



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

Asignatura:

Aspectos Inmunológicos del Proceso Reproductivo

Año: 2020

**“Introducción al Manual OMS 2010”**

**“Recolección de muestra”**

**“Examen físico”**

Alumnos:

Bassetto Aneley

Belluccini Luisina

Brun María Florencia

Garbuglia María Paula

Lamagni Ernesto

Marchetti Antonella

Mout Pablo Santiago

Sabas Sibila

Docente: Adriana Brufman

## **Introducción**

En respuesta a una creciente necesidad para la estandarización de los procedimientos para el examen del semen humano, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó el Manual de Laboratorio para el Examen del Semen Humano y la Interacción del Semen con el Moco Cervical en 1980. La segunda, tercera y cuarta ediciones de dicho manual fueron publicadas en 1987, 1992 y 2001 respectivamente. Dichas publicaciones han sido utilizadas extensamente por médicos clínicos e investigadores de todo el mundo. Sin embargo, debido a que el campo de la andrología ha continuado su desarrollo a gran velocidad y este hecho, junto con una creciente conciencia de la necesidad de mediciones estandarizadas de todas las variables del semen, su revisión y actualización además de un mayor aporte de mayor evidencia, surgió la quinta edición en el año 2010 la cual aún no se encuentra disponible en idioma español.

Además en los últimos años, la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) en colaboración con la OMS ha desarrollado un programa para disminuir las diferencias entre centros en cuanto al diagnóstico y valoración de las muestras seminales y así unificar criterios en los distintos laboratorios.

### **La quinta edición comprende tres partes:**

Análisis de semen (Cap 2–4)

Preparación de los espermias (Cap 5 and 6)

Control de Calidad (Cap 7).

La primera parte está dividida en 3:

1- métodos estándar (procedimientos de rutina para determinar calidad de semen)

2- tests opcionales

3-tests de investigación que no suelen usarse rutinariamente

### **Los principales conceptos de la quinta edición están resaltadas a continuación**

- La sección sobre preparación de espermias fue ampliada, se agregó un capítulo de criopreservación de espermatozoides.

Los procedimientos relacionados con el análisis del moco cervical se dividieron en un capítulo de procedimientos opcionales y otro con características del mucus.

- Tiene menos apéndices que ediciones anteriores y solo se restringen a explicar información específica o raramente necesaria.
- Evaluación del número de espermias

Las diluciones de semen y las áreas de la cámara utilizadas para evaluar el número de espermatozoides por muestra fueron modificadas para permitir hasta 200. Se enfatizó en la importancia de los errores en las muestras y de la certeza de los resultados numéricos obtenidos.

El comité editorial considera que el número total de espermias por eyaculación provee una más adecuada evaluación de función testicular que la concentración de espermias, pero para eso el volumen debe ser medido correctamente.

- Evaluación de la azoospermia. Aunque superficialmente fácil, el diagnóstico de azoospermia es confuso por muchos factores, entre ellos grandes errores asociados con la cuenta de pocos espermatozoides, el gran número de campos microscópicos que se analizan y las dificultades en el examen de los restos presentes en el pellet. Los cambios recomendados incluyen examinar muestras fijas no centrifugadas e indicar la sensibilidad de los métodos de recuento empleados

Sin embargo, también se incluyen los métodos de centrifugación necesarios para acumular un número suficiente de células para los procedimientos terapéuticos, y los métodos para la detección de espermatozoides móviles en muestras no fijadas para la evaluación del semen posterior a la vasectomía.

- Evaluación de la motilidad espermática. Un cambio importante con respecto a las ediciones anteriores está en la categorización de la motilidad de los espermatozoides. Ahora se recomienda que los espermatozoides se clasifiquen como progresivamente móviles, no progresivamente móviles e inmóviles (en lugar de grados a, b, c o d).
- Evaluación de la morfología del esperma. Algunos laboratorios evalúan sólo las formas normales, mientras que otros consideran que el tipo, la ubicación y el alcance de la anomalía son más importantes. Sigue siendo controvertido si estas o las evaluaciones diferenciales o semicuantitativas aumentan el valor del análisis de semen. La evidencia que respalda la relación entre el porcentaje de formas normales (según se define mediante una categorización estricta o una evaluación de la morfología asistida por computadora) y las tasas de fertilización in vivo justifica tratar de determinar una subpoblación morfológicamente distinta de espermatozoides dentro del semen. En esta edición, se incluyen más micrografías y de mejor calidad de espermatozoides considerados normales y en el límite, acompañadas de explicaciones de por qué cada espermatozoide se ha clasificado de la forma en que lo ha hecho. Esto debería ayudar a capacitar a los técnicos para categorizar los espermatozoides de manera consistente. Datos recientes de una población fértil han permitido dar valores de referencia para el porcentaje de formas morfológicamente normales.
- Control de calidad. Este capítulo ha sido completamente reescrito. Es necesario un control riguroso de la calidad del análisis de semen para que los métodos analíticos sean sólidos. Se dan sugerencias sobre cómo mejorar el rendimiento del laboratorio cuando los resultados del control de calidad no son satisfactorios.
- Rangos de referencia y límites de referencia. Los datos que caracterizan la calidad del semen de hombres fértiles, cuyas parejas tuvieron un tiempo de embarazo de 12 meses o menos, proporcionaron los rangos de referencia para este manual. Para generar los rangos de referencia se utilizaron datos brutos de entre 400 y 1900 muestras de semen de padres recientes de ocho países de tres continentes. Se consideró un intervalo de referencia unilateral para el semen, ya que es poco probable que valores altos de cualquier parámetro sean perjudiciales para la fertilidad. El percentil 5 se da como límite de referencia inferior, y la distribución completa para cada parámetro del semen también se da en el Apéndice 1. En el último manual de la OMS se estableció, además el concepto de LÍMITE DE REFERENCIA INFERIOR (LRI). Los valores que se encuentren por encima del límite no garantizan una fecundación exitosa y un posterior embarazo, pero amplían sus posibilidades. La cantidad de personas por debajo del límite ha ido aumentando con el paso de los años debido a las costumbres de la sociedad y a los nuevos hábitos de vida tales como la alimentación, tabaco, tóxicos ambientales, etc.

El **ESPERMOGRAMA** es actualmente una herramienta básica que nos proporciona la mejor información para evaluar la fertilidad del varón y es muy útil a la hora de indicar tratamientos personalizados para la pareja.

### **Recolección de muestra de semen**

**Instrucciones:** El paciente debe recibir las instrucciones claras 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 pérdida de alguna fracción de la muestra. En ellas debemos detallarles: Lugar de recogida, forma de recoger la muestra, contenedores de recogida, medidas higiénicas, abstinencia, tiempo entre recogida y entrega al laboratorio, normas de transporte al laboratorio en el caso de que se recoja en casa, y medicación.

**Abstinencia sexual:** Según la OMS la muestra debe ser recolectada con un mínimo de 2 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, para evitar la variabilidad. Recordemos además que se recomiendan entre 2 y 3 análisis para fijar el estado basal de un individuo. La abstinencia sexual implica no tener relaciones sexuales ni masturbación por el período indicado.

**Medidas higiénicas:** Lavarse las manos y el pene con agua y jabón y enjuagar bien antes de obtener la muestra. No deben aplicarse pomadas o lubricantes en los genitales durante las 8 horas anteriores a la obtención de la muestra.

**Lugar de recolección:** 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.

La recolección de la muestra en casa solo se hace 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. A veces ocurren los llamados bloqueos, o la imposibilidad de recoger la muestra. Cuando se trate de una recogida de muestra para una prueba diagnóstica no tendrá mayor importancia. Trataremos de tranquilizar a nuestro paciente, recomendándole dar una vuelta antes de intentarlo de nuevo. Si el bloqueo persiste se recomendará la recogida de la muestra en casa. El problema surge cuando el análisis de semen va encaminado a evaluar una muestra que debe ser utilizada posteriormente para técnicas de reproducción asistida, donde la recogida no se puede dilatar más allá de unas horas. Si los métodos anteriores no dan resultado habrá que recurrir a la administración de fármacos, tales como Levitra, Cialis o Viagra.

Si se recolecta la muestra en casa, el frasco o contenedor debe ser pesado previamente, y el paciente deberá anotar la hora de recolección de la muestra y llevarla al laboratorio.

El informe debe aclarar que la muestra fue recolectada en un lugar ajeno al laboratorio.

**Transporte:** En caso de que la muestra sea recogida en casa, tener en cuenta que: hay que llevarla al laboratorio antes de una hora desde la recogida, se debe transportar a una temperatura entre 20-37°C, protegida de la luz, en un contenedor adecuado, que debe ser proporcionado preferiblemente por el laboratorio.

**Contenedores de recogida:** 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. Los contenedores de recogida que utilizemos deben ser de cristal o plástico. Además deben estar testeados para comprobar que el material no es tóxico.

Forma de recogida: 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 que no es tóxico para los espermatozoides.

Cuando haya imposibilidad de recolectar la muestra por masturbación, se podrá realizar mediante el uso de preservativo. No se puede usar un preservativo cualquiera sino preservativos especiales que hay en el mercado, que no son tóxicos para la muestra dado que no contienen espermicidas. Además, se le debe informar al paciente 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.

Nunca por coitus interruptus, ya que se puede perder la primera fracción de la muestra, se puede contaminar la muestra y se puede afectar la movilidad por el pH ácido de la vagina.

Recolección de la muestra para examen microbiológico: En esta situación la contaminación microbiológica de fuentes no seminales deben ser evitadas. El recipiente de la muestra, las pipetas, tips y todo lo utilizado debe ser estéril. El paciente debe: orinar, con objeto que la orina limpie la uretra de gérmenes, lavarse las manos y el pene con jabón para reducir el riesgo de contaminación con organismos comensales de la piel, secarse las manos y el pene, eyacular dentro del recipiente estéril.

El análisis microbiológico está recomendado tras los siguientes hallazgos:

- Hipospermia: volumen bajo de semen y/o pH<7.
- Hemospermia: sangre o hematíes en semen.
- Leucocitospermia: >106 leucocitos / ml semen.
- Aglutinaciones espontáneas de los espermatozoides en el eyaculado.
- Marcada asteno-, oligoteratozoospermia.
- Antecedentes de infecciones urogenitales o de las glándulas accesorias con datos actuales de posible infección de vía seminal.
- En casos de inclusión en programas de reproducción asistida, ya que aquí es fundamental que la muestra de semen no contamine los medios de cultivo enriquecidos de nutrientes en los cuales se incuban normalmente ovocitos y espermatozoides.

Recolección de datos: La siguiente información debe ser incluida en el informe del paciente: nombre y apellido, 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. Además se le han de preguntar al paciente los siguientes datos: Si ha tomado alguna medicación en fechas anteriores, asegurarnos que sólo ha recogido una eyaculación, si es para análisis microbiológico corroborar que ha cumplido las normas de higiene (lavado de manos y genitales y orinar previamente), la forma de recogida, lugar de recogida, y deberemos anotar además cualquier incidencia, como dolencia al eyacular, sangrado, etc.

Recepción: La muestra debe ser incubada a 37°C mientras el semen se licua. 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.

### **Factores que afectan a la calidad de la muestra:**

#### **Recogida de la muestra completa:**

Un análisis de semen correcto se debe realizar sobre una muestra de semen completa: La primera parte del eyaculado aporta las secreciones del testículo-epidídimo (esta fracción es rica en espermatozoides) y las secreciones de la próstata. La segunda parte corresponde a las secreciones de vesículas seminales. Por tanto, si se derrama una fracción de la primera parte, al faltar parte de los espermatozoides obtendremos una concentración irreal, más baja; y si se derrama una fracción de la segunda, la fracción que aporta más volumen, lo que ocurrirá es que obtendremos un volumen más bajo y una concentración espermática más alta. En consecuencia, una muestra incompleta debe ser desechada. Si es incompleta se debe recolectar una segunda muestra nuevamente luego del periodo de abstinencia de 7 días.

**Abstinencia sexual:** En un estudio se observó que la abstinencia entre 1 y 8 días no influye en la movilidad, en la morfología, en la vitalidad ni en el pH, pero sí en las determinaciones de volumen y concentración, que van aumentando a lo largo de los ocho días. Por otra parte, parece que el periodo de abstinencia de la penúltima eyaculación podría condicionar los valores de la última, siempre que una eyaculación no consiga vaciar los depósitos del epidídimo.

**Variabilidad biológica:** Se puede apreciar que a lo largo de los días hay considerables saltos en la concentración espermática, así como en el número total de espermatozoides por eyaculación, debido a la variabilidad intraindividual. Se puede concluir que es imposible caracterizar a un individuo con un solo análisis de semen y que es necesario realizar 2-3 análisis para estudiar el estado basal de un individuo.



**Fármacos:** Podemos encontrar gran cantidad de principios activos que van a afectar la calidad seminal, actuando a diferentes niveles.

- Antipsicóticos (fenotiazidas)
- Antidepresivos
- Antihipertensivos (alfametildopa)
- Antihistamínicos
- Andrógenos
- Esteroides anabolizantes
- Antiulcerosos (ranitidina, cimetidina)
- Espironolactona
- Nitrofurantoína
- Colchicina
- Quimioterapia
- Sulpiride.

En el caso de que el tratamiento se prolongue en el tiempo y/o que los efectos sean irreversibles, como en la quimioterapia, es recomendable que se conserven los espermatozoides en un banco de semen.

#### Tóxicos:

- Marihuana: Inhibe GnRH y la espermatogénesis.
- Heroína y metadona: Disminuyen la gonadotropinas, la libido y retrasan e incapacitan la eyaculación.
- Cocaína: Estimula el deseo y la erección. Hay estudios que apoyan que afecta a la espermatogénesis.
- Tabaco: Afecta a la movilidad espermática. Actúa sobre las enzimas antioxidantes intracelulares.
- Alcohol crónico: Deprime el SNC e interfiere mecanismos que actúan sobre la excitación sexual.
- Algunos autores destacan que el vino tomado a dosis moderadas aumenta la calidad seminal debido al efecto antioxidante que aportan los componentes de la piel de la uva.

Factores ambientales: Últimamente se ha descubierto que hay multitud de factores ambientales que actúan como disruptores endocrinos. Son sustancias que tienen acción estrogénica o antiestrogénica. Actúan en las primeras fases del desarrollo fetal, en los periodos pre o perinatal, pero sus efectos son de aparición tardía, pudiendo aparecer en el adulto.

Duración de la espermatogénesis: Otro de los factores que se ha de tener en cuenta cuando se estudie la calidad seminal es que cualquier intervención sobre el testículo necesitará al menos 75 días (2 meses y medio) para ponerse en evidencia. Esto es así porque la espermatogénesis del hombre dura eso, 75 días. Por ejemplo, si tenemos el caso de un individuo sometido a quimioterapia, que se sabe afecta la espermatogénesis, se deberá estudiar si se ha producido la recuperación normal de ésta después de unos tres meses del tratamiento.

#### Otros:

- Ejercicio físico
- Fiebre
- Estrés
- Exposición a altas temperaturas.

## **Examen físico del semen**

El análisis del 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:** La licuefacción se realiza mediante una simple observación visual. Una muestra normal es una muestra acuosa, homogénea, sin grumos ni coágulos.

Inmediatamente después de la eyaculación, el semen, dentro del recipiente de recolección, tiene un aspecto de una masa semisólida coagulada. Dentro de unos pocos minutos, a temperatura ambiente, comenzará a licuarse. La licuefacción normalmente ocurre en los primeros 15 minutos tras la recolección de la muestra y se considera anormal cuando no ocurre dentro de los 60 minutos, lo cual debe informarse. Las muestras de semen recolectadas en casa o por condón normalmente ya han licuado al momento de su llegada al laboratorio.

La licuefacción normal de las muestras de semen pueden contener gránulos tipo jelly (cuerpos gelatinosos) que no licuan; esto no parece tener significancia clínica. La presencia de hilos de moco, sin embargo, puede interferir con el análisis de semen, pudiendo obturar una pipeta o impedir una buena colocación de un cubreobjetos sobre el porta y es necesario separarlos de la muestra a la hora de recoger alícuotas para las distintas determinaciones.

- **Licuefacción retardada:** Cuando la muestra no licua dentro de los 60 minutos. En estos casos debemos recurrir a algún método que nos permita licuarla y homogeneizarla, solo de esta manera obtendremos resultados fiables. Dentro de estos métodos se puede recurrir a un tratamiento mecánico o a una digestión enzimática (Ej: bromelina, una enzima proteolítica). Estas manipulaciones pueden afectar la bioquímica del plasma seminal, la motilidad y morfología de los espermatozoides, por lo que es necesario registrar su utilización.
- **Viscosidad del semen:** La viscosidad de la muestra puede ser estimada mediante dos métodos:
  - Recoger la muestra utilizando una pipeta de plástico desechable calibrada (pipeta pasteur), dejar que la muestra caiga por efecto de la gravedad y observar.
  - También puede hacerse introduciendo una varilla de vidrio en la muestra, retirarla y observar cómo cae la muestra.

En cualquiera de los dos métodos se considera anormal cuando se forma un filamento de más de 2 cm; para considerarse normal debe caer gota a gota.

No hay que confundir una muestra viscosa con una muestra no licuada. El aspecto de la muestra puede ser líquido, homogéneo y luego hacer un gran filamento cuando la recogemos con pipeta pasteur, en el caso de ser muy viscosa.

La viscosidad elevada interfiere prácticamente con todas las determinaciones: movilidad, concentración, anticuerpos antiespermatozoides (AAE), bioquímica. Fundamentalmente es debido a la dificultad de recoger con pipeta un volumen de muestra determinado, lo que imposibilita cualquier tipo de cuantificación.

Para disminuir la viscosidad se utilizan los mismos métodos que para la licuefacción retardada.

- **Apariencia del eyaculado**: una muestra de semen que licua normalmente debería ser homogénea, gris opalescente.
  - A veces puede tener un aspecto traslúcido; ello es debido a que posiblemente tenga una baja concentración de espermatozoides.
  - Un aspecto marrón-pardo nos indicará un sangrado en tracto genital horas o días antes.
  - Si la coloración es rojiza nos indicará la presencia de hematíes frescos, procedentes de un sangrado en el momento de la recogida.
  - El color amarillento es indicativo de ictericia, o presencia de ciertas vitaminas. También es posible que se deba a la presencia de altos niveles de flavoproteínas oxidadas, procedentes de vesículas seminales. Esto indica una elevada abstinencia. También en caso de leucospermia.
- **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, ya que nos permite calcular el número total de espermatozoides y células no espermáticas en el eyaculado. Para esto el manual de la OMS nos describe dos métodos:
  - Mediante pesada (método más utilizado). Para ello debemos asumir la siguiente aproximación: que la densidad de la muestra de semen es 1g/ml. Por lo tanto, la masa es igual al volumen, es decir, un gramo de semen corresponde a 1 ml.

Lo que haremos será pesar el recipiente vacío, etiquetas incluidas. Una vez recogida la muestra pesaremos el recipiente nuevamente. La diferencia calculada nos dará número de gramos, que como hemos dicho anteriormente corresponderá al volumen de la muestra en mililitros.

- Medida directa del volumen. Se necesitan recipientes calibrados (caros y difíciles de conseguir).

Lo que no se debe hacer nunca es medir el volumen mediante la transferencia a pipetas, jeringas o probetas. Estos métodos de transferencia están sujetos a mayor error.

El manual establece el límite inferior de referencia en 1,5ml. Un volumen menor es indicativo de:

- Obstrucción de vías seminales o ausencia de conductos deferentes.
- Pérdida de alguna fracción de la muestra en el momento de la recolección.
- Eyaculación retrógrada (el semen se vuelca en la vejiga en lugar de seguir su vía natural de salida, que es la uretra).

Por otro lado, un volumen alto puede ser producido por un aumento en la secreción de algunas glándulas en casos de inflamación.

- **pH del semen**: El pH refleja el balance entre las distintas secreciones, principalmente entre el pH alcalino de vesículas seminales y el ácido de la próstata.

Para la determinación del pH se utilizan tiras de medición del pH. Luego de homogeneizar la muestra, se coloca una gota de semen sobre la tira y se la distribuye; se debe leer el cambio de color, que debe ser homogéneo, dentro de los 30 segundos. El color se compara con una tira calibrada para poder leer el pH.

El pH debe ser medido luego de la licuefacción, preferiblemente luego de los 30 minutos. Para muestras viscosas puede utilizarse un medidor de pH.

El límite de referencia inferior establecido por la OMS es de 7,2.

**Bibliografía:**

- 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).
- Manual de laboratorio para el análisis del semen - Mª José López García, Aurora Urbano Felices, Marta Cárdenas Povedano - 2012 1ª Ed.