

CORRELACION ENTRE PARAMETROS CONVENCIONALES DEL ESPERMOGRAMA Y LA PRUEBA DE RESISTENCIA OSMOTICA EN PACIENTES INTEGRANTES DE PAREJAS FERTILES O INFERTILES *

Darío Bruera, Laura Vincenti, María E Santillán

Dirección: Marta Fiol de Cuneo, Rubén D Ruiz, Jorge L Lacuara

Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Santa Rosa 1085 (5000 - Córdoba). Departamento de Asistencia a la Reproducción (DAR). Instituto Modelo de Ginecología y Obstetricia (IMGO). Arturo M. Bas 57 (5000 - Córdoba).

RESUMEN

En la clínica andrológica, el espermograma es considerado como un indicador adecuado del potencial fertilizante del paciente. Una prueba de segunda generación recientemente incorporada a los recursos diagnósticos en esta área es la prueba de resistencia osmótica (PRO), a la que se considera como un detector precoz de fallas en la integridad funcional de la membrana del espermatozoide.

En el presente trabajo, investigamos la relación entre los parámetros convencionales del espermograma y la PRO. Se estudiaron pacientes divididos en 2 grupos: A) con fertilidad comprobada (23-32 años; n=11) y B) integrantes de pareja estéril (25-35 años; n=17). Se determinaron: concentración espermática, motilidad, velocidad de traslación, morfología y PRO (incubación del semen en solución hipoosmótica de citrato de sodio y fructosa, 150 mOsm/l, a 37°C durante 60 min). En condiciones normales, más del 60 % de los espermatozoides muestran cambios morfológicos por hiperhidratación.

Los resultados muestran que el grupo A supera significativamente el porcentaje de espermatozoides reactivos e íntegros con respecto al grupo B. Además

existe una correlación significativa entre PRO vs. motilidad y porcentaje de formas normales; no así entre PRO y concentración o volumen, hallazgos relevantes en cuanto al diagnóstico y posibilidad de aplicación de técnicas universalmente aceptadas de reproducción asistida.

Palabras clave: semen - prueba de resistencia osmótica - espermograma - morfología espermática - fertilidad conyugal - esterilidad conyugal.

INTRODUCCION

Los problemas psicológicos, sexuales y conyugales en las parejas estériles han sido extensamente estudiados^{1,7,16,19}.

Johnston y col.¹⁴ y Menning¹⁶ calificaron la esterilidad como la "principal crisis existencial" en las parejas, origen de trastornos emocionales en sus matrimonios y en sus relaciones sexuales. Freeman y col.² realizaron una investigación pretratamiento de 200 parejas y encontraron que el 49 % de las mujeres y el 15% de los hombres afirmaban que la infertilidad era la experiencia más traumática de sus vidas.

* El presente recibió el Premio al Mejor Trabajo del Area Clínica en el II Congreso Científico Argentino de Estudiantes de Medicina realizado en Córdoba en septiembre de 1991 y es publicado por disposición del Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Médicas (RHCD 1530/91).

El 40 % de los casos de esterilidad conyugal son atribuibles a factor masculino exclusivamente⁹. Es por ello que la andrología ha experimentado rápidos adelantos y cada vez se reconoce más la importancia de la evaluación objetiva de la calidad y características funcionales de los espermatozoides¹⁵. El espermograma convencional ha sido durante mucho tiempo la prueba de laboratorio rutinariamente empleada para el estudio de la esterilidad masculina. Si bien éste aporta datos referidos a concentración espermática, motilidad, morfología y otros parámetros físico-químicos, no puede realmente predecir la capacidad funcional de los espermatozoides para fertilizar "in vivo". En un intento de aproximarse a la evaluación más exacta de este parámetro, Yanagimachi y col.²¹ desarrollaron un test que estudia la capacidad de los espermatozoides humanos para penetrar ovocitos de hamster desnudos de zona pellúcida. Sin embargo, esta prueba es compleja, onerosa y los resultados obtenidos en diversos laboratorios son aún discutibles^{2,18}. Es evidente por lo tanto, la necesidad actual de desarrollar pruebas que, siendo accesibles y económicas, estén al alcance de la mayoría de los laboratorios y reflejan fielmente el potencial fertilizante masculino.

Recientemente Jeyendran y col.¹⁹, han propuesto el estudio de la resistencia osmótica de la membrana espermática como indicador de la integridad funcional de la membrana del gameto masculino. Siendo este estudio de escasa difusión en nuestro medio, nos propusimos en el presente trabajo investigar comparativamente los espermatozoides obtenidos de pacientes con fertilidad comprobada o integrantes de parejas estériles evaluando:

- los parámetros convencionales del espermograma y
- la resistencia osmótica de la membrana espermática

A su vez, intentamos determinar las posibles correlaciones existentes entre los hallazgos del estudio convencional del semen y la funcionalidad de la mem-

brana espermática, como se revela a través de su comportamiento en un medio hipotónico.

MATERIAL Y METODOS

En todos los casos el semen se obtuvo por masturbación, con un período de abstinencia sexual entre 48 y 72 hs. Las muestras se recogieron en recipientes estériles y fueron procesadas antes de la primera hora del eyaculado. Los 28 casos estudiados se dividieron en 2 grupos: A) compuesto por 11 hombres con fertilidad comprobada, es decir que engendraron hijos en los dos últimos años y no presentaron hasta la fecha problemas de esterilidad. B) formado por 17 hombres integrantes de parejas que consultaron por esterilidad.

Las edades oscilaron para el grupo A entre 22 y 32 años y para el grupo B entre 25 y 35 años.

En ambos grupos se evaluaron:

1. *Características físicas*: estas incluyeron, volumen total del eyaculado, color, viscosidad, turbidez, pH y aspecto del semen.

2. *Motilidad*: para lo cual se vertió una gota de semen que cayó de una aguja 21 G sobre un portaobjetos y se la cubrió con cubreobjeto de 20x20 mm. Fue observada al microscopio de contraste de fases (x 400) y los espermatozoides clasificados en móviles y quietos, y dentro de los primeros en progresivos rápidos, progresivos lentos y no progresivos u oscilatorios. Los resultados se expresaron en % de las respectivas formas.

3. *Vitalidad*: para evaluar el porcentaje de formas muertas, se utilizó la técnica de coloración supravital con eosina 5%⁶. En no menos de 200 células se cuantificaron las teñidas (muertas) y las no coloreadas (vivas)

4. *Concentración espermática*: fue determinada mediante el método del hemocitómetro, para lo cual se diluyó el semen con agua destilada en proporción variable de acuerdo a la con-

concentración espermática estimada en gota fresca. Se llenó la cámara de Neubauer mejorada (Neubauer improved chamber, 0,1 deep, 11400 sqmm, Bausch & Lomb) y fue leída al microscopio de contraste de fases (x 400), expresando los resultados en millones de espermatozoides/ml semen.

5. *Morfología espermática*: un extendido de semen fresco fue secado al aire y se lo fijó con una solución 1:1 de etanol 95% y éter. Cada preparado fue teñido con el método de Papanicolaou¹⁷ y observado al microscopio (x 1000) bajo inmersión en aceite de cedro. En cada caso se contaron por lo menos 200 espermatozoides y los resultados fueron expresados en % de las diferentes formas según la clasificación de MacLeod¹⁴ (Fig 1) y criterio estricto de Kruger¹⁸.

Todas las determinaciones previamente detalladas, fueron realizadas según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS)¹⁵.

6. *Prueba de resistencia osmótica (PRO)*: se preparó una solución de 150 mOsm/l compuesta por 7.35 g de citrato de sodio y 13.41 g de fructosa en 100 ml de agua bidestilada. La osmolaridad fue corroborada por determinación del descenso del punto crioscópico a través de un osmómetro digitalizado (Fiske osmometer, Fiske Associated Inc.). A 1 ml de esta solución se añadió 0.1 ml de semen. Se lo agitó suavemente con el vértex y fue incubado en estufa termostatazada a 37°C durante 60 min.

TABLA I: Características del semen en pacientes con fertilidad comprobada (grupo A) y pacientes integrantes de parejas estériles (grupo B).

PARAMETRO	GRUPO A (n=11)	GRUPO B (n=17)	SIGNIFICACION
VOLUMEN (ml)			
CONCENTRACION (x10 ⁶ /ml)	3.2 + 0.4	3.3 + 0.4	
MOVILES (%)	105.6 + 31.0	92.9 + 18.6	
RAPIDOS (%)	56.8 + 4.5	42.4 + 4.8	p < 0.05
NORMALES (%)	61.8 + 5.5	33.9 + 5.7	p < 0.005
	31.1 + 3.0	25.1 + 2.1	

Los valores extremos fueron: volumen (ml): 0.7 - 4.8 (grupo A) y 0.5 - 6.3 (grupo B); concentración (x10⁶/

Se colocó una gota de la mezcla entre porta y cubre y fue evaluada en el microscopio de contraste de fases (x 400), evaluándose no menos de 50 gametos en cada lectura. Los resultados fueron expresados en porcentaje de formas reactivas e íntegras, considerándose en esta categoría a los espermatozoides que por hiperhidratación presentaron deformidad (hinchamiento) de cabeza, pieza intermedia y/o cola¹⁰ (Fig 2).

Todas las determinaciones fueron realizadas por no menos de dos observadores experimentados y los resultados consignados representan el promedio obtenido a partir de las lecturas realizadas.

El procesamiento estadístico de los datos fue realizado empleando la prueba "t" de Student y el coeficiente de correlación de Pearson.

RESULTADOS

La Tabla I muestra los resultados obtenidos al evaluar los parámetros del espermograma convencional en los pacientes integrantes de los grupos en estudio. Como puede apreciarse, el grupo A muestra porcentajes significativamente mayores en lo que respecta a formas móviles y rápidas, mientras que en lo referido a volumen, concentración y morfología espermática, ambos grupos son semejantes.

ml): 32.2 - 380.5 (grupo A) y 2.8 - 236 (grupo B); móviles (%): 40 - 85 (grupo A) y 5 - 75 (grupo B); rápidos

(%): 15 - 80 (grupo A) y 0 - 75 (grupo B); espermatozoides morfológicamente normales (%): 17 - 54 (grupo A) y 10 - 37 (grupo B).

La Tabla II muestra los resultados obtenidos en la PRO. Como puede obser-

varse, el porcentaje de espermatozoides reactivos e íntegros de los pacientes con fertilidad comprobada (grupo A) fue significativamente mayor que en los integrantes de parejas estériles ($p < 0.001$).

TABLA II: Resultados obtenidos en la PRO en pacientes con fertilidad comprobada (grupo A) y pacientes integrantes de parejas estériles (grupo B).

PARAMETRO	GRUPO A (n=11)	GRUPO B (n=17)	SIGNIFICACION
PRO (%)	70.4 + 2.3	55.7 + 2.2	$p < 0.001$

Dado que el procesamiento estadístico mediante la prueba "t" de Student mostró que ambos grupos estudiados difieren significativamente tanto en algunos parámetros del espermograma convencional como en la prueba de resistencia osmótica, fue de interés investigar la existencia de correlación estadística entre esos datos.

En la Tabla III se consignan los resultados obtenidos al procesar nuestros

resultados según el coeficiente de correlación de Pearson. Como puede apreciarse, la PRO se correlaciona de manera significativa con el porcentaje de espermatozoides rápidos, móviles o normales. Además existe correlación significativa entre porcentaje de formas normales y porcentaje de espermatozoides rápidos.

TABLA III: Correlación existente entre los parámetros estudiados según coeficiente de correlación de Pearson.

PARAMETROS	r	p	n
PRO vs. RAPIDOS	0.51	< 0.005	28
PRO vs. NORMALES	0.41	< 0.05	28
PRO vs. MOVILES	0.43	< 0.05	28
NORM. vs. RAP.	0.51	< 0.005	28

DISCUSION

La integridad funcional de la membrana espermática no es sólo importante para el metabolismo de los gametos sino también es un determinante potencial de su capacidad fertilizante. Es bien sabido que la unión exitosa del espermatozoide y el ovocito depende de procesos previos tales como la capacitación espermática y la reacción acrosomal⁹, que involucran cambios en las propiedades de las biomembranas. Por lo tanto, la integridad morfológica y funcional de la membrana espermática es de importancia fundamental para el

proceso de fertilización y las pruebas de laboratorio que evalúen estos parámetros podrían ser de utilidad para pronosticar la capacidad fecundante del gameto masculino.

Los estudios histológicos solo detectarían alteraciones morfológicas relevantes; de manera semejante, la coloración con eosina evidencia disrupciones de membranas debidas a injuria o muerte celular. Por lo tanto, el desarrollo de técnicas de relativa sencillez y más sensibles que detecten alteraciones funcionales, aún previas a las morfológicas, es una necesidad dentro de los estudios andrológicos.

Una propiedad de la membrana celular es su capacidad de permeabilidad selectiva. Si se incubaba una célula en un medio hipotónico, el agua penetrará a la misma para alcanzar el equilibrio osmótico. Este influjo de agua incrementa el volumen celular resultando en una relación superficie: volumen mínima 10. La cola del espermatozoide parece ser particularmente susceptible a dichas condiciones hipoosmóticas. En 1966 Drevius y Erickson⁵ observaron que cuando espermatozoides bovinos son expuestos a soluciones hipotónicas (CINa 24 a 43 mM), las colas sufren hinchamiento por hiperhidratación. En 1984, Jeyendran y col.¹⁰, propusieron esta técnica para el estudio del semen humano en el diagnóstico de la infertilidad masculina. Puede asumirse que la capacidad del espermatozoide para deformarse por retención de agua en presencia de una solución hipoosmótica es signo de que el transporte de agua a través de la membrana ocurre normalmente, es decir, sugiere integridad morfológica y actividad funcional normal de la membrana espermática.

Además, en ese trabajo los autores son categóricos al afirmar haber encontrado una buena correlación entre PRO y el índice de penetración de ovocitos de hamster, proponiendo a la resistencia osmótica como un parámetro estrechamente relacionado con la capacidad fertilizante "in vitro".

Por el contrario, en trabajos posteriores de Chan y col.³, estudiando a un número considerablemente mayor de casos, califican a esta correlación como "insignificante" y como "débil" a la existente entre PRO y morfología ($r=0.32$) ó motilidad ($=0.22$).

Sin embargo, Van der Ven y col.²⁰ informan haber determinado una "fuerte" relación entre los resultados de la PRO y la fertilización de ovocitos humanos en un programa de fertilización in vitro (FIV).

Como surge claramente de estos antecedentes, no existe el presente una opinión universalmente aceptada en lo

que respecta al valor de la PRO como parámetro predictivo de la capacidad fertilizante del semen humano.

Con las limitaciones relativas al número de casos estudiados, podemos inferir de nuestros resultados que en el lote investigado, la PRO, el porcentaje de formas móviles y el porcentaje de espermatozoides rápidos, son parámetros que definen claramente 2 grupos distintos, es decir, el de sujetos con fertilidad comprobada y el de aquéllos que han consultado por esterilidad conyugal. Una característica generalmente bien aceptada como pronóstico para el éxito del proceso reproductivo es la referida a morfología¹³. En los grupos aquí estudiados, no detectamos diferencias estadísticamente significativas, debido probablemente, al reducido número de observaciones; sin embargo, el porcentaje de espermatozoides normales fue interior en el grupo B.

En cuanto al valor de la PRO como prueba de estudio del semen, concordamos en remarcar que refleja fundamentalmente la integridad funcional de la membrana. Es obvio que esta estructura celular tiene una participación relevante en la movilidad y velocidad de traslación espermática. La buena correlación detectada entre estos parámetros apoya esta aseveración.

Asimismo, el desplazamiento de las gametas masculinas, obedece a leyes hidrodinámicas que son respetadas por su morfología normal, la cual es conservada, entre otros factores por las biomembranas. Esto se ve reflejado en la correlación existente entre normales y rápidos, y entre PRO y normales.

Además de su función estructural, es sabido que la membrana espermática es asiento de complejas reacciones moleculares (activación enzimática, oxidación de grupos sulfhidrilos, etc.) estrechamente ligados tanto a la traslación como a los procesos de activación y reacción acrosomal^{4,12}. Puesto que en el presente trabajo no se investigó de manera directa la capacidad fertilizante

de los gametos, no podemos opinar categóricamente si la PRO tiene valor predictivo a este respecto.

Sin embargo, los antecedentes expuestos, permiten afirmar que esta prueba de relativa sencillez, constituye un elemento útil para contribuir a un estudio más completo del semen humano.

CONCLUSIONES

En las muestras estudiadas:

— El porcentaje de formas móviles, rápidas o reactivas e íntegras fue significativamente mayor en hombres fértiles que en los integrantes de pareja estéril.

— La PRO se correlaciona de manera estadísticamente significativa con el porcentaje de formas móviles, rápidos o de morfología normal.

— A su vez, existe buena correlación entre porcentaje de formas rápidas o de morfología normal.

— Postulamos que la PRO constituye un elemento diagnóstico accesible y relevante para el estudio del semen humano, en cuanto revela aspectos de la funcionalidad de la membrana espermática.

SUMMARY

It is well accepted that routine semen analysis is a useful tool for valuation of male potential fertility. In our environment, HOST has been recently applied as an additional approach which early detects structural and/or functional alterations of the sperm membranes.

We investigated the possible relationship between some semen parameters and HOST in males from A) fertile couples (23-32 years old; n=11) and B) sterile couples (25-35 years old; n=171). Sperm concentration, motility, morphology and HOST (semen incubation in hypoosmotic saline solution - sodium citrate and fructose, 150 mOsm/l, 37°C during 60 min) were evaluated. In HOST determinations, results higher than 60 % of swollen cells are considered within the normal range.

In our study, sperm from males of B group showed a significantly lower percentage of hyperhydrated cells than those from A group (55.7+2.2% and 70.4+2.3% respectively; $p < .001$). In addition, a significant statistical correlation between HOST vs motility or normal morphology was found. On the contrary, we detected no correlation between HOST vs sperm concentration or volume. We suggest that development and application of HOST as a routine, can play an important role in the evaluation and prognosis of an infertile couple.

Key words: hypoosmotic swelling test - semen analysis - sperm morphology - male sterility.

Agradecimiento

Nuestro reconocimiento al Sr. Jorge Bryan Lacuara por su colaboración en la confección computarizada del manuscrito y las figuras.

BIBLIOGRAFIA

1. Bell JS: Psychological problems among patients attending an infertility clinic. *J Psychosom Res.* 25: 1-5, 1981.
2. Bronson RA and Rogers BJ: Pitfalls of the zona-free hamster egg penetration test: protein source as a major variable. *Fertil Steril* 50: 851-856, 1988.
3. Chan SYW, Fox EJ, Chan MMC, Tsoi W, Wang Ch, et al.: The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routine semen analysis, and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay. *Fertil Steril* 44: 668-672, 1985.
4. Cornwall G, Vindivich D, Tillman S and Chang T: The effect of sulfhydryl oxidation on the morphology of immature hamster epididymal spermatozoa induced to acquire motility in vitro. *Biol Reprod* 39: 141-155, 1988.
5. Dreivius LO and Eriksson H: Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp Cell Res* 42: 136-156, 1966.
6. Eliasson R: Supravital staining of human spermatozoa. *Fertil Steril* 28: 1257-1260, 1977.

7. Elstein M: Effect of infertility on psychosexual function. *Br Med J* 5: 295-299, 1975.
8. Freeman E W, Boxer A S, Rickejs K, Tureck R and Mastroianni L: Psychological evaluation and support in a program of in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 43: 48-53, 1985.
9. Glass R H: Infertility. In: Yen S S C and Jaffe R B: *Reproductive endocrinology*. Edit. W B Saunders Co. Philadelphia, USA 2nd ed., 1986, Chapter 19, p 571.
10. Jeyendran R S, Van der H H, Perez-Peláez M, Crabo B C and Zaneveld J D: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fert* 70: 219-228, 1984.
11. Johnston W I H, Oke K, Speirs A, Clarke J A, Clarke J A, McBain J, et al.: Patient selection for in vitro fertilization: physical and psychological aspects. *Ann NY Acad Sci* 442: 490-497, 1985.
12. Joyce C, Nuzzo N, Wilson L and Zaneveld L J D: Evidence for a role of cyclooxygenase and prostaglandins in the sperm acrosome reaction and fertilization. *J Androl* 8: 74-82, 1987.
13. Kruger T F, Menkveld R, Stander F, Lombard C, Van der Merwe J, et al.: Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*: 46: 1118-1123, 1986.
14. MacLeod J: A possible factor in the etiology of human male infertility: preliminary report. *Fertil Steril* 13: 29-33, 1962.
15. *Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. (1989).
16. Menning B E: The emotional needs of infertile couples. *Fertil Steril* 34: 313-338, 1980.
17. Papanicolaou G N: A new procedure for staining of vaginal smears. *Science* 95: 438-440, 1942.
18. Paulsen C A: Another look at the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 40: 302-304, 1983.
19. Seibel M and Taymor M: Emotional aspects of infertility. *Fertil Steril* 37: 137-144, 1982.
20. Van der Ven H H, Jeyendran R S, Al-Hasani S, Perez-Peláez M, Diedrick K, et al.: Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilization. *J Androl* 7: 190-194, 1986.
21. Yanagimachi R: Zona-free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of Human spermatozoa. *Gamete Res* 10: 187-192, 1984.


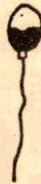







NORMALES	ANORMALES							
	CABEZA						PIEZA INTERMEDIA Y COLA	INMADUROS
								
	Pequeños	Megalo	Tapering	Amorfos	Bicéfalos	Piriformes		Espermátides

FIGURA 1: Representación esquemática de la clasificación morfológica de los espermatozoides humanos propuesta por MacLeod.

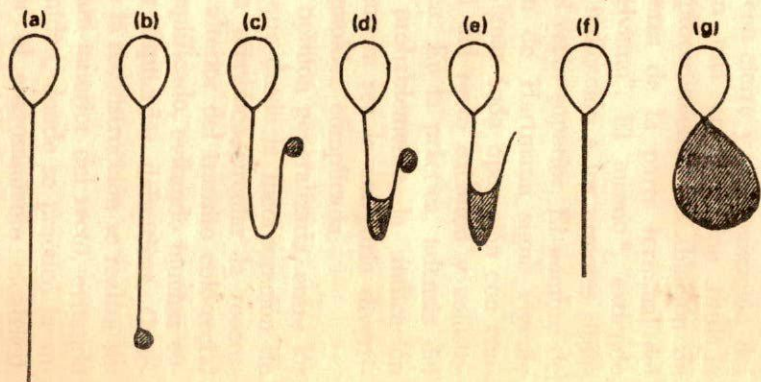


FIGURA 2: Representación esquemática de los cambios morfológicos típicos de los espermatozoides humanos sometidos a la prueba de resistencia osmótica. (a): sin cambios; (b)-(g): distintos tipos de cambios en la cola. Tomado de Jayendran y col.¹⁰