

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Morfología espermática y parámetros seminales básicos en varones normo y oligoastenoteratozoospermicos

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA: Isabel María Gimeno Miquel

TUTORA: Dra. Inmaculada Molina Botella

Valencia, 1 de Septiembre de 2014

Título

Morfología espermática y parámetros seminales básicos en varones normo y oligoastenoteratozoospermicos.

Resumen

La morfología del espermatozoide, según numerosos estudios, es uno de los factores más importante en la obtención de fecundación tanto en IIU como en FIV-ICSI. La OMS ha descrito distintos criterios de clasificación para los espermatozoides que son cada vez más restrictivos. La OMS de 1992 considera como normales aquellas muestras de semen con un porcentaje de espermatozoides normales superior al 30%. Sin embargo, la OMS de 1999 y 2010 impusieron unos valores de referencia más restrictivos, y consideran muestras normales aquellas que presentan unos porcentajes superiores al 14 y al 4 % respectivamente, siguiendo los criterios estrictos de Kruger. Diversas publicaciones han relacionado la morfología espermática con otras características seminales como la concentración, motilidad y calidad de la misma, por lo que las alteraciones morfológicas de los espermatozoides podrían estar relacionadas con las alteraciones de otras variables de la muestra en fresco. El objetivo del presente trabajo es relacionar la morfología de los espermatozoides con distintos parámetros seminales en fresco, tanto macroscópicos como microscópicos, en varones normales y oligoastenoteratozoospermicos, en función de los criterios descritos por la OMS de 2010. Se analizaron un total de 99 muestras de sémenes diagnósticos, de las cuales 54 se correspondieron con varones normales y 45 con varones oligoastenozoospermicos. El 23,23% de las muestras fueron teratozoospermicas. De cada una de las muestras se estudiaron las variables relacionadas con la calidad del semen, como volumen, licuado, pH, concentración y motilidad. La morfología se analizó mediante el analizador automático de espermatozoides (CASA). Los resultados obtenidos demuestran que la morfología espermática está relacionada con la motilidad de la muestra en fresco, ya que los espermatozoides morfológicamente normales presentan una motilidad superior, mientras que la concentración espermática no parece estar relacionada con dicha morfología.

Palabras clave

Morfología espermática, CASA, teratozoospermia, motilidad, concentración.

Alumno/a: Dña. Isabel María Gimeno Miquel

Tutora: Dra. Inmaculada Molina Botella

Valencia, 1 de Septiembre de 2014

Title

Sperm morphology and basic seminal parameters in normal and oligoasthenotheratozoospermic men.

Abstract

Sperm morphology, according to numerous studies, is one of the most important factors in obtaining of fecundation in IUI and FIV-ICSI. WHO has described different classification criteria for spermatozoa that are increasing stringency. WHO of 1992 considers as normal samples those with a percentage of normal spermatozoa upper than 30%. However, WHO of 1999 and 2010 imposed more restrictive reference values, and considers normal samples those who presents a percentage of normal forms upper than 14 and 4% respectively, following Kruger strict criteria. Several publications have related sperm morphology with another seminal characteristics such as concentration, motility and quality of it, so sperm morphological alterations could be related to alterations in other variables of the fresh sample. The aim of the present study is to relate morphology of spermatozoa with different seminal parameters in fresh, both macroscopic and microscopic, in normal and oligoasthenotheratozoospermic males, depending on the criteria described by WHO 2010. A total of 99 samples of diagnostic semen were analyzed, of which 54 corresponded to normal men and 45 with oligoasthenozoospermic men. The 23,23% of the samples were theratozoospermic. From each of the samples were studied the variables related with semen quality, such as volume, liquefaction, pH, concentration and motility. Morphology was analyzed by automatic sperm analyzer (CASA). The results show that sperm morphology is related to the motility of fresh sample, because morphologically normal spermatozoa have a higher motility, while spermatoc concentration does not appear to be related to this morphology.

Key words

Sperm morphology, CASA, theratozoospermia, motility, concentration.

Alumno/a: Dña. Isabel María Gimeno Miquel

Tutora: Dra. Inmaculada Molina Botella

Valencia, 1 de Septiembre de 2014

Dedicatorias y agradecimientos

Después de estos cuatro años me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han acompañado a lo largo de este camino.

En primer lugar, doy las gracias a Inma, mi tutora del TFG y profesora en mi último curso, por haberme ayudado con este trabajo y por haberme mostrado lo maravilloso que puede llegar a ser el mundo de la reproducción, del cual me gustaría algún día poder formar parte.

Después, como no a Majo, mi teacher particular, que ha sido mi guía en el laboratorio y me ha enseñado todo lo necesario para poder desarrollar este trabajo, y a la que sin duda le deseo lo mejor, porque se lo merece.

También agradecer a la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital La Fe, porque aunque mi estancia ha sido más corta de lo que me hubiera gustado, han hecho que me sienta muy cómoda allí, sobretodo Dori y Estrella, que me acogieron en el laboratorio y que han hecho que mi día a día allí sea mucho más ameno.

Por supuesto también agradecer a mis padres y a mis hermanos por haberme apoyado en todas mis decisiones, y a toda mi familia por sus consejos y ánimos para seguir adelante.

A mis compañeros de clase, en especial Ainhoa, Sandra, Raquel, Alba, Alejandro y Cristina, por haber hecho cada día único y haberme ayudado siempre que lo necesitaba, y a los que voy a echar mucho de menos ahora que nuestros caminos se separan. Y a mis amigas de fuera de clase, con las que puedo contar siempre que lo necesito.

Y por último, a todos los profesores que han participado en mi aprendizaje y en mi formación como biotecnóloga y como persona.

Isabel

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. El problema de la infertilidad en varones	1
1.2. Análisis de semen en fresco	3
1.3. Parámetros seminales y esterilidad de causa masculina	5
2. Objetivos	9
3. Material y métodos	11
3.1. Tipo de estudio	11
3.2. Recogida y evaluación de las muestras de semen	11
3.2.1. Análisis de la muestra de semen	11
3.3. Tinción de la muestra de semen (método Diff-Quik)	20
3.4. Análisis de la morfología espermática (CASA)	21
3.5. Variables asociadas al varón y a la muestra de semen	23
3.6. Diseño experimental	24
3.7. Análisis estadístico	24
4. Resultados	27
4.1. Parámetros seminales básicos en función de la esterilidad de causa masculina	27
4.2. Parámetros seminales básicos en función de la morfología espermática	28
4.3. Análisis de regresión logística para las variables seminales en función de la morfología espermática	29
5. Discusión	31
6. Conclusiones	36
7. Referencias bibliográficas	38

Índice de tablas

Tabla 1. Principales causas de infertilidad masculina y porcentaje de incidencia sobre la población de varones estériles

Tabla 1. Clasificación de la viscosidad y símbolo asociado

Tabla 2. Clasificación de la motilidad espermática según la OMS 2010

Tabla 3. Clasificación de la aglutinación en distintos grados y símbolo de cada uno

Tabla 4. Valores de referencia de cada una de las distintas variables seminales según la OMS de 2010

Tabla 5. Media, error estándar y significación estadística (p-valor) de los parámetros seminales volumen, pH, morfología y concentración y motilidad en fresco y capacitado entre las muestras normozoospermicas y oligoastenozoospermicas

Tabla 6. Media, error estándar y significación estadística (p-valor) de los parámetros seminales concentración y motilidad en fresco y en capacitado entre las muestras normozoospermicas y teratozoospermicas

Tabla 7. Pruebas de razón de verosimilitud del análisis de regresión logística para las variables de la muestra de semen en función de la morfología espermática

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de cada una de las partes principales de un espermatozoide

Figura 2. Esquema detallado de las partes del espermatozoide

Figura 3. Imagen real de una cámara Makler y dibujo esquematizado de las medidas de la cuadrícula y su visualización a 200 aumentos

Figura 4. Tipos de movilidad de los espermatozoides. A. Progresivo rápido. B. Progresivo lento. C. No progresiva. D. Inmóvil

Figura 5. Clasificación de los defectos morfológicos de los espermatozoides. Adaptación del criterio estricto de Kruger. Manual OMS 2010

Figura 6. Espermatozoides morfológicamente anormales con colas dobles y cabezas dobles

Figura 7. Técnica para la realización de la extensión de la muestra de semen

Figura 8. Sistema CASA para el análisis espermático, compuesto por un microscopio óptico conectado a una platina atemperada, a la cámara de vídeo y al ISAS

Figura 9. Procedimiento manual de captura de espermatozoides en el programa ISAS

Figura 10. Análisis de la morfología espermática en el programa ISAS

Figura 11. Diseño experimental en el que aparecen las variables a analizar. Rto: recuento; Mot: motilidad; Aglut: aglutinado; Vol: volumen; Morfo. morfología

Índice de abreviaturas

CASA: Análisis de espermatozoides asistido por ordenador

ES: Error estándar

FA: Factor de análisis

FIV: Fecundación *in vitro*

FN: Formas normales

ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

IIU: Inseminación intrauterina

ISAS: Integrated Semen Analysis System

NTSM: Número total de espermatozoides móviles

OMS: Organización Mundial de la Salud

SPA: Sperm penetration assay

TRA: Técnica de Reproducción Asistida

URH: Unidad de reproducción humana

VE: Varón estéril

VN: Varón normal

WHO: World Health Organization

1. Introducción

1.1. El problema de la infertilidad en varones

La infertilidad se define como la incapacidad de una pareja para lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales regulares sin medidas anticonceptivas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce la infertilidad como un problema de salud público. Suele afectar al 15% de la población, y 1 de cada 6 parejas necesita ayuda médica para poder conseguir descendencia.

El factor masculino es el responsable del 35% de los casos de infertilidad (Teppa-Garrán, 2004), considerándose generalmente que el varón presenta una alteración del espermiograma, que aunque es un análisis importante, no proporciona información sobre otro tipo de alteraciones responsables de dicha infertilidad.

La infertilidad puede estar causada por distintas condiciones y problemas físicos, como defectos congénitos (criptorquídea, hipospadias), distintos tipos de enfermedades (patologías urológicas, de transmisión sexual, genéticas, etc.), exposición a productos químicos y/o tóxicos, o distintos estilos de vida que causan generalmente un bajo recuento espermático y una baja calidad seminal. Algunas de estas causas se recogen a continuación en la tabla 1.

Tabla 1. Principales causas de infertilidad masculina y porcentaje de incidencia sobre la población de varones estériles

Principales causas de infertilidad	Incidencia
Varicocele	40%
Infecciones glándulas accesorias masculinas	10%
Factor genético	5%
Factor inmunológico	5%
Factor endocrino	5%
Alteraciones nerviosas de la eyaculación	4%
Displasia de la vaina fibrosa del espermatozoide	
Factor psicológico	

Cáncer testicular

Gonadotoxinas

De un 30 a un 40% de los casos el problema se encuentra en los testículos. Entre ellos, una alteración muy común son las venas dilatadas, más comúnmente conocidas como varicocele, que afecta a los órganos del aparato reproductor masculino (Anawalt *et al.*, 2005). Esta patología produce un descenso de la capacidad de producción de espermatozoides, y, como resultado, disminuye tanto la concentración como la motilidad espermática. También suele estar relacionada con la aparición de anomalías estructurales en la cabeza del espermatozoide y la presencia de anticuerpos antiespermatozoides. Estas alteraciones cuantitativas y cualitativas de los parámetros seminales suelen ser consecuencia de un aumento de la temperatura testicular y del incremento de productos tóxicos, como radicales libres (Teppa-Garrán *et al.*, 2004).

Entre el 10 y el 20% de los casos el problema se debe a un bloqueo en la ruta de secreción del esperma desde los testículos hasta el pene. Entre las causas de este tipo de alteraciones se encuentra la azoospermia obstructiva, la agenesia de deferentes, la vasectomía y distintos tipos de infecciones, sobre todo de testículos, epidídimo, próstata y vías urinarias. Este tipo de infecciones si no son tratadas correctamente pueden producir atrofia testicular, comprometer las glándulas accesorias o bloquear las vías seminales, además de incrementar la presencia de leucocitos y radicales libres en el semen o la producción de anticuerpos antiespermatozoides.

Pero en la mayoría de los casos la causa de infertilidad es desconocida y la mayor parte de los laboratorios de FIV consideran suficiente el análisis de semen como prueba de cribado inicial.

1.2. Análisis de semen en fresco

El estudio rutinario de las muestras seminales incluye la evaluación de las variables macroscópicas, microscópicas y complementarias recomendadas por la OMS de 2010.

Las variables que se analizan en el examen macroscópico son la licuefacción, viscosidad, aspecto, volumen y pH, mientras que en el examen microscópico son el recuento de espermatozoides, motilidad, aglutinación y presencia de elementos celulares distintos a los espermatozoides.

Además de estas variables, también se pueden realizar una serie de pruebas accesorias o complementarias según el criterio de cada laboratorio, como son el test de viabilidad, test de la Eosina, HOS test (análisis adicional de vitalidad), test de progresión, MAR test o prueba de diagnóstico inmunológico, morfología espermática, test de hamster o Sperm penetration Assay (SPA) o test de la hemizona (HZA).

De entre todas estas variables, la concentración espermática es una de las que sirven como predictora de la fertilidad en varones. Según diversos estudios realizados, una baja concentración de espermatozoides está asociada a una baja tasa de embarazo (Bonde *et al.*, 1998). Existen diversos factores que pueden producir una disminución de la concentración espermática de manera puntual, como el periodo de abstinencia sexual.

La motilidad espermática también está relacionada con las tasas de embarazo según diversos estudios (Donnelly *et al.*, 1998). Una de las principales causas de infertilidad masculina es precisamente la disminución de la motilidad espermática, denominada astenozoospermia, y que puede tener su origen en anomalías en la morfología flagelar, como el síndrome de Kartagener, o en una disminución de la frecuencia del ritmo del flagelo debida a alteraciones en la producción de energía intracelular. La motilidad de una muestra de semen depende, además, del ambiente y de las condiciones de análisis.

En cuanto a la morfología, varios estudios han demostrado que el análisis de la morfología espermática puede resultar útil para predecir la tasa de fertilización en programas de fertilización *in vitro* (FIV), ya que el porcentaje de formas normales está altamente relacionado con la capacidad fecundante *in vivo* (Marnet *et al.*, 2000) y con la capacidad de desarrollo de los embriones. De hecho, Ron-El *et al.* (1991) y Parinaud *et al.* (1993) han demostrado que un porcentaje elevado de formas espermáticas anormales, conocido como teratozoospermia, se asocia con fallos en la fertilización, una mala morfología embrionaria y un bajo ratio de embarazo. Por lo tanto, los espermatozoides anormales generalmente presentan un menor potencial de fecundación. Las principales causas de aparición de una morfología anómala son el varicocele, alteraciones citogenéticas y las gonadotoxinas (alcohol y nicotina principalmente).

Los espermatozoides constan morfológicamente de tres partes claramente diferenciadas (figura 1 y 2), que son la cabeza, la pieza intermedia o cuello y la cola.

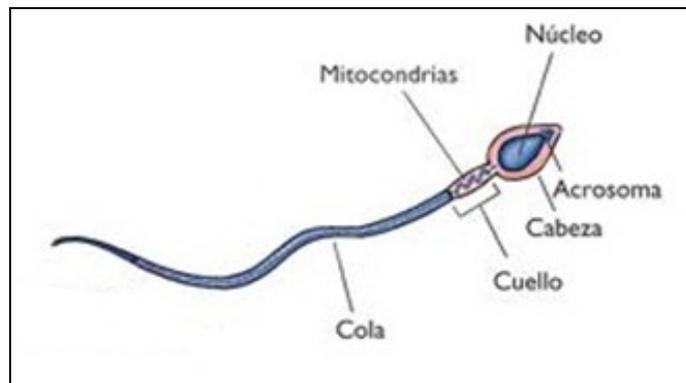


Figura 1. Esquema de cada una de las partes principales de un espermatozoide.

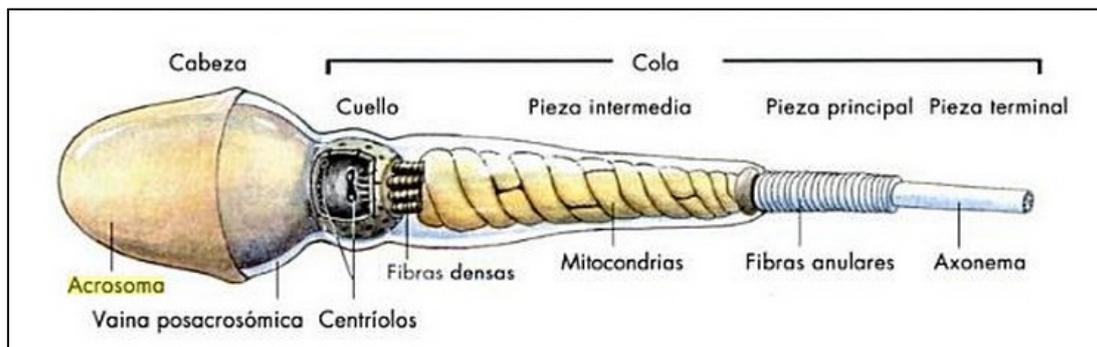


Figura 2. Esquema detallado de las partes del espermatozoide.

La cabeza contiene el núcleo del espermatozoide (haploide) y una estructura altamente especializada denominada acrosoma. La alta condensación de la cromatina del núcleo permite disminuir el volumen de la cabeza, lo que facilita el movimiento del espermatozoide a través de los fluidos. El acrosoma es un orgánulo secretor que contiene proteasas y enzimas hidrolíticas, como hialuronidasa, cuya función es la separación de las células del cúmulo que rodea al ovocito mediante la hidrólisis del ácido hialurónico que las mantiene unidas. También contiene acrosina, que es una enzima hidrolítica que rompe la zona pelúcida del ovocito para que el espermatozoide pueda penetrar en el interior del ovocito.

La pieza intermedia o cuello está situada entre la cabeza y el flagelo, y en su interior se encuentran las mitocondrias, a partir de las cuales se obtiene la energía necesaria para permitir el movimiento de los espermatozoides.

Por último, la estructura flagelar, que tiene una longitud de aproximadamente 50 μm , permite el desplazamiento del espermatozoide a lo largo del tracto reproductor femenino para poder fecundar al óvulo, a una velocidad de aproximadamente 3 - 3,5 mm/min. Está recubierto por una vaina fibrosa y por la membrana flagelar.

1.3. Parámetros seminales y esterilidad de causa masculina

Según la OMS del 2010, las variables de la muestra de semen que contribuyen en mayor medida a la obtención de gestación, tanto *in vivo* como *in vitro*, son la concentración y motilidad en fresco y en capacitado y la morfología.

Se ha demostrado que los espermatozoides morfológicamente normales nadan más rápido y más recto y exhiben una mayor frecuencia de golpe flagelar (Olmedo *et al.*, 1995). En cambio, las anomalías espermáticas han sido asociadas con alteraciones de la fertilidad, siendo la mayoría de los espermatozoides morfológicamente anormales inmóviles o con una movilidad muy lenta (Overstreet *et al.*, 1981). Existen distintas explicaciones para este efecto, como una hidrodinámica deficiente debido a anomalías en la morfología de la cabeza, anomalías en la

morfología flagelar que impiden un movimiento normal, distintas alteraciones en el control de la propagación de la onda flagelar o anomalías metabólicas en el mecanismo de producción y transducción de la energía dentro de la célula (Katz *et al.*, 1982).

El moco cervical también actúa restringiendo la entrada de espermatozoides anormales en el tracto reproductor femenino. De hecho, cualquier tipo de alteración en las propiedades bioquímicas del moco puede producir cambios en la receptividad hacia los espermatozoides. Un estudio realizado por Eggert-Kruse *et al.* (1996) demostró que la morfología espermática tiene una gran influencia en la interacción entre los espermatozoides y el moco cervical, y, de igual manera, Bianchi *et al.* (2004) demostraron que también actúa como barrera frente al paso de espermatozoides con anomalías estructurales en la cromatina y en el DNA. Este proceso de selección se basa en el diferente patrón de motilidad que muestran los espermatozoides con una morfología normal frente a los de morfología anormal, ya que éstos son incapaces de nadar correctamente a través del moco, y por ese motivo el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales es mayor en el moco cervical que en el eyaculado.

Son muchos los estudios que demuestran que los parámetros de motilidad y morfología de la muestra seminal influyen en la tasa de gestación (Van Voorhis *et al.*, 2001; Karabulut and Tekin, 2012). La morfología espermática se considera un parámetro importante para predecir el pronóstico de gestación. Un metanálisis reciente encontró una mayor tasa de embarazo en parejas con una morfología normal igual o superior al 4%. Al comparar las características de los grupos con morfología normal frente a una anormal se observó diferencias en el porcentaje de movilidad progresiva en la muestra de semen capacitada (aproximadamente el 90 y 80% respectivamente), (Kably-Ambe *et al.*, 2013).

Otro estudio también demostró que un porcentaje de espermatozoides normales mayor al 30% daba una tasa de gestación significativamente mayor cuando el número total de espermatozoides móviles (NTSM) tras capacitar era superior a los 5 millones (Badawy *et al.*, 2009), por lo tanto, la evaluación del NTSM tras capacitar se considera un factor importante para la toma de decisiones clínicas. A pesar de ello, es

necesario un estudio prospectivo con mayor significación clínica, además de un buen diseño experimental, para establecer la influencia de este parámetro en la obtención de gestación (Kably-Ambe *et al.*, 2013).

Pese a dichas evidencias, no existe consenso acerca del valor predictivo de la morfología en la obtención de gestación porque el criterio estricto de morfología se desarrolló, en un principio, para técnicas de fecundación *in vitro*. Muchos estudios prospectivos y retrospectivos han demostrado que la morfología espermática por sí sola, ya sea analizada antes o después de las técnicas de capacitación, no ayuda a dar un valor predictivo de los resultados de la gestación tanto *in vivo* como *in vitro*.

En la bibliografía consultada no se han encontrado publicaciones que relacionen las variables macroscópicas y microscópicas de las muestras seminales en función de los criterios establecidos por la OMS ni en función de su morfología. Estas comparaciones permitirían conocer las variables seminales relacionadas con la causa de esterilidad (concentración y motilidad) y también con la morfología espermática. De este modo, se podrían simplificar y mejorar los actuales test diagnósticos basados únicamente en el cribado de las muestras de semen previo a la realización de las TRA.

2. Objetivos

Los objetivos del presente trabajo son:

1. Comparar las variables seminales macroscópicas y microscópicas de las muestras diagnósticas, tanto en fresco como en capacitado, en función de la esterilidad de causa masculina y de su morfología.
2. Determinar las variables de la muestra de semen que influyen sobre la morfología espermática.

3. Material y métodos

3.1. Tipo de estudio

Estudio retrospectivo de cohortes en el que se incluyeron 99 muestras de sémenes diagnósticos realizados desde Mayo hasta Junio de 2014 en el laboratorio de Andrología de la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital Universitario y Politécnico la Fe de Valencia.

3.2. Recogida y evaluación de las muestras de semen

Las muestras de semen se recogieron por masturbación en un frasco estéril, con un intervalo máximo de abstinencia sexual entre 2 y 7 días antes de la recogida de la muestra, ya que abstinencias mayores afectan a la motilidad espermática y abstinencias menores al número de espermatozoides recuperados, con lo que se realizaría un mal diagnóstico. Todas las muestras de sémenes diagnósticos incluidas en este estudio presentaron una concentración en fresco superior a 10 millones/ml, lo que permitió la evaluación de la morfología espermática con el sistema CASA.

Una vez obtenidas las muestras se registraron y etiquetaron inequívocamente tanto con el nombre y apellidos del paciente como con el número de laboratorio único para cada muestra. A continuación fueron entregadas al laboratorio de Andrología para poder realizar el diagnóstico en fresco antes de que transcurra 1 hora del momento de la recogida, ya que a partir de este tiempo la motilidad comienza a disminuir. La muestra debe permanecer a temperatura corporal (37°C) hasta el momento del análisis.

3.2.1. Análisis de la muestra de semen

El análisis rutinario de las muestras de semen incluye dos tipos de examen, el macroscópico y el microscópico según la OMS de 1999 y 2010:

- **Análisis macroscópico:** incluye aquellas variables que se pueden valorar a simple vista. No debe realizarse más de una hora después de la eyaculación para evitar la deshidratación y/o cambios en la temperatura que alteren la calidad del semen.

Volumen

El volumen del eyaculado se mide por aspiración completa de la muestra empleando una pipeta graduada de 10 ml. Según los valores de referencia de la OMS de 1999, se considera una muestra normal a aquella que tiene un volumen igual o superior a 2 ml. Un volumen inferior puede ser indicativo de obstrucción de las vías seminales o ausencia de conductos deferentes, pérdida de alguna fracción de la muestra en el momento de la recogida o eyaculación retrógrada. Un volumen elevado puede deberse a un aumento del volumen de secreción de algunas glándulas, como ocurre en caso de inflamación o en periodos largos de abstinencia.

Viscosidad

La viscosidad o consistencia de la muestra licuada se estima aspirando la muestra con una pipeta y observando la libre caída de las gotas para ver la longitud del filamento formado. En una muestra normal se observan gotas pequeñas y bien definidas, mientras que en las muestras de viscosidad anómala se observa la formación de un filamento. Según el grado de viscosidad las muestras se clasifican según aparece en la tabla 2:

Tabla 2. Clasificación de la viscosidad y símbolo asociado

Simbología	Significado
+	la muestra es demasiado viscosa y no entra en la pipeta
++	forma un hilo al caer
+++	el eyaculado cae gota a gota

Una viscosidad elevada, resultado de una inflamación crónica de próstata, alto contenido de moco o presencia de anticuerpos antiespermatozoides entre otras causas, interfiere con todas las determinaciones posteriores, como motilidad o concentración.

Licuefacción

La licuefacción es el paso del estado de gel del eyaculado, en el cual los espermatozoides se encuentran atrapados entre las fibras del coágulo mucoso y en letargo, a un medio líquido por la acción de los activadores del plasminógeno. La licuefacción se analiza mediante una simple observación visual. Ocurre normalmente en los primeros 15 minutos tras recoger la muestra, a temperatura ambiente, y se considera anormal cuando no tiene lugar pasados 60 minutos de la recogida. Cuando la licuefacción no es completa debe anotarse en el informe del seminograma.

pH

El pH refleja el balance entre las diferentes secreciones, ya que el pH de la próstata es ácido y el de las vesículas seminales es alcalino. Se mide con tiras de papel con un intervalo de 6,5 a 10. Para medirlo se coloca una gota de semen sobre la tira y a los 30-60 segundos la zona impregnada, que debe ser uniforme, se compara con la cartilla de calibración para determinar el pH de la muestra, que debe ser igual o superior a 7,2. El pH del semen se alcaliniza, por lo que es conveniente medirlo después de la licuefacción. Un pH inferior a 6,5 o 7 puede ser indicativo de una obstrucción de las vías eyaculatorias, ausencia bilateral congénita de los vasos deferentes o anomalía funcional de las vesículas seminales.

- **Examen microscópico:** para su realización es imprescindible la utilización de un microscopio de contraste de fases.

Concentración o recuento de espermatozoides

Para determinar la concentración espermática se emplea la cámara Makler (Sefi Meical Instruments, Haifa, Israel), que está compuesta de dos piezas de cristal ópticamente planas. La parte superior, que sirve de cubreobjetos, está subdividida en 100 microcuadrados de 0,1 x 0,1 mm de lado. La profundidad de la cámara es de 10 micras (Figura 3). En primer lugar se calienta la cámara a 37°C para evitar el shock térmico, y a continuación se coloca una gota de 5 a 10 μl de semen y se observa al microscopio a un aumento de 200x. De esta manera, el número de espermatozoides contenidos en cualquier línea de 10 microcuadrados indicará la concentración en millones/ml, ya que la cámara permite que los espermatozoides sean distribuidos de manera uniforme.

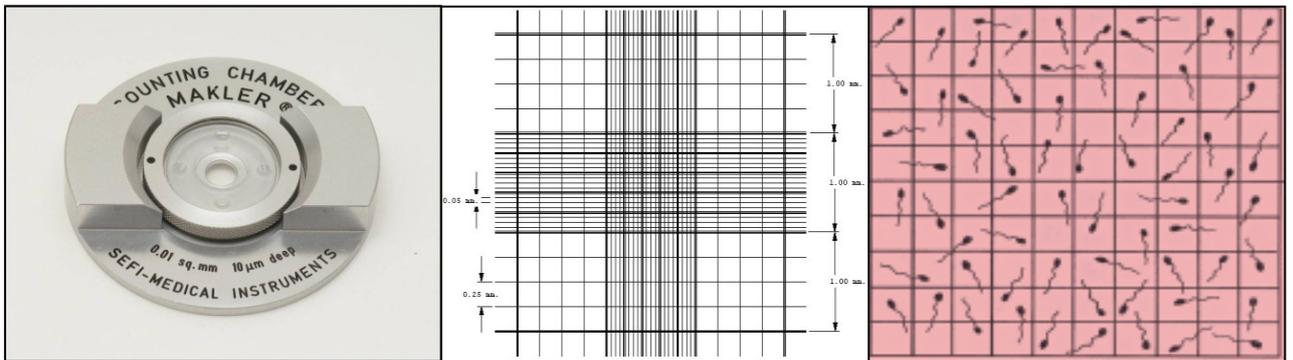


Figura 3. Imagen real de una cámara Makler y dibujo esquematizado de las medidas de la cuadrícula y su visualización a 200 aumentos.

Motilidad

La motilidad espermática se valora también empleando la misma cámara Makler. La OMS categoriza la motilidad en cuatro grupos (Figura 4). Los espermatozoides con motilidad rápida progresiva son aquellos que avanzan de forma rectilínea con una velocidad superior a 25 $\mu\text{m/s}$. Por debajo de éstos se encuentran los que presentan un movimiento progresivo lento, en la que los espermatozoides se desplazan pero sin experimentar un avance efectivo, es decir, formando elipses. Y por último se encuentran los que presentan una motilidad no progresiva, y sólo mueven la cabeza y/o cola sin desplazarse, y los inmóviles.

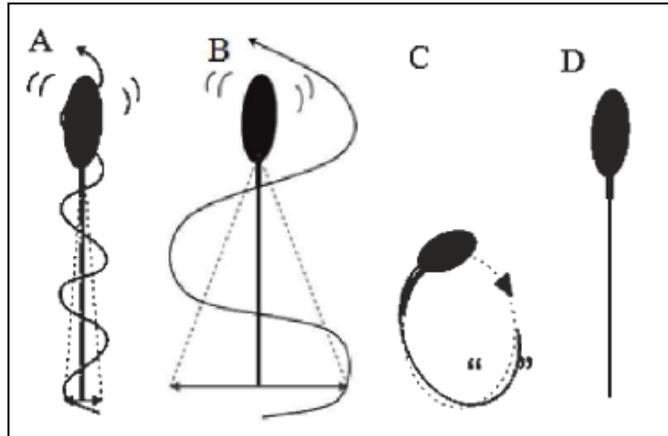


Figura 4. Tipos de movilidad de los espermatozoides. A. Progresivo rápido. B. Progresivo lento. C. No progresiva. D. Inmóvil.

Cada una de estas categorías recibe una nomenclatura distinta, como se aprecia en la tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de la motilidad espermática según la OMS 2010

Categoría OMS	Denominación	Velocidad
Rápida progresiva	a / +++	$\geq 25 \mu\text{m/s}$
Progresiva lenta	b / ++	5-24 $\mu\text{m/s}$
No progresiva	c / +	$< 5 \mu\text{m/s}$
Inmóviles	d / 0	-

La motilidad se valora observando 100 espermatozoides y estimando el porcentaje de ellos que presenta cada una de las categorías. Para ello es aconsejable valorar grupos de 10 espermatozoides y después obtener un valor promedio.

Aglutinación

Las aglutinaciones se producen cuando los espermatozoides se adhieren entre sí a través de la cabeza, la pieza intermedia o la cola. La presencia de aglutinaciones es indicativo de que puede existir una esterilidad de causa inmunológica. En ocasiones puede aparecer una pseudoaglutinación, que es la adhesión de los espermatozoides con filamentos de moco, con otros tipos

celulares que no son espermatozoides o con detritos, que no se considera aglutinación. Para la valoración se emplea la siguiente simbología (Tabla 4):

Tabla 4. Clasificación de la aglutinación en distintos grados y símbolo de cada uno.

Símbolo	Significado
+	Pequeñas aglutinaciones que implican a menos del 20% de los espermatozoides
++	La aglutinación implica a un 20 - 60 % de los espermatozoides
+++	Más del 60% de los espermatozoides están aglutinados

Morfología espermática

La morfología se analiza con el objetivo de 100 aumentos bajo aceite de inmersión. La clasificación morfológica seguida es la de la OMS de 1992 y la descrita por Kruger, Acosta y colaboradores, incluidas en las recomendaciones de la OMS de 1999. Las categorías en las que se clasifican son las siguientes, atendiendo a la morfología de la cabeza, cuello y pieza intermedia, cola y gota citoplasmática:

- Espermatozoide normal: La OMS considera espermatozoides morfológicamente normales a aquellos integrantes de una subpoblación de espermatozoides potencialmente fertilizadores seleccionados naturalmente en el moco cervical. Se caracterizan por poseer una cabeza ovalada y aplanada anteriormente, de 3,7 a 4,7 μm de longitud y 2,5 a 3,2 μm de anchura. El acrosoma debe ser aproximadamente de un tamaño de entre el 40 al 70% de la cabeza. La pieza intermedia debe ser menor a 1 μm de anchura y la longitud aproximadamente la mitad de la longitud de la cabeza. La cola o flagelo debe ser uniforme y ligeramente más delgada que la pieza intermedia, desenrollada (recta o sin presentar angulaciones bruscas que sugieran rotura) y de una longitud de 45 μm . La gota citoplasmática debe ser inferior a la tercera parte de la cabeza. Las bolsas citoplasmáticas a la altura de la pieza intermedia no deben ser mayores que la mitad del espermatozoide. La ausencia o presencia de una pequeña

vacuola en la cabeza se considera normal, pero si aparecen muchas o son excesivamente grandes puede significar que el ADN está dañado.

- Espermatozoide casi normal: Poseen una anchura de 2 a 3,5 μm , pueden presentar anomalías ligeras en la forma de la cabeza, pero el acrosoma debe ser normal, y no tener defecto en el cuello, pieza intermedia o cola.
- Espermatozoides anormales: Son aquellos que presentan defectos tanto en la cabeza, cuello, pieza intermedia y cola.

Defectos en la cabeza: presentan cabezas grandes, de más de 6 μm de longitud y/o más de 3,5 μm de anchura, formas redondas, alargadas, pequeñas, con forma de pera, irregulares, con ausencia de acrosoma, con acrosoma inferior al 30% del tamaño de la cabeza o superior al 70% o con vacuolas de más del 20% del área de la cabeza.

Defectos del cuello y cola: presentan colas o piezas intermedias quebradas, es decir, formando un ángulo de 90° o más con el eje longitudinal de la cabeza, colas cortas o ausencia de cola.

Defectos en la pieza intermedia: pieza intermedia anormalmente estrecha, con forma irregular, o con bolsas citoplasmáticas de un tamaño superior a la tercera parte del área de la cabeza.

Formas dobles: presentan cabeza y/o colas dobles.

Colas enrolladas, cortas, dobladas, irregulares o múltiples.

En las figuras 5 y 6 se observan los tipos de anomalías morfológicas más comunes que suelen aparecer en los espermatozoides.

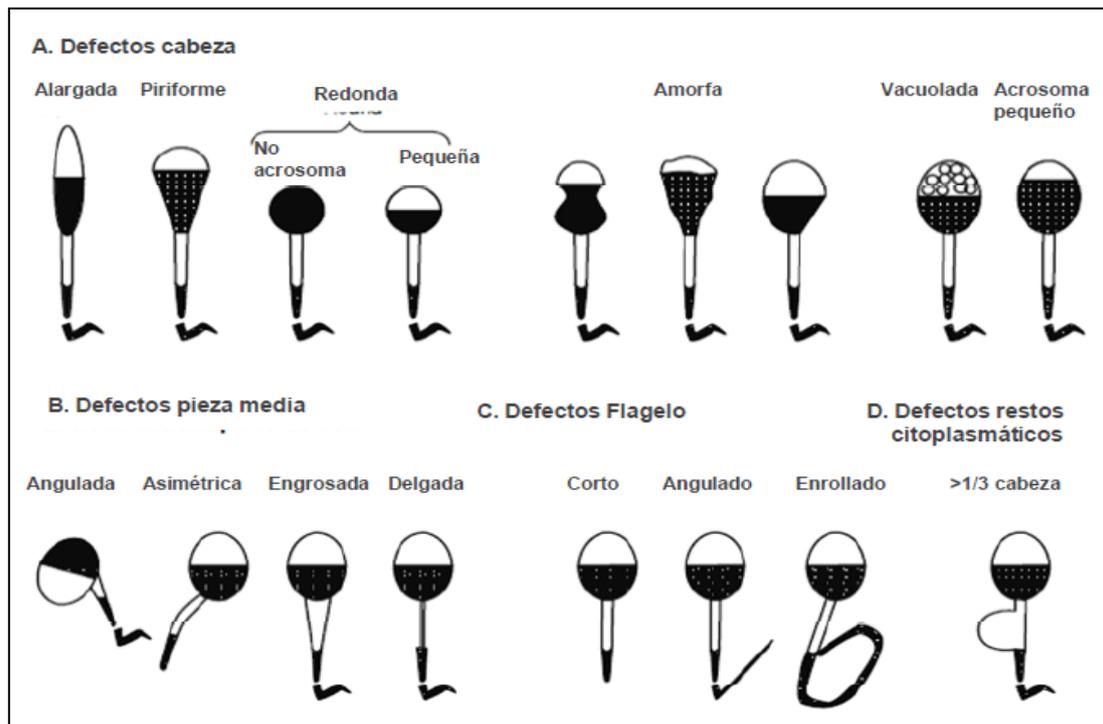


Figura 5. Clasificación de los defectos morfológicos de los espermatozoides. Adaptación del criterio estricto de Kruger. Manual OMS 2010.

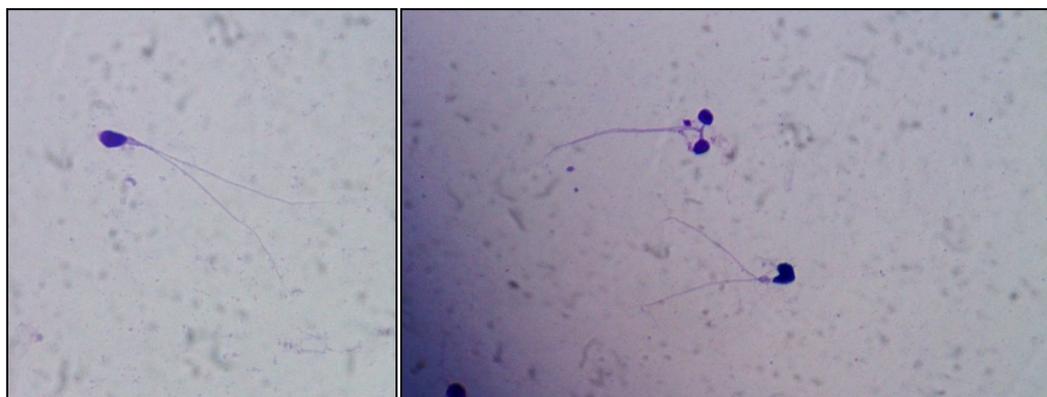


Figura 6. Espermatozoides morfológicamente anormales con colas dobles y cabezas dobles.

La OMS de 1992 considera los espermatozoides casi normales como normales, y define como eyaculados de buen pronóstico aquellos que presentan un porcentaje superior al 30% de formas normales. Sin embargo, la OMS de 1999 establece tres categorías de fertilidad aplicando los criterios estrictos de Kruger, que son varón fértil cuando tiene un porcentaje de espermatozoides normales superior al 14%, varón de buen pronóstico a aquel que presenta entre un 4 y un 14 % de formas normales, y varón de mal pronóstico al que tiene menos de un 4% de espermatozoides normales.

Por último, el quinto manual de la OMS establece un valor para el límite inferior de referencia para la morfología espermática del 4%.

Tomando como referencia los valores de la OMS de 2010, las muestras se clasifican en función del recuento, motilidad y morfología en las siguientes categorías:

Normozoospermica: eyaculado normal, con ≥ 15 millones de espermatozoides/ml, una motilidad $\geq 32\%$ (tipo a+b) y con una morfología $\geq 4\%$ de formas normales.

Oligozoospermica: presenta una baja concentración espermática, inferior a 15 millones espermatozoides/ml.

Astenozoospermica: presentan una motilidad baja, inferior a un 32% de tipo a+b.

Teratozoospermica: presenta una morfología anormal, $< 4\%$ de formas normales.

Oligoastenozoospermica: tanto la concentración como la motilidad son bajas, y se distinguen dos tipos:

- Moderada (OAM): concentración entre 10 y 15 millones de espermatozoides/ml y motilidad entre 20 y 32% de tipo a+b.
- Severa (OAS): concentración inferior a 10 millones/ml, y motilidad por debajo de 20% de a+b.

Oligoastenoteratozoospermica: todas las variables están alteradas.

Azoospermica: no presenta espermatozoides en el eyaculado.

Aspermia: ausencia de eyaculado.

Los valores de referencia según la OMS de 2010 para las variables seminales se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Valores de referencia de cada una de las distintas variables seminales según la OMS del 2010

Variable seminal	Valor de referencia
Volumen	1,5 (1,4 - 1,7)
pH	$\geq 7,2$
Concentración de espermatozoides (10^6 por eyaculado)	15 (12-16)
Número total de espermatozoides (10^6 por eyaculado)	39 (33-46)
Motilidad (tipo a + b)	32 (31-34)
Morfología espermática	≥ 4

3.3. Tinción de la muestra de semen (método Diff-Quik)

La determinación de la morfología espermática consta de varios pasos. En primer lugar se realiza una extensión de una gota de semen de 10 a 15 μl en un portaobjetos. Para ello se coloca otro porta formando un ángulo de 45° , tal y como se muestra en la figura 7, y tocando la gota se arrastra y se deja secar al aire.

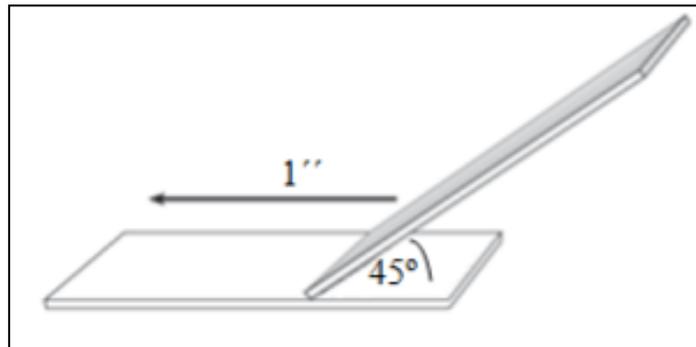


Figura 7. Técnica para la realización de la extensión de la muestra de semen.

Una vez seca, se procede a la fijación con etanol absoluto (99,8%), y posteriormente a la tinción de la muestra mediante el método Diff-Quik. Este es un método de tinción rápido y fácil de usar, que consta de dos pasos. Primero se introduce el porta en la solución de tinción 1 (PANREAC: eosina amarillenta para tinción rápida, nº Cat. 253999), durante 30 segundos, y después otros 30 segundos en la solución de tinción 2, que es el colorante Giemsa (MERK: azul-eosina azul de metileno, en metanol, nº Cat. 1092040500). Luego se lava con agua destilada para eliminar los restos del colorante y se deja secar al aire. Después se coloca un cubreobjetos sobre el porta aplicando, mediante una pipeta Pasteur, unas gotas de pegamento Eukitt (Eukitt® lot. Nº G47 500 ml) para que las muestras puedan ser almacenadas durante largos períodos de tiempo sin sufrir ningún tipo de daño.

3.4. Análisis de la morfología espermática (CASA)

Para analizar la morfología espermática se examina al microscopio óptico cada uno de los portaobjetos preparados a 100 aumentos bajo aceite mineral de inmersión (MERK nº Car. 4699). El microscopio está conectado a un ordenador con un sistema integrado de análisis de semen humano. El análisis de los espermatozoides se realizó utilizando el software del sistema Integrated Semen Analysis System (ISAS v.1.2 Serial Number: 0030149D), que es un sistema informatizado de análisis espermático basado en el análisis de una imagen. Permite analizar la morfología de muestras teñidas y analizarlas individualmente, ya que presenta un módulo de morfología que incorpora las variables morfológicas de la cabeza, acrosoma y pieza intermedia del espermatozoide en cuanto a tamaño (área, perímetro, longitud y anchura) y forma (elipticidad, elongación, regularidad y rugosidad), de acuerdo a los criterios estrictos de Kruger y de la OMS de 1999 y 2010.

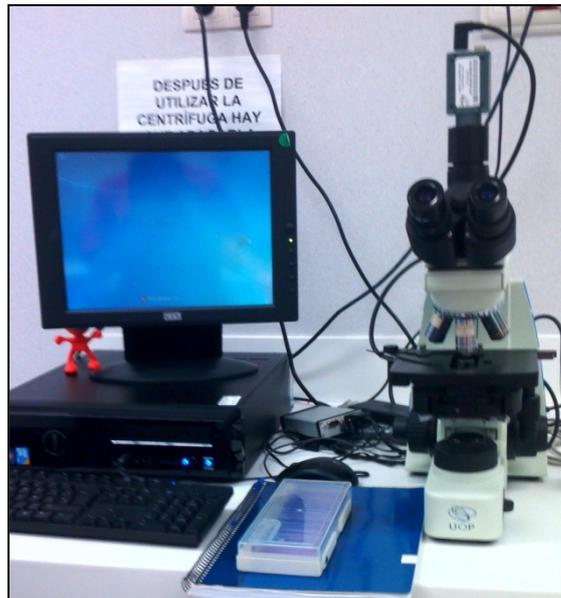


Figura 8. Sistema CASA para el análisis espermático, compuesto por un microscopio óptico conectado a una platina atemperada, a la cámara de vídeo y al ISAS.

De cada una de las muestras se capturan al azar 100 espermatozoides por el procedimiento manual gracias a una cámara incorporada al microscopio, y recorriendo la superficie de izquierda a derecha y de arriba abajo para evitar obtener imágenes de campos ya recorridos. El software proporciona un cuadro de 100 x 100 megapíxeles en

el cual se encuadra la cabeza y la pieza intermedia del espermatozoide, y a continuación se captura (Figura 9), despreciando los espermatozoides con cabezas superpuestas, en contacto con otras partículas o dañados.



Figura 9. Procedimiento manual de captura de espermatozoides en el programa ISAS.

Una vez capturados 100 espermatozoides, el programa posee una función, denominada Factor de Análisis (FA), que permite obtener el nivel de análisis más adecuado para cada célula. Esta herramienta elabora una máscara que se ajusta a la imagen microscópica original de cada espermatozoide, diferenciando cabeza, pieza intermedia y acrosoma en distintos colores. El criterio seguido fue el de utilizar el FA 0 para los 100 espermatozoides. Pero uno de los principales inconvenientes de este software es que hay que revisar todas las imágenes y ajustar manualmente la máscara de aquellos espermatozoides que no estén bien superpuestas, utilizando para ello diferentes herramientas informáticas. Una vez ajustadas todas las máscaras se obtiene un informe con el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y anormales.

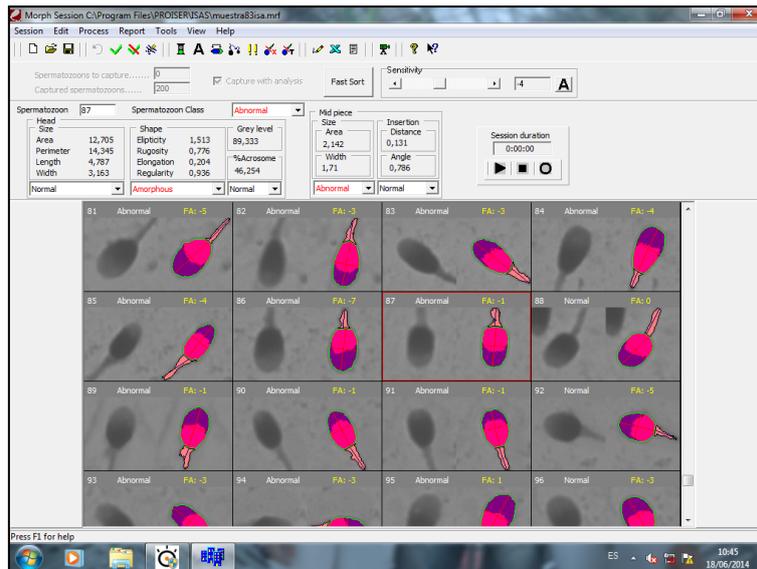


Figura 10. Análisis de la morfología espermática en el programa ISAS.

3.5. Variables asociadas al varón y a la muestra de semen

Las variables clínicas del varón y de la muestra de semen que se incluyeron en el estudio fueron las siguientes:

- La causa de esterilidad masculina, en la que se consideraron 2 niveles en función de la OMS 2010: varón normal (VN) y varón estéril (VE).
- Variables seminales macroscópicas de las muestras de sémenes diagnósticos: volumen, licuado, aglutinado y pH.
- Variables seminales microscópicas de las muestras diagnósticas: concentración (millones de espermatozoides/ml) y motilidad, tanto en fresco como en capacitado, y morfología espermática de las muestras en fresco.

3.6. Diseño experimental

En primer lugar, se analizaron las muestras de sémenes diagnósticos. Las variables examinadas en fresco fueron la concentración espermática, la motilidad, pH, aglutinación, licuado y volumen. En capacitado se analizó la concentración y motilidad espermática.

A continuación, se procedió a la fijación de las muestras en fresco para poder estudiar la morfología espermática.

Por último, se realizó el análisis estadístico para determinar las variables seminales que están relacionadas con la morfología espermática.

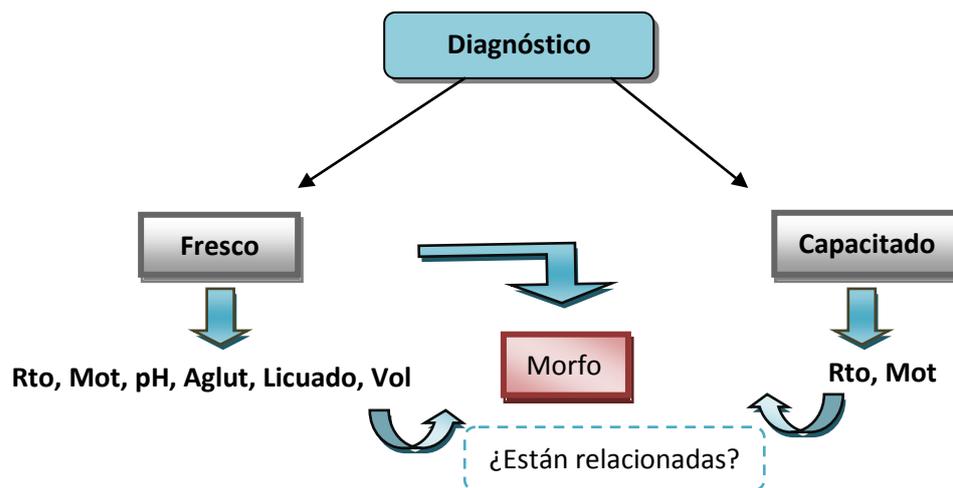


Figura 11. Diseño experimental en el que aparecen las variables a analizar. Rto: recuento; Mot: motilidad; Aglut: aglutinado; Vol: volumen; Morfo. morfología.

3.7. Análisis estadístico

Los datos fueron recogidos del programa informático PIERA (Esterilidad y Reproducción Asistida Programa Interactivo, Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia). El análisis estadístico se realizó con el programa Statgraphics Plus versión 5.1 (Manugistics, Inc., Rockville, MA, Estados Unidos).

En la evaluación de las muestras diagnóstico se realizó una prueba de comparación de medias (t-Student) de las variables macroscópicas y microscópicas en función de la esterilidad de causa masculina. Para analizar el efecto de la morfología espermática sobre el tipo de infertilidad del varón se utilizó la prueba de Chi-cuadrado.

Para estudiar la relación entre la morfología y el resto de variables seminales se utilizó un estudio de regresión logística binaria con el procedimiento "stepwise" de selección de las potenciales variables a incluir.

Las diferencias mínimas significativas se calcularon a un nivel de significación p-valor inferior a 0,05.

4. Resultados

4.1. Parámetros seminales básicos en función de la esterilidad de causa masculina.

Se estudiaron un total de 99 muestras de sémenes diagnósticos, realizadas en la URH desde Mayo hasta Junio de 2014.

Se evaluaron las variables macroscópicas (volumen y pH) y microscópicas (morfología, concentración y motilidad en fresco y en capacitado) y se compararon en función de la presencia o no de esterilidad de causa masculina según la OMS de 2010.

En la tabla 6 se comparan las variables macroscópicas y microscópicas en fresco y en capacitado entre muestras normozoospermicas y oligoastenozoospermicas.

Tabla 6. Media, error estándar y significación estadística (p-valor) de los parámetros seminales volumen, pH, morfología y concentración y motilidad en fresco y capacitado entre las muestras normozoospermicas y oligoastenozoospermicas.

	Normales	Oligoasteno	
	Media ± ES	Media ± ES	p-valor
Total	54	45	
Volumen (ml)	3,06 ± 0,2	3,09 ± 0,2	0,9400
pH (ui)	8,37 ± 0,00	8,44 ± 0,00	0,2233
Recuento Fresco (millones/ml)	72,85 ± 2,62	47,71 ± 3,07	0,0000
Motilidad Fresco (%)	40,28 ± 0,68	24,1 ± 0,8	0,0000
Morfología Fresco (%)	28 ± 0,5	20 ± 0,9	0,0048
Recuento Capacitado (millones/ml)	44,37 ± 3,66	28,73 ± 3,20	0,0128
Motilidad Capacitado (%)	86,30 ± 0,46	84,44 ± 0,58	0,0049

Las muestras normozoospermicas presentaron una concentración y motilidad, tanto en fresco como en capacitado, significativamente superior a las muestras oligoastenozoospermicas, lo que era de esperar. Además, se observa que la causa de esterilidad masculina se debió fundamentalmente a la motilidad de la muestras, ya que las muestras oligoastenozoospermicas presentan un porcentaje de motilidad lineal progresiva inferior al 32% (astenozoospermia). En cuanto a la morfología en fresco, se

observó un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides normales en las muestras normozoospermicas que en las oligoastenozoospermicas (28 vs 20; $p=0,0048$).

4.2. Parámetros seminales básicos en función de la morfología espermática

Se estudiaron un total de 99 muestras de sémenes diagnósticos, de los cuales el 7,07% se correspondieron con varones teratozoospermicos según la OMS de 2010 (< 4% de formas normales), el 23,23% con varones teratozoospermicos según la OMS de 1999 (<14% de formas normales) y el 69,70% según la OMS de 1992 (<30% de formas normales). Debido al bajo porcentaje de varones teratozoospermicos según la OMS del 2010 (7,07%), las muestras se clasificaron siguiendo la OMS 1999 en normozoospermicas ($\geq 14\%$ de formas normales) y teratozoospermicas (<14% de formas normales).

En la tabla 7 se comparan las variables microscópicas en fresco y en capacitado entre muestras normozoospermicas y teratozoospermicas.

Tabla 7. Media, error estándar y significación estadística (p-valor) de los parámetros seminales concentración y motilidad en fresco y en capacitado entre las muestras normozoospermicas y teratozoospermicas.

	Normales	Terato	
	Media \pm ES	Media \pm ES	p-valor
Total	76	23	
Recuento Fresco (millones/ml)	64,11 \pm 2,67	52,55 \pm 4,72	0,0376
Motilidad Fresco (%)	34,90 \pm 1,11	26,32 \pm 1,68	0,0001
Recuento Capacitado (millones/ml)	41,44 \pm 2,81	23,37 \pm 5,11	0,0026
Motilidad Capacitado (%)	86,04 \pm 0,41	83,70 \pm 0,74	0,0089

Las muestras normozoospermicas presentaron una concentración y motilidad tanto en fresco como en capacitado significativamente superior a las muestras teratozoospermicas. La mayor significación estadística se obtuvo para las variables motilidad en fresco y concentración y motilidad en capacitado.

4.3. Análisis de regresión logística para las variables seminales en función de la morfología espermática.

En la tabla 8 se presentan los resultados del análisis de regresión logística binaria "stepwise" para las variables de la muestra de semen en función de la morfología espermática.

Se incluyeron las variables macroscópicas volumen, licuado, pH y aglutinado y las variables microscópicas concentración y motilidad en fresco y en capacitado.

Tabla 8. Pruebas de razón de verosimilitud del análisis de regresión logística para las variables de la muestra de semen en función de la morfología espermática.

Factor	Chi-cuadrado	Df	p-valor
pH	10,6736	1	0,0011
Motilidad Fresco	135,026	1	0,000
Recuento Capacitado	6,25053	1	0,0123
Motilidad Capacitado	4,76363	1	0,0291
Licuado	7,05993	2	0,0293

Se observan coeficientes de correlación significativos y positivos para el pH, motilidad en fresco, recuento en capacitado, motilidad en capacitado y licuado. Estos coeficientes de regresión positivos indican un aumento en el porcentaje de espermatozoides normales conforme aumenta el pH, licuado (los espermatozoides anormales quedarían atrapados en el moco cervical), motilidad en fresco y recuento y motilidad en capacitado.

La bondad del ajuste presenta un p-valor de 1,5673E-12, indicando que esta bondad de ajuste es baja y que, por lo tanto, existen otras variables que afectarían al porcentaje de espermatozoides normales.

5. Discusión

Al comparar las muestras normozoospermicas con las oligoastenozoospermicas se ha observado que las primeras presentaron una concentración y motilidad, tanto en fresco como en capacitado, significativamente superiores. Además, la causa principal de esterilidad masculina fue debida a la motilidad lineal progresiva, ya que era inferior al 32%, es decir, eran muestras principalmente astenozoospermicas, mientras que la concentración en fresco, aunque era inferior a las muestras normozoospermicas, superaba el valor límite establecido por la OMS de 2010, que es de más de 15 millones de espermatozoides/ml.

Los resultados obtenidos a partir de la comparación de las muestras normales con las teratozoospermicas demostrarían que la morfología del espermatozoide no estaría relacionada con la concentración de la muestra en fresco. Sin embargo, la motilidad en fresco sí que se relacionaría con el porcentaje de formas normales, de tal forma que, conforme aumenta esta motilidad, se observa un aumento significativo del porcentaje de espermatozoides normales. Por lo tanto, esta motilidad en fresco superior en el caso de los varones normales sería la responsable de la obtención de un recuento y una motilidad en capacitado significativamente superiores.

Parinaud *et al.* (1996) obtuvieron resultados similares en un estudio, en el cual observaron una fuerte relación entre la motilidad y el porcentaje de formas normales. Además, al relacionar la morfología con la motilidad, observaron que, de entre las anomalías morfológicas estudiadas, el acrosoma es el que tiene una mayor influencia sobre la motilidad progresiva, mientras que las anomalías en la cola eran las que menor influencia tenían sobre la motilidad del espermatozoide. También obtuvieron una relación positiva entre el porcentaje de espermatozoides móviles y la viabilidad celular. Otro estudio realizado por Morales *et al.* (1988) también apoya los resultados obtenidos, ya que también encontraron que los espermatozoides morfológicamente anormales suelen ser inmóviles o presentar una motilidad muy baja, y que, por lo tanto, las células morfológicamente normales y anormales exhiben una motilidad diferente.

En el estudio de Karabulut and Tekin (2013) también se observó que los espermatozoides morfológicamente anormales tienen una motilidad inferior. También relacionaron estos parámetros con la concentración espermática, observándose que también existe una relación entre la concentración y la morfología. Los varones con recuentos inferiores a 5×10^6 espermatozoides/ml presentaron un porcentaje de espermatozoides normales inferior al 4%. Estos resultados indican que en los varones con concentración por debajo de 5×10^6 espermatozoides/ml deberían realizarse de rutina morfologías espermáticas para completar el diagnóstico de la esterilidad de causa masculina.

En cuanto a la morfología en fresco, se ha observado un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides normales en las muestras normozoospermicas que en las oligoastenozoospermicas (28 vs 20; $p=0,0048$). Diversos estudios (Rogers *et al.*, 1983; Nallella *et al.*, 2006) han demostrado que el análisis de la morfología puede ser utilizado para el diagnóstico y la predicción de la infertilidad masculina. De hecho, los resultados de dichos estudios indican que un único parámetro, como es la disminución del número de espermatozoides morfológicamente normales, está fuertemente asociado con la infertilidad. Por lo tanto, en el caso de esterilidad de causa masculina severa, la realización de una morfología espermática ayudaría a completar el seminograma diagnóstico y a conocer las causas de dicha esterilidad.

Generalmente, la presencia de formas anormales en el eyaculado suele ser indicativo de que existe un daño en la función gonadal, debido, entre otras causas, a la exposición a determinadas drogas o enfermedades o daños por condiciones de estrés o desórdenes andrológicos (Rogers *et al.*, 1983).

En relación con las variables seminales que influyen sobre la morfología espermática, se han obtenido coeficientes de regresión significativos y positivos para el pH, licuado, motilidad en fresco y concentración y motilidad en capacitado, indicando un aumento en el porcentaje de espermatozoides normales conforme aumenta el pH, licuado, motilidad en fresco y recuento y motilidad en capacitado.

En cuanto a la motilidad en fresco y la concentración y motilidad en capacitado, como ya se ha indicado anteriormente, la motilidad en fresco superior en el caso de los varones normales sería la responsable de la obtención de un recuento y una motilidad en capacitado significativamente superiores. Nallella *et al.* (2006) observaron que cuando un eyaculado presenta una motilidad normal, este parámetro, por sí solo, era indicativo de un desarrollo normal del axonema del espermatozoide durante la espermatogénesis en los testículos, un proceso de maduración normal en el epidídimo y de unos constituyentes del plasma seminal normales.

En relación con el licuado se observa un mayor porcentaje de formas normales en las muestras con licuefacción completa, lo que indicaría que la falta de licuado de las muestras determinaría una disminución significativa del porcentaje de espermatozoides normales. Tal vez, los espermatozoides normales quedarían atrapados en el coágulo formado por el líquido seminal. La licuefacción se consigue por la acción de una sustancia llamada fibrinolisisina, que es liberada por la próstata al eyaculado. Algunos estudios han determinado que una licuefacción incompleta del eyaculado produce un fluido vesicular seminal más viscoso, lo que supone una importante restricción del movimiento para los espermatozoides, es decir, se manifiesta como una astenozoospermia en el varón (Martínez-Heredia *et al.*, 2008). Siguiendo esta hipótesis, otros estudios han reportado que la frecuencia del golpe flagelar está inversamente relacionada con la viscosidad del medio. Moore *et al.* (1999) también observaron que una licuefacción incompleta del eyaculado puede producir agregados de espermatozoides, formando así grupos de espermatozoides en coágulos seminales microscópicos. Los espermatozoides también pueden agregarse por otros factores, como restos celulares, gotas prostáticas u otros materiales insolubles, pudiendo influir dichas agregaciones en la capacidad de fertilización del eyaculado. La licuefacción incompleta suele aparecer en varones con infecciones en la próstata o en varones con características espermáticas anormales (Comhaire *et al.*, 1999)

En relación con el pH, se observa un aumento del porcentaje de formas normales conforme aumentan los valores de pH (pH básicos). Estos resultados justificarían los cambios realizados por la OMS en los rangos de pH. La OMS de 1992 consideraba a las muestras seminales como normales cuando presentaban unos pH comprendidos entre 7,2 y 8. Sin embargo, a partir de 1999, la OMS consideró que no

existía un rango superior de pH y solo se consideraban patológicos los pH ácidos inferiores a 7, indicativo de disgenesia del conducto deferente, vesículas seminales o epidídimo cuando la muestra es azoospermica. De hecho, la OMS consideró que los pH básicos no influirían sobre las características de los espermatozoides. Diversos estudios han comprobado como la motilidad de los espermatozoides cesa cuando el pH es inferior a 6 o superior a 10 (Fox *et al.*, 1973), y que la disminución gradual del pH y de la osmolaridad también llevan a una disminución de la motilidad espermática (Makler *et al.*, 1981). Blackshaw and Emmens (1951) compararon la motilidad de los espermatozoides en diferentes rangos de pH, y observaron un máximo en la motilidad en torno a un pH de 8,5 y una fuerte caída en torno a 9,7.

Como se ha indicado anteriormente, el pH del semen sí que tendría influencia sobre la motilidad de los espermatozoides. En el presente trabajo observamos un aumento significativo del porcentaje de espermatozoides normales conforme aumenta el pH. Sin embargo, el efecto del pH sobre la motilidad sería el responsable de la relación existente entre la morfología y los rangos de pH.

No se han encontrado estudios que demuestren que el incremento del pH conlleve un aumento en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales. Además, existen múltiples opiniones acerca de la utilidad de la medida del pH, y de hecho, algunos autores, como Rune Eliasson, opinan que el pH del plasma seminal no proporciona ningún tipo de información de valor (Meacham, 2002) .

6. Conclusiones

Una vez analizados y expuestos los resultados de este estudio, las conclusiones que se pueden extraer son:

1. La morfología del espermatozoide no estaría relacionada con la concentración de la muestra en fresco. Sin embargo, la motilidad en fresco sí que estaría relacionada con el porcentaje de formas normales. Los espermatozoides morfológicamente anormales tienen una motilidad inferior.

2. La morfología del espermatozoide es significativamente mejor en las muestras normozoospermicas. La disminución del número de espermatozoides morfológicamente normales, está fuertemente asociado con la infertilidad.

3. Se observa un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides normales conforme aumenta el pH, licuado, motilidad en fresco y recuento y motilidad en capacitado.

4. La motilidad en fresco significativamente superior en el caso de los varones normales sería la responsable de la obtención de un recuento y una motilidad en capacitado significativamente superiores en el caso de los varones normales.

5. Se observa un mayor porcentaje de formas normales en las muestras con licuefacción completa. La falta de licuado de las muestras determinaría una disminución significativa del porcentaje de espermatozoides normales ya que quedarían atrapados en el coagulo formado por el líquido seminal.

6. El aumento del pH determina un incremento significativo de la morfología espermática. El efecto del pH sobre la motilidad espermática sería el responsable del efecto positivo del pH sobre la morfología espermática.

7. Referencias bibliográficas

ANAWALT, BRADLEY D.; MATSUMOTO, ALVIN M. AND SCHLEGEL, PETER, 2005. Infertility and Men. *The Endocrine Society*

BADAWY, AHMED; ELNASHAR, ABOUBAKR AND ELTOTONGY, MOHAMED, 2009. Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination. *Fertil Steril*, Vol. 91, No.3: 777-81

BIANCHI, P.G.; DE AGOSTINI, A.; FOURNIER, J.; GUIDETTI, C.; TAROZZI, N.; BIZZARO, D. AND MANICARDI, G.C., 2004. Human cervical mucus can act in vitro as a selective barrier against spermatozoa carrying fragmented DNA and chromatin structural abnormalities. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 21, No. 4: 97-102

BLACKSHAW, A.W. AND EMMENS, C.W., 1951. The interaction of pH, osmotic pressure and electrolyte concentration on the motility of ram, bull and human spermatozoa. *J. Physiol.*, Vol. 114: 16-26

BONDE, JENS PETER E.; ERNST, ERIK; KOLD JENSEN, TINA; HJOLLUND, NIELS HENRIK; KOLSTAD, HENRIK; BRINK HENRIKSEN, TINE; SCHEIKE, THOMAS; GIWERCMAN, ALEKSANDER; OLSEN, JORN AND SKAKKEBAEK, NIELS ERIK, 1998. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *The Lancet*, Vol. 352: 1172-1177

COMHAIRE, F.H.; MAHMOUD, A.M.A.; DEPUYDT, C.E.; ZALATA, A.A. AND CHRISTOPHE, A.B., 1999. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Human Reproduction*, Vol. 5, No.5: 393-398

DONNELLY, EILISH T.; LEWIS, SHEENA E. M.; MCNALLY, JAMES A. AND THOMPSON, WILLIAM, 1998. In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertility and Sterility*, Vol. 70, No. 2: 305-314

EGGERT-KRUSE, W.; REIMANN-ANDERSEN, J.; ROHR, G.; POHL, S.; TILGEN, W. AND RUNNEBAUM, B., 1996. Sperm morphology assessment using strict criteria and relationship with sperm-mucus interaction in vivo and in vitro. *Fertil Steril*, Vol. 63, No.3: 612-624

FOX, C.A.; MELDRUM, S.L. AND WATSON, B.W., 1973. Continuous measurement by radio-telemetry of vaginal pH during human coitus. *The Journal of the Society for Reproduction and Fertility*, Vol. 33: 69-75

KABLY-AMBE, ALBERTO; CAMPOS-CAÑAS, JORGE A; GONZÁLEZ, GUSTAVO E; CARBALLO, ESPERANZA AND ROQUE, ARMANDO, 2013. Influencia del estudio seminal en el éxito de la inseminación intrauterina y en las complicaciones perinatales. *Ginecol Obstet Mex*, Vol. 81, No. 7: 365-369.

KARABULUT, AYSUN AND TEKIN, ARZU, 2013. Alterations in the morphology and motility of spermatozoa: relation with total sperm count. *Pamukkale Tip Dergisi*, Vol. 6, No.1: 1-4

KATZ, DAVID F.; DIEL, LESLIE AND OVERSTREET, JAMES W., 1982. Differences in the movement and morphologically normal and abnormal human seminal spermatozoa. *Biology of Reproduction*, Vol. 26: 566-570

MAKLER, A.; DAVID, R., BLUMENFELD, Z. AND BETTER, OS., 1981. Factors affecting sperm motility. VII. Sperm viability as affected by change of pH and osmolarity of semen and urine specimens. *Fertil Steril*, Vol. 36, No. 4: 507-511

MARNET B., VIEITEZ G., MILHET P., RICHUILLEY G., LESOURD F. AND PARINAUD J. (2000). Computer-assisted assessment of sperm morphology: comparison with conventional techniques. *International Journal of Andrology*, 23: 22-28

MARTÍNEZ-HEREDIA, JUAN; MATEO, SARA; VIDAL-TABOADA, JOSÉ M., BALLESCÀ, JOSÉ LUIS AND OLIVA, RAFAEL, 2008. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Human Reproduction*, Vol. 23, No.4: 783-791

MEACHAM RANDALL, 2013. Perspectives and Editorials. *Journal of Andrology*, Vol. 23, No.3: 330-331

MOORE, H.D.M.; MARTIN, M. AND BIRKHEAD, T.R., 1999. No evidence for killer sperm or other selective interactions between human spermatozoa in ejaculates of different males in vitro. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 266: 2343-2350

MORALES P., KATZ D.F., OVERSTREET J.W., SAMUELS S.J., AND CHANG R.J, 1988. The relationship between the motility and morphology of spermatozoa in human semen. *Journal of Andrology*, Vol.9, No.4: 241-247

NALLELLA, KIRAN P.; SHARMA, RAKESH K.; AZIZ, NABIL AND AGARWAL, ASHOK, 2006. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertility and Sterility*, Vol. 85, No.3: 629-634

OLMEDO, DRES. BRUGO, S.; CALAMERA, J.C.; GONZÁLEZ, O.; DEPARCI, A.; VERDINELLI, J.; CASAL, J.M.; ALE, R.; URRUTIA, F.; GRIPPO, L.; LIC. NODAR, F., 1995. La morfología espermática y su importancia como diagnóstico de capacidad fertilizante. Desarrollo de un nuevo método de valoración por Video-Imágenes y su aplicación clínica. *Rev. Arg. de Urol.*, Vol. 60, No.1: 35-56.

OMBELET W., FOURIE FL, VANDEPUT H., BOSMANS E, COX A, JANSSEN M, KRUGER T.,1994. Teratozoospermia and in-vitro fertilization: a randomized prospective study. *Hum. Reprod.*, 9: 1479-1484

OVERSTREET JW; PRICE MJ; BLAZAK WF, LEWIS EL, KATZ DF, 1981. Simultaneous assessment of human sperm motility and morphology by videomicrography. *The Journal of Urology*, Vol. 126: 357-360

PARINAUD, JEAN; VIEITEZ, GERARD; MOUTAFFIAN, HÉLÈNE; RICHUILLEY, GÉRARD AND MILHET, PIERRETTE, 1996. Relationships between motility parameters, morphology and

acrosomal status of human spermatozoa. *Human Reproduction*, Vol. 11, No.6: 1240-1243

ROGERS, B. JANE; BENTWOOD, BARBARA J.; VAN CAMPEN, HANA; HELMBRECHT, GARY; SODERDAHL, DOUGLAS AND HALE, RALPH W., 1983. Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity. *American Society of Andrology*, Vol. 4: 119-125

RON-EL, R.; NACHUM, H.; HERMAN, H.; GOLAN, A.; CASPI, E. AND SOFFER, Y., 1991. Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality. *Fertility and Sterility*, Vol. 55: 338-344

TEPPA-GARRÁN, ALEJANDRO D. AND PALACIOS-TORRES, ANSELMO, 2004. Evaluación actual de la infertilidad masculina. *Investigación clínica*, Vol. 45, No.4: 355-370

VAN VOORHIS, BRADLEY J; BARNETT, MITCHELL; SPARKS, AMY E. T.; SYROP, CRAIG H.; ROSENTHAL, GARY AND DAWSON, JEFFREY, 2001. Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, Vol. 75, No. 4: 661-668

WAINER, ROBERT; ALBERT, MARTINE; DORION, AGNÈS; BAILLY, MARC, BERGÈRE, MARIANNE; LOMBROSO, RAOUL; GOMBAULT, MYRIAM AND SELVA, JACQUELINE, 2004. Influence of the number of motile spermatozoa inseminated and their morphology on the success of intrauterine insemination. *Human Reproduction*, Vol. 19, No.9: 2060-2065

World Health Organization: WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edition.

Bibliografía complementaria

BRAVO DELGADO, JUAN ANDRÉS, 2010. Estudio de la influencia de la estación sobre los parámetros seminales y morfométricos del espermatozoide de morueco de raza Ile de France.

DEVOTO C, ENZO; MADARIAGA A, MARCIA; LIOI C, XIMENA, 2000. Factores causales de infertilidad masculina. Contribución del factor endocrino. *Rev. méd. Chile.*, Vol.128, No.2: 184-192

GRAVES, JENNIFER E.; HIGDON, H. LEE; BOONE, WILLIAM R. AND BLACKHURST, DAWN W., 2005. Developing techniques for determining sperm morphology in today's andrology laboratory. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol.22, No. 5: 219-225

GUNALP, SERDAR; ONCULOGLU, CEM; GURGAN, TIMUR; KRUGER, THINUS F. AND LOMBARD, CARL J., 2001. A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds. *Human Reproduction*, Vol.16, No.1: 110-114

GUZICK, DAVID S.; OVERSTREET, JAMES W.; FACTOR-LITVAK, PAM; BRAZIL, CHARLENE K.; NAKAJIMA, STEVEN T.; COUTIFARIS, CHRISTOS; CARSON, SANDRA ANN; CISNEROS, PAULINE; STEINKAMPF, MICHAEL P.; HILL, JOSEPH A.; XU, DONG AND VOGEL, DONNA L., 2001. Sperm morphology, motility and concentration in fertile and infertile men. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 345, No.19: 1388-1393

JORGENSEN N.; AUGER J.; GIWERCMAN A.; IRVINE D.S.; JENSEN T.K.; JOUANNET P.; KEIDING N.; LE BON C.; MACDONALD E.; PEKURI A.M.; SCHEIKE T.; SIMONSEN M.; SUOMINEN J. AND SKAKKEBCEK N. E., 1997. Semen analysis performed by different laboratory teams: an intervariation study. *International Journal of andrology*, 20: 201-208

KATZ, DAVID F.; OVERSTREET, JAMES W.; SAMUELS, STEVEN J.; NISWANDER, PAUL W.; BLOOM, TODD D. AND LEWIS, ERNEST L., 1986. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *Journal of Andrology*, Vol. 7: 203-210

LARSEN, LENE; SCHEIKE, THOMAS, JENSEN, TINA KOLD; BONDE, JENS PETER, ERNST, ERIK; HJOLLUND, NIELS HENRIK, ZHOU, YUE; SKAKKEBEK, NIELS ERIK; GIWERCMAN, ALEKSANDER AND THE DANISH FIRST PREGNANCY PLANNER STUDY TEAM, 2000. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Human Reproduction*, Vol. 15, No. 7: 1562-1567

LÓPEZ GARCÍA, M^a JOSÉ; URBANO FELICES, AURORA AND CÁRDENAS POVEDANO, MARTA, 2012. Manual de laboratorio para el análisis del semen.

MORTIMER, SHARON T., 2000. CASA - Practical Aspects. *Journal of Andrology*. 515-524

