

PERFIL DE LA MORFOLOGIA ESPERMATICA EN PACIENTES
NORMOSPERMICOS Y DISPERMICOS

Mónica Medina Basso¹, Marta Fiol de Cuneo², Rubén D. Ruiz²,
Sofía P de Fabro¹, Jorge L Lacuara²

¹ Ila. Cátedra de Histología, Embriología y Genética. Instituto de Biología Celular.

² Cátedra de Fisiología Humana. Instituto de Fisiología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. - Córdoba - Argentina.

RESUMEN

La evaluación de la morfología espermática ha adquirido relevancia por su valor pronóstico de la potencial fertilidad masculina tanto en reproducción natural como asistida.

En el presente trabajo se determinó el perfil morfológico de muestras de semen de pacientes normospermicos y dispérmicos a fin de establecer una correlación estructura - función. Las muestras fueron obtenidas de pacientes que acudieron a consulta andrológica por ser integrantes de parejas infértiles. Los extendidos fueron teñidos según la técnica de Papanicolaou y para la evaluación de la morfología espermática se utilizaron los criterios de la OMS, teniendo en cuenta la actual modificación de Kruger. Del total de la población estudiada ($n = 46$), el 35 % correspondió a pacientes normospermicos (A), el 39 % a astenospermicos, el 7 % a oligospermicos, el 2 % a terastopérmicos y el 17 % presentó alteraciones combinadas. El porcentaje promedio de espermatozoides normales fue de $23,7 \pm 1,23$ en la población total. Cuando se compararon los pacientes del grupo A con los astenospermicos, se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de espermatozoides con anomalías en pieza intermedia y cola ($p < 0,02$). Asimismo cuando se analizaron las muestras según presentarán ninguna (A), una (B) ó 2

ó + alteraciones combinadas (C), se observó que el porcentaje de formas normales fue decreciendo en los grupos en ese orden (A ó B vs. C $p < 0,05$). El porcentaje de espermatozoides fusiformes (tapering) también fue significativamente superior en el grupo C ($p < 0,01$ vs. A ó B). Las anomalías de pieza intermedia y cola también fueron significativamente superiores en el grupo C. De los resultados expuestos, surge que 1) el mayor número de alteraciones funcionales, se correlaciona con un mayor porcentaje de anomalías estructurales y 2) en el grupo de astenospermicos, el déficit en la motilidad, se asocia con un mayor porcentaje de alteraciones en pieza intermedia y cola.

Palabras clave: espermatozoide - análisis semen - evaluación de morfología espermática - pacientes normospermicos, astenospermicos y dispérmicos.

INTRODUCCION

El valor predictivo de los distintos parámetros del espermograma convencional con respecto a la potencial capacidad fertilizante de las gametas masculinas, no está aún claramente establecido¹. Sin embargo se acepta que la concentración espermática, la motilidad y el porcentaje de formas normales poseen, desde el punto de vista clínico, un valor pronóstico considerable^{2,10}.

Se ha considerado la importancia de la morfología espermática en la predicción del éxito de técnicas de reproducción asistida, como la fecundación in vitro (FIV) ^{11, 13, 15}. Rogers y col ¹⁹ sostienen que el factor morfológico es el que mejor se correlaciona con la capacidad de penetración de ovocitos de hamster y otros autores han informado resultados similares con respecto al test de ensayo de hemizona ^{5,21}.

Los criterios para considerar a la gameta masculina normal o en los distintos tipos dismórficos han variado desde la clasificación inicial realizada por Mc.Leod en 1952 ¹⁴. En 1971 Eliasson ⁴ definió morfométricamente a los espermatozoides y recientemente Menkvel y col. ¹⁶ propusieron un criterio estricto de normalidad. Por otra parte, las técnicas de microscopía electrónica de transmisión y de barrido han aportado información adicional en esta área ^{17, 19, 22}.

Desde un punto de vista clínico, también se ha modificado el porcentaje mínimo de formas normales que debe considerarse límite para clasificar a un paciente como teratospérmico. La Organización Mundial de la Salud ¹⁸ indica un 20% mientras que Kruger y col. ¹¹ consideran un 14% como valor límite y un 5% como valor de mal pronóstico. Si bien estudios de semen humano con técnicas de coloración supravital han sugerido que los espermatozoides anormales exhiben un menor grado de viabilidad ⁶ y se mueven más lentamente, las posibles explicaciones que permiten correlacionar morfología con actividad funcional espermática aún no han sido totalmente aclaradas. Con el propósito de aportar datos que contribuyan a interpretar dicha relación, en el presente trabajo: Se determina el perfil morfológico en muestras de semen provenientes de pacientes normospérmicos y dispérmicos y se correlaciona los diferentes tipos morfológicos con alteraciones en la concentración y/o motilidad espermática.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 46 muestras de semen de pacientes provenientes de parejas

infértiles que consultaron en el Depto. de Asistencia a la Reproducción del Instituto Modelo de Ginecología y Obstetricia. El análisis del eyaculado se realizó de acuerdo a las recomendaciones de la OMS. Las muestras fueron obtenidas por masturbación luego de 48-72 hs de abstinencia. Inmediatamente después de la licuefacción se estimó motilidad en gota fresca (una gota con aguja 21 g. y cubreobjetos de 20x20 mm) observándose en microscopio de contraste de fases con una magnificación de 400 X. La concentración espermática fue determinada en cámara de Makler (Sefi Medical Instruments). La vitalidad (porcentaje de espermatozoides vivos) fue evaluada mediante coloración supravital con eosina. Para el estudio de la morfología espermática los extendidos fueron secados al aire, fijados en alcohol 95°/éter, 1:1 v/v y teñidos según el método de Papanicolaou descrito por la OMS ¹⁸.

Los espermatozoides se consideraron normales de acuerdo a los criterios de Menkvel y colaboradores ¹⁶. Los extendidos se observaron con microscopio de contraste de fases con una magnificación de 1000 X. Las evaluaciones se realizaron en 5 zonas diferentes del preparado, se eligieron campos donde hubiere entre 5 y 10 espermatozoides para una buena interpretación de la lectura ¹⁶ y se contaron en cada muestra no menos de 200 células. Para evitar errores subjetivos se realizó previamente un control en la evaluación de la morfología espermática según Vincenti y col ²⁰, no detectándose variaciones significativas.

Las muestras se separaron en grupos según provinieran de:

- 1) pacientes normospérmicos (semen con todos los parámetros dentro de los límites normales)
- 2) pacientes oligospérmicos (concentración < de 20 x 10/ml).
- 3) pacientes astenospérmicos (< 50 % con progresión anterógrada o < del 25 % con progresión lineal rápida).
- 4) pacientes teratospérmicos (< 14 % de formas normales).

Además se los separó según el número de alteraciones que presentarían las muestras de semen en:

A) pacientes normospermicos, los que no tenían alteraciones.

B) pacientes que presentan una sola alteración.

C) pacientes que presentan dos o más alteraciones.

Se utilizó este criterio teniendo en cuenta que en un eyaculado, todos los espermatozoides no son funcionalmente equivalentes. Para el análisis estadístico de los datos se empleó el test "t" de Student para muestras independientes, el análisis de varianza (ANOVA) y el test de Cochran. (Programa: Statistical Package for the Social Sciences). Los resultados se expresan como media \pm Error Standard (E.S.M.).

RESULTADOS

De las 46 muestras de semen incluídas en el presente estudio, 16 correspondieron a pacientes normospermicos (35%), 18 pacientes presentaron astenospermia (39%), 3 presentaron oligospermia (7%), 1 presentó teratospermia (2%) y 8 pacientes presentaron alteraciones combinadas (17%). (Tabla I).

Tabla I

Alteración de las variables espermáticas en la población (n = 46) *		
Diagnóstico	n	%
Normospermia	16	35
Astenospermia	18	39
Teratospermia	1	2
Oligospermia	3	7
Oligoteratospermia	2	4
Oligoastenospermia	2	4
Astenoteratospermia	1	2
Oligastenoteratospermia	3	7

* Según criterio descripto en Materiales y Métodos.

En la Figura 1 se ilustra la distribución de frecuencias de espermatozoides normales en la población general.

Cuando se comparó el porcentaje de espermatozoides normales en las muestras de normospermicos ($27,58 \pm 2,04$, $n=16$) versus el de astenospermicos ($24,67 \pm 5,9$, $n=18$), las diferencias no fueron significativas. En cambio estos grupos se diferenciaron en el porcentaje de espermatozoides con anomalías en pieza intermedia y cola (Fig. 2).

Cuando se analizaron las muestras según presentarían: A) ninguna, B) una o C) dos o más alteraciones combinadas, se observó que el porcentaje de formas normales fue decreciendo en los grupos en ese orden (Fig. 3).

En la Fig. 4 puede apreciarse que los espermatozoides fusiformes aumentaron significativamente en el grupo que mostraba dos o más alteraciones. Asimismo los espermatozoides con anomalías en pieza intermedia y cola se incrementaron significativamente en los grupos B) con una alteración y C) con dos o más alteraciones (Fig. 5).

DISCUSION

En el presente trabajo, el perfil de distribución de frecuencias de espermatozoides normales es comparable al informado por Menkveld y col.¹⁶, quienes obtuvieron un promedio de $16,7 \pm 7,2$ de células morfológicamente normales. Más aún, Freund⁷ encontró, a semejanza del presente estudio, que el mayor número de muestras se agrupan entre 15,5% y el 35% de formas normales.

Se ha demostrado que el semen humano, a diferencia del de otros mamíferos, se caracteriza por poseer una elevada proporción de gametas morfológicamente anómalas⁶. Nuestros resultados confirman la heterogeneidad de la población espermática, en cuanto a morfología. El aumento del porcentaje de espermatozoides con alteraciones en la pieza intermedia y cola encontrado en los pacientes astenospermicos (Fig. 2) y en aquellos que presentan una alteración (grupo B), o dos o más alteraciones (grupo C), (Fig. 5), es esperable, ya que la pieza intermedia,

donde se encuentran las mitocondrias que proveen ATP para la motilidad y la cola son estructuras para que el espermatozoide se desplace adecuadamente.

Para garantizar la integridad funcional de los espermatozoides se requiere entre otros factores la estructura normal de todos sus componentes, aunque ésto no se puede determinar solamente mediante la microscopía óptica. Hancock y col.⁸ empleando microscopía electrónica de transmisión, consignan alteraciones en las estructuras del axonema en pacientes astenospermicos.

Katz⁹ postula posibles explicaciones para las alteraciones de la motilidad en espermatozoides morfológicamente anormales: 1) alteraciones hidrodinámicas resultantes de cambios en la forma de la cabeza, 2) alteraciones concomitantes en el flagelo que afecten la motilidad, 3) anomalías no estructurales que impidan la propagación del latido flagelar y 4) anomalías de tipo metabólico que afecten la producción de energía y la transducción quimio-mecánica en la célula.

Nosotros detectamos que en los pacientes astenospermicos hay mayor número de espermatozoides con alteraciones en la pieza intermedia donde está la maquinaria metabólica y en la cola, estructura responsable del latido flagelar, lo que estaría de acuerdo con la hipótesis de Katz e indicaría que los factores hidrodinámicos serían menos relevantes.

Cuando se agruparon las muestras en las categorías A, B y C, se observó la disminución del porcentaje de formas normales en los grupos B y C con una o dos o más alteraciones, lo que indicaría una estrecha correlación entre estructura-función. En este contexto, los espermatozoides con anomalías en pieza intermedia y cola y los fusiformes serían las formas más involuacradas.

Teniendo en cuenta la importancia que ha adquirido la morfología espermática, entre los factores que condicionan la esterilidad masculina y su valoración en las técnicas de reproducción, el presente trabajo aporta datos que

contribuyen a interpretar los cambios de la morfología celular y su probable incidencia en el pronóstico clínico.

SUMMARY

The evaluation of spermatic morphology is of importance due to its prognostic value in potential male fertility, both in natural and in assisted reproduction.

In the present work, the morphologic profile of samples of semen from normal and dispermic patients was determined, in order to establish a correlation between structure and function. Samples were obtained from male partners of infertile couples who attended andrologic consultation. The smears were stained by the Papanicolaou technique, and the criteria of the OMS and the recent modification of Kruger were followed to evaluate spermatic morphology. Of all the patients studied ($n = 46$), 35 % were normospermics (A), 39 % asthenospermics, 7 % oligospermics, 2 % terastospermics and 17 % presented combined alterations. The average percentage of normal spermatozoa was of 23.7 ± 1.23 in the whole population. When group A patients were compared with asthenospermics, significant differences were found in the percentage of spermatozoa with middle piece and tail alterations, in the last group ($p < 0.02$). Similarly, when samples were analysed according to the presence of alterations: none (A), one (B) two or more (C), it was observed that the percentage of normal forms decreased in the groups in that order ($A < B < C$); (A or B vs C $p < 0.05$). The percentage of tapering spermatozoa was significantly higher in group C ($p < 0.01$ vs A or B).

From the above results, it appears that 1) the larger number of functional alterations is related to a higher percentage of structural anomalies, and 2) the deficient motility in the asthenospermic group, is associated to the middle piece and tail alterations.

Key words: spermatozoa - semen analysis - sperm morphology evaluation - normospermic - asthenospermic - dispermic patients.

AGRADECIMIENTOS:

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Médicas y al Instituto Modelo de Ginecología y Obstetricia (I.M.G.O.) quienes nos proporcionaron las muestras del semen analizado.

BIBLIOGRAFIA

1. Amann R P: Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Androl* 10: 89-98, 1989.
2. Blasco L: Clinical tests of sperm fertilizing ability. *Fertil Steril* 41: 177-192, 1984.
3. Calamera J C, Quiros M C, Brugo S, Nicholson R F, Vilar O: Adenosine 5' - Triphosphate (ATP) activity in normal and pathological human semen. Relationship with round cells of the ejaculate. *Andrologia* 18: 214-219, 1986.
4. Eliasson R: Standards for investigation of human semen. *Andrología* 3: 49-51, 1971.
5. Franken D R, Kruger T F, Menkveld R, Oehninger S, Coddington C C, Hodgen C D: Hemizona assay and teratozoospermia: increasing sperm insemination concentration to enhance zona pellucida binding. *Fertil Steril* 54: 497-503, 1990.
6. Fredricsson B, Jork G: Morphology of postcoital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance. *Fertil Steril* 28: 841-845, 1977.
7. Freund M: Standards for the rating of human sperm morphology. A cooperative study. *Int J Fertil* 11: 97-118, 1966.
8. Hancock A D, Kretser D M: The axonal ultrastructure of spermatozoa from men with asthenospermia. *Fertil. Steril* 57: 661-664, 1992.
9. Katz D F, Diel L, Overstreet W: Differences in the movement of morphologically normal and abnormal human seminal spermatozoa. *Biol Reprod* 26: 566-570, 1982.
10. Kruger T F, Acosta A A, Simmons K F, Swanson R J, Matta J F et al: New method of evaluating sperm morphology with predictive value for in vitro fertilization. *Urology* 30: 248-251, 1987.
11. Kruger T F, Acosta A A, Simmons K F, Swanson R J, Matta J F et al: Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 49: 112-117, 1988.
12. Kruger T F, Menkveld R M, Stander F S H, Lombard C J, Van der Merwe J P et al: Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 46: 1118-1123, 1986.
13. Liu D Y, Du Plessis Y P, Nayudu P L, Johnston W I H, Baker H W G: The use of in vitro fertilization to evaluate putative tests of human sperm function. *Fertil Steril* 49: 272-277, 1988.
14. MacLeod J: A possible factor in the etiology of human males infertility: Preliminary report. *Fertil Steril* 13: 29-33, 1962.
15. Mashlach R, Fisch B, Eltes F, Todir Y, Ovadia J, Barton B: The relationship between sperm ultrastructural features and fertilizing capacity in vitro. *Fertil Steril* 57: 1052-1057, 1992.
16. Menkveld R, Stander T J, Kotze V W, Kruger T F, Vanzil J A: The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human Reproduction* 5: 586-592, 1990.
17. Oettlé E E, Menkveld R, Swanson R J, Oehninger S, Kruger T F et al: Photomicrographs whit interpretations. En: Menkveld R, Oettlé E E, Kruger T F, Swanson R J, Acosta A et al: Atlas of human sperm morphology, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, 1990, p 15-90, 1ª ed.
18. Organización Mundial de la Salud: Manual de laboratorio para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Cambridge University Press, 1987, 1ª ed.
19. Rogers B J, Bentwood B J, Van Campen H, Helmbrecht G, Soderdahl D et al: Sperm morphology assessment as indicator of human fertilizing capacity. *J Androl* 4: 119-125, 1983.
20. Vincenti L, Stutz G, Santillan M E, Ruiz R D, Fiol de Cuneo M, Lacuara J L: Control de calidad en el programa de investigación en espermatozoides de mamíferos, presentado en el encuentro interdisciplinario de investigación básica y aplicada en gametas. Sociedad Argentina de Biología, 1991.
21. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers B J: The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction* 15: 471-476, 1976.
22. Zamboni L: The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertil Steril* 48: 711-734, 1987.

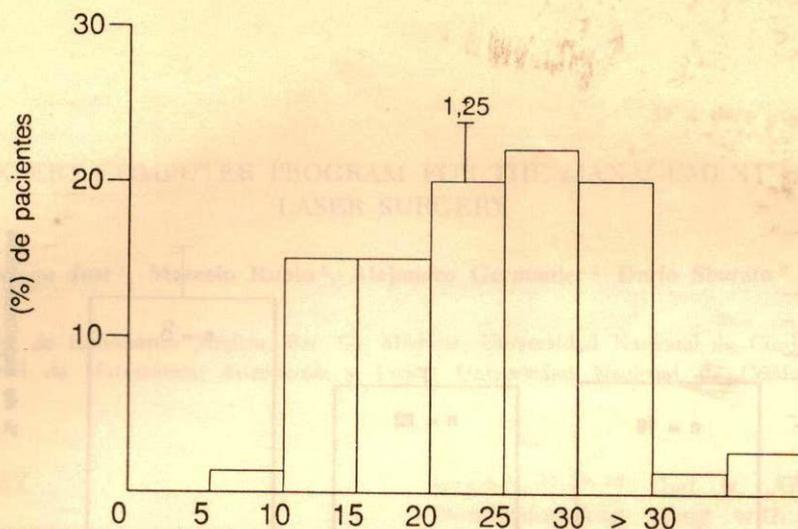


FIGURA 1: Distribución de frecuencias del porcentaje de espermatocitos morfológicamente normales en muestras de semen humano (n = 46).

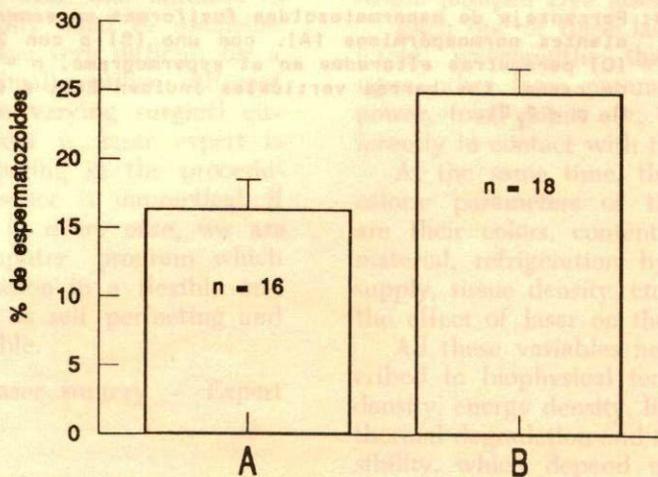


FIGURA 2: Porcentaje de espermatozoides con anomalías en pieza intermedia y cola en pacientes normospermicos (A) y astenospermicos (B). n = número de casos. Las barras verticales indican ESM. A vs B $p < 0,02$.

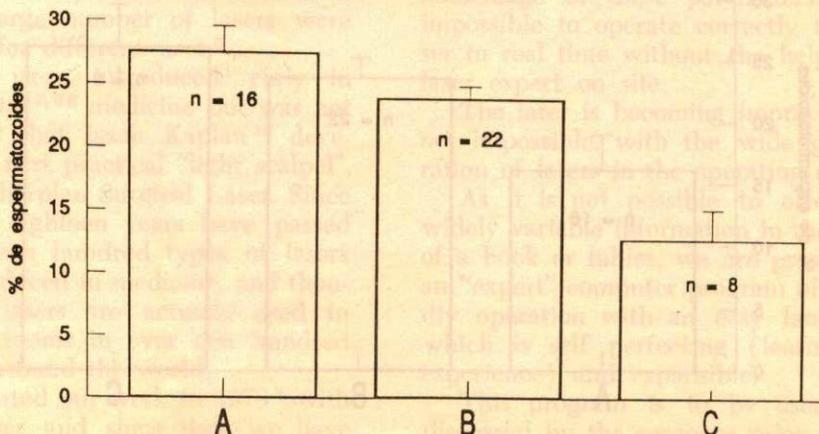


FIGURA 3: Porcentaje de espermatozoides normales en semen de pacientes normospermicos (A), con uno (B) o con 2 o más (C). parámetros alterados en el espermatograma. n = número de casos. Las barras verticales indican ESM. A ó B vs. C. $p < 0,05$.

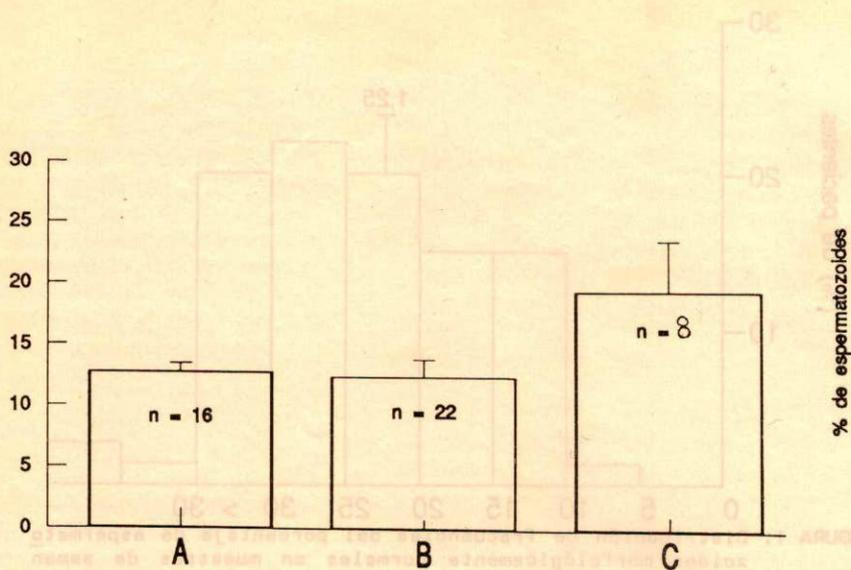


FIGURA 4: Porcentaje de espermatozoides fusiformes en semen de pacientes normospermicos [A], con uno [B] o con 2 o más [C] parámetros alterados en el espermograma. n = número de casos. Las barras verticales indican ESM. A ó B vs. C. $p < 0,01$.

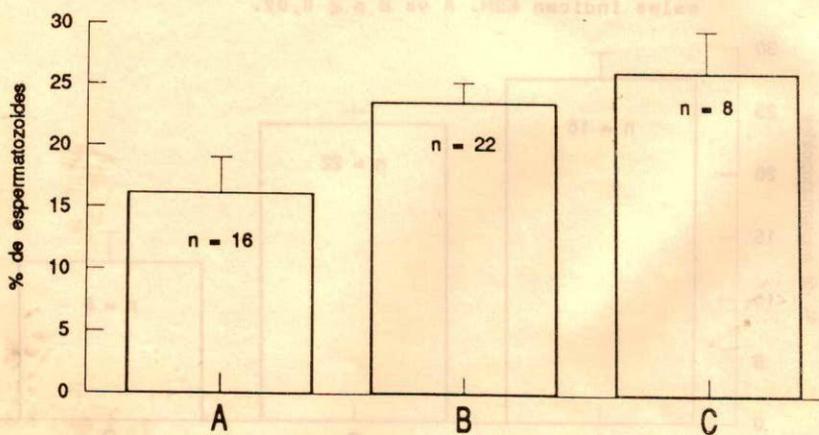


FIGURA 5: Porcentaje de espermatozoides con anomalías en pieza in termedia y cola en semen de pacientes normospermicos [A], con uno [B] o con dos o más [C] parámetros alterados en el espermograma. n = número de casos. Las barras verticales indican ESM. A vs. B. $P < 0,04$.