

2020



[TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE SEMEN]

DRA. ADRIANA BRUFMAN

ESPERMOGRAMA BASICO

RECOLECCION DE LA MUESTRA

Recolección de muestra:

❖ Preparación:

- La muestra debe ser recolectada en una habitación cercana al laboratorio, para limitar la exposición del semen a las fluctuaciones de temperatura y para controlar el tiempo entre la recolección y el análisis.
- Debe ser recolectada con un mínimo de dos días a un máximo de 7 días de abstinencia sexual. Si se requieren muestras adicionales, el número de días de abstinencia sexual debe ser lo más constante posible entre cada visita.
- El paciente debe recibir las instrucciones de recolección de muestra tanto de forma escrita como oral. Debe enfatizarse que la muestra de semen debe ser completa. El paciente debe reportar si hubo alguna pérdida de alguna fracción de la muestra.
- La siguiente información debe ser incluida en el informe del paciente: nombre, edad, periodo de abstinencia, día y horario de recolección de la muestra, pérdidas en la recolección, dificultades al momento de producir la muestra, intervalo entre la recolección de la muestra y el comienzo del análisis de semen.

❖ Recolección de la muestra de semen para diagnóstico o estudio:

- La muestra debe ser obtenida por masturbación y eyaculación en un contenedor de plástico o vidrio de boca ancha y limpio, que ha sido confirmado q no es tóxico para los espermatozoides.
- El contenedor debe ser mantenido a temperatura ambiente, entre los 20 y 37°C, para evitar grandes cambios de temperatura que pueden afectar a los espermatozoides luego de ser eyaculados en su interior. Debe ser rotulado con el nombre del paciente y su número de identificación, fecha y hora de recolección de la muestra.
- La muestra debe ser incubada a 37°C mientras el semen se licua.
- Hay que reportar si la muestra es incompleta, especialmente si la primera fracción (prostática, rica espermatozoides) es la que se perdió. Si es incompleta se debe recolectar una segunda muestra nuevamente luego del periodo de abstinencia de 7 días.

❖ Recolección de la muestra para examen microbiológico:

- En esta situación la contaminación microbiológica de fuentes no seminales, por ejemplo organismos comensales de la piel deben ser evitadas.

- El recipiente de la muestra, las pipetas, tips y todo lo utilizado debe ser estéril.
 - El paciente debe: orinar, lavarse las manos y el pene con jabón para reducir el riesgo de contaminación del espécimen con organismos comensales de la piel, secarse las manos y el pene, eyacular dentro del recipiente estéril.
- ❖ Recolección de la muestra en casa:
- Solo se hace de esta forma cuando el laboratorio no cuenta con las instalaciones necesarias para realizar la recolección de la muestra o cuando el paciente no puede masturbarse en la clínica.
 - Se le debe informar sobre la recolección y el transporte de la muestra mencionado anteriormente.
 - El frasco donde se recolecta la muestra se pesa previamente y se rotula con el nombre y el número de identificación del paciente.
 - El paciente debe anotar la hora de recolección de la muestra y llevarla al laboratorio dentro de la primera hora de recolección.
 - Durante el transporte al laboratorio la muestra debe ser mantenida a una temperatura de entre 20 y 37°C.
 - El informe debe aclarar que la muestra fue recolectada en un lugar ajeno al laboratorio.
 - Otra forma de recolectar la muestra puede ser por condón; solamente los condones que no son tóxicos para la recolección de la muestra pueden ser usados. Debe informarse al hombre sobre cómo usar el condón, como cerrarlo y como enviarlo o transportarlo al laboratorio. En el informe debe constar que la muestra fue recolectada utilizando un condón especial durante el coito sexual en un lugar ajeno al laboratorio.

El tiempo entre la recolección de la muestra de semen y el inicio de la investigación por parte del laboratorio no debe exceder las 3 horas.

INSTRUCCIONES PARA LA RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA DE SEMEN

- Tener como mínimo 2 y como máximo 7 días de abstinencia sexual.
- Lavarse las manos y el pene con agua y jabón y enjuagar bien antes de obtener la muestra.
- Obtener la muestra por masturbación (o con recolector especial) en el recipiente estéril provisto.
- Captar la muestra en su totalidad. En caso de que no esté completa, informar esto al laboratorio al momento de entregarla.
- Completar con su nombre y demás datos la etiqueta autoadhesiva provista y colocarla en el recipiente.
- La muestra debe entregarse al laboratorio dentro de los 40 minutos- 1 hora de recolectada, sin exponerla a temperaturas extremas (20°C a 37°C).

Es importante utilizar el recipiente estéril provisto, ya que el mismo ha sido testeado, asegurando la no toxicidad para los espermatozoides.

La abstinencia sexual implica no tener relaciones sexuales ni masturbación por el período indicado. No deben aplicarse pomadas o lubricantes en los genitales durante las 8 horas anteriores a la obtención de la muestra.

EXAMEN FÍSICO

El análisis de semen debe comenzarse con una simple inspección luego de que se haya licuado preferentemente a los 30 minutos, pero no más de una hora después de la eyaculación para prevenir deshidratación o cambios en la temperatura que puedan afectar la calidad del semen.

- ❖ **Licuefacción**: inmediatamente después de la eyaculación dentro del recipiente de recolección, el semen es típicamente una masa semisólida coagulada. Dentro de unos pocos minutos a la temperatura de la habitación, el semen comienza a licuar, y al tiempo aparecen grumos heterogéneos en el fluido. Mientras continúa la licuefacción, el semen se hace más homogéneo y acuoso, y al final solo quedan pequeñas áreas coaguladas. La muestra completa usualmente licúa dentro de los 15 minutos a la temperatura de la habitación y raramente a los 60 minutos o más. Si la licuefacción completa no ocurre dentro de los 60 minutos, debe ser informado. La muestra de semen recolectada en casa o por condón normalmente han licuado al momento de llegada al laboratorio. La licuefacción normal de las muestras de semen pueden contener gránulos tipo Jelly (cuerpos gelatinosos) que no licúan; esto no parece tener significancia clínica. La presencia de mucus, sin embargo puede interferir con el análisis de semen.

- ❖ **Licuefacción retardada**: ocasionalmente las muestras no licúan, dificultando el análisis de semen. En estos casos, se necesita tratamiento adicional como el mezclado mecánico o digestión enzimática.

- ❖ **Viscosidad del semen**: luego de la licuefacción, la viscosidad de la muestra puede ser estimada con una pipeta de plástico desechable calibrada, permitiendo que el semen caiga por efecto de la gravedad y observando la longitud del hilo. Una muestra normal sale en pequeñas gotas. Si la viscosidad es anormal, la gota formará un hilo mayor a 2cm de longitud. Alternativamente, la viscosidad puede ser evaluada introduciendo una varilla de vidrio en la muestra y observando la longitud del hilo formado al retirar la varilla. Nuevamente, la viscosidad debe ser informada como anormal cuando el hilo sea mayor a los 2cm. En contraste las muestras parcialmente no licuadas, un semen viscoso es pegajoso y su consistencia no cambia con el tiempo. Altas viscosidades pueden ser reconocidas por propiedades elásticas de la muestra, las cuales se adhieren fuertemente cuando se las quiere pipetear. Los métodos para disminuir la viscosidad son los mismos que para los de licuefacción retardada.

- ❖ Apariencia del eyaculado: una muestra de semen que licua normalmente, posee una opalescencia gris homogénea. Puede parecer menos opaca si la concentración de semen es baja; el color también puede ser diferente.

- ❖ Volumen del semen: el volumen de la eyaculación está constituido mayoritariamente por las secreciones de la vesícula seminal y glándula prostática, con una pequeña contribución de las glándulas bulbouretrales y epidídimo. Es indispensable la precisión en la medida del volumen del semen en cualquier análisis de semen, ya que permite calcular el número total de espermatozoides y células no espermáticas en el eyaculado. La mejor medición del volumen de muestra se realiza pesando el semen en el recipiente donde se recolectó. Para ello, se debe recolectar la muestra en un recipiente previamente pesado (y limpio); se pesa el recipiente con la muestra en su interior y luego se realiza la resta correspondiente. Se asume que la densidad del semen es de 1g/ml. También, el volumen de muestra puede ser calculado directamente, recolectando el eyaculado en un recipiente calibrado. El límite de referencia inferior del volumen de semen es de 1,5ml.

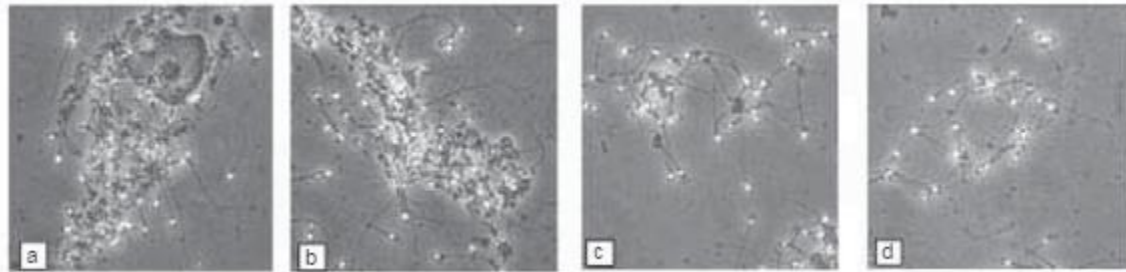
- ❖ PH del semen: el pH del semen refleja el balance entre los valores de pH de las diferentes secreciones de las glándulas accesorias, mayormente la secreción alcalina proviene de la vesícula seminal, mientras que el contenido ácido proviene de la secreción prostática. El pH debe ser medido luego de la licuefacción en un tiempo dado, preferiblemente luego de los 30 minutos, pero antes de la hora ya que es influenciado por la pérdida de CO₂ que ocurre luego de la producción. Para la medición de pH, luego del homogeneizado de la muestra, se utilizan tiras de medición de pH a las cuales se le coloca una gota de semen y se la distribuye sobre la tira y se espera al cambio de color que debe ser homogéneo en la zona impregnada con la muestra (menor a 30segundos). Luego se compara el color con una tira calibrada para poder leer el pH. Para muestras viscosas, el pH de una pequeña alícuota de semen puede ser medido utilizando un pHímetro diseñado para medir soluciones viscosas. Actualmente hay pocos valores de referencia sobre el pH del semen de hombres fértiles. El límite de referencia inferior es de 7,2.

EXAMEN MICROSCOPICO

EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO

Agregación

Se refiere a la adherencia de los espermatozoides inmóviles el uno al otro o de los espermatozoides móviles a los filamentos de moco, células no espermáticas o residuos, se considera agregación no específica y debe registrarse como tal. (**FIG 1:** espermatozoides unidos a células epiteliales (a), debris (b), otros espermatozoides (c,d))

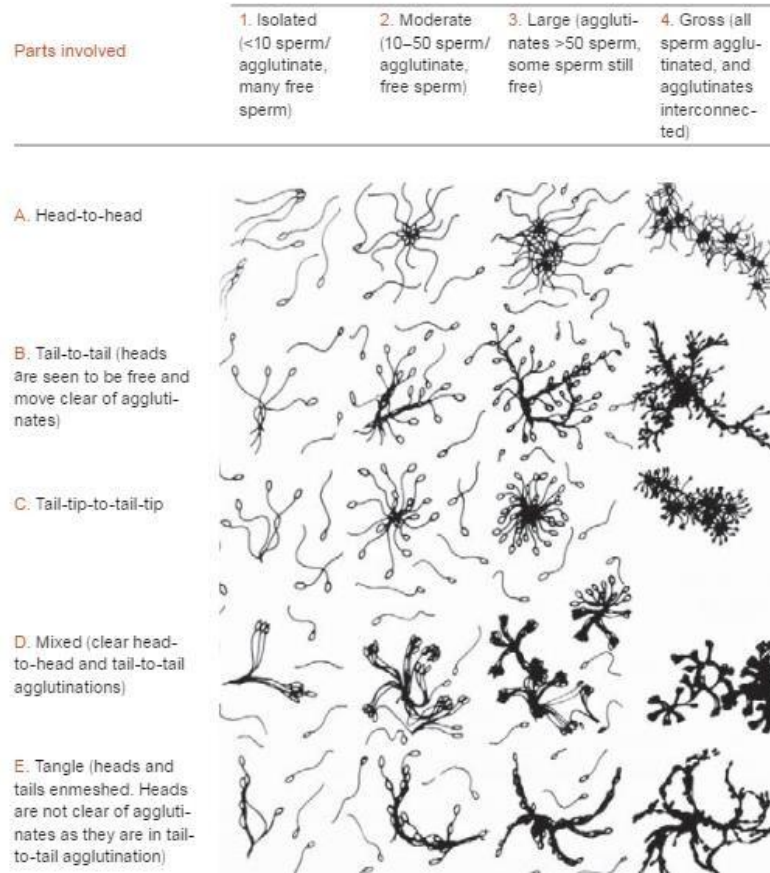


Aglutinación

La aglutinación de los espermatozoides significa que los espermatozoides móviles se adhieren entre ellos, cabeza con cabeza, cola con cola o de un modo mixto, por ejemplo, cabeza con cola. La movilidad es vigorosa con movimientos de agitación frenética, pero a veces los espermatozoides están tan aglutinados que su movilidad se ve limitada. Cualquier tipo de aglutinación debe tenerse en cuenta. Los distintos tipos de aglutinación se clasifican en grados 1-4 y los sitios de unión en letras A-E(**FIG 2**).

- Grado 1: <10 espermatozoides por aglutinado, muchos espermatozoides libres.
- Grado 2: 10-50 espermatozoides por aglutinado, espermatozoides libres.
- Grado 3: >50 espermatozoides aglutinados, pocos espermatozoides libres.
- Grado 4: Todos los espermatozoides se encuentran aglutinados y las aglutinaciones se encuentran interconectadas.

FIG 2



Preparación de muestras para examen microscópico directo

Se prepara una muestra de semen en fresco y se la evalúa en un microscopio de contraste de fase.

1. Mezclar bien la muestra de semen.
2. Tomar una alícuota de semen inmediatamente después de la mezcla, para evitar que los espermatozoides sedimenten.
3. Repetir el procedimiento para obtener un replicado.
4. El volumen de semen y las dimensiones del cubreobjetos debe ser estandarizado, de modo que los análisis se llevan a cabo en una preparación de profundidad fija de aproximadamente 20 μm , lo que permite que los espermatozoides nadar libremente.
5. Colocar un volumen estándar de semen en un portaobjetos de vidrio limpio.
6. Se cubre con un cubreobjetos
7. Tenga cuidado para evitar la formación y el atrapamiento de burbujas de aire
8. Evaluar la preparación húmeda al microscopio.

MOVILIDAD ESPERMÁTICA

La movilidad espermática constituye uno de los parámetros fundamentales para valorar la calidad del eyaculado. Esta depende de factores intrínsecos (estructura del flagelo, etc). En la valoración de la motilidad espermática hay un aspecto cuantitativo, o porcentaje de espermatozoides con motilidad y un aspecto cualitativo o velocidad y direccionalidad de los espermatozoides móviles. La evaluación de la motilidad espermática a través de la observación directa con el microscopio óptico adolece de falta de objetividad, esto puede ser corregido mediante el uso de equipos de análisis computarizados e imágenes.

El grado de movilidad espermática progresiva está relacionado con la tasa de embarazo. Existen tres tipos de movilidad:

- Móviles progresivos(MP): son espermatozoides que se mueven activamente tanto linealmente como en grandes círculos, independientemente de su velocidad.
- Móviles no progresivos (MNP): todos los otros tipos de movilidad presentes que tengan ausencia de desplazamiento. Por ejemplo: nadan en círculos pequeños, se mueve el flagelo pero no se desplaza, o cuando se observan pequeños movimientos del flagelo.
- Inmóviles (I): no presentan movilidad.

El límite de referencia inferior (LRI) para la suma de espermatozoides móviles progresivos y no progresivos, debe ser mayor a 40%. El LRI para los móviles progresivos debe superar el 32%, de lo contrario se denomina .

Preparación y evaluación de las muestras para movilidad

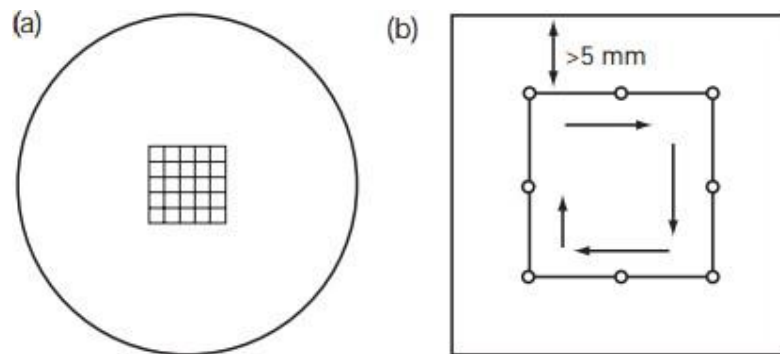
El estudio de la movilidad espermática se debe hacer lo más rápido posible después de la licuefacción de la muestra, preferentemente a los treinta minutos- una hora posterior a la eyaculación para evitar el deterioro de los espermatozoides (deshidratación, cambio de pH, temperatura de movilidad, etc.)

1. La evaluación de la movilidad se debe realizar a 37°C, incubando la muestra durante diez minutos a esta temperatura.
2. Homogeneizar la muestra.
3. Tomar una alícuota rápidamente para evitar que los espermatozoides sedimenten.
4. Repetir el procedimiento anterior.
5. Por cada replicado tomar una alícuota de semen que ajuste a 20µm de profundidad de la cámara, aproximadamente 10µl.
6. Esperar aproximadamente sesenta segundos para que la muestra se estacione.
7. Examinar la muestra con un objetivo de contraste de 200X o 400X.
8. Comenzar el conteo inmediatamente.
9. Deben ser observados en una cámara reticulada (**FIG 3 a**), se debe realizar en un área de al menos 5mm desde el borde del cubreobjetos para evitar errores de observación (efecto de secado)(**FIG 3 b**).
10. Realizar un escaneo sistemático para evitar evaluar dos veces la misma área.
11. Al momento de realizar la medida, hacerlo en diferentes sectores cambiándolos eventualmente.
12. Evaluar aproximadamente 200 espermatozoides por replicado para informar el porcentaje de las distintas categorías de movilidad.

13. Preferentemente el conteo se debe realizar en el siguiente orden: móviles progresivos, no progresivos e inmóviles. En cada replicado se debe repetir este orden para disminuir errores.
14. Si la diferencia entre los porcentajes de las movilidades en los replicados es aceptable, reportar cada una de las movilidades realizando un promedio entre ambas, de lo contrario se deben preparar nuevas muestras.
15. Solo se deben contar espermatozoides intactos (con cola y cabeza)

FIG 3: Cámaras para evaluar la movilidad espermática

- (a) Reticulado para facilitar el recuento de las distintas movilidades.
- (b) Campos seleccionados para la evaluación de movimiento espermático.



La evaluación de la movilidad de los espermatozoides en forma directa por observación al microscopio óptico carece de objetividad, existe un método que permite un análisis mucho más objetivo y posee ciertas ventajas sobre los métodos manuales, proporciona alta precisión y datos cuantitativos en los parámetros cinéticos de los espermatozoides.

Sistema CASA(computerassisted semen analysis)

Hay algunos factores que afectan el rendimiento del método de CASA como ser, la preparación de las muestras, la velocidad de fotogramas, la concentración de espermatozoides, la profundidad de la cámara de conteo.

El sistema consta de un microscopio con contraste de fases conectado a una platina que permite mantener las muestras a 37°C, una cámara de video de alta resolución conectada a una pantalla de televisión y un software de análisis de imágenes. El análisis se realiza al capturar imágenes de los espermatozoides en movimiento y luego la información es transferida al procesador matemático, que organiza y proporciona datos de la movilidad espermática.

El instrumento debe ajustarse a la comodidad del usuario, para garantizar un rendimiento óptimo, el fabricante indica los ajustes necesarios, pero los usuarios deben verificar que el instrumento funcione correctamente, para garantizar repetitividad y fiabilidad. Las muestras se deben procesar de la misma manera que en el método manual, deben mantenerse a 37°C ya que la motilidad de los espermatozoides es afectada por la temperatura.

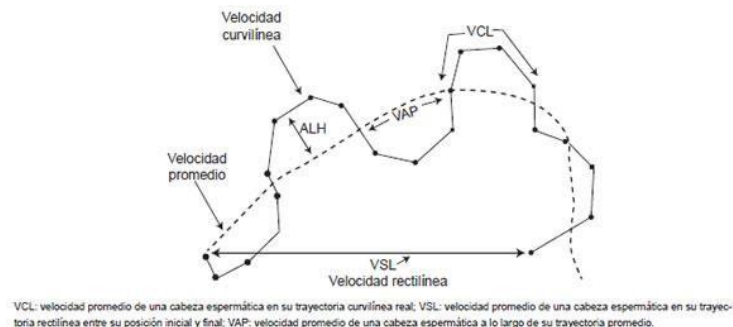
La motilidad puede evaluarse en semen sin diluir, si la concentración de espermatozoides esta entre $2 \cdot 10^6/\text{ml}$ y $50 \cdot 10^6/\text{ml}$. Las muestras de semen de concentraciones mayores a $50 \cdot 10^6/\text{ml}$ deben diluirse, ya que es muy probable que ocurran colisiones y se pueden generar errores. Una muestra 16g debe ser centrifugada por seis minutos, para producir un plasma seminal libre de espermatozoides, y luego se debe diluir la muestra de semen original con el plasma seminal sin espermatozoides para llevar a una concentración de $50 \cdot 10^6/\text{ml}$.

Las cámaras son descartables de $200\mu\text{m}$ de profundidad, es un sistema de doble cámara, ambas deben ser llenadas y analizadas. Se analizan seis campos por cámara, o sea 12 campos en total, y se deben evaluar al menos 200 espermatozoides en cada cámara. Cada espermatozoide debe ser seguido por un minuto, para lograr resultados precisos. Las muestras pueden analizarse directamente o en una grabación de un video.

En el sistema CASA permite medir varias clases de velocidad de la trayectoria (**FIG 4**):

- **VCL:** velocidad curvilínea, representa la distancia recorrida por la cabeza del espermatozoide por unidad de tiempo ($\mu\text{m/s}$).
- **VSL:** velocidad progresiva, es una medida de la distancia recorrida en línea recta por unidad de tiempo ($\mu\text{m/s}$).
- **VAP:** velocidad media de la trayectoria, expresa la velocidad media con la que la cabeza del espermatozoide recorre su trayectoria espacial ($\mu\text{m/s}$).
- **ALH:** amplitud de de la trayectoria del espermatozoide, se representa por la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (μm).
- **LIN:** la linealidad de la trayectoria curvilínea del espermatozoide, se expresa como el cociente de las velocidades progresiva y curvilínea ($VSL/VCL \times 100$).
- **WOB:** es una medida de la oscilación sobre el camino del espermatozoide (VAP/VCL).
- **STR:** índice de rectitud (VSL/VAP), es la relación entre la velocidad rectilínea y la velocidad media.

FIG 4



VITALIDAD ESPERMÁTICA

La vitalidad espermática se refleja en la proporción de los espermatozoides que están "vivos" de acuerdo al criterio de exclusión de algún colorante vital o mediante la expresión de su capacidad osmorreguladora cuando se los expone a condiciones hipoosmóticas. Esto debe ser determinado si el porcentaje de espermatozoides inmóviles supera el 50%. La proporción de espermatozoides vivos puede ser determinada utilizando técnicas de tinción basadas en el principio de que las

células muertas, cuyas membranas plasmáticas están dañadas, permiten la entrada de ciertos colorantes. Se cuentan 200 espermatozoides inmóviles con el microscopio óptico o de contraste de fase, diferenciando aquellos que están vivos (no coloreados) de las células muertas (coloreadas). Las evaluaciones de la vitalidad espermática sirven para verificar la exactitud de la evaluación de motilidad, ya que el porcentaje de células muertas no debe ser mayor (dentro de los errores de conteo) que el de espermatozoides inmóviles. Además, la presencia de gran proporción de células vivas, pero inmóviles puede significar que existen defectos estructurales en el flagelo.

Preparación y evaluación de muestras utilizando eosina:

Este método es simple y rápido pero las preparaciones húmedas no se puede almacenar durante con fines de control de calidad.

-Preparación del reactivo:

1. NaCl, 0,9% (p / v): se disuelven 0,9 g de NaCl en 100 ml de agua purificada.
2. Eosina Y, 0,5% (p / v): se disuelven 0,5 g de eosina Y (índice de color 45380) en 100 ml de NaCl 0,9%.

Nota: Algunas soluciones de eosina disponibles en el mercado son soluciones acuosas hipotónicas que provocar falsos positivos. Si se utiliza una solución de este tipo, añadir 0,9 g de NaCl a 100 ml de solución para elevar la osmolalidad.

-Procedimiento:

1. Mezclar bien la muestra de semen.
2. Retirar una alícuota de 5 μ L de semen y se combinan con 5 μ L de solución de eosina en un portaobjetos. Mezclar con una punta de pipeta.
3. Cubrir con un cubreobjetos, dejar asentar durante 30 segundos.
4. Repetir los pasos anteriores para realizar un replicado.
5. Examine cada preparado, preferentemente con objetivo de contraste de fase negativa \times 200 \times 400.
6. Contabilizar el número de espermatozoides coloreados (muertos) y las células no teñidas (vitales).
7. Evaluar 200 espermatozoides en cada repetición, a fin de disminuir el error de muestreo.
8. Calcular el promedio y la diferencia de los dos porcentajes de células vitales de las preparaciones.
9. Si la diferencia entre los porcentajes es aceptable puede ser informada, en cas contrario repetir la evaluación.

Preparación y evaluación de muestras utilizando HOST:

-Preparación de reactivos: Solución para fines de diagnóstico: disolver 0,735 g de citrato de sodio deshidratado y 1,351 g de D-fructosa en 100 ml de agua purificada. Congelar una alícuota de 1mL a -20 C.

-Procedimiento:

1. Descongelar la solución de diagnóstico y mezclar bien antes de usar.
2. Caliente 1 ml de solución de diagnóstico en microcentrífuga a 37 ° C durante 5 minutos.
3. Mezclar bien la muestra de semen.

4. Tomar una alícuota de 100 μ L de semen y añadir a la solución de diagnóstico, mezclar suavemente con pipeta.
5. Incubar a 37 ° C durante 5 minutos o 30 minutos, luego se transfieren una alícuota de 10 μ L a un portaobjetos limpio y cubrir con un cubreobjetos.
6. Realizar un replicado.
7. Examine cada replicado en el microscopio.
8. Contabilizar el número de espermatozoides no hinchados (muertos) y las células hinchadas (vitales).
10. Evaluar 200 espermatozoides en cada repetición, a fin de disminuir el error de muestreo.
11. Calcular el promedio y la diferencia de los dos porcentajes de células vitales de las preparaciones.
12. Si la diferencia entre los porcentajes es aceptable puede ser informada, en cas contrario repetir la evaluación.

CONCENTRACIÓN Y NÚMERO DE ESPERMATOZOIDES

El número de espermatozoides por eyaculado y la concentración son parámetros relacionados con la tasa de embarazo.

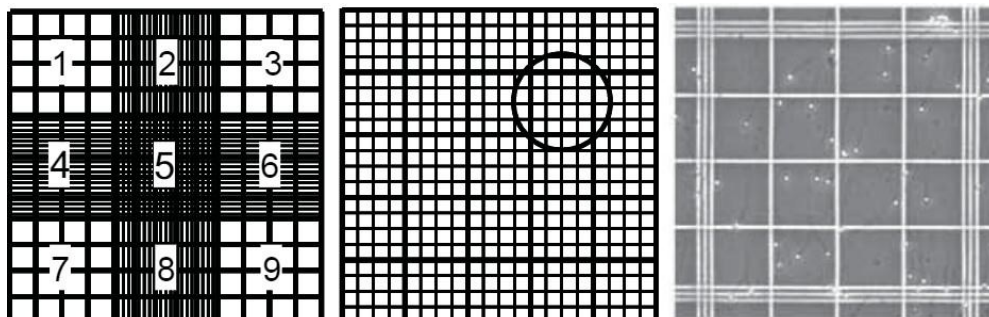
- Concentración: se refiere al número de espermatozoides por unidad de volumen de semen.
- Número de espermatozoides: refleja el número total de espermatozoides presentes en el eyaculado y se calcula multiplicando la concentración de espermatozoides por el volumen de eyaculado.

El número total de espermatozoides en el eyaculado se correlaciona con el volumen testicular y por lo tanto es una medida de la capacidad de los testículos para producir espermatozoides y la permeabilidad de las vías. La concentración de espermatozoides en el semen, está relacionada con las tasas de fertilización y embarazo, influenciada por el volumen de las secreciones de la vesícula seminal y la próstata por lo que no es una medida específica de la función testicular.

Cámara de hemocitómetro (Neubauer)

El hemocitómetro de Neubauer tiene dos cámaras de recuento separadas, cada una con una con un patrón microscópico (3mm x 3mm) de líneas de división grabadas en la superficie del vidrio. Se utiliza un cubreobjetos de espesor especial (0,44mm), que se coloca sobre la rejilla y es sostenido por pilares de vidrio a 0,1 mm por encima del suelo de la cámara. Cada área de recuento se divide en nueve cuadrículas de 1 mm x 1 mm (**FIG 3** izquierda), la cuadrícula central, número 5, tiene 25 cuadrados secundarios (**FIG 3** central). En la imagen se observa una micrografía de uno de los 25 cuadrados del panel central cargado (**FIG 3** derecha), este contiene una rejilla de 16 cuadrados terciarios delimitados por líneas triples.

FIG



3

Pasos para determinar el número total de espermatozoides.

1. El examen se realiza sobre preparación homogenizada, sin diluir de la muestras de semen licuado colocada sobre un porta/ cubreobjetos para determinar tanto la dilución como la cámara a utilizar.
2. Mezclar el semen y preparar las diluciones con fijador.
3. Cargar la cámara de hemocitómetro y dejar que la muestra se asiente.
4. Evaluar la muestra dentro de los 10-15 min (para evitar la evaporación).
5. Contar por lo menos 200 espermatozoides por replicado.
6. Comparar los resultados de los replicados, si la diferencia es notable repetir las diluciones.
7. Calcular la concentración de espermatozoides por ml.
8. Calcular el número total de espermatozoides en el eyaculado.

Preparación de las diluciones y conteo en cámara Neubauer.

Para determinar la dilución a realizar debemos examinar la muestra en fresco colocando una gota de semen entre porta y cubre y examinarlo con objetivos de 200X-400X.

Contar los espermatozoides para determinar la dilución según:

Spermatozoa per $\times 400$ field	Spermatozoa per $\times 200$ field	Dilution required	Semen (μ l)	Fixative (μ l)	Chamber	Area to be assessed
>101	>404	1:20 (1 + 19)	50	950	Improved Neubauer	Grids 5, 4, 6
16-100	64-400	1:5 (1 + 4)	50	200	Improved Neubauer	Grids 5, 4, 6
2-15	8-60	1:2 (1 + 1)	50	50	Improved Neubauer	Grids 5, 4, 6
<2	<8	1:2 (1 + 1)	50	50	Improved Neubauer or large-volume	All 9 grids or Entire slide

Diluyente de Mac Combers-Saunders(fijador): disolver 50g de bicarbonato de sodio y 10ml de formalina 35% V/V, en 1000ml de agua. Si se desea se puede añadir 25g de azul de tripano o 5ml de violeta saturado de genciana, para resaltar las cabezas. Conservar a 4°C.

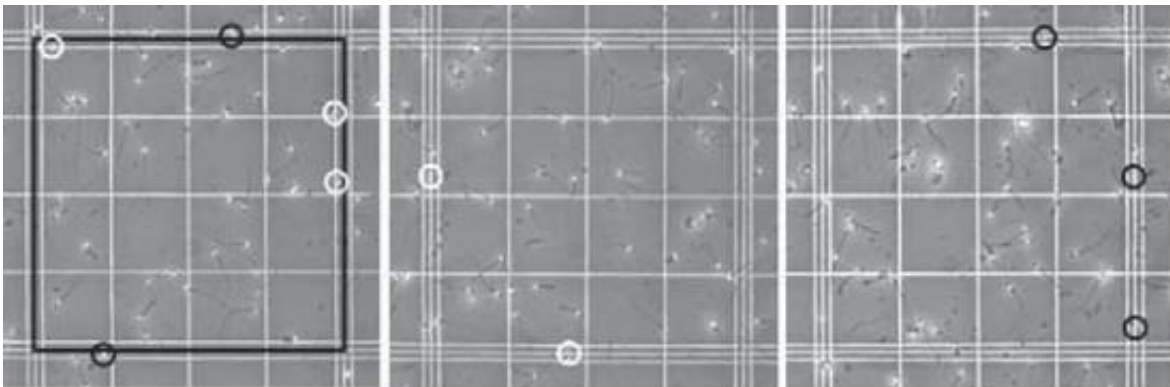
Una vez realizada la dilución homogeneizar bien la muestra, humedecer la superficie del hemocitómetro para adherir el cubreobjetos, una vez adherido se procede a cargar la cámara con una micro pipeta aspirando 10 μ L de la dilución rápidamente para evitar que sedimenten los espermatozoides.

Recuento en cámara:

1. Solo se deben contar espermatozoides enteros, con cola y cabeza, debemos tener en cuenta la ubicación de la cabeza dentro de la cuadrícula.
2. Para evitar contar los mismos espermatozoides se deben elegir dos lados de cada cuadrante, en el caso de la figura el izquierdo e inferior formando una L. Un

- espermatozoide con su cabeza sobre la línea que divide dos cuadrados adyacentes debe ser contado solo si esa línea es una de las elegidas.
3. Un espermatozoide se cuenta si la mayor parte de su cabeza se encuentra entre las dos líneas internas pero no si la mayor parte de su cabeza se encuentra entre las dos líneas externas, de los lados elegidos.
 4. La línea media define el límite de cada cuadrante (**FIG 4**)
 5. Se cuentan los espermatozoides dentro de cada cuadrante y aquellos que están con la cabeza entre las dos líneas internas (círculos blancos) pero no aquellos que están entre las dos líneas exteriores (círculos negros).
 6. Un espermatozoide que esta con la mayor parte de su cabeza apoyada en la línea central se cuenta solo si esa es la línea inferior o izquierda del cuadrante, pero no si se trata de una línea derecha o superior del mismo.
 7. Se deben evaluar ambas cámaras del hemocitómetro, si concuerdan los valores del recuento, las alícuotas tomadas se consideran representativas de la muestra. Deben contarse al menos 200 espermatozoides en cada cámara para disminuir el error.
 8. Si la diferencia entre ambas es aceptable, realizar un promedio de ambas y proceder a calcular la concentración.
 9. Si la diferencia es alta, preparar dos nuevas diluciones y volver a contar.

FIG 4



Calculo de la concentración de espermatozoides en semen.

La concentración de espermatozoides en semen será el número de espermatozoides contados (N) dividido por el volumen en que se encuentran, es decir el volumen de la cantidad total n de filas examinadas por replicado (20nl por cada rejilla 4, 5 y 6), multiplicado por el factor de dilución.

$$C=(N/n) \times (1/20) \times \text{factor de dilución} \quad [\text{espermatozoides/nl}]$$

El LRI de la concentración de espermatozoides es 15×10^6 espermatozoides por ml y el LRI del número total de espermatozoides es 39×10^6 espermatozoides por eyaculado.

Camara de Makler

Es una cámara alternativa para la evaluación de concentración de espermatozoides, la ventaja de esta cámara frente a la de Neubauer es que ésta utiliza las muestras sin diluir, aumentando la precisión del procedimiento y la reproducibilidad de los resultados.

La cuadrícula de la cámara de recuento Makler® mide 1 x 1 mm, y tiene una profundidad de sólo 0,01 mm, y está subdividida en 100 cuadros de 0,1 x 0,1 mm, cada uno. El recuento de espermatozoides se realiza de la siguiente manera: se transfirieron a la cámara 3-5 µl de muestra de semen previamente inmovilizada por incubación a 60°C durante 10 minutos y el recuento se realiza después de 5 minutos en los 10 cuadrados de la cámara. El número total de espermatozoides contados es la concentración final.

Bajo número de espermatozoides en el recuento

Si no se observan espermatozoides en los distintos replicados se puede pensar en una azoospermia. Aunque la azoospermia es descripción del eyaculado y no es suficiente evidencia para el diagnóstico. Se puede utilizar el término azoospermia si no se observan espermatozoides en el pellet de la muestra centrifugada. Se deben tener en cuenta que la presencia o ausencia de espermatozoides en el pellet está relacionada tanto con el tiempo como con la velocidad de centrifugado y que posterior al centrifugado la movilidad puede perderse y la concentración será subestimada.

ELEMENTOS CELULARES DIFERENTES A LOS ESPERMATOZOIDEOS

El eyaculado puede contener además de espermatozoides, distintos tipos celulares que se los denominan como "células redondas". Se pueden encontrar células epiteliales del tracto uretral y próstata, células de la espermatogénesis y leucocitos, un eyaculado normal no debe contener más de 5×10^6 células redondas/ml.

- Leucocitos

Entre los que predominan los neutrófilos, están presentes en todas las eyaculaciones, el número de leucocitos no debe superar 1×10^6 /ml. Un número excesivo de estas células (leucocitospermia), sugiere la existencia de una infección y una pobre calidad de semen.

Para la identificación de leucocitos se utilizan técnicas basadas en la existencia de peroxidasa intracelular y antígenos específicos de los leucocitos.

Si el número de leucocitos en semen es elevado se precede realizar un estudio microbiológico, para investigar una infección en las glándulas anexas, analizando el primer y segundo chorro urinario, liquido prostático, y plasma seminal.

- Células germinales inmaduras

Son las células redondas no identificadas como leucocitos, incluyen las espermatídes, espermatocitos y espermatogonias, estas suelen ser difíciles de identificar. Estas células germinales inmaduras en semen suelen indicar un desorden en la espermatogénesis.

Se las puede identificar mediante una tinción, y ser diferenciadas de los leucocitos por características citológicas y por ausencia de peroxidasa intracelular o de antígenos leucocitarios.

La excesiva descamación de estas células puede indicar una función defectuosa de túbulos seminíferos, como en la hipoespermatogénesis, el varicocele, y la disfunción de las células de Sertoli. Esto está asociado a un bajo éxito en la fertilización in vitro.

Recuento de células diferentes a espermatozoides

Se utiliza el hemocitómetro, igual que para el recuento de espermatozoides. La concentración de células germinales o leucocitos puede ser calculada en forma relativa a la concentración de espermatozoides mediante la fórmula:

$$C = N \times S / 100$$

N: es el número del tipo celular contado en los mismos campos que 100 espermatozoides.

S: es el recuento de espermatozoides en millones por ml.

C dará la concentración de la célula en millones por ml.

Si no se observan células en el total del portaobjetos es apropiado informar que existen 3,7 células por unidad de volumen examinada. Por lo tanto para una muestra de 1µm el contaje es de 3.700 células/ml que es el límite de detección inferior.

PARTES DEL ESPERMATOZOIDE

La variabilidad morfológica del espermatozoide humano dificulta su evaluación, pero la observación de los espermatozoides recuperados del tracto reproductivo femenino, especialmente del mucus endocervical postcoital y de la superficie de la membrana pelúcida, han ayudado a definir la apariencia del potencial espermatozoide morfológicamente normal.

Un espermatozoide consta de una cabeza y una cola o flagelo. Ambos están cubiertos por una membrana plasmática espermática.

La cabeza espermática contiene un núcleo haploide empaquetado por protaminas: esta forma compactada es más hidrodinámica y facilita la movilidad y la penetración del espermatozoide a través de la membrana del ovocito. El núcleo se encuentra cubierto por una envoltura nuclear y la teca o matriz perinuclear.

En la parte anterior del núcleo se encuentra el acrosoma. Éste es una vesícula secretora modificada que contiene enzimas que digieren proteínas y glúcidos complejos, utilizadas para degradar y penetrar la cubierta externa del gameto femenino. El acrosoma consta de dos membranas: una externa, que se encuentra por detrás de la membrana celular del espermatozoide y una interna, que rodea el núcleo espermático.

El flagelo es una estructura cuya principal porción motora se denomina axonema. Éste está formado por microtúbulos que parten del centriolo localizado en la base del núcleo del espermatozoide. Los microtúbulos presentan un rearrreglo único conocido como "9 + 2", el cual se refiere a nueve parejas de microtúbulos periféricos y simétricos conectados pareja a pareja por brazos de dineína a dos microtubulos centrales por segmentos radiales.

El flagelo está constituido por 4 regiones diferentes: el cuello, la pieza media, y los segmentos principal y terminal.

El cuello es una estrecha franja que conecta al flagelo con la cabeza; después del cuello se observa una región (pieza media) que contiene, bajo la membrana plasmática, mitocondrias dispuestas helicoidalmente que envuelven al axonema.



Esquema detallado de las partes del espermatozoide

ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA

El estudio morfológico del semen comprende la evaluación de la normalidad estructural del espermatozoide, considerando sus elementos anatómicos visibles.

De acuerdo a la OMS, una muestra de semen con una calidad espermática normal es aquella con un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales mayor o igual al 30%. Para llevar a cabo la valoración de la morfología se deben analizar un mínimo de 100 espermatozoides.

Para que un espermatozoide sea considerado normal, la cabeza, cuello, pieza media y cola deben ser normales.

Se tienen en cuenta los siguientes criterios:

- La cabeza debe ser lisa, regularmente contorneada y de forma oval, de de 3,7 a 4,7 μm de longitud y 2,5 a 3,2 μm de ancho. Debe estar bien definida la región acrosomal comprendiendo entre un 40-70% de la parte distal de la cabeza.
- La región acrosomal no debe contener grandes vacuolas y no más de 2 vacuolas pequeñas, que no deben ocupar más del 20% de la cabeza del espermatozoide.
- La región post acrosomal no debe contener vacuolas.

- La pieza media debe ser delgada (menor a 1 μm de ancho), regular y de la misma longitud que la cabeza espermática.
- El citoplasma residual es considerado una anomalía únicamente cuando está en exceso, por ejemplo cuando excede un tercio de la cabeza espermática.
- La pieza principal debe ser uniforme a lo largo de toda su longitud, debe ser más delgada que la pieza media y de aproximadamente 45 μm de longitud. Debe estar desenrollada (recta o sin presentar angulaciones bruscas que sugieran rotura).

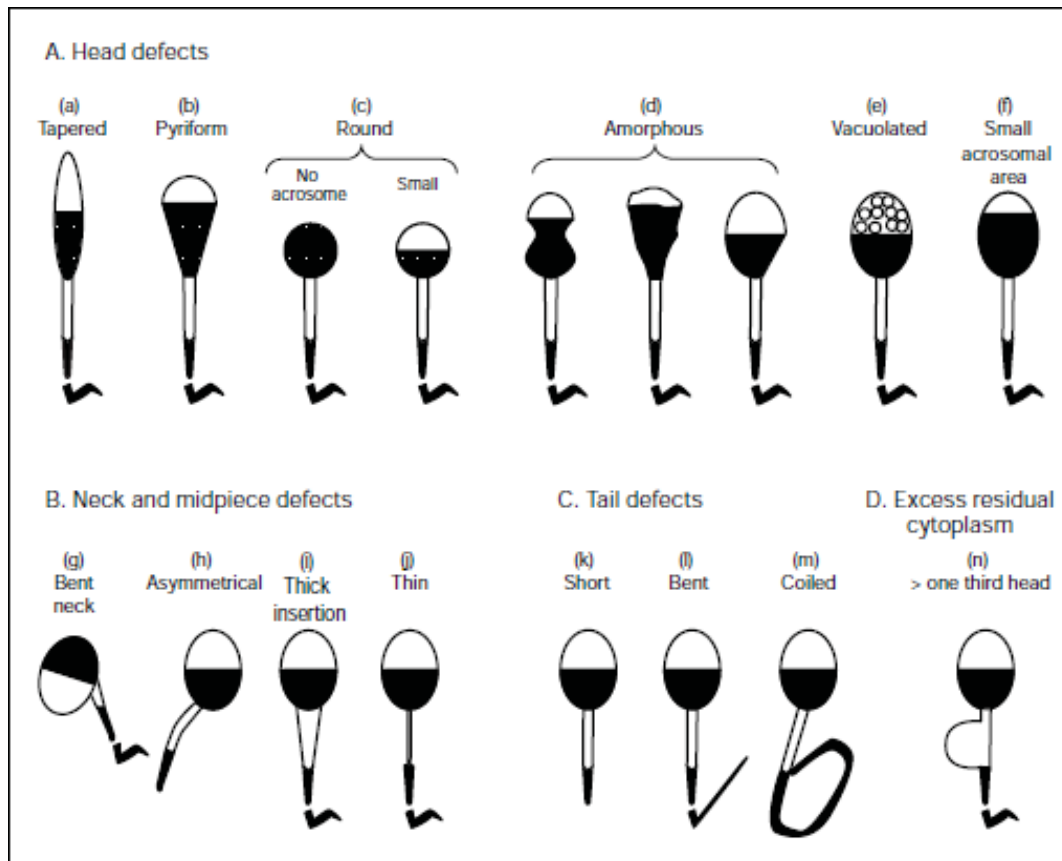
Las muestras de semen humano contienen espermatozoides con diferentes tipos de malformaciones. Una espermatogénesis defectuosa y patologías del epidídimo están comúnmente asociadas a espermatozoides morfológicamente anormales.

Los defectos morfológicos son usualmente mixtos.

Un espermatozoide anormal tiene un menor potencial fertilizante, dependiendo del tipo de anomalías y también presentan ADN anormal. Los defectos morfológicos han sido asociados con un incremento de la fragmentación del ADN, un incremento en la incidencia de aberraciones cromosómicas, cromatina inmadura, aneuploidía.

Se deben estudiar:

- Defectos de cabeza: esto incluye cabezas grandes, ovales, pequeñas redondas, tapering, piriformes, amorfas, vacuoladas, cabezas dobles y presencia de acrosoma en menos del 40 % o más del 70% de la parte distal, o la combinación de cualquiera de estas.
- Defectos del cuello y pieza intermedia: cuello hinchado, irregular, parte media inclinada o la combinación de cualquiera de estas.
- Defectos de la cola: cola pequeña, múltiple, horquillada, angulada, irregular, parte media inclinada o la combinación de éstas.
- Vesículas citoplasmáticas: mayores de un tercio de la cabeza del espermatozoide; generalmente se localizan en el cuello y pieza media aunque algunos espermatozoides inmaduros las pueden tener en otras regiones a lo largo de la cola.



Clasificación de los defectos morfológicos de los espermatozoides. Adaptación del criterio estricto de Kruger. Manual OMS 2010.

Todas las micrografías de la imagen anterior fueron evaluadas por los criterios morfológicos descritos anteriormente.

El análisis de la morfología de los espermatozoides es subjetiva y particularmente difícil de estandarizar, ya que intenta dibujar un punto artificial de corte entre las células normales y anormales, sobre la base de una multitud de características de cabezas de espermatozoides y colas.

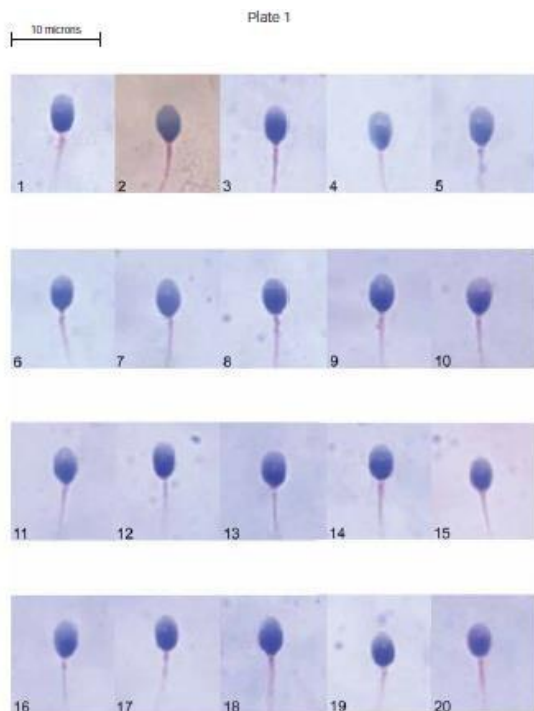
Por otro lado, la OMS ha variado los criterios previos para su análisis. La nueva metodología está basada en el “índice de teratozoospermia”, que expresa el porcentaje de anomalías por espermatozoide anormal, pasando a un segundo plano el número de células que son normales.

Los trabajos de Kruger proponen un criterio más estricto en la evaluación de la morfología, ya que consideran a los espermatozoides *borderline* como anormales.

Este método está basado en criterios muy estrictos, es decir, cualquier pequeña anomalía convierte al espermatozoide en anormal, con lo que el valor mínimo de espermatozoides normales para considerar una muestra morfológicamente adecuada pasa del 30% a un 14 %.

Por lo tanto, un semen es considerado TERATOZOOSPERMICO cuando presenta menos del 30% de formas normales según la OMS, o menos del 14 % según el criterio estricto de Kruger. El quinto manual de la OMS establece un valor para el límite inferior de referencia para la morfología espermática del 4%.

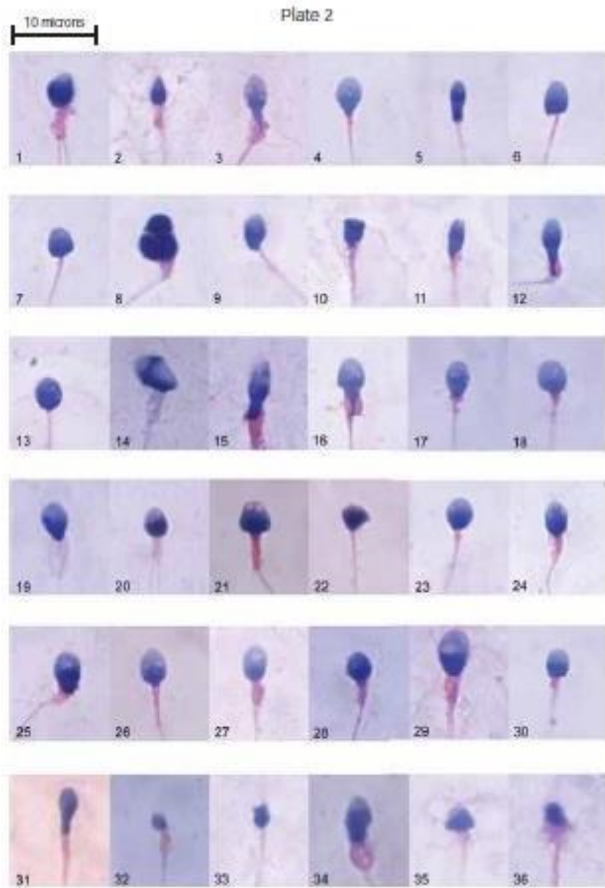
A continuación se presentan distintas imágenes, obtenidas del Manual de la OMS (quinta edición) que permiten observar la amplia variabilidad morfológica entre espermatozoides.



Micrographs courtesy of C. Brazil.

Morphology assessment of spermatozoa in Plate 1

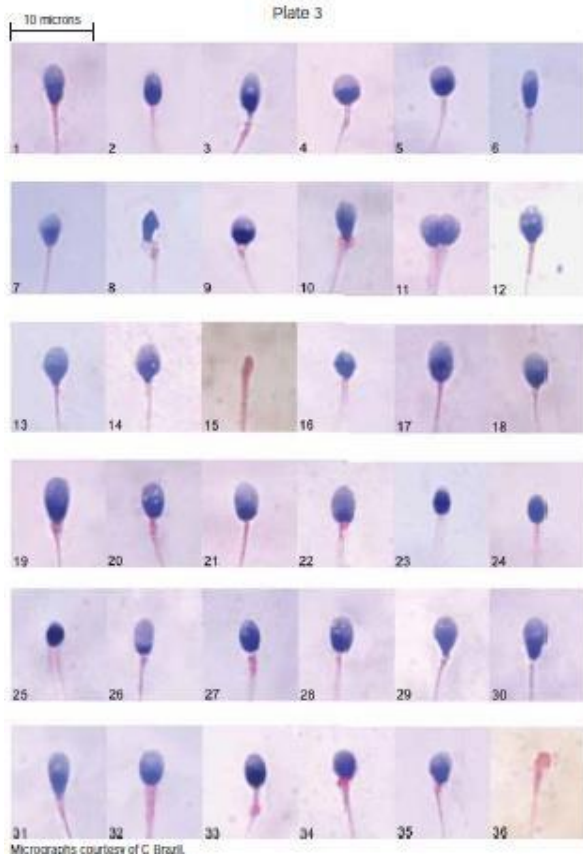
Sperm	Head shape	Other head comments	Midpiece comments	Principal piece comments	Overall sperm classification	Comments
1	normal		normal		normal	if PP OK
2	normal		normal		normal	if PP OK
3	normal		normal		normal	if PP OK
4	normal		normal		normal	if PP OK
5	normal		normal		normal	if PP OK
6	normal		normal		normal	if PP OK
7	normal		normal		normal	if PP OK
8	normal		normal		normal	if PP OK
9	normal		normal		normal	if PP OK
10	normal		normal		normal	if PP OK
11	normal		normal		normal	if PP OK
12	normal		normal		normal	if PP OK
13	normal		normal		normal	if PP OK
14	normal		normal		normal	if PP OK
15	normal		normal		normal	if PP OK
16	normal		normal		normal	if PP OK
17	normal		normal		normal	if PP OK
18	normal		normal		normal	if PP OK
19	normal		normal		normal	if PP OK
20	normal		normal		normal	if PP OK



Micrographs courtesy of C. Brazil.

Morphology assessment of spermatozoa in Plate 2

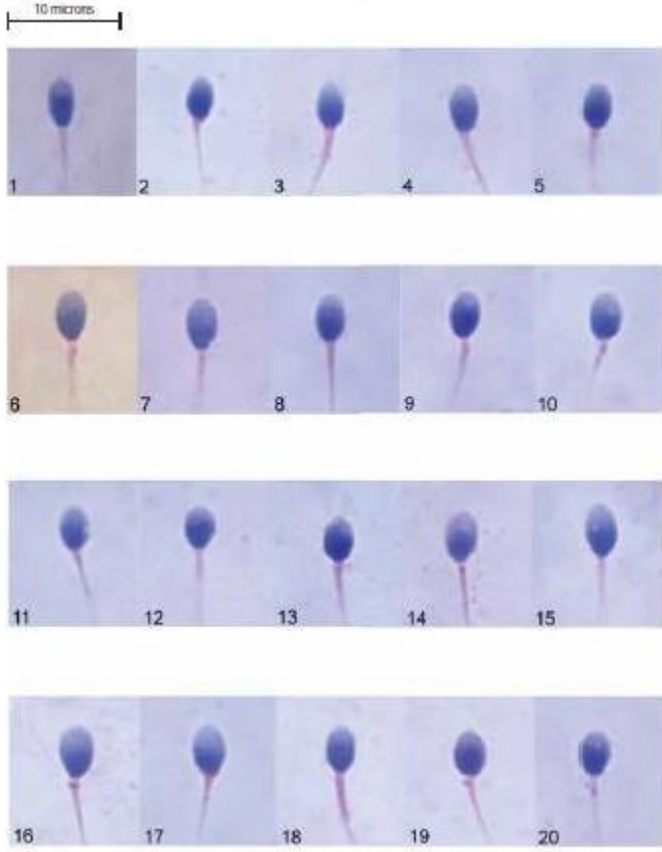
Sperm	Head shape	Other head comments	Midpiece comments	Principal piece comments	Overall sperm classification	Comments
1	abnormal		thick	double	abnormal	
2	abnormal		irreg		abnormal	side view
3	abnormal	pyriform	bent, irreg. ERC		abnormal	>one third
4	abnormal				abnormal	
5	abnormal	pyriform			abnormal	
6	abnormal				abnormal	
7	abnormal				abnormal	
8	abnormal		thick		abnormal	
9	abnormal		insert		abnormal	
10	abnormal				abnormal	
11	abnormal				abnormal	
12	abnormal	pyriform		bent	abnormal	
13	abnormal	>2 vac, PA vac			abnormal	
14	abnormal		thick		abnormal	
15	abnormal	pyriform	thick, ERC		abnormal	>one third
16	abnormal	pyriform	ERC		abnormal	>one third
17	normal	PA vac			abnormal	
18	abnormal		thick, insert		abnormal	
19	abnormal		abnormal		abnormal	
20	abnormal		thick		abnormal	
21	abnormal		thick		abnormal	
22	abnormal				abnormal	
23	abnormal				abnormal	
24	normal	>2 vac	thick		abnormal	
25	abnormal		thick, bent		abnormal	
26	abnormal		thick		abnormal	
27	abnormal	>70% acr	thick		abnormal	
28	abnormal		thick		abnormal	
29	abnormal		thick		abnormal	
30	abnormal		thick		abnormal	
31	abnormal	pyriform	thick		abnormal	
32	abnormal	small	thick		abnormal	
33	abnormal	small	thick		abnormal	
34	abnormal		ERC		abnormal	>one third
35	abnormal		thick		abnormal	
36	abnormal		thick		abnormal	



Morphology assessment of spermatozoa in Plate 3

Sperm	Head shape	Other head comments	Midpiece comments	Principal piece comments	Overall sperm classification	Comments
1	abnormal	tapered	thick		abnormal	
2	abnormal				abnormal	
3	abnormal		irreg		abnormal	
4	abnormal	round			abnormal	
5	abnormal	round			abnormal	
6	abnormal	tapered			abnormal	
7	abnormal	tapered			abnormal	
8	abnormal	amorphous	thick		abnormal	
9	abnormal	round	thick		abnormal	
10	abnormal	tapered	irreg, thick		abnormal	
11	—				—	two cells
12	abnormal	>2 vac, PA vac			abnormal	
13	abnormal				abnormal	
14	normal	PA vac			abnormal	
15	—				—	pinhead
16	abnormal	small			abnormal	
17	abnormal	large			abnormal	
18	normal		thick		abnormal	
19	abnormal		thick		abnormal	
20	abnormal	>2 vac	insert		abnormal	
21	normal	>70% acr			abnormal	
22	abnormal	>70% acr			abnormal	
23	abnormal	<40% acr, small			abnormal	
24	abnormal	<40% acr, small			abnormal	
25	abnormal	<40% acr, small			abnormal	
26	abnormal	>70% acr			abnormal	
27	abnormal	<40% acr, >2 vac	irreg		abnormal	
28	normal	>2 vac			abnormal	
29	abnormal	tapered			abnormal	
30	abnormal	tapered			abnormal	
31	abnormal	tapered			abnormal	
32	normal		thick		abnormal	
33	normal		thick		abnormal	
34	abnormal	<40% acr	thick		abnormal	
35	abnormal		thick, bent		abnormal	
36	—				—	pinhead

Plate 4

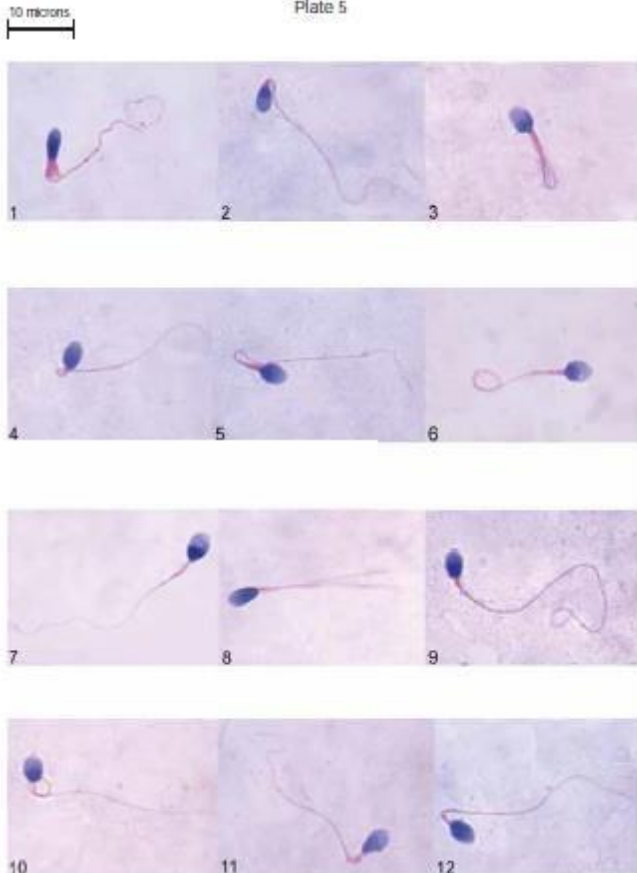


Micrographs courtesy of C. Brant.

Morphology assessment of spermatozoa in Plate 4

Sperm	Head shape	Other head comments	Midpiece comments	Principal piece comments	Overall sperm classification	Comments
1	abnormal	flat	thick		abnormal	
2	normal		thick, bent		abnormal	
3	normal		thick		abnormal	
4	normal		thick, bent		abnormal	
5	normal		thick		abnormal	
6	normal		thick		abnormal	
7	abnormal	irreg			abnormal	
8	normal		thick		abnormal	
9	normal		insert, bent		abnormal	
10	normal		thick, bent		abnormal	
11	abnormal	PA vac			abnormal	
12	abnormal				abnormal	
13	abnormal	<40% acr, >2 vac	thick		abnormal	
14	normal		irreg		abnormal	
15	normal		insert		abnormal	
16	normal		thick		abnormal	
17	normal		insert, thick		abnormal	
18	normal		thick, too long		abnormal	
19	normal	<40% acr	insert		abnormal	
20	normal	<40% acr	irreg		abnormal	

Plate 5



Micrographs courtesy of C. Brant.

Morphology assessment of spermatozoa in Plate 5

Sperm	Head shape	Other head comments	Midpiece comments	Principal piece comments	Overall sperm classification	Comments
1	abnormal		ERC		abnormal	>one third
2	normal		bent	normal	abnormal	
3	abnormal	>70% acr		looped	abnormal	
4	normal		bent	normal	abnormal	
5	normal		thick	looped	abnormal	
6	abnormal	PA vac		coiled	abnormal	
7	normal				normal	
8	normal			double	abnormal	
9	abnormal			coiled	abnormal	
10	abnormal		bent, insert	coiled	abnormal	
11	normal		thick	bent	abnormal	
12	normal		bent	normal	abnormal	

TINCIONES

Los métodos de tinción son muy variados, pero los más utilizados son:

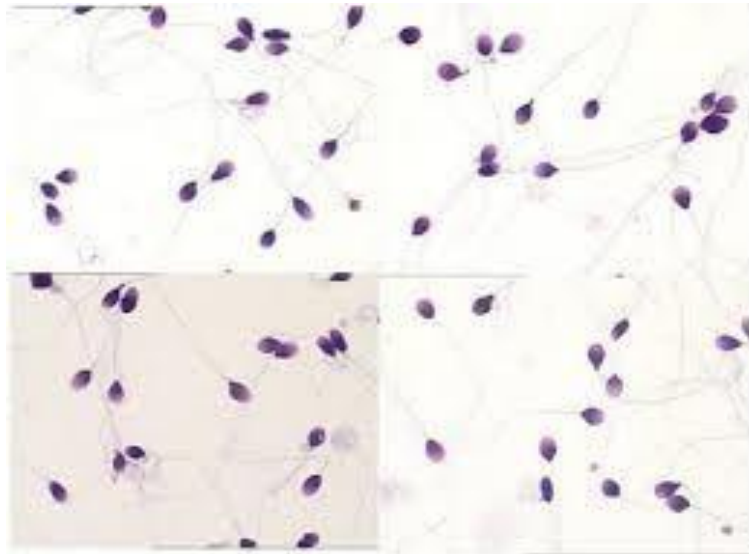
- Diff-Quik
- Papanicolaou
- Shorr
- Giemsa
- Spermac
- Testsimplets

Diff-Quik

La tinción de Diff-Quik colorea al acrosoma de morado pálido, mientras que la región post-acrosomal, la pieza media y el flagelo se tiñen de morado oscuro. El análisis morfológico con esta tinción provee de resultados similares comparándolo con Papanicolaou.

Un efecto negativo de esta tinción es que puede ocurrir una tinción excesiva de la célula y del fondo o *background*, lo cual se puede contrarrestar lavando primero la muestra de semen antes de realizar el

frotis.



E spermatozoides coloreados con tinción Diff-Quick

La tinción de Diff-Quik se realiza de la siguiente manera: Se realiza un frotis en un portaobjetos de la muestra fresca para evaluación de la morfología espermática. Luego, se deja secar bien a

temperatura ambiente y se tiñe con la tinción HEMA3 o Diff-Quick, que consiste en un fijador con alcohol metilo, y dos colorantes, uno con eosina y otro con azul de metileno.

En el fijador, la lámina se mantiene por un minuto; en el colorante rojo se deja por dos minutos, y finalmente se mantiene en el colorante violeta por dos minutos más.

La observación se realiza al microscopio óptico, con un aumento de 100x, utilizando aceite de inmersión.

Papanicolaou

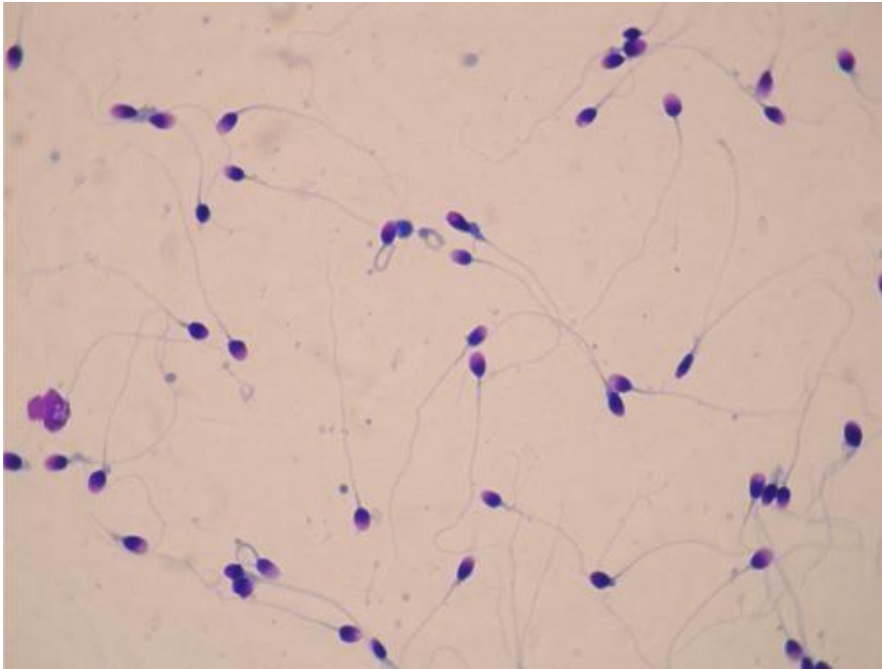
El método de Papanicolaou ofrece una buena definición tanto de células espermáticas como de otros tipos celulares. Esta tinción colorea al acrosoma de azul claro, la región post-acrosomal de azul oscuro, la pieza media de verde y el flagelo de rojo. Su tiempo de procesamiento es de dos horas.



E spermatozoides coloreados con método de Papanicolaou

Giemsa

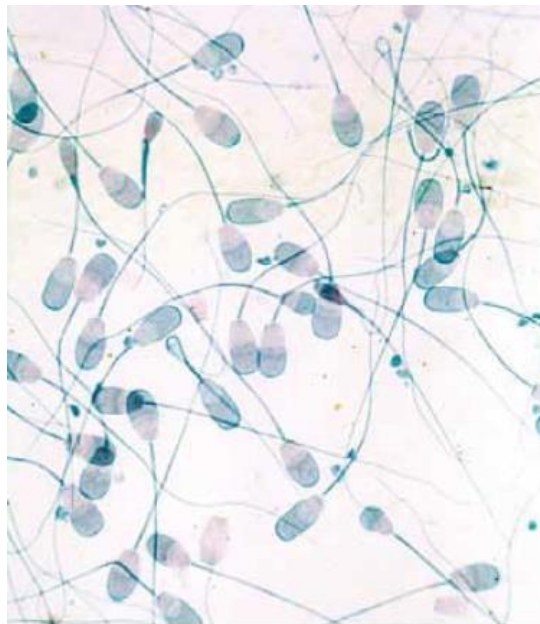
La tinción de Giemsa no se usa tan comúnmente como los demás, ya que los espermatozoides sin acrosoma teñidos pueden aparecer como normales y los flagelos pueden no teñirse.



Espermatozoides coloreados con Giemsa

Spermac

El método de Spermac tiñe la porción nuclear de rojo, mientras que el acrosoma, la pieza media y el flagelo se tiñen de verde.

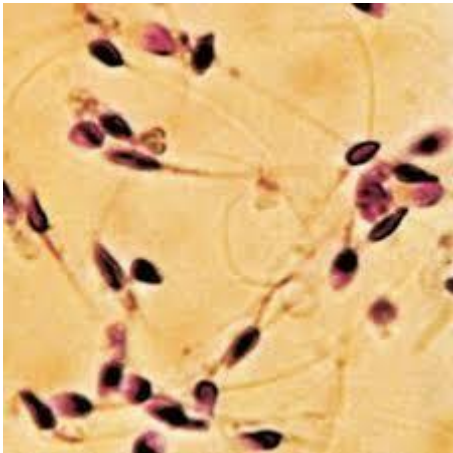


Espermatozoides coloreados con método Spermac

Testsimplets®

El kit comercial Testsimplets® fue introducido por Schirrenet *al.* en 1977 (Henkelet *al.*, 2008), y consiste en un portaobjetos cubierto por una capa coloreada, constituida por dos colorantes: 2,1

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de acetato de violeta de cresil y $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ nuevo azul de metileno. Cabe resaltar que esta tinción no necesita de un frotis para teñir la muestra. Se coloca una gota de semen sobre la capa coloreada, y luego se cubre con un cubreobjetos, para ser observado posteriormente al microscopio. La intensidad del color y la proporción de mezclado de los colorantes en el recubrimiento de los portaobjetos son constantes y están estandarizados).



Kit comercial Testsimplets®

Espermatozoides coloreados con por el kit comercial Testsimplets®

La OMS recomienda la tinción de Papanicolaou, ya que ofrece una buena tinción de los espermatozoides y de otras células. Permite la tinción de la región acrosomal y posacrosomal de la cabeza, las gotas citoplasmáticas, la pieza media, y del flagelo.

Algunos laboratorios utilizan tinciones rápidas como la Diff-Quik; sin embargo, algunos frotis teñidos con tinciones rápidas pueden presentar un fondo coloreado y no siempre ofrecen la misma calidad que el Papanicolaou. Además, el tamaño de la cabeza espermática teñida con Diff-Quik es más grande que las teñidas con Papanicolaou o con Shorr; incluso, las cabezas espermáticas teñidas son un poco más pequeñas que las cabezas de los espermatozoides vivos en el semen original, aunque su forma no cambia.

FACTORES QUE PUEDEN AFECTAR LA MORFOLOGÍA

Dentro de los factores que pueden afectar la morfología espermática encontramos:

- Tabaco, alcohol (in vitro), cocaína, plomo, cadmio
- Antiepilépticos, tales como el valproato, la carbamazepina y la oxcarbazepina.
- Pesticidas
- Quimioterapia
- Radioterapia
- Varicocele
- Edad
- Hipotiroidismo
- Hiperprolactinemia, infecciones seminales, fiebre, tumores testiculares y enfermedad inflamatoria de Bowel
- Genéticos

MORFOLOGIA ESPERMATICA

1- Preparación de los extendidos

Utilizar portaobjetos limpios y desengrasados (preferentemente nuevos)

Como es necesaria una buena visualización de los espermatozoides realizar extendidos finos con 5 - 10 ul si se trata de muestras con un numero aceptable de gametas Si por el contrario la concentración es baja , pueden hacerse extendidos con 20 ul .

Realizar dos extendidos:

- con semen entero
- con zoides lavados con solución fisiológica de buena calidad (no menos de 3 veces)

2- Tinciones

FIJACION:

Esta dependerá del tipo de coloración que se desea practicar.

2.1 Coloración de Papanicolau modificada

REACTIVOS :

- Hematoxilina
- Orange G
- Eosina amarilla
- Alcohol 96%
- Eter etílico

TECNICA :

- 1- Fijar los extendidos secados al aire en volúmenes iguales de Alcohol - Eter durante 10 minutos por lo menos.
- 2- Cubrir con Hematoxilina dejando actuar durante 3 minutos.
- 3- Enjuagar con Alcohol 96 %
- 4- Cubrir con Orange G , 1 minuto

- 5- Realizar 3 enjuagues con Alcohol 96 %
- 6- Cubrir con EA 36 durante 3 minutos.
- 7- Realizar tres enjuagues con Alcohol 96º
- 8- Dejar secar al aire

2.2- Coloración de Hematoxilina – Eosina

REACTIVOS:

- Hematoxilina
- Eosina
- Alcohol 96%

TECNICA

- 1- Fijar los extendidos secados al aire con alcohol 96% .
- 2- Dejar secar el alcohol y cubrir con Hematoxilina durante 2 minutos
- 3- Lavar con agua caliente para activar la Hematoxilina
- 4- Cubrir con Eosina durante 30 segundos
- 5- Enjuagar y dejar secar al aire

2.3- Tinción 15

REACTIVOS

- Fijador : triarilmetano 1.8 mg/l en alcohol metileno
- Solución 1 : Xanteno 1 g/l en buffer azidasidica
- Solución 2 : mezcla de tincion de tiazina (0.625 g/l Azur A y 0.625 g/l Azul de metileno) en buffer

TECNICA

- 1 – Realizar el extendido y dejar secar al aire
- 2 - Sumergir el extendido en el fijador durante 5 segundos y secar el excedente por escurrimiento sobre papel absorbente.
- 3 – Sumergir en solución 1 durante 5 segundo y luego en solución 2 por el mismo tiempo.

- 4 – Escurrir el excedente
- 5 – Lavar con agua y dejar secar al aire.

2.4- Coloración de MayGrumwald - Giemsa

TECNICA

- 1- Fijar con etanol o directamente con MayGrumwald
- 2- Continuar como una Coloración de formula leucocitaria (Giemsa va menor tiempo)

2.5- Coloración de Hematoxilina –Verde Brillante

REACTIVOS

- Hematoxilina de Harris al 30 % en H₂O
- Verde brillante al 0.1% en metanol
- Metanol puro

TECNICA

- 1 – A gregar Metanol puro durante 2 0 3 minutos
- 2 – Agregar H₂O uno o dos minutos y volcar
- 3 – Agregar Hematoxilina de Harris durante 15 minutos
- 4 – Volcar y lavar suavemente por inmersión en un recipiente con agua
- 5 – Dejar secar
- 6 – Agregar Verde brillante durante exactamente 5 minutos
- 7 – Idem punto 4

2.6- Coloración de Shorr

REACTIVOS

- Hematoxilina
- Alcohol amonium
- Etanol al 50 % , 75 % y 95 %
- Alcohol absoluto

- Xileno
- Colorante de Shorr

TECNICA

- 1 – Secar y fijar el frotis con etanol 75 % por 1 minuto
- 2 – Realizar 12 – 15 inmersiones en agua corrientes
- 3 – Agregar Hematoxilina 1 – 2 minutos
- 4 – Idem punto 1
- 5 – Realizar 5 pasajes de 5 segundos cada uno por alcohol amonium
- 6 – Idem punto 1
- 7 – Agregar Etanol al 50 % durante 5 minutos
- 8 – Agregar colorante de shorr durante 3 a 5 minutos
- 9 – Agregar Etanol al 50 % , 75 % y 95 % durante 5 minutos cada uno
- 10 – Realizar dos pasajes de 5 minutos cada uno por alcohol absoluto
- 11 - Realizar dos pasajes de 5 minutos cada uno por xileno

EVALUACION

- Estudiar en cada preparado por lo menos 200 espermatozoides
- Utilizar un microscopio con buena iluminación y un objeto de inmersión de 100 x de tal manera de tal manera de lograr una magnificación total de 1000 x.
- Informar % de normales, alteraciones de cabeza , segmento intermedio , cola y células de la progenie cada 100 zoides.
- Es aconsejable limpiar el preparado por atrás con alcohol para mejor visualización.

REACTIVOS

Alcohol amonium : 95 ml etanol 75 % + 5 ml hidróxido de NH₄ 25 %

EXAMEN QUIMICO

Bioquímica del plasma seminal

El plasma seminal se compone de las secreciones de las vesículas seminales, secreción prostática y secreción del epidídimo.

Existen varios marcadores bioquímicos de la función de las glándulas accesorias, como ácido cítrico, cinc, γ -glutamyltranspeptidasa y fosfatasa ácida para la próstata; fructosa y prostaglandinas para las vesículas seminales y L-carnitina libre, glicerilfosforilcolina, y α -glucosidasa para el epidídimo. Una función secretoria disminuida se manifiesta como una baja emisión total de los marcadores específicos, los cuales, por lo tanto, pueden usarse para estimar la función de las glándulas secretorias accesorias. En ocasiones una infección puede causar una disminución considerable de la función secretoria, pero a pesar de esto la cantidad total del marcador o los marcadores presentes todavía puede estar dentro del amplio rango de normalidad. La infección también puede producir un daño irreversible del epitelio secretorio, de modo que incluso después del tratamiento, la capacidad secretoria aún será baja.

La elección de los marcadores bioquímicos se basa, no en su papel o interés fisiológico, sino únicamente en que sea producido específicamente mediante una de las glándulas anexas o una zona muy determinada del tracto genital masculino. Permiten realizar una verdadera cartografía anatómica del aparato genital.

Es posible, en efecto, localizar una afección del tracto genital en función de la disminución de un determinado marcador, teniendo en cuenta que:

- Cada glándula posee su marcador específico.
- Si una glándula está afectada, hay disminución de la concentración de su marcador.
- Esta disminución no es compensada porque no hay mecanismos de regulación homeostática, como para la glucemia.
- Si hay obstrucción al nivel del tracto, las secreciones de las glándulas situadas más arriba no se pueden evacuar y se observará una disminución del marcador correspondiente.

Capacidad secretoria de la próstata

El contenido de cinc y de ácido cítrico del semen refleja bien la secreción de la próstata. Existe una buena concordancia entre el cinc, el ácido cítrico y las fosfatasaas ácidas.

Todos ellos aumentan cuando se produce una exclusión del fluido de la vesícula seminal en el eyaculado, y disminuyen en la atrofia prostática por insuficiencia androgénica grave, prostatitis severa y obstrucción del canal prostático.

- **Ácido cítrico:** su producción es testosterona dependiente, pero sus niveles no están correlacionados cuantitativamente con la concentración plasmática de testosterona. Valores disminuidos son compatibles con estados inflamatorios o neoplásicos de la próstata. Por el contrario, valores superiores sugieren que todo el semen es de origen prostático como consecuencia de una insuficiencia de las vesículas seminales.
- **Fosfatasa ácida:** es una enzima térmicamente muy estable, incluso frente a la desecación. Conserva su actividad luego del eyaculado por grandes periodos de tiempo, superando los 6 meses.
- **Zinc:** estudios sugieren que el zinc presenta un rol en la estabilización de la membrana celular y la cromatina nuclear del espermatozoide.

El zinc presenta propiedades antioxidativas que participan en la neutralización de especies reactivas de oxígeno producidas por espermatozoides defectuosos y/o leucocitos en el semen humano tras la eyaculación. Las especies reactivas de oxígeno son una de las principales causas de disfunción espermática debido a las alteraciones que producen en la fluidez e integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, lo cual se traduce en alteraciones en la movilidad y morfología del espermatozoide, y a su papel en la fragmentación del ADN. En dos estudios publicados recientemente, se evidencia el efecto positivo de un compuesto de antioxidantes (vitaminas y oligoelementos) sobre la concentración, movilidad y morfología espermática y el grado de fragmentación del ADN espermático en varones infértiles.

El zinc también es responsable de la actividad antibacteriana en el plasma seminal. La principal actividad antibacteriana del plasma seminal es transitoria y dependiente de péptidos derivados proteolíticamente de las semenogelinas I y II y de la unión de iones zinc.

Se encuentra disminuido en la prostatitis y elevado en la agenesia bilateral de conductos deferentes u obstrucción de los conductos eyaculadores, así también como en el hipogonadismo.

- **Antígeno prostático específico (PSA):** es una proteasa sérica, una glicoproteína de cadena simple con un peso de 34 KDa. Su función es la licuación del fluido seminal para permitir la movilidad espermática. La concentración de esta proteína en el semen de sujetos sanos varía entre 0,4-3,0 mg/mL. En condiciones fisiológicas normales una pequeña cantidad

filtra hacia la circulación sanguínea donde alcanza una concentración no mayor a los 4,0ng/mL. Niveles elevados de PSA en el suero, han sido asociados a cáncer de próstata, hipertrofia prostática benigna o inflamación genitourinaria.

Capacidad secretoria de las vesículas seminales

La concentración de fructosa en el semen refleja la función secretoria de las vesículas seminales. En los casos de azoospermia por ausencia congénita de los conductos deferentes, un nivel bajo de fructosa puede mostrar también la disgenesia de las vesículas seminales. La determinación de fructosa también puede ser de utilidad en los raros casos de obstrucción del conducto eyaculador. El semen de estos pacientes, al igual que el de pacientes con disgenesia de los conductos deferentes y vesículas seminales, se caracteriza por su pequeño volumen, pH bajo y por la falta de coagulación y del olor característico. Su reducción también puede ser un indicador de una OAT severa.

Capacidad secretoria del epidídimo

Hasta épocas recientes el principal marcador clínico de la secreción epididimaria era la L-carnitina. Recientemente se ha comenzado a trabajar con la α -glucosidasa.

Existen dos isoenzimas en el plasma seminal: la forma predominante es neutra y se origina en el epidídimo mientras que la forma menor, ácida, proviene de la próstata.

La α -glucosidasa neutral es más específica del epidídimo y parece tener mayor sensibilidad que la L-carnitina y la glicerilfosforilcolina como marcador. Su determinación es más útil para el diagnóstico de obstrucción distal de la vía eyaculadora, especialmente cuando se la utiliza juntamente con determinaciones hormonales y con otros parámetros testiculares. Más aun, la determinación de α -glucosidasa es más simple, barata y rápida que la de los otros marcadores.

- α -glucosidasa: sus niveles en el plasma seminal descienden en las obstrucciones bilaterales de las colas de los vasos deferentes.
- L-carnitina: valores disminuidos se encuentran en todos los trastornos epididimarios, como varicocele. Sus niveles descienden en las obstrucciones de la cola de los vasos deferentes.
- Glicerilfosforilcolina (GPC): marcador específico de la cabeza de los conductos deferentes. Sus niveles descienden en obstrucciones bilaterales de dicha zona.

Métodos de cuantificación

Obtención del plasma seminal

Después de analizar el semen se toma una alícuota de la muestra que nos quede y se procede a la centrifugación: durante 10 minutos a 1000g de Fuerza Centrífuga Relativa. Posteriormente se

decanta el plasma seminal del sobrenadante y se conserva congelado a -20°C hasta su procesamiento.

Pretratamiento del plasma seminal

Es largo y meticuloso.

- Para la determinación de la L-carnitina hay dos posibilidades: o se realiza previamente la desproteización con ácido perclórico, seguida de una neutralización, o bien se realiza una desproteización por paso a través de membrana de filtración Millipore™, que elimina las proteínas del plasma seminal.
- Para la determinación de la fructosa y el citrato se realiza una desproteización seguida de una neutralización.
- La determinación del zinc, de las fosfatasa ácidas, de la α -1,4 glucosidasa se realiza directamente en el plasma seminal o después de simple dilución en NaCl 0,15 M.

A) Técnica UV a 340nm

Permite la cuantificación de tres sustratos, carnitina, fructosa y citrato. El parámetro a determinar es el primer sustrato de una cascada de reacciones enzimáticas a 37°C , es pues el parámetro limitante. La última reacción es la reacción indicadora, que acaba en la formación o el consumo de NADH_2 o a NADPH_2 , que se mide por la variación a punto final de la absorbancia por espectrofotometría UV a 340 nm. La detección se desarrolla en 2 tiempos:

Se incuba en primer lugar el plasma seminal con el reactivo 1 que contiene el tampón de reacción, los sustratos anexos necesarios y las diferentes enzimas de la cascada, excepto la primera enzima.

Luego se añade el reactivo 2, reactivo desencadenante, conteniendo la primera enzima que inicia la cascada de reacciones. Se efectúa la medida al final de la reacción, cuando se agota el sustrato inicial.

- L-Carnitina. El reactivo desencadenante es la carnitina acetil transferasa. Ilustración 1.
- Fructosa. El estuche comercial utilizado está concebido para analizar al mismo tiempo la fructosa y la glucosa. El esperma contiene poca glucosa, pero sin embargo hay que eliminar esta interferencia. Ilustración 2.

Con ese fin, el primer reactivo contiene la hexocinasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que realiza la totalidad de la cascada enzimática de la glucosa, mientras sólo la fructosa es transformada en fructosa-6-fosfato.

La primera medida efectuada tiene en cuenta la formación de NADH_2 debida específicamente a la presencia de glucosa.

Luego la fosfoglucoisomerasa, contenida en el segundo reactivo, da lugar a la continuación de la determinación específica de la fructosa.

Así, por diferencia entre las dos medidas de absorbancia, se consigue la cuantificación de la fructosa.

- Citrato: la técnica es parecida a la de la carnitina, con un reactivo que activa la citrato liasa. Ilustración 3.

Ilustraciones:

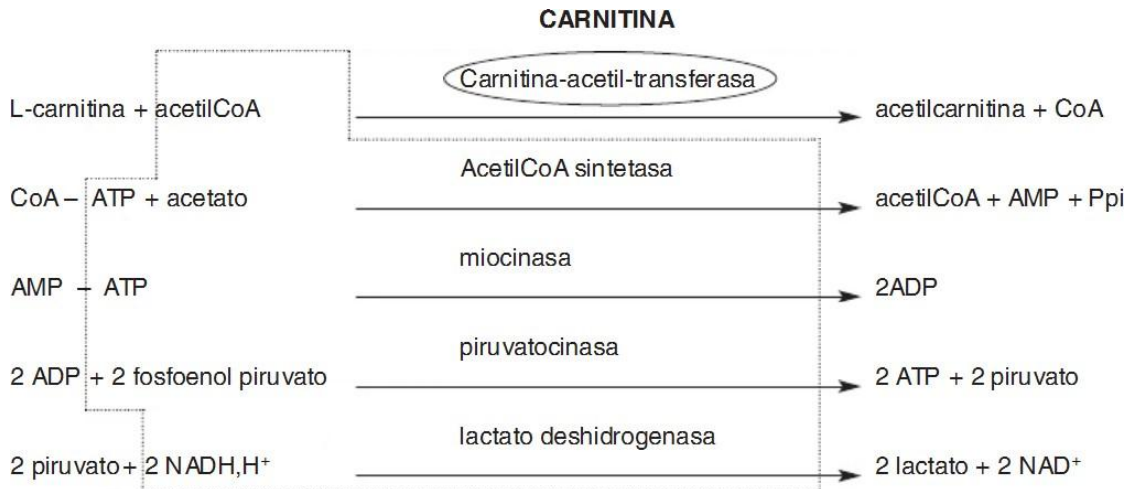


Ilustración1. Técnica de cinética enzimática para la determinación de la L-carnitina en plasma Seminal

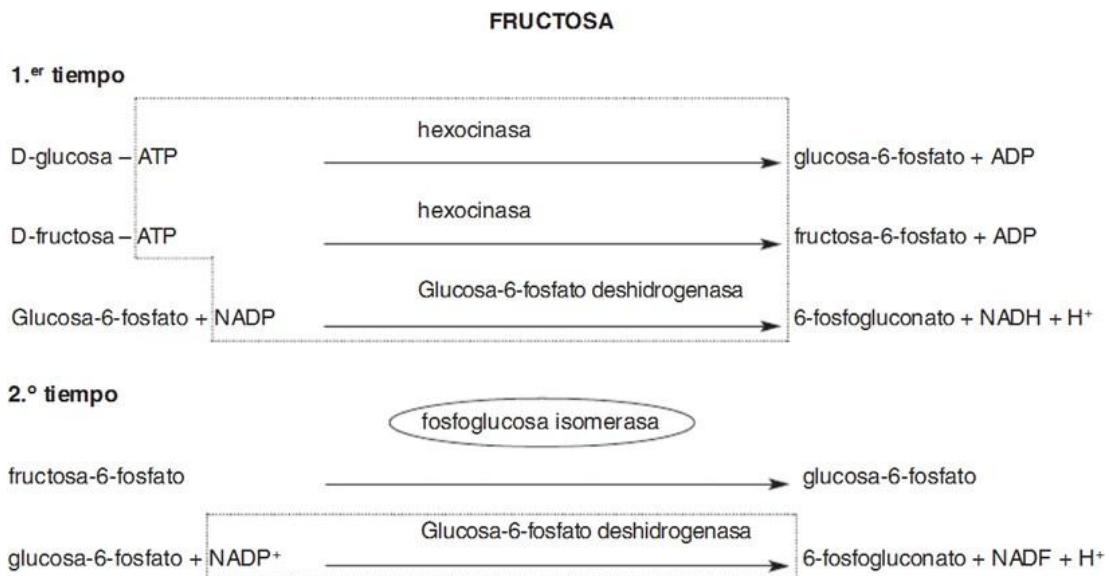


Ilustración 2. Técnica de cinética enzimática para la determinación de la fructosa en el plasma Seminal

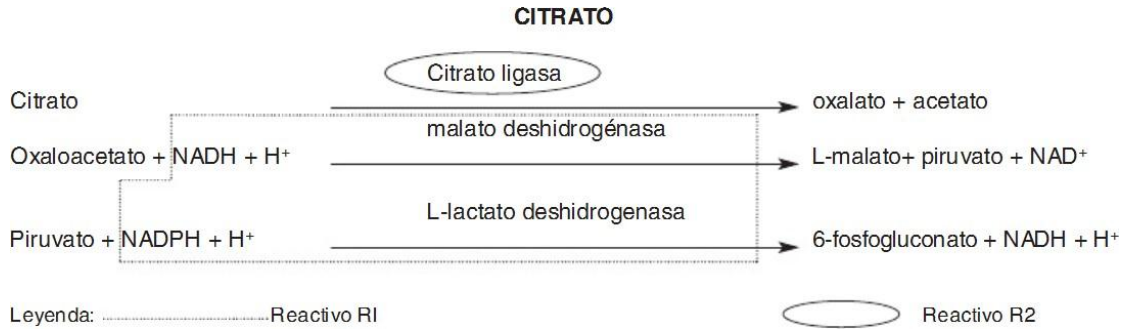


Ilustración3. Técnica de cinética enzimática para la determinación del citrato en el plasma Seminal

B) Técnicas colorimétricas

- L-Carnitina. Se mide la formación de CoASH después de la acción de la carnitina acetil

transferasa sobre el acetil CoA y sobre la L-carnitina de la muestra. El CoASH formado reacciona con el DTNB para formar el anión 5-tio-2-nitrobenzoato amarillo que absorbe a 405 nm.

- Fructosa: en condiciones de calor y acidez la fructosa reacciona con el indolo formando un complejo coloreado que absorbe a 470 nm.
- Zinc. El zinc forma con el 5-Br-PAPS un complejo coloreado el cual se mide a punto final a 560 nm
- Fosfatasa ácida. Un sustrato específico, el α -naftilfosfato, es hidrolizado a 37°C, acabando en la formación de un compuesto azóico coloreado. Es un método cinético colorimétrico: se mide el aumento medio de densidad óptica por minuto a 405 nm durante 3 minutos (método de Hillmann modificado).
- α -1,4 Glucosidasa neutra. La actividad enzimática es medida por hidrólisis a pH 6,8 y a 37°C del p-nitrofenilglucopiranosido en p-nitrofenol, que al añadirle carbonato sódico se transforma en un producto amarillo medible por su absorbancia a 405 nm. Para que la medida de esta isoenzima sea específica, se utilizan dos inhibidores: El dodecilsulfato de sodio, SDS, que inhibe la actividad de la isoenzima α -glucosidasa ácida prostática. La castanospermina, alcaloide que inhibe todas las actividades hidrolásicas del esperma y

permite realizar un blanco de muestra. La actividad de la α -1,4-glucosidasa neutra es fácil de medir, rápida, sensible y específica.

- Las determinaciones de L-carnitina, fructosa, citrato y fosfatasa ácida están comercializadas y son automatizables.

Expresión de los resultados

Los valores normales de los marcadores seminales varían de un laboratorio a otro, en función de las técnicas utilizadas. Cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores usuales. Tienen que ser establecidos a partir de esperma procedente de sujetos que ya hayan procreado. Los resultados se expresan en concentración o en cantidad por eyaculado.

Bibliografía:

- [http://www.nascentis.com/instrucciones para la recolección de la muestra de semen](http://www.nascentis.com/instrucciones_para_la_recoleccion_de_la_muestra_de_semen)
- WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4ª Ed. (2001)
- WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 5ª Ed. (2010)
- Cardona Maya W, Berdugo J, Cadavid A – Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer– Revista Actas urológicas Españolas Vol.4 (2008) / Fuente: <http://scielo.isciii.es/pdf/ae/v32n4/v32n4a10.pdf>
- Manual de laboratorio para el análisis del semen - Mª José López García, Aurora Urbano Felices, Marta Cárdenas Povedano – 2012 1ra ed.