Tercer Congreso virtual de Ciencias Morfológicas.
Tercera Jornada Científica de la Cátedra Santiago Ramón y Cajal.

ANOMALÍAS MORFOLÓGICAS DE LOS ESPERMATOZOIDES EN HOMBRES CON ESPERMOGRAMA NORMAL.

Autores:

Dr. Iván Triana de la Paz[1], Dr. Raúl López Pérez[2], Dra. MSc. Marisabel Blanca García Gutiérrez[3], Dr. Pedro Sánchez Freire[4], Dra. Elena María Menéndez Hernández[5], Dra. Norma Pérez Pérez de Prado[6]

[1] Especialista de 1er grado en MGI e Histología. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara "Serafín Ruiz de Zárate Ruiz". Cuba

[2] Especialista de 2ndo grado en Histología. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara "Serafín Ruiz de Zárate Ruiz". Cuba

[3] Especialista de 1er grado en Histología y 2ndo grado en MNT. Máster en MNT. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara "Serafín Ruiz de Zárate Ruiz". Cuba

[4] Especialista de 1er grado en Histología. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara "Serafín Ruiz de Zárate Ruiz". Cuba

[5] Especialista de 1er grado en Histología. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara "Serafín Ruiz de Zárate Ruiz". Cuba

[6] Especialista de Primer Grado en Medicina General Integral y Bioestadística. Hospital Infantil "José Luis Miranda" Santa Clara. Cuba

ivantp@capiro.vcl.sld.cu

ivantp@infomed.sld.cu

Resumen

Introducción: En el estudio de la infertilidad masculina, el análisis de la morfología espermática resulta de interés por su alto valor predictivo de fertilidad, puesto que se ha observado que los espermatozoides de morfología anormal exhiben patrones de movimiento deficientes. La evaluación morfológica está incluida dentro del espermograma convencional y la Organización Mundial de la Salud recomienda determinar el porcentaje de espermatozoides con morfología normal, clasificando las anomalías espermáticas según la región de la célula afectada. Objetivos: Identificar y clasificar las anomalías morfológicas de los espermatozoides estudiados. Materiales y métodos: Se realizó un estudio

descriptivo transversal de las alteraciones morfológicas de los espermatozoides de 25 hombres con espermograma normal estudiados en la consulta de reproducción asistida de la provincia de Villa Clara: Resultados y discusión: Se estudió un total de 2997 células, en las cuales se identificaron 583 anomalías que afectaron todas las partes del espermatozoide. Conclusiones: Predominaron las anomalías correspondientes a la cabeza espermática, seguidas de las del flagelo y la pieza intermedia.

Introducción

El estudio de la fertilidad masculina se basa en el análisis de las características físicas del semen, dentro de las cuales, la morfología espermática se considera una de las más importantes, estimándose que posee un alto valor predictivo de fertilidad.[1-3] La importancia de la morfología del espermatozoide en la valoración de la calidad espermática, es un hecho hace tiempo aceptado por la comunidad científica, considerándose que existe una clara asociación entre la estructura y la función de un espermatozoide. Se ha observado que los espermatozoides morfológicamente normales son capaces de un movimiento más rápido y recto. En cambio, la mayoría de las formas anormales son inmóviles o exhiben una movilidad muy lenta. Existen distintas explicaciones para este efecto, como una hidrodinámica deficiente debido a alteraciones en la morfología de la cabeza, anomalías del flagelo que impiden un movimiento normal, distintas alteraciones en el control de la propagación de la onda flagelar o anormalidades metabólicas en el mecanismo de producción y transducción de la energía dentro de la célula.[4] De hecho, se plantea que la morfología espermática puede considerarse un indicador de la salud general del individuo, constituyendo un parámetro extremadamente sensible a diversas formas de estrés fisiológico y ambiental.[2]

La evaluación morfológica está incluida dentro del espermograma convencional y la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda determinar el porcentaje de espermatozoides con morfología normal, puesto que se ha demostrado que las muestras con una alta proporción de formas anormales presentan un bajo potencial de fertilidad.[5, 6] Sin embargo, a diferencia de algunos animales domésticos que generalmente ostentan una población espermática morfológicamente homogénea,[7, 8] la especie humana muestra una gran heterogeneidad y pleomorfismo respecto a la morfología espermática,

tanto en un mismo eyaculado como entre individuos.[3, 5] Este hecho conllevó a un proceso de descripción de los espermatozoides morfológicamente normales largo y complejo, que incorporó sucesivamente varios métodos recomendados por diferentes autores, hasta la publicación de la primera edición del "Manual de laboratorio para el examen y procesamiento del semen humano" de la OMS en 1980, donde por primera vez se intenta homogeneizar esta metodología a nivel mundial. Por otra parte, el estudio de la morfología se ha visto afectado por numerosos factores, como son la forma de realizar la extensión y tipo de tinción empleada, la zona del portaobjeto que se lee al microscopio, los criterios que se siguen y la subjetividad del propio observador. Es por ello que en la última versión del citado manual de la OMS, publicado en 2010,[6] se estandariza la metodología para la evaluación de la morfología espermática, adoptándose plenamente los criterios del grupo de Tygerberg,[2, 5, 6] los cuales se exponen a continuación:

- La cabeza debe ser lisa, de contornos regulares y de forma ovalada. Debe existir un acrosoma bien definido que ocupe 40 - 70% del área de la cabeza. La región acrosómica no debe contener vacuolas grandes o no más de dos vacuolas pequeñas que no deben ocupar más del 20% de la cabeza. La región post-acrosómica no debe contener ninguna vacuola.
- La pieza intermedia debe ser esbelta, regular y de aproximadamente 1,5 veces la longitud de la cabeza. El eje mayor de la pieza intermedia debe estar alineado con el eje mayor de la cabeza.
- El citoplasma residual es considerado una anomalía solo cuando está en exceso (más de un tercio del tamaño de la cabeza).
- La pieza principal debe tener un calibre uniforme a todo su largo, debe ser más delgada que la pieza intermedia y su longitud es aproximadamente diez veces la longitud de la cabeza. Puede estar doblada sobre sí misma, siempre que no sea a un ángulo agudo que indique ruptura del flagelo.

Esta descripción del espermatozoide normal se basa en los trabajos de varios investigadores, que reportan el hallazgo de que los espermatozoides recuperados del moco endocervical del cuello uterino después del coito, exhiben características morfológicas muy homogéneas que se corresponden con las descritas, mientras que muy rara vez se pueden encontrar allí formas

anormales. Lo anterior contrasta con lo que ocurre en el examen del semen eyaculado, donde como norma existe una población espermática morfológicamente heterogénea. Esta evidencia apoya la teoría de que solo los espermatozoides morfológicamente normales son capaces de migrar a través del moco cervical y finalmente lograr la fecundación. Más aún, únicamente espermatozoides con las mencionadas características morfológicas normales han sido hallados adheridos a la zona pelúcida del oocito; de modo que se piensa que una selección de tales espermatozoides tiene lugar, no solo durante la migración a través del moco endocervical, sino también a nivel del cúmulos oophorus, la corona radiata y la zona pelúcida.[2, 9]

Existen diferentes clasificaciones para determinar la morfología anormal de los espermatozoides. En la propuesta por la OMS[6] las anomalías espermáticas se clasifican de la siguiente forma (Figura 1):

- Defectos de la cabeza: pequeña o grande, alargada, piriforme, redonda, amorfa, vacuolada (más de dos vacuolas o más del 20% del área de la cabeza ocupada por vacuolas), vacuolas en la región post-acrosoma, doble cabeza, o cualquier combinación de las anteriores.
- Defectos del cuello y la pieza intermedia: inserción asimétrica de la pieza intermedia en la cabeza, pieza intermedia gruesa o irregular, doblada, anormalmente delgada o cualquier combinación de las anteriores.
- Defectos de la pieza principal: corta, múltiple, rota, doblada en ángulo agudo, anchura irregular, enrollada o cualquier combinación de las anteriores.
- Exceso de citoplasma residual (ECR): presencia de gran cantidad de citoplasma teñido e irregular (más de un tercio del tamaño de la cabeza).

Debe señalarse que, a través de las cinco ediciones del "Manual de laboratorio para el examen y procesamiento del semen humano" de la OMS, se han disminuido progresivamente los valores límites de porcentaje de espermatozoides normales, desde 80,5% en la primera edición de 1980, hasta un 4% en la última edición de 2010. Se piensa que la razón de esta drástica reducción involucra varios factores, como la implementación de criterios más estrictos en la evaluación morfológica de los espermatozoides y un declive real de formas normales en el semen humano, debido a múltiples factores ambientales negativos. De hecho, existen estudios que demuestran una

disminución significativa tanto en la concentración, como en el porcentaje de espermatozoides normales en las últimas décadas.[2, 10]

Aunque el análisis de la morfología espermática ha sido abordado por numerosos autores de varios países y existe consenso en la comunidad científica sobre su importancia en el estudio de la fertilidad masculina, no se ha constatado la existencia en la provincia de trabajos sobre esa línea de investigación. Teniendo en cuenta esta situación, se decidió estudiar las características morfológicas de los espermatozoides en el eyaculado de un grupo de hombres con espermograma normal, estudiados en la consulta de reproducción asistida de la provincia de Villa Clara.

Objetivos

1. Identificar las anomalías morfológicas de los espermatozoides estudiados.
2. Clasificar las anomalías morfológicas según la región del espermatozoide afectada.

Materiales y métodos

En el presente trabajo se utilizaron las muestras seminales de 25 hombres con espermograma normal, estudiados en la consulta de reproducción asistida de la provincia de Villa Clara durante los meses de enero a marzo del año 2014. De cada muestra se preparó una lámina, para lo cual se tomaron de 5 a 10 µl de semen, realizando una extensión sobre un portaobjetos de vidrio previamente rotulado con un número consecutivo. Las extensiones se dejaron secar al aire antes de ser fijadas y teñidas por el método de Hematoxilina y Eosina (H/E). Para la observación de las láminas se utilizó un microscopio óptico binocular Optech con lente ocular de 10X y objetivo de 100X, para una magnificación total de 1000X. Las imágenes se captaron mediante una cámara fotográfica digital Canon Power Shot G11 acoplada al microscopio, recorriendo la superficie del frotis de izquierda a derecha y de arriba abajo para evitar obtener imágenes de campos ya recorridos. Las fotografías se tomaron en formato JPG, con una resolución de 3648 x 2736 píxeles y con un tamaño de píxel de 0,023 µm en ambos ejes. Utilizando el programa para la medición de imágenes digitales ImageJ, se analizó un total de 2997 células, en las cuales se identificó la presencia de anomalías morfológicas según la clasificación establecida por la OMS que se expuso en la introducción del presente trabajo.

Resultados

En las 2997 células estudiadas se identificaron 583 anomalías (19,4%) (Figura 2). Predominaron las anormalidades de la cabeza espermática (59,1%), entre las cuales se observaron, en orden de frecuencia: cabezas alargadas, pequeñas, piriformes, redondas, acrosomas ausentes, cabezas amorfas, vacuoladas, múltiples, acrosomas pequeños y cabezas ausentes. En segundo lugar se ubicaron las anomalías del flagelo espermático (26,2%), entre las que se encontraron: flagelo enrollado, angulado, ausente, corto y múltiple, en ese orden. El tercer lugar correspondió a las anomalías de la pieza intermedia (12%) que correspondieron a piezas intermedias gruesas y de inserción asimétrica. Por último se identificó la presencia de exceso de citoplasma residual (2,5%). (Gráfico 1 y tabla 1).

Discusión

Existe consenso en que la morfología espermática es uno de los aspectos de la evaluación del semen que mejor predice el potencial de fertilidad de una muestra seminal, por ello la identificación de anomalías morfológicas resulta una parte esencial del examen del semen en las consultas de infertilidad. En el presente estudio se observó un predominio de las anomalías de la cabeza espermática, lo cual coincide con la mayoría de los trabajos revisados.[4, 11-13] Numerosos autores han señalado asociaciones entre las anormalidades de la cabeza espermática y alteraciones de la fertilidad masculina. Se ha demostrado por ejemplo, que la presencia de espermatozoides con cabezas muy pequeñas se asocia con infertilidad e incluso se obtienen pobres resultados cuando tales espermatozoides son utilizados en procedimientos de fertilización in vitro, presumiblemente porque una cabeza tan pequeña implica un alto grado de fragmentación del ADN.[14] Además, se ha encontrado una disminución de la capacidad fecundante en espermatozoides con cabezas demasiado grandes o muy alargadas; éstos últimos también se asocian con la presencia de infecciones del tracto urogenital masculino y varicocele.[15, 16] Por otra parte se reporta que los espermatozoides con cabezas pequeñas y redondas usualmente presentan acrosomas pequeños o ausentes, lo cual se asocia con su incapacidad para penetrar la zona pelúcida del oocito debido a la ausencia de la enzima acrosina.[2]

En el caso de las alteraciones del flagelo, que en el presente trabajo ocuparon el segundo lugar en orden de frecuencia, resulta evidente la importancia de la

integridad de esta estructura para un adecuado y efectivo movimiento de la célula que permita la fecundación, por lo cual las alteraciones de la cola espermática, como colas cortas, enrolladas o ausentes se han asociado con infertilidad en varias investigaciones.[2, 3] A semejanza del presente, en otros estudios realizados también se ubican estas alteraciones como las más frecuentes después de las anomalías de la cabeza.[4, 12] Sin embargo, en un una investigación realizada en el Instituto Nacional de Endocrinología de la Habana utilizando el microscopio electrónico de barrido, predominaron las alteraciones del flagelo espermático, seguidas de las de la pieza intermedia y en último lugar las de la cabeza.[17]

Las alteraciones de la pieza intermedia del espermatozoide ocuparon el tercer lugar de frecuencia en el presente estudio, seguidas de la presencia de exceso de citoplasma residual. En otros trabajos revisados también se reportan estas alteraciones, aunque en algunos predomina el hallazgo de exceso de citoplasma residual sobre las anomalías de la pieza intermedia.[12] Se presume que ambos tipos de anomalías puedan interferir con una adecuada motilidad del espermatozoide, dada la importancia de la vaina mitocondrial de la pieza intermedia en la producción de la energía necesaria para el movimiento de los microtúbulos que constituyen el axonema del flagelo. Por otra parte, la producción mitocondrial de ATP también es necesaria para la reacción acrosómica a nivel de la cabeza espermática durante la fecundación. Además la presencia de exceso de citoplasma residual en la célula espermática se asocia con inmadurez del espermatozoide y producción de especies reactivas de oxígeno que pueden causar daño del ADN.[13, 18, 19]

Conclusiones

En el presente trabajo se evidenció la presencia de variadas anomalías morfológicas que afectaron todas las partes de los espermatozoides, pertenecientes a muestras seminales consideradas normales según los parámetros vigentes para el espermograma. Predominaron las anomalías correspondientes a la cabeza espermática, seguidas de las del flagelo y la pieza intermedia.

Bibliografía

1. Kruger T, Coetzee K. The role of sperm morphology in assisted reproduction. Human Reproduction Update [seriada en Internet]. 1999 [citado 29 May 2014]; 5(2): Disponible en: http://humupd.oxfordjournals.org/content/5/2/172.full.pdf?origin=publication_detail.

2. Menkveld R. Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Asian Journal of Andrology [seriada en Internet]. 2010 [citado 31 May 2013]; 12(1): Disponible en: http://www.nature.com/aja/journal/v12/n1/full/aja200914a.html.

3. Menkveld R, Holleboom CA, Rhemrev JP. Measurement and significance of sperm morphology. Asian J Androl [seriada en Internet]. 2011 [citado 7 Feb 2015]; 13(1): Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21076438.

4. Gimeno Miquel IM. Morfología espermática y parámetros seminales básicos en varones normo y oligoastenoteratozoospérmicos [Tesis]. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia; 2014.

5. Menkveld R. Sperm morphology assessment using strict (Tygerberg) criteria. Methods Mol Biol [seriada en Internet]. 2013 [citado 8 Feb 2015]; 927: Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22992902.

6. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization Press; 2010 [citado 4 May 2013]. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf.

7. Maroto Morales A. Evaluación objetiva de la morfometría de los espermatozoides de ovino (Ovis aries). Relaciones con la fertilidad [Tesis]. Albacete, España: Universidad de Castilla-La Mancha; 2012

8. Ros Santaella J. Morfometría espermática en ciervo ibérico (Cervus elaphus hispanicus) [Tesis]. Albacete, España: Universidad de Castilla-La Mancha; 2012.

9. Garrett C, Liu DY, Baker HW. Comparison of human sperm morphometry assessment models based on zona pellucida selectivity. Soc Reprod Fertil Suppl [seriada en Internet]. 2007; 65 [citado 4 May 2013]Disponible en:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17644976.
10. Rolland M, Le Moal J, Wagner V, Royere D, De Mouzon J. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. Hum Reprod [seriada en Internet]. 2013 [citado 8 Feb 2015]; 28(2): Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23213178.
11. Álvarez Lleó C. Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del Sperm Class Analyzer [Tesis]. Valencia, España: Universidad de Valencia; 2003.
12. Flores E, Lobo A, Chelhod M, Rojas L, Salazar R, Albarado L. Motilidad y morfología espermática, en estudiantes de la Universidad de Oriente. Rev Obstet Ginecol Venez [seriada en Internet]. 2012 [citado 26 May 2013]; 72(1): Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0048-77322012000100008&lng=es.
13. Sivanarayana T, Ravi Krishna C, Jaya Prakash G, Murali Krishna K, Madan K. CASA derived human sperm abnormalities: correlation with chromatin packing and DNA fragmentation. J Assist Reprod Genet 2012;29:1327–34.
14. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. Hum Reprod [seriada en Internet]. 2000 [citado 8 Feb 2015]; 15(4): Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10739828.
15. Menkveld R, Kruger TF. Sperm morphology and male urogenital infections. Andrologia [seriada en Internet]. 1998 [citado 8 Feb 2015]; 30 Suppl 1: Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9629443.
16. Kahraman S, Akarsu C, Cengiz G, Dirican K, Sozen E, Can B, et al. Fertility of ejaculated and testicular megalohead spermatozoa with intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod [seriada en Internet]. 1999 [citado 8 Feb 2015]; 14(3): Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10221704.
17. Rodríguez Pendás BV, Toledo Sánchez CA, Gómez Alzugaray M, Santana Pérez F, GDomínguez Alonso E. Alteraciones microscópicas de espermatozoides humanos por microscopía electrónica de barrido. Revista cubana de endocrinología [seriada Internet]. 2013; 24(2): Disponible en:

http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=c44e1a54-dd61-49ef-82e2-9827cbaf7bd1%40sessionmgr111&vid=1&hid=119.
18. Gergely A, Kovanci E, Senturk L, Cosmi E, Vigue L, Huszar G. Morphometric assessment of mature and diminished-maturity human spermatozoa: sperm regions that reflect differences in maturity. Hum Reprod [seriada en Internet]. 1999 [citado 24 May 2013]; 14(8): Disponible en: http://humrep.oxfordjournals.org/content/14/8/2007.full?sid=21c05b9c-6233-4786-951d-980fccd91ad5.
19. Cruz I, Colmenares M, Berrueta-Carrillo L, Gomez-Perez R, Montes H, Berrueta L, et al. Evaluación de la calidad del espermatozoide humano: comparación entre la integridad del ADN espermático y variables del semen. Invest clín [seriada en Internet]. 2010 Mar [citado 4 May 2013]; 51(1): Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332010000100009&lng=es.

Anexos

Figura 1. Clasificación de las anomalías espermáticas según la OMS.

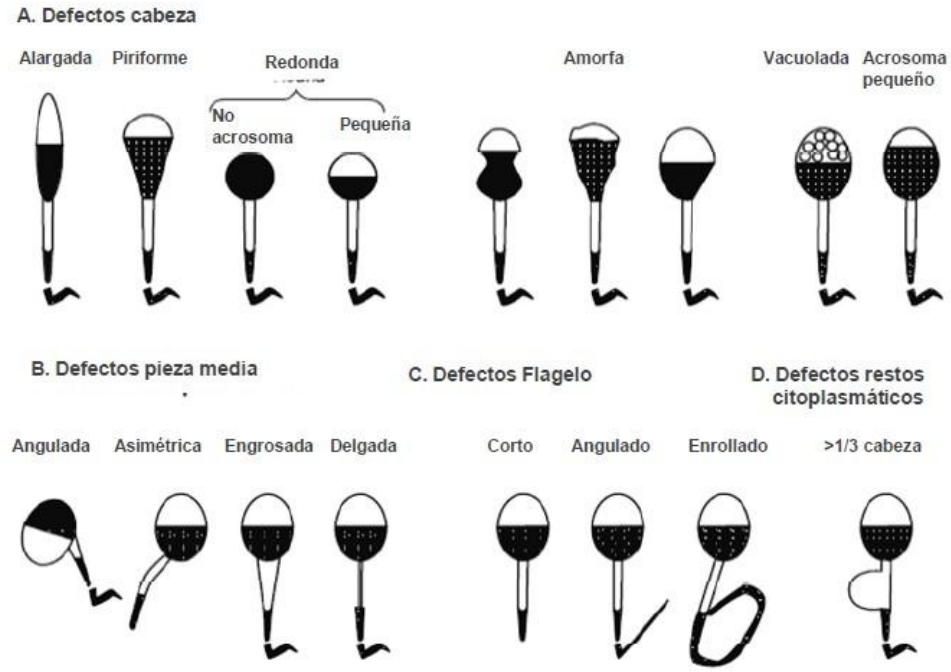

Figura 2. Microfotografías de espermatozoides anormales. Tinción: H/E. Magnificación: 1000X.

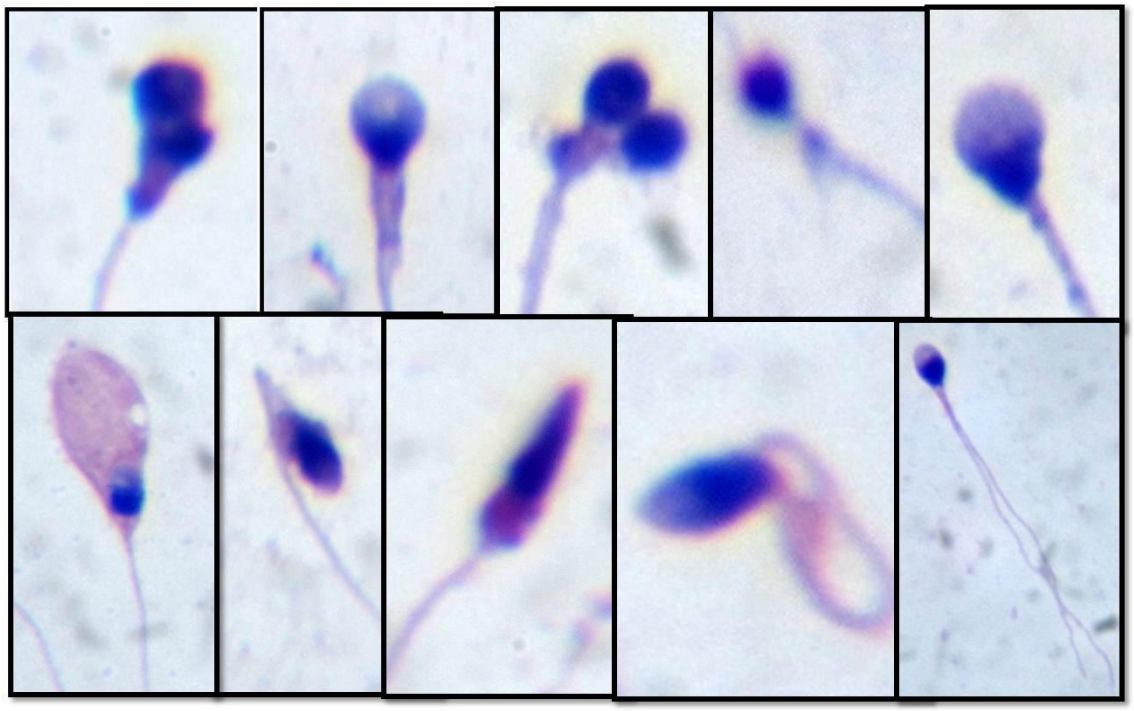

Gráfico 1. Distribución de las anomalías espermáticas según la región afectada

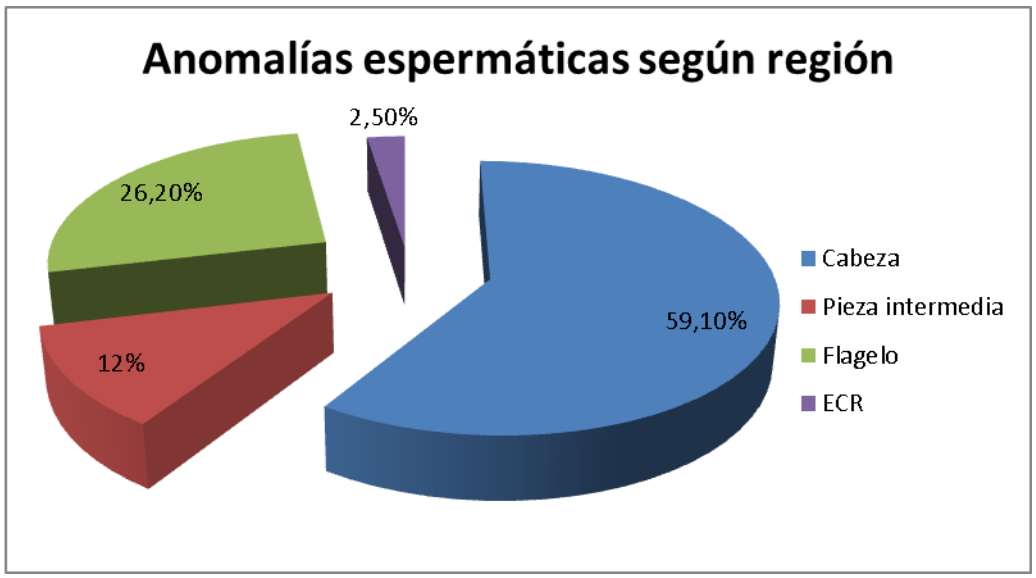

Tabla 1. Anomalías espermáticas detectadas.

Anomalía espermática	**Número**	**%**
Cabeza alargada	95	16,2
Cabeza piriforme	44	7,5
Cabeza redonda	31	5,3
Cabeza pequeña	56	9,6
Cabeza ausente	6	1
Acrosoma pequeño	14	2,4
Acrosoma ausente	38	6,5
Cabeza amorfa	32	5,4
Cabeza múltiple	6	1
Cabeza vacuolada	23	3,9
Pieza intermedia asimétrica	7	1,2
Pieza intermedia gruesa	63	10,8
Flagelo corto	17	2,9
Flagelo ausente	24	4,1

Flagelo angulado	53	9
Flagelo enrollado	57	9,7
Flagelo múltiple	2	0,3
Exceso de citoplasma residual	15	2,5
Total	583	100