



Cambios morfológicos de las células germinales masculinas en relación con la edad y la oximetría en pacientes con problemas de fertilidad

Ernesto Gómez Arzapalo y V,* Isabel Herrera Ávalos,** María Inés Uribe Uribe,** Minerva García de la Paz,** José Alfredo Villacorta Argaez**

RESUMEN

Objetivo: determinar las variables morfológicas espermáticas en las muestras seminales en dos grupos de pacientes con edades diferentes.

Material y métodos: se estudiaron las muestras de 101 parejas en el Laboratorio del Hospital de Perinatología y Obstetricia Río de la Loza. Se eligieron pacientes con dos o más años de infertilidad, de enero de 2005 a agosto de 2007. Con las muestras de células obtenidas de esta población abierta multi-referida se formaron dos grupos: el primero de 27 a 35 años y el segundo de 36 a 45 años. Las muestras se obtuvieron por masturbación con por lo menos dos días de abstinencia. Se analizó su morfología con la tinción acuosa de Wright Stain modificación de Bernard W. 1970 Dade Behring®. Se procesaron las muestras en el analizador de gases ABL.330 Radiometer 1990, se compararon los resultados con los hallazgos en la disfunción de los potenciales de la membrana mitocondrial con el equipo Apoalert® MM. La preparación del semen, en la capacitación espermática, se realizó con la técnica *Isolate* de dos gradientes de desconcentración *Isolate upper-lower* (Irving Scientific) gradientes de 40 y 90%, respectivamente. La cuenta de células se procesó en la cámara de Makler.

Resultados: en el primer grupo la densidad espermática por eyaculado fue de 130.23^{n6} con 31.6% de células germinales normales, las malformaciones de la cabeza 27.7% y del flagelo 8%, con coeficiente de correlación de 0.45630. En el segundo grupo, los promedios de densidad espermática por eyaculado fueron de 326^{n6} , de las cuales 52.2% fueron de células normales, 33.1% con malformaciones de cabeza, el coeficiente fue de 0.4236; y en el flagelo fue de 12%, con coeficiente de 0.0236. La gasometría mostró la hipersaturación de oxígeno superior a las arteriales, con coeficiente de correlación de 0.0194 para las muestras normales.

Conclusiones: los resultados del potenciómetro, cuyos valores varían entre 7.2 y 7.6 de pH (OMS), no guardan relación significativa con la edad, factor de ajuste de 0.1. El coeficiente de saturación base en exceso de -0.483 en las muestras con incremento en teratogénesis. Los eventos apoptóticos tempranos, AnV y MM se correlacionaron significativamente en fracciones de baja motilidad ($r = 0.68$, $p = 0.05$) en 12 muestras de donantes.

Palabra clave: densidad espermática, teratogénesis seminal, hipoxia.

ABSTRACT

Objective: To determine the spermatic morphological variables in the seminal samples of two groups of patients of different ages.

Material and methods: The samples of 101 couples were submitted to studies at the laboratory of the Río de la Loza Perinatology and Obstetrics Hospital. Patients with two or more years of infertility were chosen, from January 2005 to August 2007. The cell samples obtained from this open population were processed by diagnostic methodology, and divided into two groups: one group (50 men) from 27 to 35 years and the other (51 men) from 36 to 45 years. The samples were obtained by masturbation with a minimum of a two-day abstinence. The morphological study was performed with aqueous stain of Wright Stain, with the modification of Bernard W. 1970 Dade Behring®. All seminal samples were processed in the gas analyzer ABL.330 Radiometer 1990, the results were compared with the findings. The preparation of the semen in the spermatic capacitation was done with the technique of isolation of two gradients, desconcentration *Isolate upper-lower* (Irving Scientific) in gradients of 40% and 90%, respectively. The cell counting process was done in the Makler chamber.

Results: In the first group the spermatic density found per patient was of 130.23^{n6} with 31.6% of normal germinal cells, head malformations added up to 27.7%, and tail malformations to 8%, with correlation coefficient of 0.45630. In the second group, spermatic density averages per ejaculation were 326^{n6} , 52.2% were normal cells, with head malformations 33.1%, the coefficient was 0.4236; and tail malformations 20.2%, with coefficient of 0.0236. Blood gas analysis showed oxygen hypersaturation higher than the arterial levels, with a correlation coefficient of 0.0194 for normal samples.

Conclusions: The potentiometer results, with values between 7.2 and 7.6 pH OMS, do not show any significant relation due to age, adjust factor of 0.1. The base excess coefficient of -0.483 in the samples with teratogenesis excess. The early apoptotic events AnV and MM significantly were correlated with low motility fraction ($r = 0.68$ $p = 0.05$) in samples of twelve donors.

Key words: spermatic density, seminal teratogenesis, hypoxia.

Los resultados del análisis morfológico de las células germinales estudiadas en 101 parejas infértiles, de enero de 2005 a agosto de 2007, demostraron teratogénesis acrosomal y flagelar, lo que obligó a explorar otras posibles causas.

Al análisis retrospectivo de la evaluación de las 101 parejas en programas de baja complejidad se agregaron 24 casos a los que se hizo estudio del pH con el potenciómetro, y se complementó con gasometría completa. Como consecuencia de la primera experiencia analítica en los dos grupos con edades diferentes, se supuso de esos factores morfológicos podrían ser la causa de la infertilidad.¹

Se detallaron y monitorizaron los procesos de inducción ovulatoria; se corroboraron el desarrollo folicular, los valores hormonales y el crecimiento endometrial trilaminar adecuados; sin embargo, no se obtuvieron los resultados deseados.

Por lo anterior se decidió estudiar el factor masculino desde la embriofisiología espermática, para tratar de entender qué sucedió en los 17 días de desarrollo²⁻⁵ y maduración germinal, en el conducto tubular de los seminíferos al epidídimo. Primero se revisaron los resultados reportados del pH, que dieron 8, cifra incompatible para fertilizar, según la OMS.⁶ También se analizaron la saturación de oxígeno y las bases en el plasma seminal, que al compararse con los hallazgos reportados en la bibliografía, con diversas técnicas de nanotecnología con marcadores selectivos en la disfunción de los potenciales de membrana mitocondrial,⁷ se encontraron muchas coincidencias.

* Clínica Florida Satélite.

** Hospital de Obstetricia y Perinatología Río de la Loza. Laboratorio-Métodos Diagnósticos.

Correspondencia: Dr. Ernesto Gómez A. Correo electrónico: egav@iwm.com.mx

Recibido: enero, 2009. Aceptado: marzo, 2009.

Este artículo debe citarse como: Gómez AVE, Herrera AI, Uribe UMI, García PM, Villacorta AJA. Cambios morfológicos de las células germinales masculinas en relación con la edad y la oximetría en pacientes con problemas de fertilidad. Rev Mex Reprod 2009;1(4):145-50.

La versión completa de este artículo también está disponible en:

MATERIAL Y MÉTODOS

En un lapso de 31 meses se estudiaron 101 parejas con problemas de infertilidad. Para estudiar el factor masculino los varones se dividieron en dos grupos: el primero de 27 a 35 años, con promedio de 31 años, y el segundo de 36 a 50 años de edad. En los hombres conocidos como fértiles los valores del pH se encontraron altos y bajos (7.2-7.6). Se eligió la formación en subgrupos para conocer si la edad guardaba relación con la concentración, morfología o motilidad de los espermios.

RESULTADOS

En 34 casos, con límites de edad de 27 y 35 años, la densidad espermática por eyaculado fue de 130.23^{N6} , con 31.6% de células germinales normales. Las malformaciones de la cabeza fueron 27.7% y del flagelo 8%, con coeficiente de correlación de 0.45630 (figura 1). La movilidad promedio fue de 45.9% y el volumen seminal promedio de 2.8 mL.

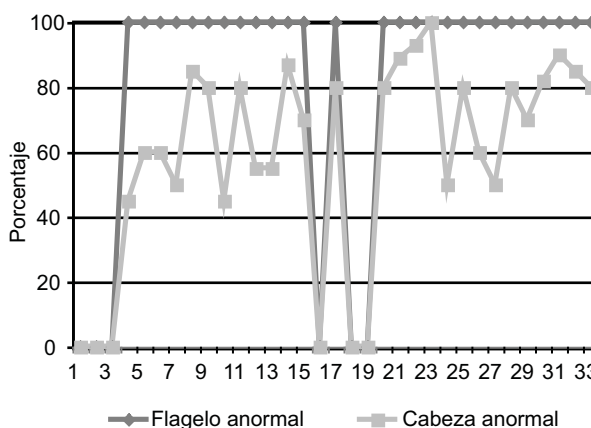


Figura 1. Anormalidades de la cabeza y el flagelo. Correlación 0.45630.

En el grupo de 36 a 50 años se documentaron 51 pacientes, con promedio de densidad espermática por eyaculado de 326^{N6} , de la cual 52.2% fueron de células normales. Las malformaciones de la cabeza fueron 33.1%, coeficiente 0.4236, con diferencia de 4.3% respecto del grupo control; y del flagelo 12%, con coeficiente de 0.0236 y en la cabeza 0.04236. La movilidad promedio fue de 72% (figura 2) y el volumen seminal

promedio fue de 3 mL. El resto de los datos como progresión o licuefacción no fueron significativos. Sólo hubo 4% de leucocitosis en el líquido seminal (figura 2).

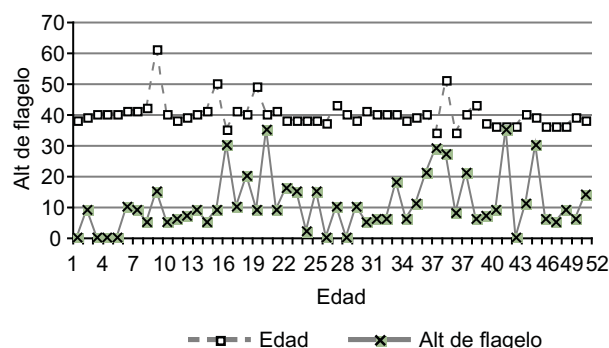


Figura 2. Relación entre la edad y las alteraciones del flagelo. Alteraciones de la cabeza (coeficiente de correlación de 0.4236). Alteraciones del flagelo (coeficiente de correlación de 0.0236).

Testigo oximétrico y su relación con los bicarbonatos

En 24 muestras complementarias con infertilidad durante dos o más años, las lecturas del potenciómetro incorporado al analizador, corriendo la gasometría completa, fueron diferentes; se obtuvieron cifras entre 7.2 y 7.6, sin estar relacionadas con la edad, con factor de ajuste de 0.1, rangos aceptados en la bibliografía mundial. Conocimos el ambiente hiperbárico en concentración y de saturación de oxígeno en las muestras de plasma seminal; como control las comparamos con fluidos hemáticos arterial y venoso y se observó que las tendencias en los resultados de las muestras seminales normales con fertilidad comprobada eran superiores a las de los fluidos hemáticos mayores a 127 mmHg. En las muestras con infertilidad se encontraron valores de oxígeno promedio de 101.276 mmHg (cuadro 1, figura 3).

En los elementos de las bases, especialmente la saturación base en exceso, con coeficiente de correlación entre la saturación base en exceso y las células morfológicamente anormales de -0.48988302 se encontraron

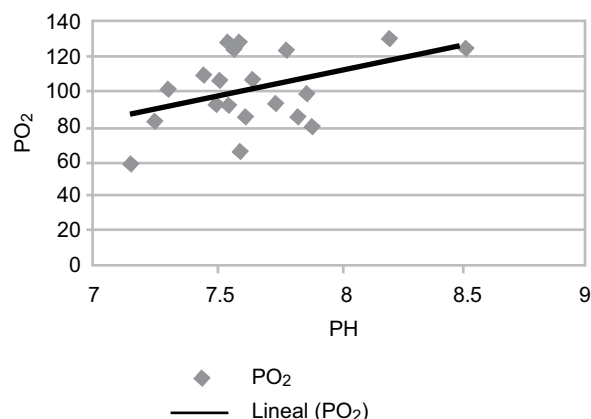


Figura 3. Correlación entre PO_2 y pH. La correlación entre PO_2 y pH estadísticamente no es significativa en el plasma seminal. $R^2 = 0.1874$.

cifras negativas que acompañan un evidente incremento en la teratogénesis (figura 4).

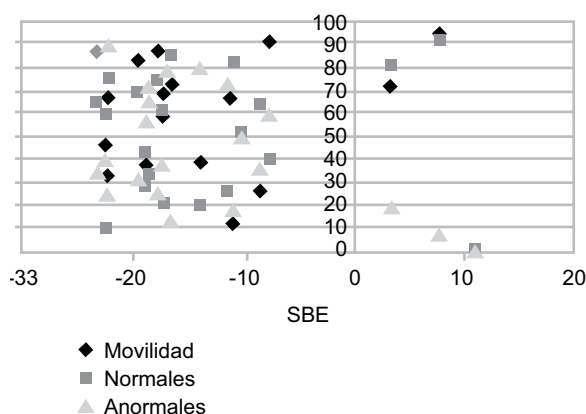


Figura 4. Relación entre saturación base en exceso (SBE) y morfología espermática. Coeficiente de correlación entre la saturación base en exceso y la movilidad: -0.120507171. Coeficiente de correlación entre la saturación base en exceso y normales: 0.01946614. Coeficiente de correlación entre la saturación base en exceso y anormales: -0.48988302.

Cuadro 1.

Parámetro ⁸	Sangre arterial	Sangre venosa
pH	7.35 a 7.45	0.50 unidades-menor
PaCO ₂	35 a 45 mmHg	35-58 mmHg " 6 mmHg
PaO ₂	127.8	

Estos resultados se compararon con estudios de evaluación de la membrana mitocondrial, potencialmente relacionada con los mecanismos de apoptosis en espermatozoides humanos eyaculados, con cambios en la motilidad y la morfología con el análisis con anexina-V y con MitoSensor. En doce muestras de los donadores

se comprobó la translocación de la fosfatidilserina a través de la membrana plasmática, lo que mostró una correlación positiva cuando se comparó con el grado de disfunción mitocondrial ($r = 0.65$) ($p = 0.05$).

Con estos resultados se pensó que el ambiente hiperbárico en los túbulos y el epidídimo, junto con el equilibrio de las bases, en especial la saturación base en exceso, son factores fundamentales para el desarrollo, maduración y morfología de las células germinales, cuya relación esta implícita con la capacidad de fertilización.^{9,10} Estos hallazgos abren una vía de investigación y obligan a incorporar este concepto como una herramienta más en la valoración del varón supuestamente infértil, sin dejar atrás los protocolos tradicionales.

Tinciones usadas en las muestras seminales en programas de fertilidad

La tinción usada en nuestro protocolo fue la modificada del método inicial de Diff-Quick Stein®, Dade, Behring, con modificación de Bernard, descrita en 1970. La muestra se aguardó una hora hasta completar la licuefacción; después se efectuó el extendido laminar y se aguardó 24 horas a temperatura ambiente de 36°C, tiempo requerido para iniciar el proceso de tinción. Los tiempos de tinción fueron de 18 segundos por colorante suspendido en agua en sus tres etapas. Después del secado de la lámina a la intemperie se realizó la lectura morfológica celular (figura 5).

La técnica de Papanicolaou modificada para espermatozoides, con eosina-nigrosina (modificación de la técnica de Blom) es común en la determinación de la dinámica espermática. Aunque su proceso es más prolongado, las tinciones usadas para la identificación morfológica y movilidad (necropermia) de las células germinales son las de Shorr.

Interpretación morfológica de las células germinales

Las láminas para clasificación morfológica celular se procesaron con la tinción de Shorr. En la figura 5 se observa una imagen de células normales; en cambio, en la figura 6 se observan células con malformaciones mixtas acrosomales y flagelares.¹¹

La técnica que valora la funcionalidad de la membrana consiste en utilizar diacetato de carboxifluoresceína y yoduro de propidio, bajo microscopio de fluorescencia.

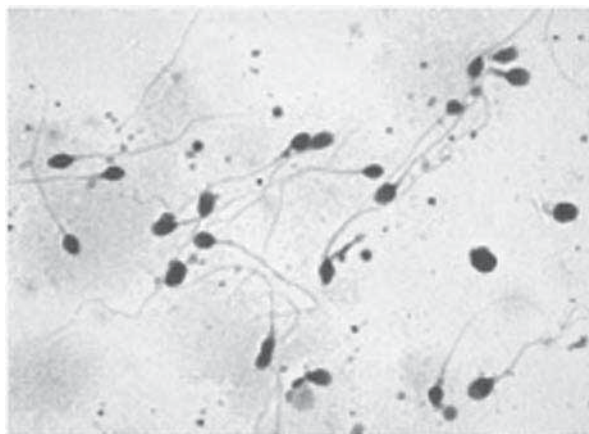


Figura 5. Muestra normal con técnica de Papanicolaou.



Figura 6. Muestra con alteraciones mixtas. Técnica de tinción de Diff-Quick.

Con esta técnica se visualizan los espermatozoides funcionales de color verde, en contraste con los espermatozoides muertos de color naranja (figura 7).

Capacitación espermática

Las muestras de semen se recolectaron por masturbación (con abstinencia sexual de dos a cinco días) en un recipiente de plástico estéril y se colocaron a baño María. En este primer paso se realizó la espermatobioscopia precapacitación.

La preparación del semen, o capacitación espermática,^{12,13} se llevó a cabo con la técnica de dos gradientes *Isolate upper-lower* (Irving Scientific), en gradientes de 40 y 90%, respectivamente. La muestra se mezcló volumen a volumen, con fluido tubárico humano

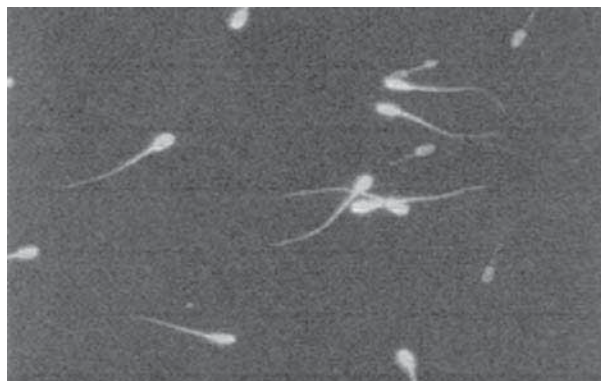


Figura 7. Tinción de Shorr (necropermia). La necrosis es un proceso pasivo de energía que está relacionado con una respuesta inflamatoria significativa, lo cual no sucede durante la apoptosis.

(HTF) enriquecido con suero sintético sustituto (SSS) al 10% (HTF más SSS 10%). Se centrifugó durante cinco minutos a 1,600 rpm, se eliminó el sobrenadante, y se resuspendió la pastilla o parte sólida del centrifugado con 2 mL de fluido tubárico humano más suero sintético sustituto 10%. Los gradientes de *Isolate* se colocaron en tubos de 15 mL (Falcon, Becton Dickinson, NJ), y se depositaron en la parte cónica: 1) 1 mL del gradiente menor o *lower* (40%) y 1 mL del mayor o *upper* (90%), se procuró no mezclar los gradientes. 2) La muestra resuspendida previamente se colocó por encima de los dos gradientes en 2 mL de fluido tubárico humano más suero sintético sustituto al 10%. Se centrifugó durante doce minutos a 1,600 rpm. Se eliminó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 1 mL de HTF más SSS 10%, se centrifugó durante cinco minutos a 1,600 rpm; se eliminó de nuevo el sobrenadante y la mezcla se ajustó a 0.5 mL. Se realizó la espermatobioscopia poscapacitación.

RESULTADOS

Durante décadas se ha cuestionado la fisiología y maduración de la célula germinal masculina. Bedford, en 1973, abordó el tema de la maduración espermática en el epidídimo; posteriormente, diferentes autores detallaron atribuciones exógenas ambientales y adictivas,¹²⁻¹⁵ sin olvidar los padecimientos infecto-contagiosos de transmisión sexual.

Como factor endógeno,¹⁴ el metabolismo endocrino toma un papel preponderante y con esto, en forma

sustantiva, enmarca el patrón del comportamiento de la masa corporal. Según el índice de Quételet, se toma como normal 24.9 kg/m², menos de 18.5 kg/m² es peso bajo, y más de 25 kg/m² es sobrepeso u obesidad.

En este contexto, los participantes en el deterioro somático celular son factores que han contribuido a desarrollar una estructura temática en el comportamiento fisiológico.

En el delicado proceso germinativo y de maduración, los radicales libres, producto de la oxidación en presencia de productos tóxicos provenientes de sustancias adictivas, infecciosas, tener más de 45 años de edad, disfuncionalidad estructural u hormonal son cofactores únicos o mixtos que causan daño. La maduración recuerda el proceso embriofisiológico como secuencia ordenada de factores de equilibrio en este corto lapso de 17 días en el ambiente homeostático. En este estudio se reunieron 101 casos que al separarlos por edades encontramos modificaciones morfológicas en las distintas etapas de la vida reproductiva masculina; sin embargo, el coeficiente de correlación entre el pH y la edad tuvo un factor de ajuste de 0.1, por lo que no fue significativo.

En otra lectura describimos el ambiente oximétrico y la asociación apoptótica relacionada con la teratogénesis de células germinales masculinas, comparadas por dos metodologías que mostraron alteraciones que tendieron a la disminución de saturación de oxígeno, que confluyeron en resultados semejantes.

Temática de proyecto neuroendocrino

Competencia espermática

La serotonina quizá sea ser una molécula clave que participa en la regulación de la cantidad de espermatozoides expelidos durante la eyaculación, dependiendo de las circunstancias del apareamiento. Quizá en los años venideros los experimentos logren sentar las bases de un modelo neuroendocrinológico en especies inferiores de mamíferos que explique la participación del macho en la competencia espermática dentro del contexto evolutivo de la selección sexual. Por lo pronto, lo único que podemos afirmar es que los machos en estas especies inferiores también “deciden” con quién, cuándo y sobre todo, cuántos espermios serán expelidos.²⁰

REFERENCIAS

1. Gómez AVE, Herrera AI, García PM, Uribe UMI, Villacorta AJA. Estudio preliminar del comportamiento ácido-base en subpoblaciones espermáticas con estudio gasométrico. *Rev Mex Urol* 2008;68(4):215-9.
2. Rey R. Congreso de Anatomía del Cono Sur 2 y Congreso Chileno de Anatomía 21 y Congreso Rioplatense de Anatomía 37. Santiago, 2-4 nov, 2000.
3. Mans SJ, Laufer MR, Goldstein DP. *Pediatric and Adolescent Gynecology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
4. Stenchever A. *Comprehensive Gynecology*. 4th ed. St. Louis: Mosby, 2001;pp:253-67.
5. Walsh PC. *Campbell's Urology*. 8th ed. St. Louis: Mosby Saunders, 2002;pp:2428-63.
6. WHO laboratory manual for examination of human semen and sperm-cervical mucus. 4th ed. Published on behalf of the World Health Organization by Médica Panamericana: Madrid, 2001.
7. Barroso G, Taylor S, Morshedi M, Manzur F, et al. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril* 2006;85(1):149-54.
8. West JB. *Fisiología Respiratoria* 3^a ed. Panamericana, 1989.
9. Keel BA. How reliable are results from the semen analysis? *Fertil Steril* 2004;82:41-44.
10. Karabinus D, Gelety T. The impact of sperm morphology evaluated by strict criteria on intrauterine insemination success. *Fertil Steril* 1997;67:536-41.
11. Bedford JM, Calvin HI, Cooper GW. The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 1973;18:1998-2013.
12. De Jonge C. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* 2005;11:205-14.
13. Nieschlag E, Rolf C, Zitzmann M. The ageing male. *Hum Reprod* 2001;16(69):167-68.
14. Merino M, De León M. Esterilidad masculina y su asociación con patología genital y factores ambientales. *Ginecol Obstet (Mex)* 1995;63(10):427-31.
15. Zavos PM. Cigarette smoking: male and female infertility. *Fertil Contracep Sex* 1989;17(2):133-8.
16. Wentz AC. Cigarette smoking and infertility. *Fertil Contracep* 1986;46(3):365-7.
17. Volgt HJ, Heller WD, Borelli S. Sperm quality of healthy smokers, ex-smokers and never smokers. *Fertil Steril* 1986;45(1):106-10.
18. Curtis KM, Savitz DA, Arbuckle TE. Effects of cigarette smoking, caffeine consumption, and alcohol intake on fecundability. *Am J Epidemiol* 1997;146(1):32-41.
19. Foresta C, De Carlo E, Mioni R, Zorzi M. Sperm nuclear chromatin heterogeneity in infertile subjects. *Andrologia* 1989;21:384-90.
20. Lucio A, Gutiérrez-Ospina G. Competencia espermática. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta-Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica del IIBm-UNAM. 2IIBm-UNAM. Gaceta 01/001/2006.