



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

Asignatura: Aspectos inmunológicos del proceso reproductivo.



Año: 2020

“Morfología espermática y tinciones”

GRUPO 4

Integrantes:

Alarcón, Pablo

Brienza, Ivana

Cámpora, Trinidad

Capocasa, Julieta

Masiá Rojkín, María Paz

Scataglini, Molys

MORFOLOGÍA

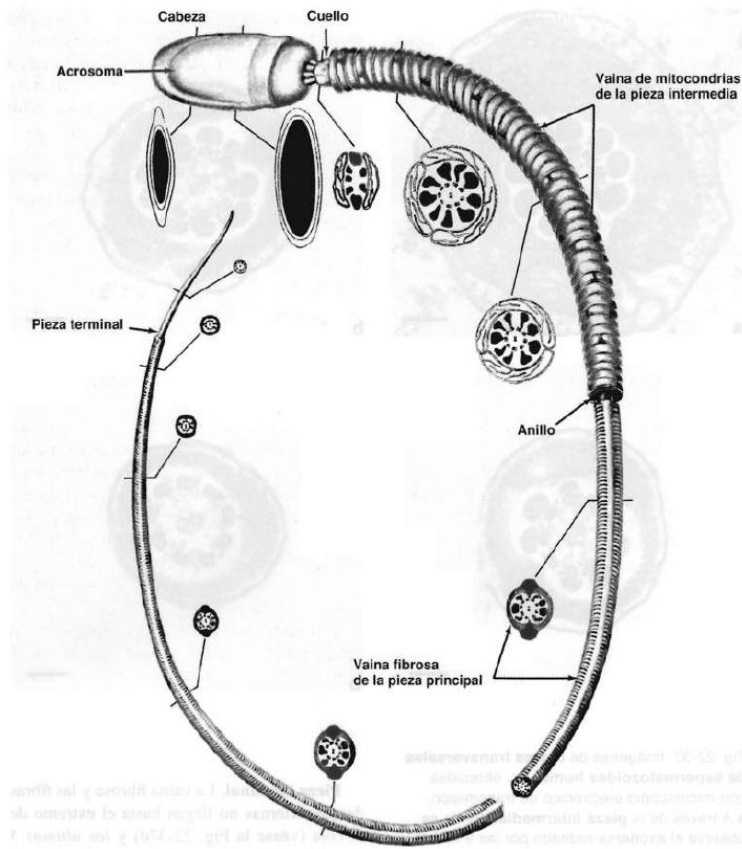
El espermatozoide maduro es una célula altamente diferenciada. Está formado por una cabeza, cuello, pieza intermedia y cola o flagelo, recubierto por una membrana plasmática espermática.

En la **cabeza** se encuentra el núcleo haploide, cubierto por una envoltura nuclear y la teca o matriz perinuclear. Su DNA se encuentra muy empaquetado por protaminas, de modo que su volumen queda reducido al mínimo, facilitando su transporte y la penetración del espermatozoide a través de la membrana del ovocito. En la parte anterior del núcleo, existe una vesícula secretora llamada acrosoma que adopta la forma de capuchón, la cual contiene gran concentración de hidratos de carbono y enzimas hidrolíticas que ayudan a atravesar la envoltura externa del oocito. Al ponerse en contacto con el oocito, el contenido de la vesícula se libera por exocitosis. 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 **cuello** es la unión entre la cabeza y el flagelo.

Luego se observa la **pieza intermedia** que contiene una gran cantidad de mitocondrias concentradas en una vaina helicoidal, envolviendo al axonema (porción motora).

La **cola**, también llamada flagelo, es una estructura larga filiforme, cuya principal función es proporcionarle movilidad al espermatozoide, impulsarlo hacia el oocito y ayudarlo a atravesar la cubierta oocitaria. En el eje está el axonema formado por microtúbulos que parten del centriolo localizado en la base del núcleo del espermatozoide. Estos microtúbulos presentan un rearmado conocido como 9+2.



ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA

El estudio morfológico comprende la evaluación de la normalidad estructural del espermatozoide. Para que un espermatozoide sea considerado normal, la cabeza, el cuello, la pieza media y la cola deben ser normales.

Un espermatozoide debe cumplir los siguientes criterios estrictos (Kruger-1987) en cada una de sus partes para considerarse normal:

-**Cabeza**: debe ser ovalada al observarla frontalmente y fusiforme cuando la observación es lateral, debe tener una longitud entre 4,0-5,0 μm y un ancho de 2,5-3,5 μm . El cociente largo/ancho debe ser 1,5 a 1,75. Debe haber una región acrosomal claramente definida que ocupa entre 40 y 70% del área total de la cabeza.

-**Pieza media**: debe ser delgada, con un ancho menor a 1 μm , aproximadamente del largo de una cabeza y media.

- **Cola**: debe ser derecha y uniforme, más estrecha que la pieza media, debe estar desenrollada y medir aproximadamente 45 μm de largo.

Entonces, estos criterios de clasificación requieren que todas aquellas formas con defectos mínimos sean consideradas anormales.

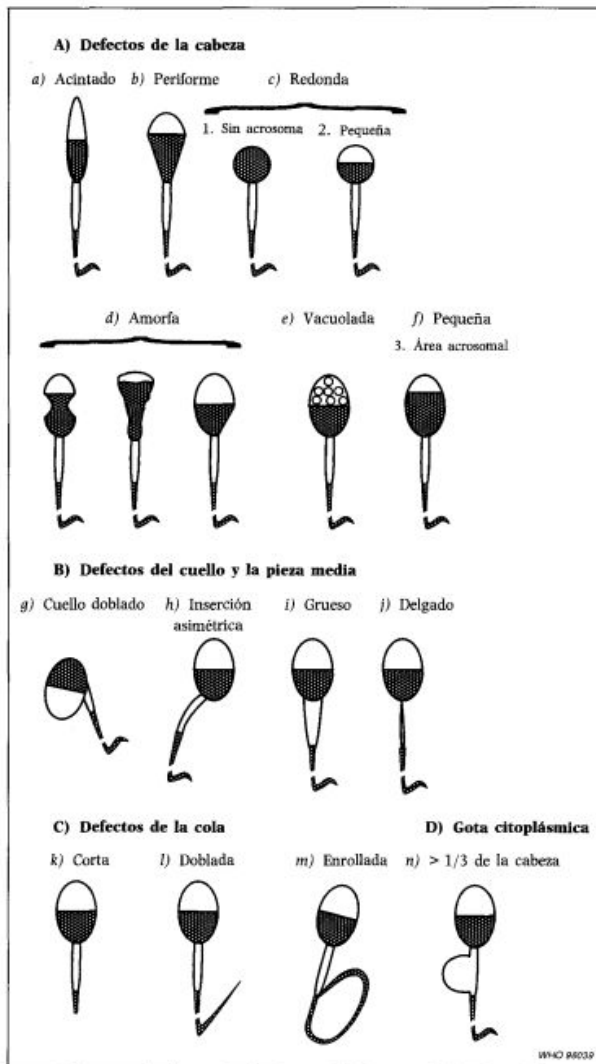
Se deben tomar en cuenta las siguientes categorías de defectos:

a) Defectos de la cabeza: puede ser grande, pequeña, acintada, piriformes, amorfa, vacuolada (> 20% del área ocupada por vacuolas no teñidas), cabezas con área acrosomal pequeña (< 40% del área de la cabeza), cabezas dobles y toda combinación entre estos.

b) Defectos del cuello y pieza media: incluyen el cuello "doblado" (el cuello y la cola forman un ángulo mayor de 90° con respecto al eje longitudinal de la cabeza), inserción asimétrica de la pieza media en la cabeza, pieza media gruesa o irregular, pieza media anormalmente fina, por ejemplo, ausencia de la batería de mitocondrias, y toda combinación entre estos.

c) Defectos de la cola: puede ser corta, múltiple, en horquilla, rota, doblada, de espesor irregular, arrollada y toda combinación entre estos.

d) Las gotas citoplásmicas mayores que un medio de la superficie de la cabeza normal. Se encuentran generalmente en la pieza media.



Modo de llevar a cabo un contaje morfológico de espermatozoides

Con preparaciones teñidas, se debe utilizar un objetivo de inmersión 100 X de campo claro y un ocular de al menos 10X.

La evaluación morfológica debe ser llevada a cabo en varias áreas del portaobjeto seleccionadas sistemáticamente. A medida que el portaobjetos es examinado sistemáticamente desde un campo microscópico hacia otro, se evalúan y registran todos los espermatozoides normales, y se anotan los defectos de los espermatozoides anormales.

Se deben contar al menos 200 espermatozoides consecutivos.

La OMS ha variado los criterios 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.

El quinto manual de la OMS establece que en un espermograma normal debe haber igual o más del **4%** de espermatozoides normales. Si se encuentra por debajo de este valor se denomina **Teratozoospermia**.

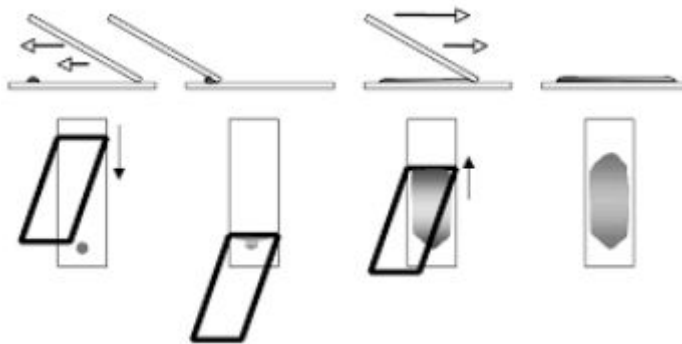
Tinciones

Preparación de las extensiones:

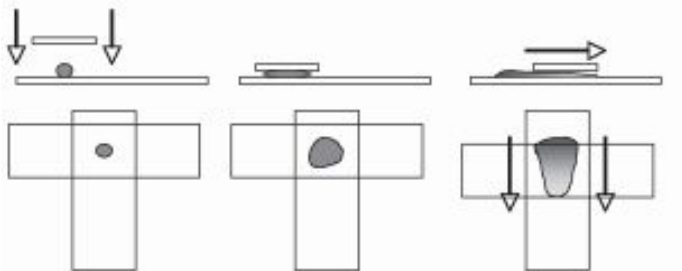
Se deben preparar por lo menos dos extensiones de la muestra de semen para realizar evaluaciones por duplicado y en caso que haya problemas con la tinción.

Los portaobjetos deben ser limpiados minuciosamente, lavados en etanol al 70% y secados y colocar luego sobre ellos una pequeña gota de semen (5 a 20 μL). Si la concentración de espermatozoides es mayor a $20 \times 10^6/\text{mL}$, se pueden utilizar 5 μL de semen; si la concentración de espermatozoides es menor a $20 \times 10^6/\text{mL}$, se deben utilizar entonces 10 a 20 μL de semen.

La técnica según la cual se estira una gota de semen sobre un portaobjeto limpio usando el borde de otro portaobjeto es adecuada para la preparación de extensiones, pero se debe cuidar de no producir extensiones muy gruesas. Esta técnica es buena para materiales poco viscosos, pero puede fallar con una muestra viscosa.



Como método alternativo, se pone una gota de semen en el medio de un portaobjeto limpio y se apoya otro portaobjeto limpio sobre el primero. La gota se extiende entre ambas superficies que luego se separan suavemente, deslizando uno sobre otro obteniéndose simultáneamente dos extensiones.



A veces la preparación de buenas extensiones se hace difícil a causa de las variaciones en la viscosidad del plasma seminal. produciendo extensiones con diferencias de grosor. Además, para muestras con baja concentración de espermatozoides, muestras viscosas, con mucho material particulado, o cuando es necesario realizar una morfología asistida por computadora, el plasma seminal puede ser diluido y removido después de la centrifugación (Liu y Baker, 1992; Menkveld y Kruger, 1996). Los espermatozoides precipitados son resuspendidos en un volumen apropiado para obtener la máxima concentración de espermatozoides posible, pero sin que esta supere $80 \times 10^6/\text{mL}$. Una alícuota de semen de 0,2 a 0,5 mL, dependiendo de la concentración de espermatozoides, es diluida a 10 mL con

salina común a temperatura ambiente. El tubo es centrifugado a 800 g durante 10 minutos y la mayor parte del sobrenadante es descartada. El precipitado es resuspendido en la solución salina restante, generalmente 20-40 μL , golpeando suavemente el tubo. Luego, 5-10 μL de esta suspensión son colocados en un portaobjetos y la gota es esparcida con una pipeta. La extensión es examinada usando una magnificación total de 400 x para asegurarse que los espermatozoides estén distribuidos uniformemente y que haya por lo menos 40 espermatozoides por campo de 400 x sin superposición o agrupamiento de los mismos. Si la extensión es demasiado densa, se debe utilizar un volumen menor o se debe diluir aún más la muestra y preparar otra extensión. Si los espermatozoides están demasiado separados en el portaobjetos, se debe utilizar una cantidad mayor de semen para aumentar el número de espermatozoides. Los portaobjetos se dejan secar al aire y luego son fijados. El procedimiento para la fijación dependerá del método de tinción a utilizar.

Métodos de tinción:

Son muy variados, pero los más utilizados son:

Papanicolaou

Diff-Quik

Shorr

Giemsa

Spermac

Testsimplets

Papanicolaou

La tinción de Papanicolaou es la técnica más utilizada en los laboratorios de andrología y es el método recomendado por la OMS. Esta técnica provee una buena tinción de los espermatozoides y de otras células. Permite distinguir la región acrosomal y post acrosomal de la cabeza, la pieza media y la cola. 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.

Además distingue muy bien los componentes celulares basófilos y acidófilos y permite realizar un examen detallado de la trama de cromatina nuclear. Aunque este método se ha empleado comúnmente en citología diagnóstica de rutina, el método convencional de Papanicolaou para citología vaginal da malos resultados cuando se aplica para los espermatozoides. La actual técnica de tinción modificada ha resultado ser útil en el análisis de la morfología de los espermatozoides y en el examen de células germinales inmaduras.

Su tiempo de procesamiento es de dos horas.

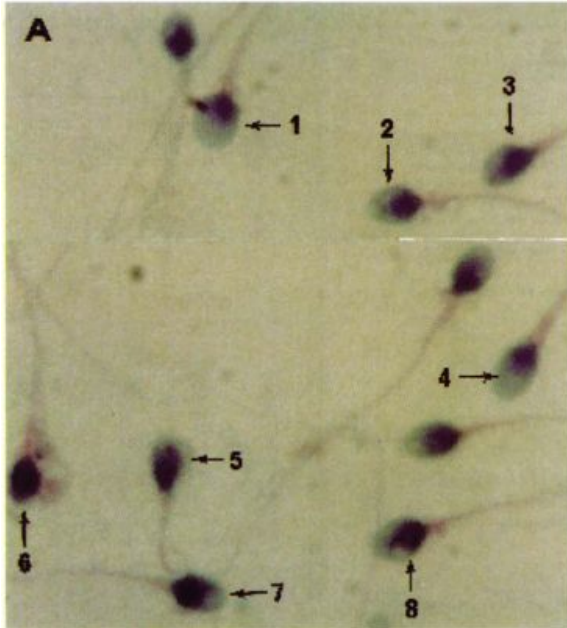


Fig. Fotomicrografías de espermatozoides teñidos con Papanicolaou 1) Anormal, cabeza grande, demasiado ancha (> 3,5 mm), 2) Anormal, área acrosomal pequeña, vacuolas, 3) Anormal, cabeza amorfa. 4) Normal. 5) Anormal, área acrosomal pequeña. 6) Anormal, cabeza amorfa y gota citoplasmática. 7) Normal, 8) Anormal, área acrosomal pequeña y vacuolas.

Diff-Quik

En algunos laboratorios, se usan métodos de tinción rápida, tal como el Diff-Quik (Kruger y col., 1987). Esta 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.

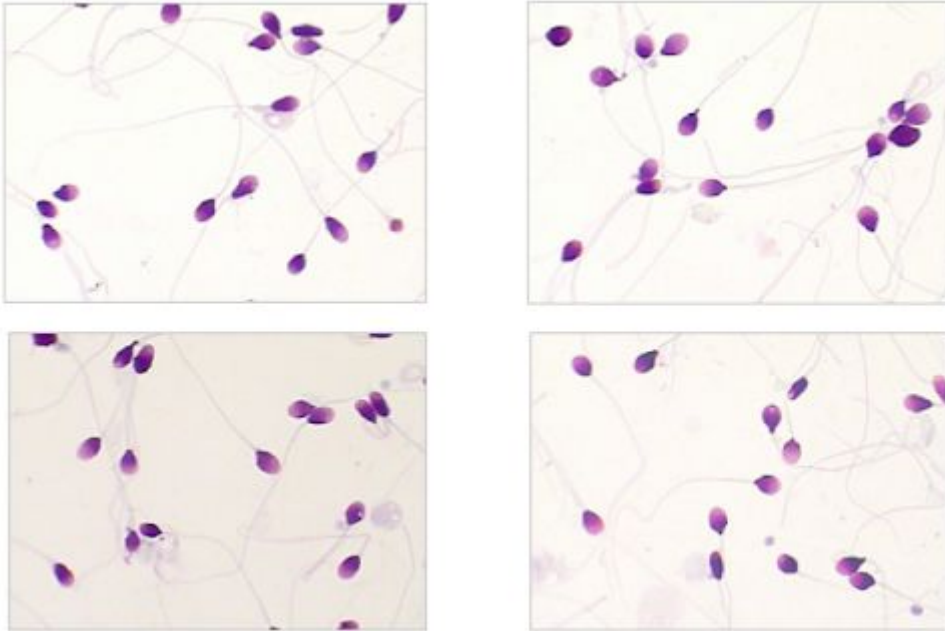
Un efecto negativo de esta tinción es que puede ocurrir una tinción excesiva de la célula y del fondo o background y pueden no tener la misma calidad que la tinción de Papanicolaou. Esto se puede contrarrestar lavando primero la muestra de semen antes de realizar el frotis.

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.

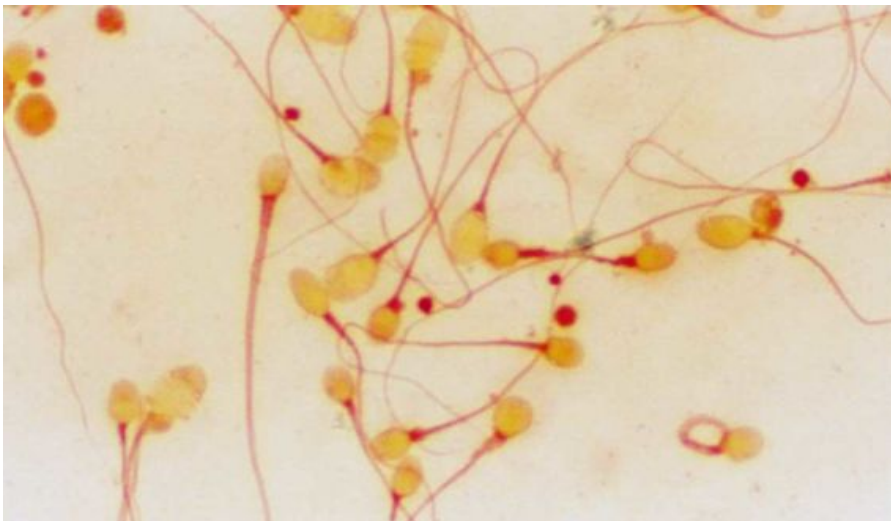
Por otro lado, cuando se utiliza el Diff-Quik, el tamaño de la cabeza del espermatozoide aparece más grande que cuando es teñido con la técnica de Papanicolaou o la tinción de Shorr (Kruger y col., 1988).



Shorr

La tinción de Shorr provee resultados similares a los de la tinción de Papanicolaou para formas normales (Meschede y col., 1993) Es muy simple de usar y es suficiente para la evaluación rutinaria de la morfología espermática.

La cabeza se tiñe de color amarillo oscuro de forma homogénea.



Giemsa

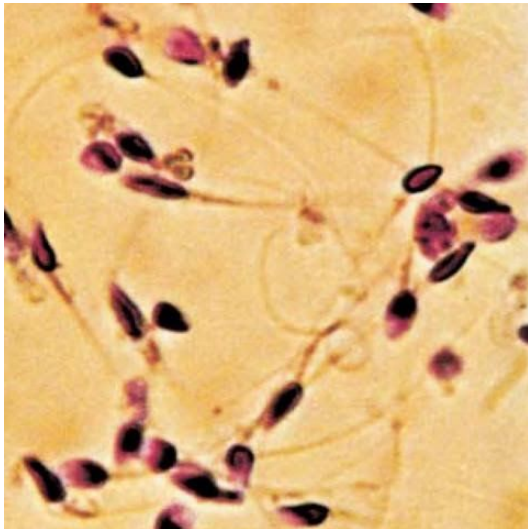
La tinción de Giemsa no se usa tan comúnmente como los demás, ya que los espermatozoides sin acrosoma teñidos pueden aparecer como normales y los flagelos pueden no teñirse.

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.

Testsimplets®

El kit comercial Testsimplets® es un método rápido para el examen morfológico de los espermatozoides. El mismo 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 µg/cm² de acetato de violeta de cresil y 1 µg/cm² 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. La coloración tarda unos 15 minutos después de lo cual el portaobjetos permanece estable durante unas pocas horas a temperatura ambiente.



Conclusión de las tinciones

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 post acrosomal 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.

BIBLIOGRAFÍA

López García, Urbano Felices, Cárdenas Povedano, (2012). *Manual de laboratorio para el análisis del semen*. 1ra ed. pp. 8 - 10.

Blaquier, J. and Blaquier, C., (2001). *Manual De Laboratorio De La OMS Para El Examen Del Semen Humano Y De La Interacción Entre El Semen Y El Moco Cervical*. 4ta ed. Madrid: Médica Panamericana, pp.20 - 28.

World Health Organization, (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th ed. Switzerland

Aksoy, Emine, Aktan, Tahsin Murad, Duman, Selcuk, & Cuce, Gokhan. (2012). *Assessment of Spermatozoa Morphology under Light Microscopy with Different Histologic Stains and Comparison of Morphometric Measurements*. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1544-1550. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022012000400045>