



AIDPR

Recuento espermático – Vitalidad

2020

Integrantes

Canale, Camila

Casesi, Paulina

Fernandez, María Agustina

Martin, Sofía Antonella

Pigozzi Bonfigli, María José

Werner, Jesica Vanina

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. Ésta se relaciona con las tasas de fertilización y embarazo, pero se ve 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.
- **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. Este valor se correlaciona con el volumen testicular y, por lo tanto, es una medida de la capacidad de los testículos para producir espermatozoides, así como también una medida de la permeabilidad de las vías.

Importancia de contar suficientes espermatozoides

Para reducir los errores de muestreo, se debe contar un número crítico de espermatozoides, ya que la precisión de la estimación del número de espermatozoides depende del número de espermatozoides contados. Cuanto mayor sea este número, mejor será su intervalo de confianza y menor su error estándar. Se cuentan preferiblemente un total de al menos 400 espermatozoides, a partir de recuentos de réplicas de aproximadamente 200.

Contar muy pocos espermatozoides producirá un resultado incierto, que puede tener consecuencias para el diagnóstico y la terapia. Pero esto puede ser inevitable cuando los espermatozoides se toman con fines terapéuticos y el número de espermatozoides es bajo.

Procedimiento de recuento de rutina

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. Cada área de recuento se divide en nueve cuadrículas de 1 mm x 1 mm (Fig. 1), la cuadrícula central, número 5, tiene 25 cuadrados secundarios (Fig. 2). En la imagen se observa una micrografía de uno de los 25 cuadrados del panel central cargado (Fig. 3), este contiene una rejilla de 16 cuadrados terciarios delimitados por líneas triples.

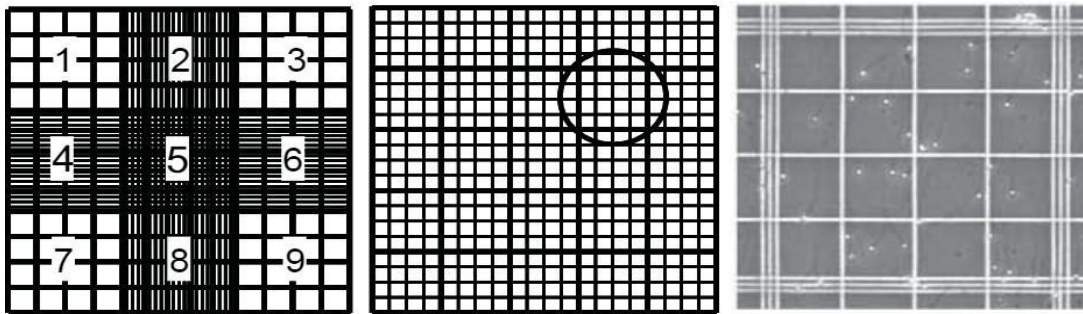


Ilustración 1. Figuras 1, 2 y 3 (Respectivamente, de izquierda a derecha)

Evaluación del número de espermatozoides en las cámaras de recuento

El número de espermatozoides debe evaluarse en ambas cámaras del hemocitómetro. Si los dos valores concuerdan suficientemente, las alícuotas tomadas pueden considerarse representativas de la muestra.

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.
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 (**Ilustración 2**)
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 (por el criterio elegido anteriormente).
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.

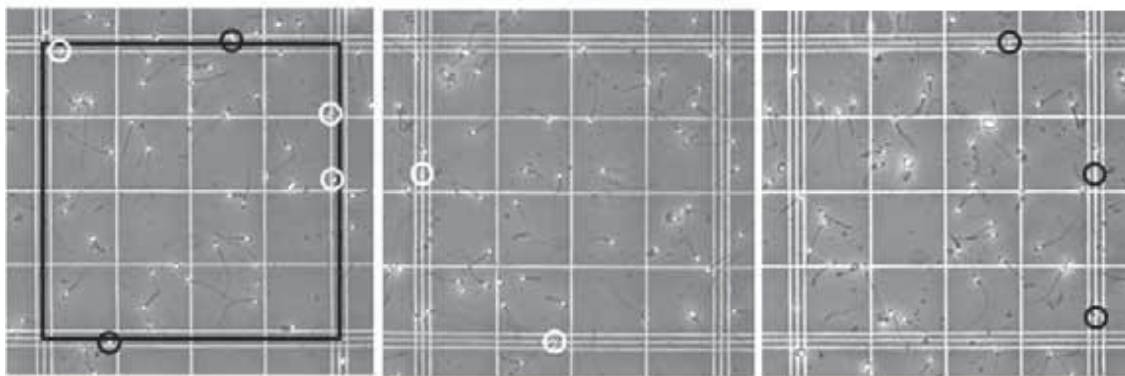


Ilustración 2

Nota: Si hay muchas colas de espermatozoides sin cabeza (cabezas de alfiler) o cabezas sin cola, su presencia debe registrarse en el informe. Si se considera necesario, su concentración puede evaluarse de la misma manera que para los espermatozoides, o su prevalencia en relación con los espermatozoides puede determinarse a partir de preparaciones teñidas.

Pasos para determinar el número total de espermatozoides.

1. El examen se realiza sobre preparación homogenizada, sin diluir de las 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 (diluyente de Mac Combers-Saunders, Bicarbonato de sodio 0.5 % P/V en solución acuosa de formol 0.5% V/V)
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.

Nota: Estas concentraciones calculadas solo pueden ser estimaciones aproximadas porque se cuentan muy pocos espermatozoides y los volúmenes pueden no ser precisos. Las concentraciones

estimadas de las preparaciones sin diluir pueden estar entre el 30% y el 130% de las concentraciones derivadas de muestras diluidas en cámaras de recuento.

Determinación de la dilución requerida

La dilución de semen requerida para permitir medir con precisión el número de espermatozoides se evalúa a partir de una preparación de semen sin diluir. Esta suele ser la preparación húmeda que se utiliza para evaluar la motilidad.

- Examine una de las preparaciones húmedas para estimar el número de espermatozoides por HPF ($\times 200$ o $\times 400$). Un HPF equivale aproximadamente a 16 nl ($a \times 200$) o 4 nl ($a \times 400$).
- Si se observan espermatozoides, cuéntelos, determine la dilución necesaria de la Tabla 2 y proceda según la preparación de las diluciones y carga de las cámaras del hemocitómetro.
- Si no se observan espermatozoides, examine la preparación húmeda replicada. Si no se encuentran espermatozoides en la segunda preparación, proceda a realizar el recuento según los pasos para bajo número de espermatozoides.

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

Tabla 1

Nota: Para fines de diagnóstico, las muestras de semen para análisis deben tener un volumen mínimo de 50 μ l, para evitar errores de pipeteo asociados con volúmenes pequeños.

Si hay muy pocos espermatozoides por campo de visión a la dilución recomendada, prepare otra dilución menor. Si hay demasiados espermatozoides superpuestos por campo de visión a la dilución recomendada, prepare otra dilución mayor.

Cálculo 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 (20 nl por cada rejilla 4, 5 y 6), multiplicado por el factor de dilución.

$$C=(N/n) \times (1/20) \times \text{factor de dilución}$$

Ejemplo: Para diluciones 1 + 4 (1: 5), utilizando las cuadrículas 4, 5 y 6, la concentración $C = (N / n) \times (1/20) \times 5$ espermatozoides por nl = $(N / n) \times (1/4)$ espermatozoides / nl (o 10^6 por ml de semen).

El LRI (límite de referencia inferior) 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.

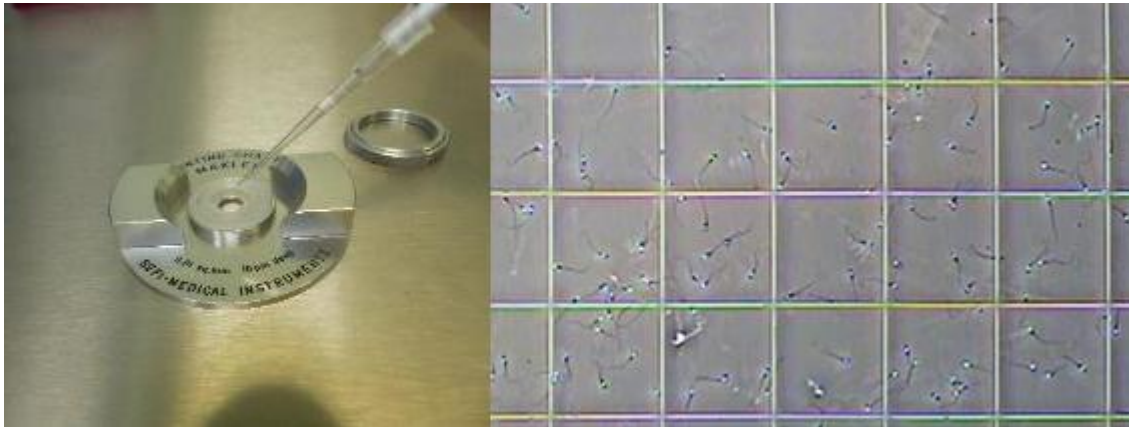
Cámara de Makler

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 debe 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.

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.

Nota: 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, el cual es el límite de detección inferior.

VITALIDAD ESPERMÁTICA

La vitalidad espermática se refleja en la proporción de los espermatozoides que están "vivos". Esto puede determinarse de 2 maneras:

- Mediante la utilización de algún colorante vital (**Eosina**). Se basa en el principio de que las células muertas tienen sus membranas plasmáticas dañadas, por lo que permiten la entrada de ciertos colorantes.
- Mediante la expresión de su capacidad osmorreguladora cuando se los expone a condiciones hipoosmóticas (**HOST**). Se basa en el principio de que las células vivas tendrán la capacidad de hincharse en condiciones hipoosmóticas, mientras que las muertas no.

Lo que se hace es contar 200 espermatozoides inmóviles con el microscopio óptico o de contraste de fase, diferenciando aquellos que están vivos (no coloreados/hinchadas) de las células muertas (coloreadas/no hinchadas).

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 contaje) 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-Nigrosina:

Este método es simple y rápido pero las preparaciones húmedas no se pueden almacenar durante un tiempo prolongado para fines de control de calidad.

Preparación del reactivo:

1. Eosina Y: Disolver 0.67 g de eosina Y (índice de color 45380) y 0.9 g de cloruro de sodio (NaCl) en 100 ml de agua purificada, calentando la solución suavemente.
2. Eosina-nigrosina: agregar 10 g de nigrosina (índice de color 50420) a los 100 ml de la solución de eosina Y.
3. Hervir la suspensión, luego dejar enfriar a temperatura ambiente.
4. Filtrar con papel de filtro para eliminar el precipitado grueso y gelatinoso. Almacenar en recipiente de vidrio oscuro y sellado.

Nota: Algunas soluciones de eosina disponibles en el mercado son soluciones acuosas hipotónicas que pueden 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 osmolaridad.

Procedimiento:

1. Mezclar bien la muestra de semen.
2. Retirar una alícuota de 50 μ l de semen y combinar con 50 μ l de solución de eosina-nigrosina 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 duplicado.
5. Examine cada preparado con óptica de campo brillante, con un aumento de 1000x y aceite de inmersión.

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 caso contrario repetir la evaluación.

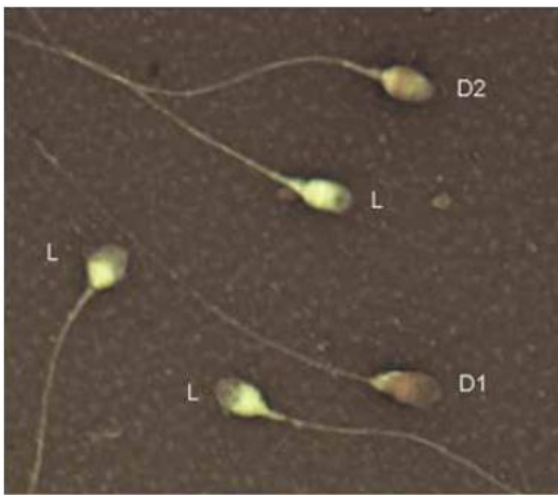


Ilustración 3

Espermatozoides teñidos con Eosina. En el caso de que tengan su cabeza teñida de color rojo (D1) o rosa oscuro (D2), esos espermatozoides serán considerados muertos. Mientras que, si tienen cabezas blancas (L) o de color rosa claro (no se visualiza en la foto), el espermatozoide se considera vivo, o sea, tiene su membrana intacta. Si la “mancha” de la tinción está limitada a únicamente una parte del cuello, y el resto de la cabeza no se encuentra manchada, se considera que el cuello tiene una membrana “con fugas”, lo cual no es señal de muerte celular ni de una desintegración total de la membrana. Este tipo de células se cuentan como vivas.

Preparación y evaluación de muestras utilizando HOST:

-Preparación de reactivos: 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.** Calentar 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 100µL 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 10µL a un portaobjetos limpio y cubrir con un cubreobjetos.
- 6.** Realizar un duplicado.
- 7.** Examine cada portaobjetos con óptica de contraste de fase con un aumento de $\times 200$ o $\times 400$.
- 8.** Contabilizar el número de espermatozoides no hinchados (muertos) y las células hinchadas (vitales).
- 9.** Evaluar 200 espermatozoides en cada repetición, a fin de disminuir el error de muestreo.
- 10.** Calcular el promedio y la diferencia de los dos porcentajes de células vitales de las preparaciones.
- 11.** Si la diferencia entre los porcentajes es aceptable, informe el porcentaje de vitalidad promedio. Si la diferencia es demasiado alta, haga dos nuevas preparaciones a partir de dos nuevas alícuotas de semen y repita la evaluación.
- 12.** Informe el porcentaje promedio de espermatozoides vitales al número entero más cercano.

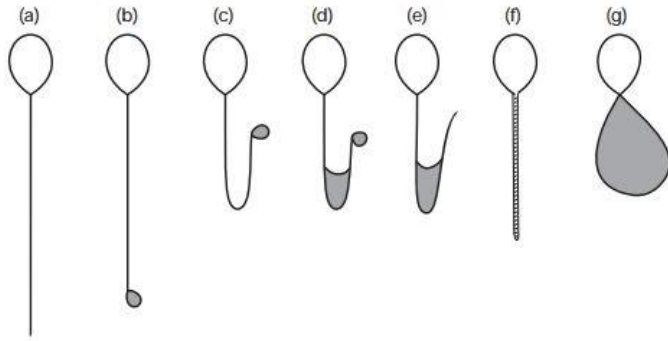


Ilustración 4. Representación esquemática de cambios morfológicos típicos en espermatozoides humanos sometidos a estrés hipoosmótico. Los espermatozoides hinchados se identifican por cambios en la forma de la célula, como lo indica el enrollamiento de la cola. Las células vivas se distinguen por la evidencia de hinchazón de la cola del esperma; puntuar todas las formas de colas hinchadas como espermatozoides vivos. (a) Sin cambios. (b) - (g) Varios tipos de cambios de cola. La hinchazón en la cola está indicada por el área gris.

Bibliografía

Examination and processing of human semen (2010). Recuperado de <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/index.html>

Dra. Adriana Brufman (2020). Técnicas de evaluación del semen.