	15-36	5.4±1.0*	1-13
Motilidad (%)				
a	27.1±4.3	5-46	18.4±5.1	0-50
b	31.4±3.6	18-45	27.6±2.7	1-55
c	9.1±1.3	2-14	8.0±1.0	3-15
d	33.6±6.5	18-80	45.5±4.2	18-80
referencia a > 25, a+b > 50				

El análisis de la motilidad progresiva (considerada como a + b), reveló que la media de los hombres fértiles supera el punto de corte establecido por la OMS (58.5%). Esto no resultó así con la motilidad progresiva de los espermatozoides de hombres infértiles, en los cuales la media fue inferior al valor referencia (46%). Dicho valor podría estar indicando la existencia de alteraciones a nivel del cuello y/o de la pieza media de los

espermatozoides de algunos pacientes, con la consecuente pérdida de motilidad.

Análisis subcelular del cuello espermático

El análisis de los cuellos espermáticos utilizando MET, permitió identificar -en ambos grupos- la existencia de

estructuras consideradas como defectuosas o anormales. Las mismas se analizaron en relación con las obtenidas en espermatozoides catalogados como normales (figura 1 a, b y c).

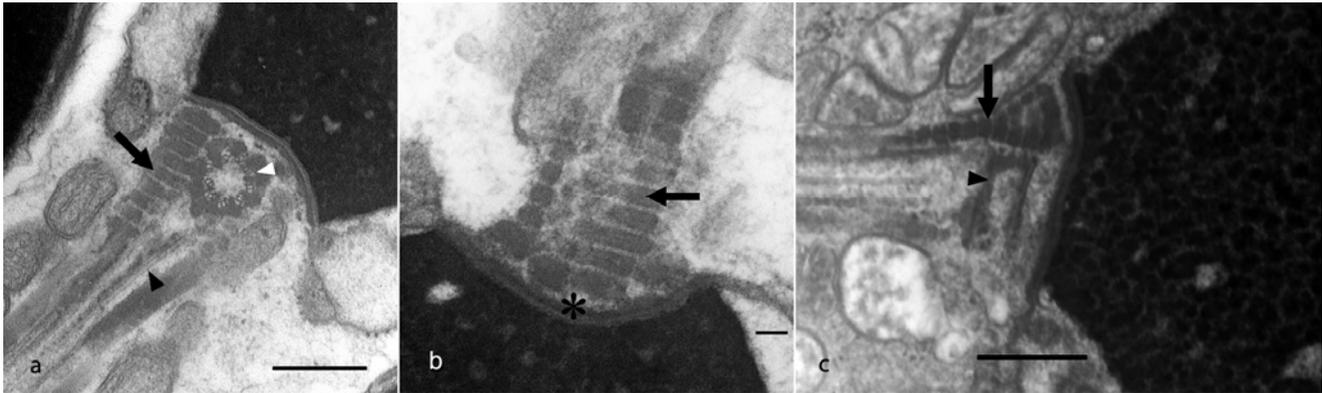


Fig. 1. Características ultraestructurales normales del cuello espermático. Las mismas fueron observadas tanto en controles sanos como en pacientes infértiles. (a) Morfología y organización de la zona de implantación y del centriolo proximal, observado en corte transversal (cabeza de flecha blanca), restos vestigiales del centriolo distal (cabeza de flecha negra) y columnas densas (flecha). (b) Aspecto, organización y disposición de las columnas densas segmentadas (flecha). Obsérvese la extensión y aspecto de la fosa de implantación (asterisco). (c) Morfología y organización de los componentes de la pieza de conexión (flecha) y fosa de implantación. Corte longitudinal del centriolo proximal (cabeza de flecha negra). Barras: a - c: 500 nm.

Los defectos hallados predominantemente fueron clasificados como: a) Desorganización total de los componentes de la pieza de conexión, en donde se observó una completa desestructuración tanto de las columnas densas y capitel como de los centriolos. (figura 2 a), b) Reducción de la zona de implantación, caracterizada por una disminución en el tamaño de la fosa de implantación, acompañada generalmente por alteraciones a nivel del capitel, reducción y desorganización de las columnas densas (figura 2 b). c) Desalineación en la implantación de la cola espermática, determinada por la pérdida del eje longitudinal entre cabeza y cola del espermatozoide (figura 2 c y d), d) Ausencia o desorganización del centriolo proximal, observándose en algunos casos tripletes de microtúbulos o microtúbulos aislados fuera de su topografía habitual (figura 2 e). e) Alteración de las

columnas densas, caracterizada por la presencia de asimetrías y modificaciones en su número, morfología y disposición (figura 2 a, b y f). En muchos cuellos espermáticos la segmentación de las columnas densas pareció reducida. En algunos casos se observaron a nivel de las mismas, segmentos de aspecto fragmentado (Fig. 2 a). f) Cuellos acéfalos caracterizados por la ausencia o reducción de las estructuras cefálicas, representadas algunas veces por pequeños restos de heterocromatina. Los mismos suelen presentarse asociados a una fosa de implantación, a la cual subyacen los componentes frecuentemente alterados de la pieza de conexión (figura 2f).

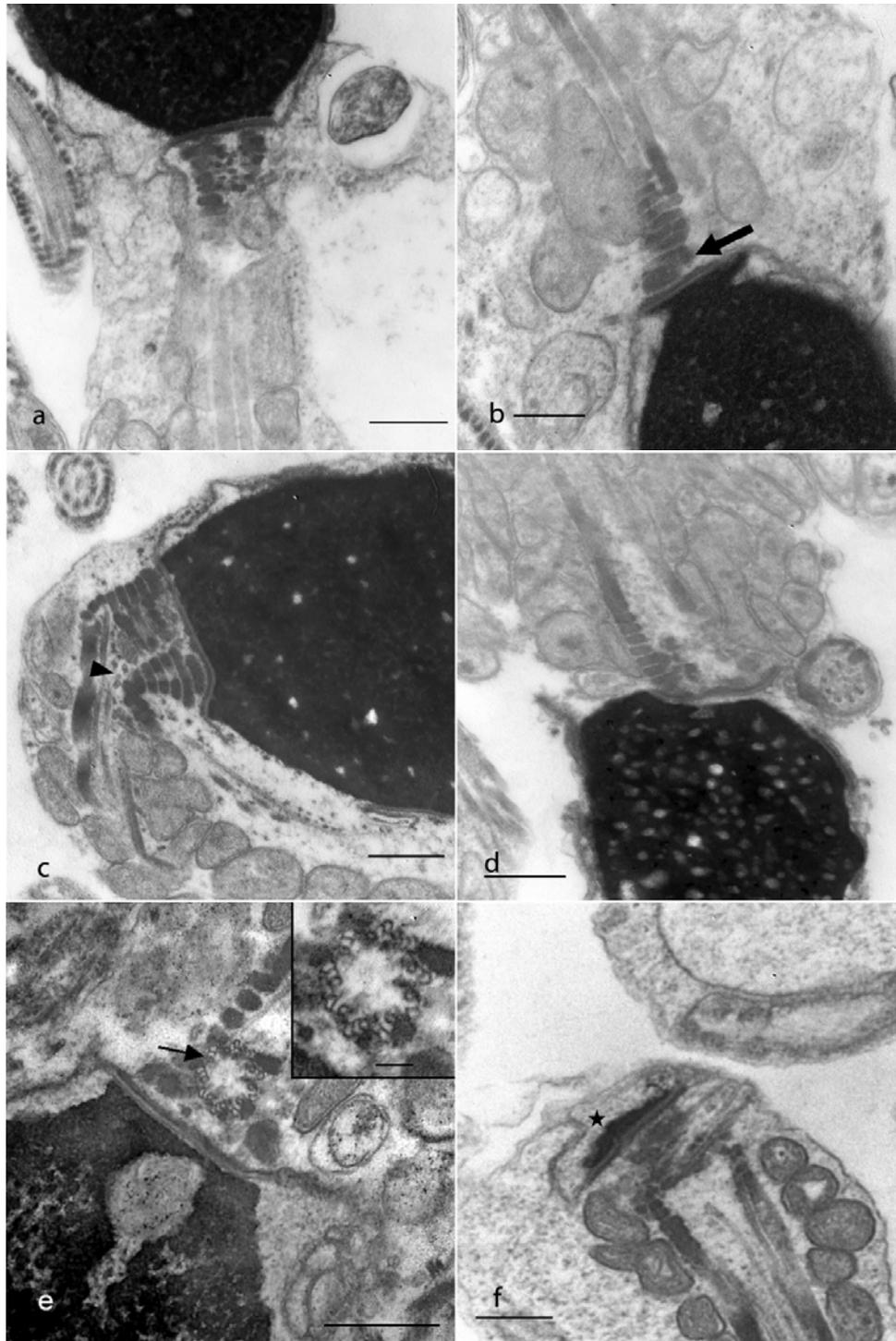


Fig. 2. Alteraciones ultraestructurales encontradas a nivel del cuello espermático. Las mismas se hallaron tanto en controles sanos como en pacientes infértiles. (a) Desorganización total de los componentes de la pieza de conexión. (b) Reducción de la zona de implantación (flecha), desorganización y alteración de las columnas densas. (c y d) Pérdida del eje de implantación de la cola espermática. En c se observan dobletes periféricos aislados (cabeza de flecha negra) que manifiestan la coexistencia de una desestructuración flagelar. (e) Desorganización del centriolo proximal (flecha). Se evidencian alteraciones en la disposición de los microtúbulos de los tripletes que conforman dicha estructura (e: inserto). (f) Espermatozoide acéfalo (asterisco). (a, b y f) Alteración en el número, morfología y disposición de las columnas densas. Barras: a - f: 500 nm, inserto en e: 100 nm.

Ninguna de las malformaciones descritas se observó en forma única y repetitiva en todos los cuellos espermáticos analizados de un mismo paciente. Las distintas alteraciones estructurales encontradas a nivel del cuello de los espermatozoides de los pacientes, son similares a las malformaciones visualizadas en las muestras provenientes del grupo control. Si bien la frecuencia de dichas alteraciones fue estadísticamente mayor en los hombres infértiles ($p < 0.05$; figura 3), llama la atención la cantidad de alteraciones presentes en los cuellos espermáticos de individuos controles. Esto sugiere que el cuello sería una región particularmente lábil durante la espermatogénesis.

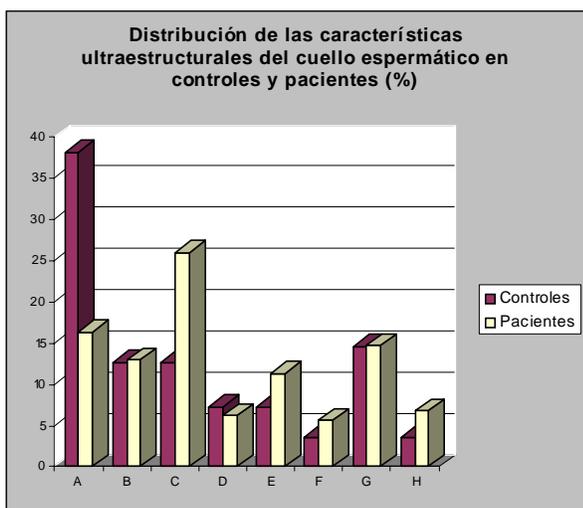


Fig. 3. Distribución de las características ultraestructurales de los cuellos espermáticos en controles fértiles y pacientes infértiles. A: estructura normal, B: lisis, C: desorganización total, D: alteración o reducción de la zona de implantación, E: pérdida del eje de implantación de la cola espermática, F: desorganización del centríolo proximal, G: alteración y desorganización de las columnas densas, H: cuellos acéfalos.

Previo a la realización de un procedimiento de fertilización asistida, es especialmente importante la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que llevan a la generación de espermatozoides patológicos, dado que muchos de ellos eluden los mecanismos naturales de selección espermática. Dentro

de las diversas malformaciones espermáticas, las alteraciones del cuello podrían ser una guía para comprender las fallas de fertilización tanto *in vivo* como *in vitro*. Por ejemplo, la presencia de centríolos alterados puede estar en relación con la no progresión del embrión luego de un ICSI. Por su parte, alteraciones de las columnas podrían generar espermatozoides inmóviles ó con trastornos de la motilidad, incapaces de fecundar por métodos naturales. El empleo de técnicas de reproducción asistida permitiría sortear este defecto, pudiéndose alcanzar la fecundación y el desarrollo de embriones normales.

En los pacientes analizados en este trabajo no existió predominancia de ninguna de las anomalías de cuello descritas. Sin embargo esto no descarta la existencia de individuos donde predomine alguna de ellas.

La prevalencia de una malformación espermática determinada, detectada habitualmente mediante MET, se vincula generalmente a la presencia de causas genéticas subyacentes, responsables de la misma (8). En base a esto, el estudio ultraestructural en pacientes seleccionados, en los que se sospechen anomalías del cuello, podría conducir a entender la patogenia del problema. Del mismo modo dicho análisis sería útil para establecer qué otros procedimientos utilizar en el diagnóstico y tratamiento del paciente infértil.

CONCLUSIONES

El análisis de la morfología espermática mediante MET, permite identificar la presencia de alteraciones no detectables por otras metodologías. Esto resulta particularmente útil cuando se desea indagar la existencia de patologías que afectan la estructura de los componentes subcelulares presentes a nivel del cuello.

Las secciones analizadas con MET en este estudio sugieren que el cuello espermático es una región especialmente lábil y en él se pueden describir diversas alteraciones, las cuales predominan francamente en hombres infértiles. La utilización conjunta de éste tipo de

estudios morfológicos con técnicas celulares y moleculares, podría ayudar a comprender las bases fisiológicas y patológicas que conducen a la formación del cuello durante la espermatogénesis. El conocimiento

así generado, podría orientar en la elección de técnicas de estudio complementarias, contribuyendo al diagnóstico etiológico de la infertilidad y a la selección del tratamiento de reproducción asistida más adecuado.

REFERENCIAS

- [1] Dey, S. K. (2010) How we are born, *J Clin Invest* 120, 952-955.
- [2] Ferlin, A., Raicu, F., Gatta, V., Zuccarello, D., Palka, G., and Foresta, C. (2007) Male infertility: role of genetic background, *Reprod Biomed Online* 14, 734-745.
- [3] Kruger, T. F., Menkveld, R., Stander, F. S., Lombard, C. J., Van der Merwe, J. P., van Zyl, J. A., and Smith, K. (1986) Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization, *Fertil Steril* 46, 1118-1123.
- [4] Kruger, T. F., Ackerman, S. B., Simmons, K. F., Swanson, R. J., Brugo, S. S., and Acosta, A. A. (1987) A quick, reliable staining technique for human sperm morphology, *Arch Androl* 18, 275-277.
- [5] Bartoov, B., Eltes, F., Reichart, M., Langzam, J., Lederman, H., and Zabludovsky, N. (1999) Quantitative ultramorphological (QUM) analysis of human sperm: diagnosis and management of male infertility, *Arch Androl* 42, 161-177.
- [6] Bartoov, B., Eltes, F., Reichart, M., Langzam, J., Lederman, H., and Zabludovsky, N. (1999) Quantitative ultramorphological analysis of human sperm: fifteen years of experience in the diagnosis and management of male factor infertility, *Arch Androl* 43, 13-25.
- [7] Chemes, H. E., Fawcett, D. W., and Dym, M. (1978) Unusual features of the nuclear envelope in human spermatogenic cells, *Anat Rec* 192, 493-512.
- [8] Chemes, E. H., and Rawe, Y. V. (2003) Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men, *Hum Reprod Update* 9, 405-428.
- [9] Zamboni, L. (1991) Physiology and pathophysiology of the human spermatozoon: the role of electron microscopy, *J Electron Microscop Tech* 17, 412-436.
- [10] Zamboni, L. (1992) Sperm structure and its relevance to infertility. An electron microscopic study, *Arch Pathol Lab Med* 116, 325-344.
- [11] Chemes, H. E. (2000) Phenotypes of sperm pathology: genetic and acquired forms in infertile men, *J Androl* 21, 799-808.
- [12] Baccetti, B., Bernieri, G., Burrini, A. G., Collodel, G., Crisa, N., Mirolli, M., Moretti, E., and Piomboni, P. (1995) Notulae seminologicae. 5. Mathematical evaluation of interdependent submicroscopic sperm alterations, *J Androl* 16, 356-371.
- [13] Baccetti, B., Bernieri, G., Burrini, A. G., Capitani, S., Collodel, G., Mirolli, M., Piomboni, P., and Renieri, T. (1995) Notulae seminologicae. 4. Mathematical evaluation of submicroscopical alterations in spermatozoa of sterile men with varicocele, *Andrologia* 27, 13-17.
- [14] Baccetti, B., Capitani, S., Collodel, G., Strehler, E., and Piomboni, P. (2002) Recent advances in human sperm pathology, *Contraception* 65, 283-287.
- [15] Escalier, D. (1983) Human spermatozoa with large heads and multiple flagella: a quantitative ultrastructural study of 6 cases, *Biol Cell* 48, 65-74.
- [16] Lalonde, L., Langlais, J., Antaki, P., Chapdelaine, A., Roberts, K. D., and Bleau, G. (1988) Male infertility associated with round-headed acrosomeless spermatozoa, *Fertil Steril* 49, 316-321.

- [17] Chemes, H. E., Carizza, C., Scarinci, F., Brugo, S., Neuspiller, N., and Schwarsztein, L. (1987) Lack of a head in human spermatozoa from sterile patients: a syndrome associated with impaired fertilization, *Fertil Steril* 47, 310-316.
- [18] Rawe, V. Y., Terada, Y., Nakamura, S., Chillik, C. F., Olmedo, S. B., and Chemes, H. E. (2002) A pathology of the sperm centriole responsible for defective sperm aster formation, syngamy and cleavage, *Hum Reprod* 17, 2344-2349.
- [19] Baccetti, B., Burrini, A. G., Collodel, G., Magnano, A. R., Piomboni, P., Renieri, T., and Sensini, C. (1989) Morphogenesis of the decapitated and decaudated sperm defect in two brothers, *Gamete Res* 23, 181-188.
- [20] Baccetti, B., Burrini, A. G., Capitani, S., Collodel, G., Moretti, E., Piomboni, P., and Renieri, T. (1993) Notulae seminologicae. 2. The 'short tail' and 'stump' defect in human spermatozoa, *Andrologia* 25, 331-335.
- [21] Albert, M., Gallo, J. M., Escalier, D., Parseghian, N., Jouannet, P., Schrevel, J., and David, G. (1992) Unexplained in-vitro fertilization failure: implication of acrosomes with a small reacting region, as revealed by a monoclonal antibody, *Hum Reprod* 7, 1249-1256.
- [22] Chemes, H. E., Olmedo, S. B., Carrere, C., Osés, R., Carizza, C., Leisner, M., and Blaquier, J. (1998) Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men, *Hum Reprod* 13, 2521-2526.
- [23] Chemes, H. E., Brugo, S., Zanchetti, F., Carrere, C., and Lavieri, J. C. (1987) Dysplasia of the fibrous sheath: an ultrastructural defect of human spermatozoa associated with sperm immotility and primary sterility, *Fertil Steril* 48, 664-669.
- [24] Escalier, D. (2006) Arrest of flagellum morphogenesis with fibrous sheath immaturity of human spermatozoa, *Andrologia* 38, 54-60.
- [25] Escalier, D., and Albert, M. (2006) New fibrous sheath anomaly in spermatozoa of men with consanguinity, *Fertil Steril* 86, 219 e211-219.
- [26] Fawcett, D. W. (1975) The mammalian spermatozoon, *Dev Biol* 44, 394-436.
- [27] Fawcett, D. W., and Phillips, D. M. (1969) The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon, *Anat Rec* 165, 153-164.
- [28] Fawcett, D. W. (1970) A comparative view of sperm ultrastructure, *Biol Reprod Suppl* 2, 90-127.
- [29] Schatten, H., and Schatten, G. (1980) Surface activity at the egg plasma membrane during sperm incorporation and its cytochalasin B sensitivity. Scanning electron microscopy and time-lapse video microscopy during fertilization of the sea urchin *Lytechinus variegatus*, *Dev Biol* 78, 435-449.
- [30] Palermo, G. D., Schlegel, P. N., Hariprasad, J. J., Ergun, B., Mielnik, A., Zaninovic, N., Veeck, L. L., and Rosenwaks, Z. (1999) Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men, *Hum Reprod* 14, 741-748.
- [31] Palermo, G. D., Cohen, J., and Rosenwaks, Z. (1996) Intracytoplasmic sperm injection: a powerful tool to overcome fertilization failure, *Fertil Steril* 65, 899-908.
- [32] Palermo, G. D., Neri, Q. V., Takeuchi, T., and Rosenwaks, Z. (2009) ICSI: where we have been and where we are going, *Semin Reprod Med* 27, 191-201.
- [33] (2001) [Laboratory manual of the WHO for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction], *Ann Ist Super Sanita* 37, I-XII, 1-123.
- [34] WHO. (1999) WHO Laboratory manual of the for the examination of human semen and sperm-cervical

- mucus interaction, 4th ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 37, I-XII, 1-123.
- [35] Menkveld, R., Stander, F. S., Kotze, T. J., Kruger, T. F., and van Zyl, J. A. (1990) The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria, *Hum Reprod* 5, 586-592.
- [36] Kruger, T. F., Acosta, A. A., Simmons, K. F., Swanson, R. J., Matta, J. F., Veeck, L. L., Morshedi, M., and Brugo, S. (1987) New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization, *Urology* 30, 248-251.
- [37] Mortimer, D., and Menkveld, R. (2001) Sperm morphology assessment: historical perspectives and current opinions, *J Androl* 22, 192-205.
- [38] Cooper, T. G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H. W., Behre, H. M., Haugen, T. B., Kruger, T., Wang, C., Mbizvo, M. T., and Vogelsong, K. M. (2010) World Health Organization reference values for human semen characteristics, *Hum Reprod Update* 16: 231-245.