



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Orientación terminal: Biología del Desarrollo

Área: Genética

Línea de Investigación: *Citogenética y Mutagénesis*

Alternativa de Titulación LIFS VII y VIII

T E S I S

Que para obtener el título de

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

Méndez Matías Galo Abad

“Evaluación de la teratozoospermia en hombres jóvenes en relación con el proceso de fertilidad y las aberraciones cromosómicas”



DIRECTORA DE TESIS: Dra. Elia Roldán Reyes

MÉXICO, DF.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





Agradecimientos.

“Por algo pasan las cosas”

“Hace muchas lunas que no te veo, solo espero el día en volverte a ver, en esta vida o en la otra y platiquemos de lo que hemos hecho el uno sin el otro”

Quiero agradecer a cada persona que me apoyo en los mejores y peores momentos de mi vida, que dieron todo para que lograra esta meta en mi vida, tanto emocionalmente como económicamente, sobre todo el apoyo moral, la calidez, la alegría, los consejos entre otras cosas, ¿de quién hablo?, de mi FAMILIA por supuesto.

Mi familia de sangre que puedo mencionar, ya que si somos pocos, nos mantenemos unidos a pesar de las circunstancias; a mi MAMÁ, Petra Ángeles Obviedo porque a ella le debo prácticamente todo, si soy quien soy es por ella, TE AMO MAMÁ. En segunda estancia pero no menos importante MI MADRE Rosa María Matias Ángeles, sé que no somos del todo compatibles pero desde el fondo de mi corazón te agradezco todo lo que me has dado y todo lo que has SACRIFICADO por mí, de igual forma TE AMO. MI PADRE que me enseñó la palabra VIVIR y darlo todo por los que quieres dejando el cuerpo y alma por aquellas personas que amas GRACIAS. Mi TIA Antonia Matias Ángeles y mi TIO Marcelino Ángeles Obviedo que cuidaron de mí durante mi niñez, no tengo palabras para decirles cuanto les quiero y perdón por todas las travesuras que hice, cada uno me enseñó algo importante en mi vida, Toña si se el significado de NO RENDIRSE NUNCA es por ti y Tío gracias a ti aprendí a SONREIRLE a la vida SIEMPRE, pronto nos veremos, cuidala mientras llegamos los tres que faltamos, te la encargamos mucho. Mis HERMANOS cada uno diferente al otro, uno es un niño de 34 años, otro prácticamente un ANGEL, el otro un visionario y soñador, uno más que es el protector pero a la vez el más sensible y la última por Mi motivación una delicada niña que es imposible no querer.

Mis amigos, Dianelly, Anali, Víctor, Karla, Laura, Fernando, mis amigos Daniel, Diana R, Andrea, Gael, Cesar, Xavier, Denis, por mencionar algunos.... buenos recuerdos!

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a la Dra. Elia Roldán Reyes por ayudarme y guiarme por esta etapa de mi vida, gracias por su tiempo y paciencia, por las pláticas y enseñanzas.



Índice

Sección

Página

Introducción	1
Semen.....	1
Espermatogénesis.....	2
Etapas de la espermatogénesis.....	3
Reacción Acrosomal.....	5
Aberraciones Cromosómicas.....	6
Alteraciones genéticas y epigenéticas en la espermiogénesis.....	8
Fertilidad Masculina.....	9
Características de los espermatozoides normales.....	10
Alteraciones morfológicas en el espermatozoide.....	11
Justificación	12
Hipótesis	12
Objetivo General	12
Objetivos particulares.....	12
Metodología	13
Calidad Seminal:Espermatobioscopía.....	13
Análisis de la morfología espermática.....	13
Técnica de Hemacolor.....	13
Cultivo de linfocitos.....	14
Elaboración de preparaciones cromosómicas.....	15
Observación de los cromosomas.....	15
Análisis estadístico.....	16
Resultados y Analisis de Resutados	16
Analisis y Discusión de Resultados	39
Conclusiones	44
Persepectivas	44
Bibliografía	45



Resumen

Las células germinales masculinas (espermatogonias) son una línea celular muy importante para la conservación de la especie, éstas se forman en las gónadas (testículos), mediante un proceso de división permanente (mitosis). De esta célula primaria a partir de dos divisiones (meiosis) se producen cuatro espermátidas haploides para después dar inicio a la metamorfosis de estas espermátidas a espermatozoides (espermioogénesis). Uno de los factores relacionados con la esterilidad del varón es el aumento del número de espermatozoides anormales (teratozoospermia), esta condición se encuentra relacionado principalmente con alteraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales, el análisis de la morfología espermática acompañado del estudio cromosómico es importante como un parámetro para la evaluación de la fertilidad y la herencia de síndromes ligados a daño en el material genético. Se realizó espermatobioscopias directas a 100 muestras de donadores voluntarios (de edad promedio de la FES Zaragoza) acompañado de un análisis de la morfología mediante la técnica de Hemacolor, de los cuales, 15 donantes se les detectó teratozoospermia ya que su porcentaje de espermatozoides normales (EN) fue menor al 15% (OMS, 1999). A los donantes con teratozoospermia se les realizó un estudio de aberraciones cromosómicas a partir de cultivos de linfocitos de sangre periférica, mediante tinción con Giemsa y microscopia de luz, se evaluó las aberraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales (tipo cromosómico y cromatídico) e índice mitótico (IM). Se observó que las muestras de los donadores con valores de morfología espermática normal <15% de EN presentan aberraciones cromosómicas estructurales tanto cromatídicas como cromosómicas en sus células somáticas (no se registraron aberraciones numéricas), con esta información se puede proponer que si un hombre joven (18 a 29 años) presenta un porcentaje <15% de espermatozoides con morfología normal, tiene la probabilidad de tener aberraciones cromosómicas, las cuales podría transmitir las a su descendencia corroborando que la morfología espermática está directamente relacionada con la integridad de su material genético.

Palabras clave: Espermatozoides humanos, teratozoospermia, aberraciones cromosómicas.



Agradecimientos Académicos:

UNAM PAPIIT: IN-213013-3

Unidad de Investigación Multidisciplinaria de Estudios Zaragoza. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

La presente tesis se desarrolló en el Laboratorio de *"Citogénética y Mutagénesis"* de la UNIGEN, laboratorio 2 planta alta de la UMIEZ, bajo la dirección de la Dra. Elia Roldán Reyes.

Introducción

Semen

Es un líquido que contiene en suspensión a los espermatozoides, está compuesto principalmente por 5% de secreciones del epidídimo, 30% de secreciones de la próstata y 65% de secreciones provenientes de la vesícula seminal. Si se fracciona el líquido seminal obtendríamos una primera fracción que contendría las secreciones epididimarias, testiculares y prostáticas, ricas en espermatozoides; y la segunda fracción contendría las secreciones de la vesícula seminal. Los espermatozoides se producen en el testículo en dos etapas que duran cerca de 60 días (Poirot *et al.*, 2005).

El plasma seminal es un medio rico y complejo, sirve a la vez de vehículo, de medio nutritivo y protector de los espermatozoides. Está compuesto de: (i) **constituyentes minerales:** Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , (ii) **glúcidos:** glucosa (0,39 mmol/L) y fructosa (de 5,5 a 27,5 mmol/L fuente de energía para los espermatozoides) producida a partir de la glucosa sanguínea, (iii) **ácidos orgánicos:** ácido cítrico que contribuye al mantenimiento de la presión osmótica del espermatozoide y ácido ascórbico, protector de los espermatozoides contra los radicales libres, (iv) **lípidos** (tres veces menos que en el plasma sanguíneo): colesterol y glicerofosforilcolina, (v) **esteroides:** testosterona y deshidroepiandrosterona, (vi) **constituyentes azotados:** aminoácidos, carnitina: que tiene un papel importante en el metabolismo de los espermatozoides

bajo la forma de acetilcarnitina, espérmidina, espérmina (responsable del olor del espermatozoide; oxidación), glutatión (protector de los espermatozoides por su poder reductor), (vii) **proteínas:** albúmina (6.3%), globulina (15.9%), β globulina (41.1%), γ globulina (23.2%), (viii) **enzimas** y (ix) **prostaglandinas** (Poirot, 2005).

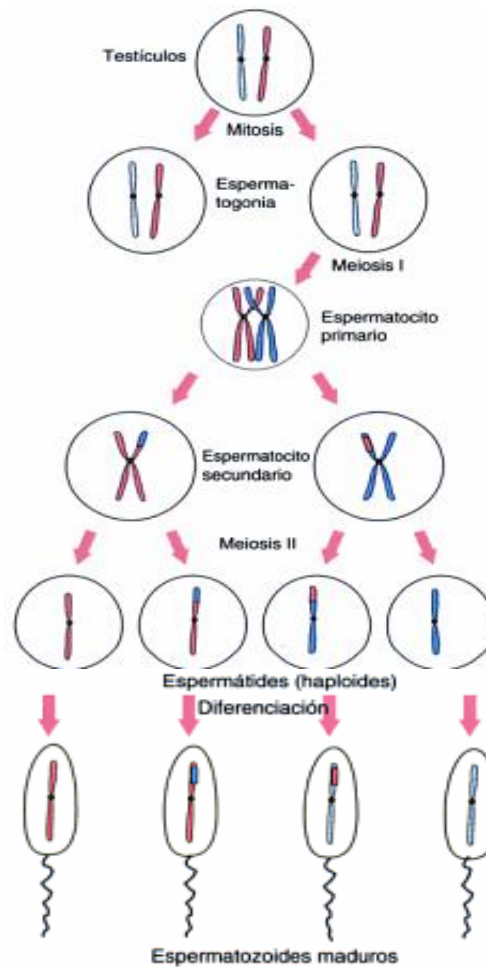


Figura 1. División Mitótica y Meiótica de las espermatogonias (Passarge, 2009).

Espermatogénesis

La espermatogénesis, es el proceso por el cual se producen los espermatozoides que comprende una serie de fenómenos complejos y singulares. Comienza poco antes de la pubertad, bajo la influencia de las concentraciones cada vez mayores gonadotropinas hipofisarias y continúa durante toda la vida (Ross *et al.*, 2008).

Las células germinales masculinas (espermatogonias) se forman en las gónadas (testículos), mediante un proceso de división permanente (mitosis; Figura 1). De esta célula primaria a partir de dos divisiones (meiosis) se producen cuatro espermátidas haploides que permanecen unidas mediante puentes citoplasmáticos y que a la vez están comunicadas con las células de Sertoli, las cuales están encargadas de dar inicio a la metamorfosis de estas espermátidas a espermatozoides. (Figura 2: espermiogénesis)(Olivera *et al.*, 2006).

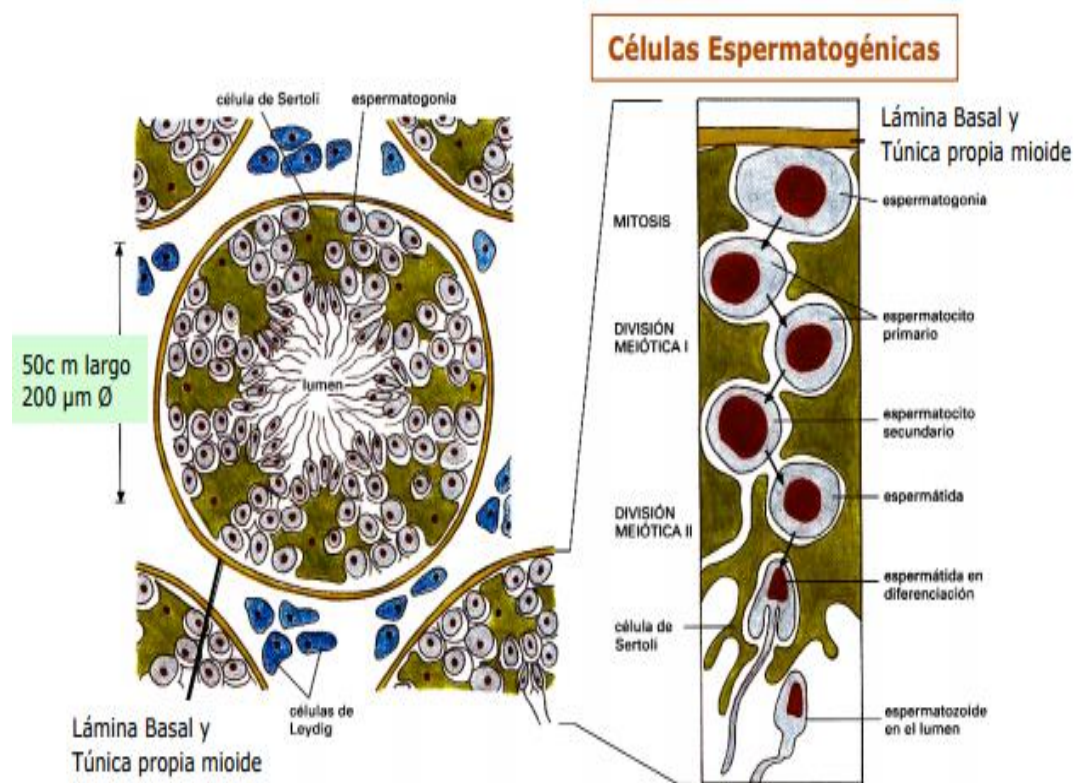


Figura 2. Espermiogénesis (Olivera *et al.*, 2006).

Etapas de la espermiogénesis

Durante la espermiogénesis se alcanzan a distinguir cuatro etapas principales, durante las cuales se desarrolla morfológicamente el espermatozoide, las etapas son:

Fase de Golgi: Es aquella fase en la que el aparato de Golgi migra cerca del núcleo y desprende vesículas para dar paso a la formación del Acrosoma. Comienza la formación del flagelo mediante la migración de un par de centriolos del lado opuesto a las vesículas desprendidas por el aparato de Golgi (Olivera *et al.*, 2006).

Fase del Capuchón: La vesícula acrosomal se aplana formando la capucha en sí. También se da la sustitución de histonas por protaminas lo que da como resultado una mayor compactación del material genético y por consecuencia del núcleo, evitando la transcripción, la replicación y depende de las modificaciones transcripcionales (Olivera *et al.*, 2006). Esta transición de histonas a protaminas involucra proteínas nucleares de transición (Zamudio *et al.*, 2008).

Fase Acrosomal: La espermatide gira de tal forma que el acrosoma queda en dirección de la membrana basal. Se depositan gránulos en el acrosoma, el citoplasma se desplaza hacia la base de la cabeza y se localiza por debajo de la unión núcleo-axonema; las mitocondrias se agrupan alrededor de este último en su parte cercana al núcleo, formando la pieza media. Uno de los centriolos pasa a formar la pieza media (Olivera *et al.*, 2006).

Fase de Maduración: Se desarrollan las características finales del espermatozoide, se adquiere la forma característica del espermatozoide y la eliminación del citoplasma por desplazamiento hacia la pieza terminal de la cola originando la gota citoplasmática. Esta fase termina con la espermiación, que es la liberación del espermatozoide a la luz del tubo seminífero, posteriormente son transportados a los ductos eferentes y de ahí al epidídimo en cuya cola se almacenan (Figura 3) (Olivera *et al.*,

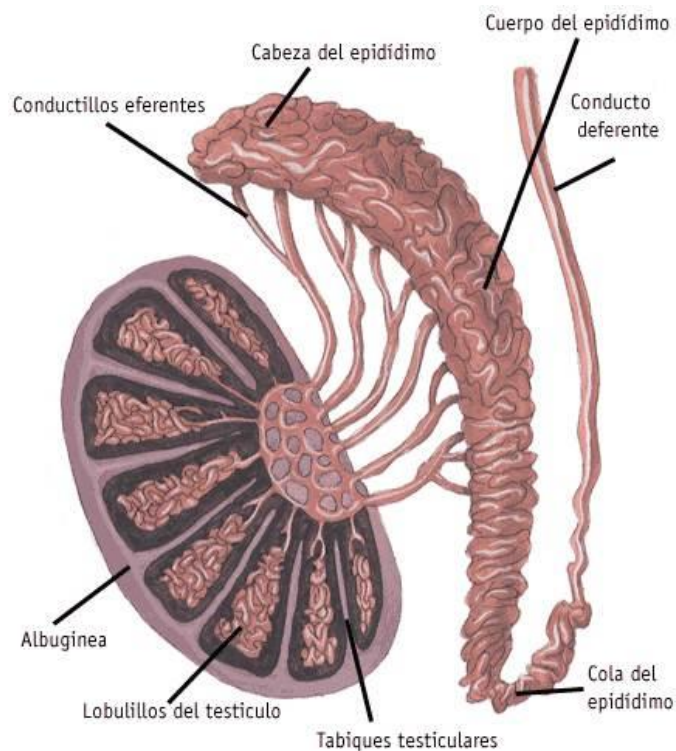


Figura 3. Estructura del epidídimo (Walsh, 2008).

2006). El proceso de maduración termina con la espermiación, o liberación de los espermatozoides a la luz del tubo seminífero. En los testículos, los espermatozoides son inmóviles o móviles *in situ* y no fecundantes (Poirot *et al.*, 2005).

El epidídimo está constituido de tres partes: la cabeza, el cuerpo y la cola (Figura 3). En el epidídimo se efectúa al mismo tiempo la reabsorción y secreción epididimaria. Sólo aquí los espermatozoides adquieren su movilidad progresiva y su aptitud para la fecundación. En el momento de la eyaculación, el líquido del epidídimo que contiene los espermatozoides es expulsado por el conducto deferente que acaba en la ampolla deferente, después pasa por los conductos eyaculadores hasta la uretra prostática. A esta altura se añade la secreción prostática (Poirot *et al.*, 2005).

Durante la eyaculación los espermatozoides junto con el plasma seminal pasan por la uretra y a través de movimientos peristálticos se libera al tracto genital femenino. Por último la capacitación del espermatozoide empieza en su tránsito por el epidídimo, pero el movimiento del flagelo empieza después de la eyaculación, todo este proceso es llamado, activación del esperma. (Olivera *et al.*, 2006)

Una de las modificaciones que se dan en la espermiogénesis es la formación del flagelo el cual tiene una composición particular (Figura 4).

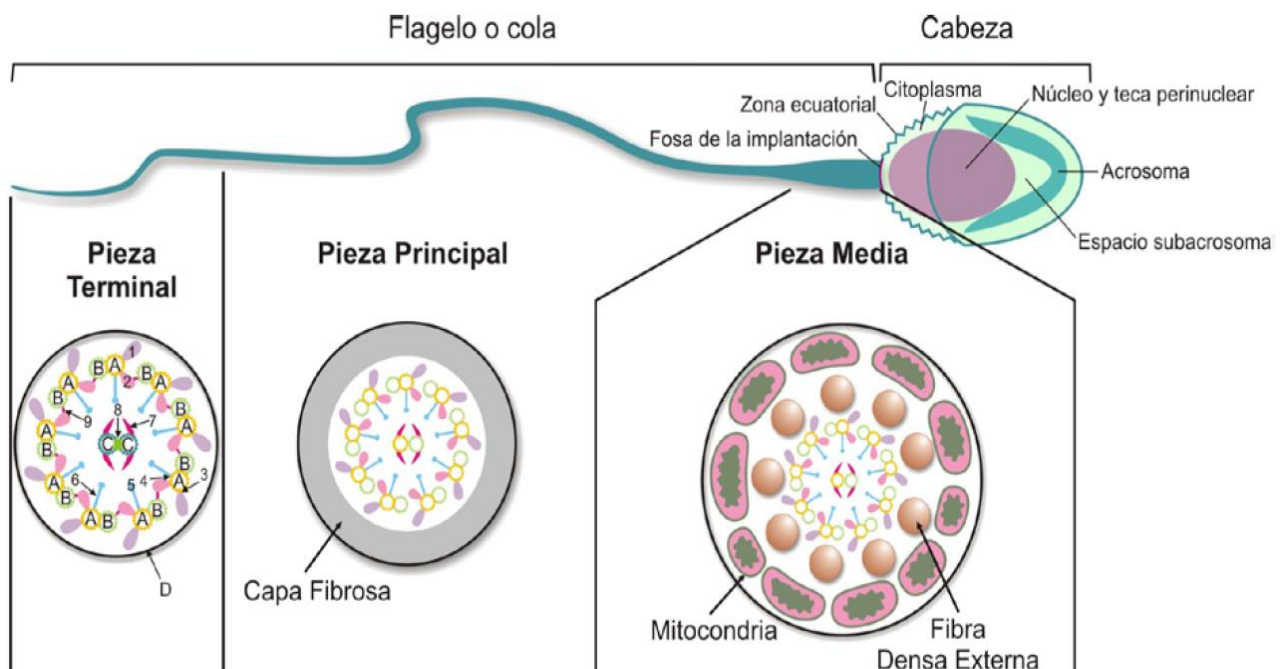


Figura 4. Estructura y componentes del flagelo del espermatozoide, y componentes de la cabeza (Olivera *et al.*, 2006).

Durante el proceso de formación del flagelo se da la síntesis de dineína, que es una de las principales proteínas formadoras de éste, además está compuesto por micro-túbulos, moléculas chaperonas, proteínas fijadoras de calcio y proteínas quinasa/fosfatasa (Olivera *et al.*, 2006).

Para que el espermatozoide fertilice al óvulo deben de desencadenarse una serie de reacciones, que son conocidas como “reacción acrosomal”, las cuales se encargan de la penetración del espermatozoide al óvulo y la fusión entre sus membranas.

Reacción acrosomal

Es la liberación de enzimas líticas (hialuronidasa) por parte de la vesícula acrosomal del espermatozoide, en el folículo ovárico, son capaces de dispersar las células de la corona radiada y así permitir que el espermatozoide se abra camino, hasta alcanzar la zona pelúcida, que es el estrato glicoproteico que rodea el ovocito (Ortega, 2012).

El inicio de la reacción acrosomal está mediada por la N-acetilglucosamina (Cardona *et al.*, 2005), y por galactosil transferasa (Percy, 1997). La unión del espermatozoide a la zona pelúcida, induce la activación y el desprendimiento de otra enzima acrosomal (acrosina), que facilita la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida, para excavar en ella un canal que le permita alcanzar la membrana plasmática, fundirse e incorporar su núcleo (Figura 5) (Langman, 1976 Tomado de: Ruiz, 1988).

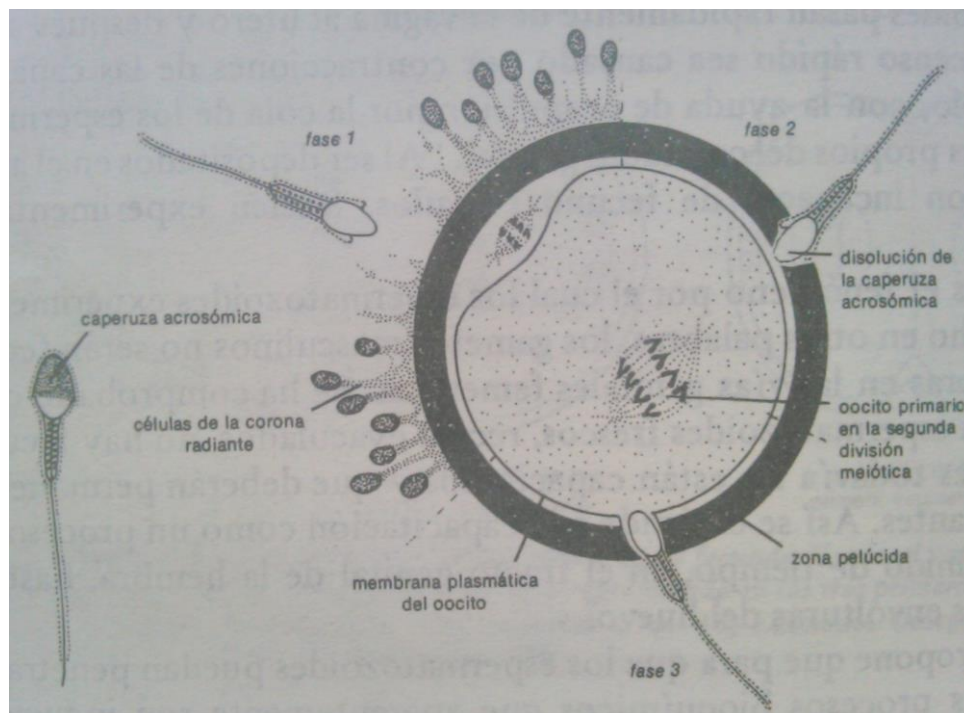


Figura 5. Reacción acrosomal (Langman, 1976; Tomado de: Ruiz, 1988).



Existe un cambio de pH en el ovulo, causado por un flujo de hidrogeniones y un influjo de sodio, teniendo como consecuencia la despolarización de la membrana y permiten la activación de canales de calcio de la membrana plasmática, permitiendo un influjo masivo de iones calcio. Este alto nivel del calcio intracelular induce la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática circundante y la liberación del contenido del espermatozoide (Percy, 1997).

El proceso de fertilización por parte del espermatozoide, depende en gran medida de la morfología espermática, la cual si es aberrante, puede ser causada por daño en el material genético de estas células.

Aberraciones Cromosómicas

Son cambios en el cariotipo que afectan el número y estructura de los cromosomas. Estos cambios pueden ser heredados a partir de inversiones y translocaciones cromosómicas balanceadas que están presentes en alguno de los padres; pueden ser *de novo* producto de una nueva mutación ocurrida en las células germinales o en el periodo postcigótico, y pueden ser adquiridos en los casos de leucemia y cáncer (Colombo *et al.*, 2003). Existen diversos tipos de aberraciones en el material genético, como son los siguientes:

Alteraciones Numéricas

Son los cambios en el número de cromosomas, este tipo de alteraciones son relativamente fáciles de identificar con métodos citogenéticos estándar, y son de dos tipos:

Aneuploidias: corresponden a la pérdida (monosomía) o ganancia (trisomía) de un cromosoma al par homologo.

Poliploidias: existe una ganancia de un set haploide completo (3n, 4n, etc.).

Las aneuploidias que afecta a todas las células de un organismo generalmente son el resultado de una no-disyunción, que se produce por una falla en la separación de los cromosomas homólogos, principalmente durante la primera división meiotica generándose gametos con mayor o menor número cromosómico. Si la no-disyunción ocurre durante la mitosis, se generan células somáticas hijas trisómicas y monosómicas; el grado del mosaicismo resultante dependerá del tiempo de la embriogénesis en donde ocurrió la no-disyunción y la supervivencia de las células con aberración (Colombo *et al.*, 2003). A diferencia de las aneuploidias, las poliploidias tiene un número cromosómico que es un múltiplo exacto del set haploide genómico, por sobre el diploide (2n). Los posibles estados poliploides son triploides (3n), tetraploides (4n) pentaploides (5n), etc.; generalmente las Poliploidias son muy poco frecuentes y letales antes del nacimiento (Colombo *et al.*, 2003).

Aberraciones Estructurales

En general las aberraciones estructurales se producen por grandes mutaciones genómicas o por deleciones cromosómicas que se presentan erróneamente. Existen evidencias que indican que las deleciones cromosómicas no se producen al azar. Existen dos grandes tipos de aberraciones cromosómicas estructurales: **Aberraciones de tipo cromosómico** y **Aberraciones de tipo cromatídico** (Figura 6; Evans, 1984).

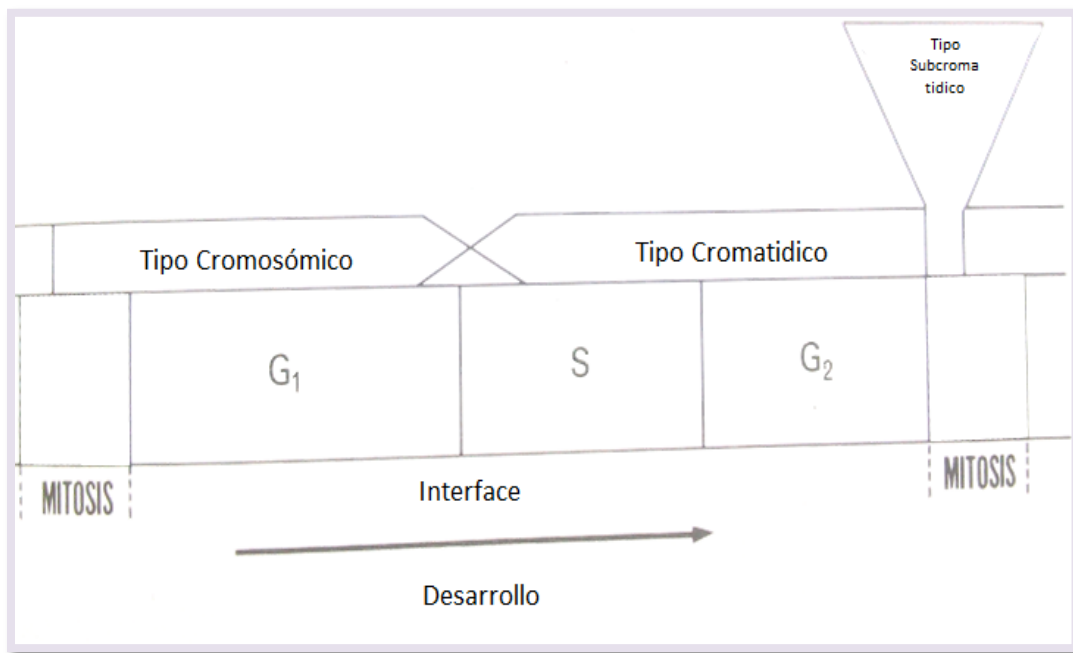


Figura 6. Relación entre el tipo de aberración y el estadio en el ciclo celular (Evans, 1984; Modificada).

Aberraciones de tipo cromosómico: deleción terminal, deleción intersticial, anillos acéntricos, anillos céntricos, inversiones, translocaciones recíprocas y cromosoma.

Aberraciones de tipo cromatídico: gap cromatídico e isocromatídico, deleción intersticial de cromátida, anillos cromatídicos acéntricos y céntricos, aberraciones de isocromatídicas, intercambio simétrico e intercambio asimétrico (Figura 7; Evans, 1984).

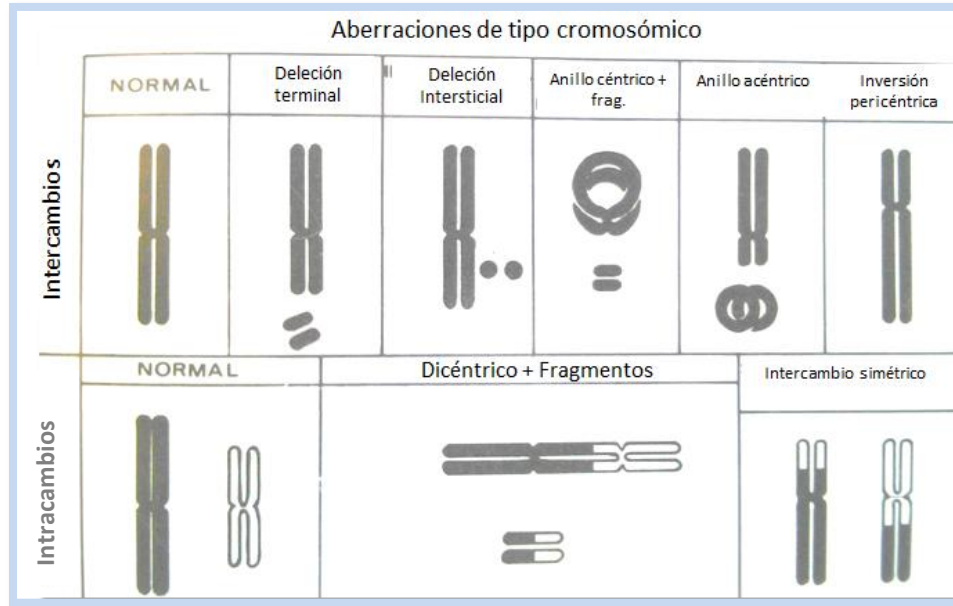


Figura 7. Aberraciones de tipo cromosómico (Evans, 1984; Modificada).

Alteraciones genéticas y epigenéticas en la espermiogénesis

La espermatogénesis es un proceso altamente regulado, que está controlado por mecanismos epigenéticos y si existe alguna perturbación en el material genético de los espermatozoides, puede resultar en infertilidad masculina. Algunos de los eventos que forman parte de la espermatogénesis pueden ser afectados por estas perturbaciones en la epigenética e integridad del material genético que están involucrados en la formación del espermatozoide, los cuales son: condensación de los cromosomas, enzimas acrosomales no funcionales, microdelecciones y empaquetamiento del DNA dentro del núcleo del espermátide. Este último evento, tiene gran impacto en la formación de la cabeza del espermatozoide y si existe un mal empaquetamiento puede producir globozoospermia (Zamudio *et al.*, 2008).

Otra de las anomalías epigenéticas que pueden afectar considerablemente el proceso de fecundación está en el acrosoma, ya que este puede presentar malformaciones incluyendo anomalías a nivel fisiológico, afectando la funcionalidad de las enzimas como son las hialuronidasa, acrosín, pro-acrosín, fosfatasa, aril sulfatasa, colágenasa, fosfolipasa C, beta galactosidasa, N- acetilglucosamina y galactosil transferasa. El daño del DNA es factor importante en la línea celular germinal ya que juega un papel importante en la espermiogénesis, se ha reportado que la eficacia de la protaminación de la cromatina en el espermatozoide está altamente correlacionada con el daño genético, teniendo como resultado una morfología espermática aberrante (Aitken *et al.*, 2011). Las anomalías también pueden presentarse en



Los proteosomas (Ortega, 2012). Los proteosomas participan en la función reguladora de la activación de las enzimas encargadas de la penetración del espermatozoide al óvulo. Los estratos para la degradación proteosomal están presentes en las capas del acrosoma en forma de proteínas ubiquitinadas receptoras de esperma. Alguna alteración en la funcionalidad proteosomal del espermatozoide interfiere en el proceso de fertilización. Los proteosomas acrosomales espermáticos están localizados extracelularmente (Yang *et al.*, 2006; Sutovsky, 2010).

Las alteraciones en las ubiquitinas reguladoras de enzimas involucradas en la funcionalidad de los proteosomas resultan en una morfología espermática anormal, tal es el caso de la pérdida del gen que codifica para la ubiquitina de tipo E2 que forma un conjugado con la enzima HR6B para su activación, si este conjugado no está presente trae como consecuencia una elongación aberrante del espermatozoide (Sutovsky, 2010).

Fertilidad Masculina

Es la capacidad, por parte del varón, de lograr un embarazo clínico antes de 12 meses o más de relaciones sexuales no protegidas. En el caso de la infertilidad este hecho no se logra, una de las causas es debido a una baja calidad seminal que puede ser causada por problemas físicos, hormonales, por el estilo de vida o factores ambientales. Alrededor de un tercio de las veces, la infertilidad es un problema por parte del hombre (Organización Mundial de la Salud).

Tomando en cuenta esto, se sabe que los hombres que tienen problemas de fertilidad pueden tener anomalías genéticas en su cariotipo que son potencialmente transmisibles, que incluyen desórdenes cromosómicos numéricos y estructurales. En la evaluación de la infertilidad la identificación de alteraciones cromosómicas puede arrojar a la luz información sobre estos mecanismos que afectan a la fertilidad (Angudio *et al.*, 2008).

Hombres con esterilidad y con variedades de sub-fertilidad muestran anomalías morfológicas en los espermatozoides y genéticas en los cromosomas (Zamudio *et al.*, 2008). Ya que todo el proceso espermatogénico y espermiogénico está regulado mediante la epigenética, alguna alteración en estos procesos y en la integridad del material genético puede ser producido por cambios heredables mitóticos y meióticos produciendo un fenotipo celular aberrante (Zamudio *et al.*, 2008).

La importancia de la morfología del espermatozoide para estimar la calidad espermática está reconocida desde los primeros trabajos que realizaron MacLeod y Gold en 1951 (Tomado de: Maroto, 2012). Este tipo de evaluación espermática está incluida dentro del espermiograma convencional, siendo una de las pruebas más importantes (Maroto, 2012). La evaluación del número de espermatozoides anormales se realiza mediante los protocolos establecidos por la OMS, 2010.

El valor mínimo de espermatozoides normales ha ido a la baja desde 1992 ya que el límite mínimo de espermatozoides normales era del $\geq 30\%$ de EN (OMS, 1992) y para el año de 1999 fue de $\geq 15\%$ de EN (OMS, 1999) teniendo como valor actual, $\geq 4\%$ de EN (OMS, 2010). Las anomalías en los espermatozoides pueden ser relativamente altas, ya que estas se pueden presentar en las distintas estructuras del espermatozoide, pueden ser en cabeza, flagelo y en la pieza media. Para que a un paciente se le considere normal, el porcentaje de los **espermatozoides normales (EN)** debe de ser $\geq 4\%$, de lo contrario se le considerara teratozoospermico (aumento en el número de espermatozoides anormales) y se infiere que tiene problemas de fertilidad (Organización Mundial de la Salud, 2010).

Características de espermatozoides normales

Estos deben ser con la cabeza de circular a ovalada, la pieza media con forma regular, sin residuos citoplasmáticos, el flagelo debe estar alargado recto, sin ningún tipo de enroscamiento, además de no presentar residuos citoplasmáticos (Figura 8; OMS, 2010).

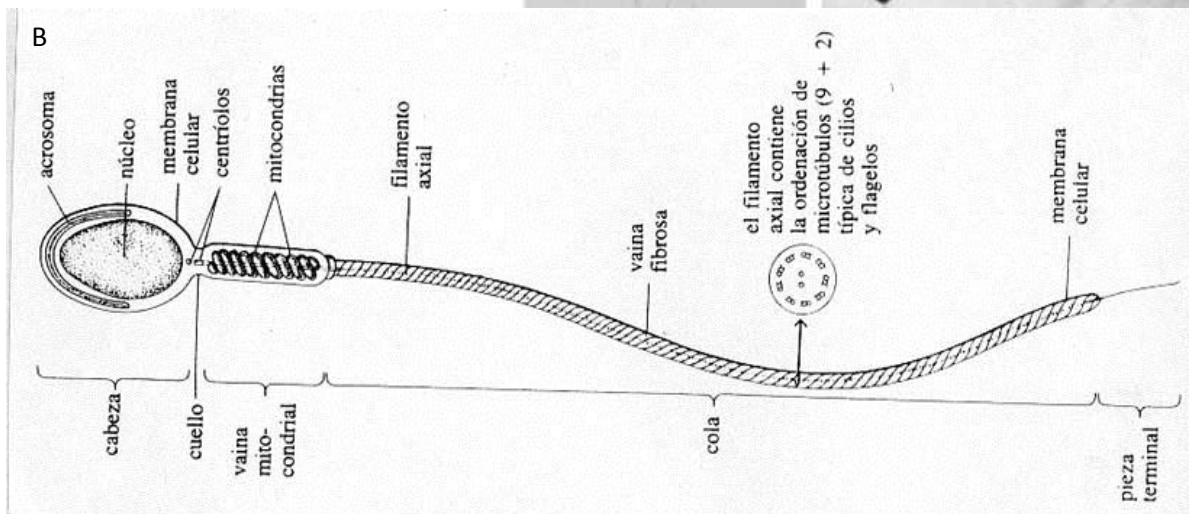
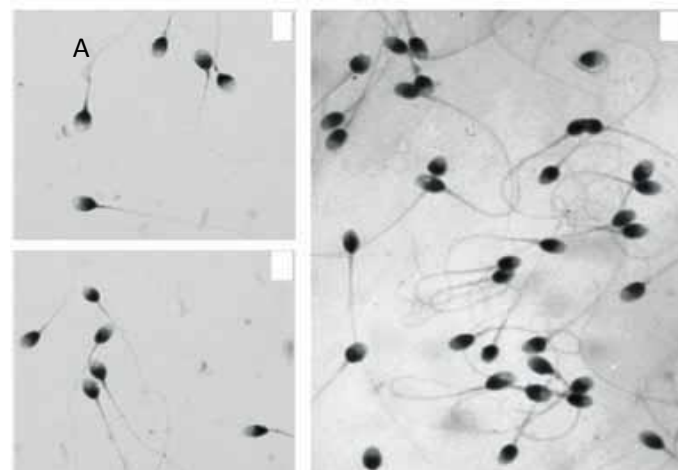


Figura 8. Morfología de un espermatozoide normal, A: tinción con nigrosina y B: esquema de los componentes de un espermatozoide (OMS, 2010).

Alteraciones morfológicas en el espermatozoide:

Cabeza: Puede presentar cabeza grande, pequeña, pequeña elongada, periforme, amorfa vacuolada, doble elongado o periforme, o cualquiera combinación entre estas opciones. La mayoría de las deformaciones en la cabeza es por un mal desarrollo en el acrosoma y la globozoospermia (Figura 9).

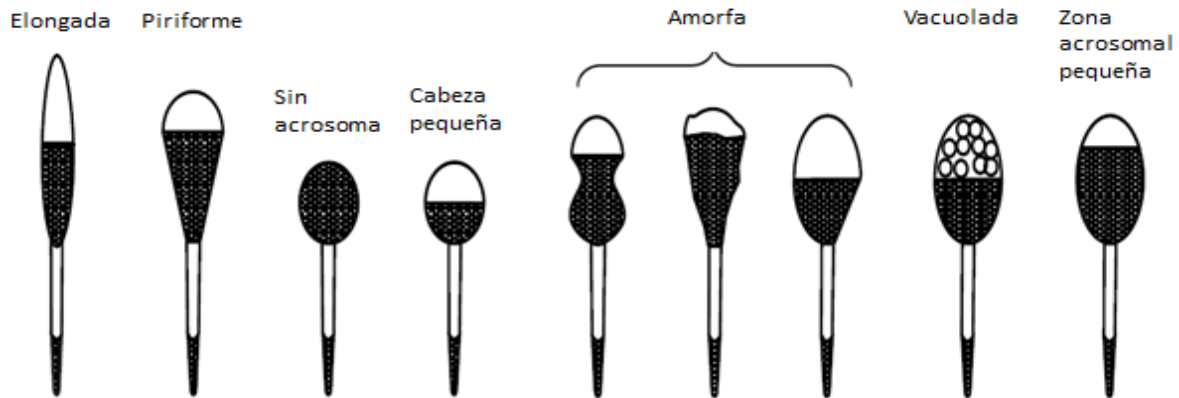


Figura 9. Anormalidades morfológicas del espermatozoide que se pueden presentar en cabeza (OMS, 2010).

Flagelo: Puede presentar más de un flagelo, ser corto, en forma de horquilla, quebrado, enrollado, irregular, o inclusive con algunas gotas citoplasmáticas terminales (Figura 10).

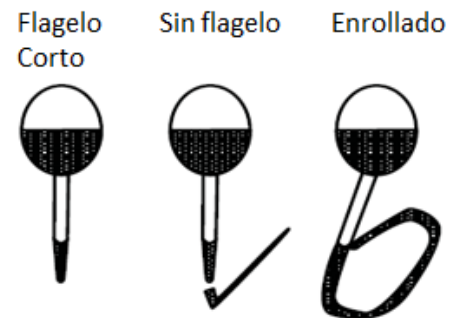


Figura 10. Anormalidades morfológicas en el espermatozoide que se puede presentar en flagelo (OMS 2010).

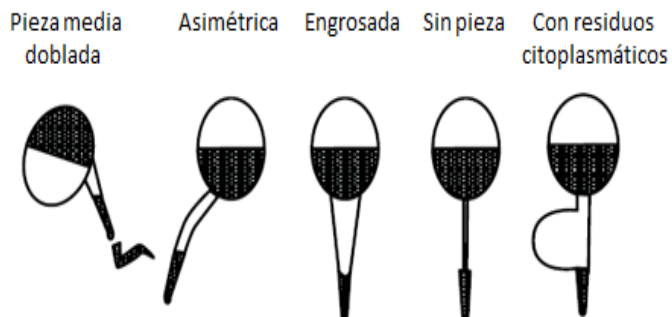


Figura 11. Anormalidades morfológicas en el espermatozoide que se pueden presentar en pieza media (OMS, 2010).

Pieza Media: Puede estar doblado, formas irregulares, quebrada, delgada, ausencia de vainas mitocondriales, muy gruesa, con presencia de gotas citoplasmáticas (Figura 11).



Justificación

Uno de los problemas de fertilidad dependientes del factor masculino está relacionado con el aumento del número de espermatozoides anormales (teratozoospermia), esta condición se encuentra relacionada, principalmente, con alteraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales transmisibles a la descendencia, por lo que el análisis de la morfología espermática acompañado del estudio cromosómico es importante como un parámetro para la evaluación de la fertilidad y la herencia de síndromes ligados a daño en el material genético. Sin embargo, en los últimos años el porcentaje de espermatozoides normales (morfología espermática) tiende a la baja, teniendo como parámetro 30% de espermatozoides normales (EN) como mínimo, en el año de 1992 para considerarse normal, en el año de 1999 el valor decayó a 15% de EN y para el 2010 el valor se encuentra en 4% de EN, todos publicados por La Organización Mundial de la Salud, este último valor de EN es muy bajo y debe considerarse como valor inferior para la morfología espermática ya que a valores de morfología espermática mayores a 4% podría encontrarse anomalías cromosómicas considerables.

Hipótesis

Si la morfología del espermatozoide está relacionada con las aberraciones cromosómicas (AC), entonces los individuos con teratozoospermia presentan mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas en células somáticas.

Objetivo General

Analizar 100 muestras seminales de donantes de la FES Zaragoza realizando una espermatobioscopía según el protocolo de la OMS 1999 y del 2010 como límite inferior de referencia para evaluar la calidad seminal y correlacionarla con el estado cromosómico de los individuos teratozoospermicos.

Objetivos Particulares

- Evaluación de la calidad seminal mediante espermatobioscopía directa.
- Establecer la condición de teratozoospermia mediante el análisis de la morfología espermática.
- Analizar los resultados obtenidos en este estudio al referirlos a valores estándares de calidad seminal propuestos por la OMS en 1999 y 2010.
- Analizar el daño cromosómico de varones teratozoospermicos mediante cariotipo de células linfocíticas.



Metodología

a) Calidad seminal: Espermatobioscopia

De 100 varones de la FES Zaragoza se obtuvo por masturbación muestras de semen que fueron etiquetadas y procesadas mediante el protocolo establecido por la OMS 1999. Para cada muestra se realizaron 2 conteos de 200 espermatozoides, de cada parámetro: progresión espermática (donde se evalúan rápidos, lentos, *in-situ* y sin movimientos), viabilidad espermática (vivos y muertos), densidad espermática (cantidad de espermatozoides por mililitro) y la morfología espermática así como también los parámetros físicos como volumen, pH, color, y viscosidad.

b) Análisis de la morfología espermática

La morfología espermática es un factor muy importante en el análisis de la salud genética del producto ya que si la integridad del material genético presenta daño puede transmitirla a su descendencia. Este parámetro se basa en la apariencia de los espermatozoides de una muestra obtenida por masturbación. Los análisis se basan en la revisión de cada una de las estructuras de un espermatozoide (cabeza, flagelo y pieza media), las cuales pueden presentar alguna alteración en la forma, lo que afecta en la capacidad de fertilización, por lo que su análisis es muy importante en el examen de fertilidad. Para la observación de cada una de las estructuras de los espermatozoides se necesitó teñirlos mediante la técnica de Hemacolor.

c) Técnica de Hemacolor

Por cada donante se realizaron dos frotis con 10 μ l de muestra seminal tratando esparcir la muestra uniformemente y puestas a secar al aire. Los frotis se hidrataron con baños en etanol al 100%, 90%, 70% durante un minuto por cada uno, posteriormente los frotis fueron colocados en agua corriente durante 5 minutos y en agua destilada por 1 minuto. La coloración de los frotis fue con una solución de Hematoxilina alumínica de Harris durante 5 min, eliminando el exceso de colorante con alcohol al 70% para que sólo los núcleos y componentes basófilos quedasen teñidos, después con agua corriente 2 minutos y agua destilada 1 minuto. Posteriormente los frotis fueron teñidos con una solución de Eosina durante 5 minutos eliminando el exceso con agua destilada. La deshidratación de los frotis fue mediante baños en soluciones de alcohol al 70%, 90% y 100% durante un minuto en cada uno. Por último los frotis fueron sometidos en dos baños, en xilol al 70% y al 100% durante un minuto y se dejaron secar al aire (Merck; Dermstadt, Alemania).

Se contaron 100 espermatozoides de cada una de las laminillas y se analizó la morfología de la cabeza, flagelo y la pieza media de los espermatozoides. Según la OMS 1999, el porcentaje de espermatozoides normales debe de superar el 15% para considerarse normal la morfología espermática, si es el caso contrario se dice que tiene teratozoospermia (Figura 12 y 13).

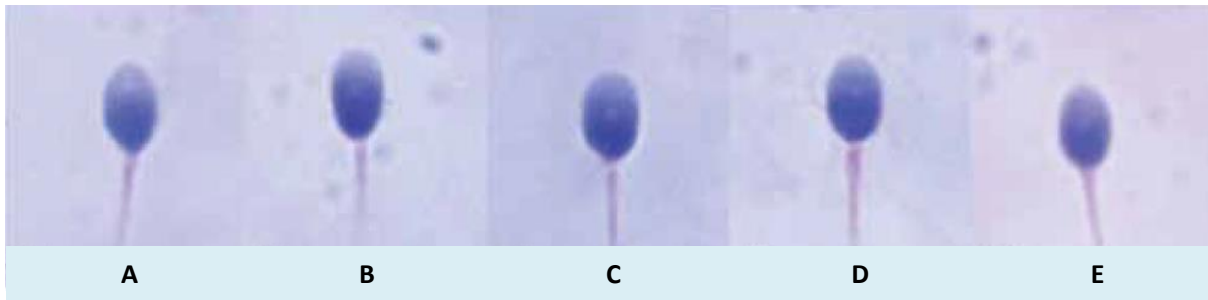


Figura 12. Espermatozoides con morfología normal A, B, C, D y E (OMS, 2010).

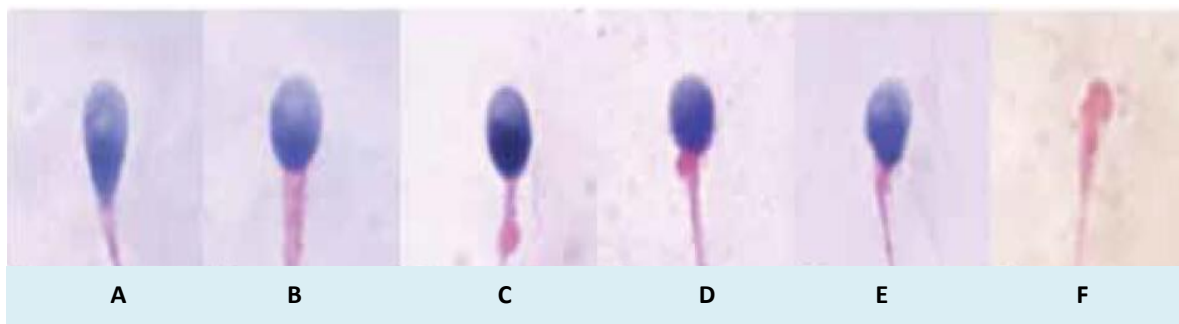


Figura 13. Espermatozoides con morfología anormal; A, espermatozoide con cabeza alargada; B, espermatozoide con pieza media engrosada; C, D y E, espermatozoides con residuos citoplasmáticos en la pieza media; F, espermatozoide sin cabeza (OMS, 2010).

A los donantes cuyo porcentaje de espermatozoides normales (morfología espermática) está por debajo del 15% se les realizó análisis de ensayo cromosómico a partir de una muestra de sangre periférica. Este procedimiento también se realizó en donantes cuyo valor de morfología espermática fue mayor a 15% para comparar y observar diferencias significativas.

d) Cultivo de linfocitos

Siembra:

Obtención de la muestra de sangre periférica de individuos teratozoospermicos y normozoospermicos. El procedimiento se realizó con una jeringa con heparina, para evitar la coagulación de la muestra. De la sangre obtenida se colocaron de 12 a 14 gotas de sangre en medio de cultivo RPMI-1640 (5 ml) activado con 100 μ l de Fitohemaglutinina. Incubando durante 48 horas a 37°C.



Cosecha:

Antes de terminadas las 48 horas (2 horas antes), se colocaron 200 µl de Colchicina (8 ug/ml, concentración final) por 5 ml de medio RPMI. Pasadas las 48 horas las muestras se centrifugaron durante 5min a 3500 rpm y se eliminó el sobrenadante. Añadiendo 5 ml de solución hipotónica de KCl (a 37°C) al 0.075 M para posteriormente incubar durante 35 min a 37 °C. Posteriormente, acabado el tiempo de incubación con solución hipotónica, se prefijaron las muestras con Carnoy (3:1) agitando durante el proceso para después centrifugar la muestra durante 15 min a 3500 rpm y eliminar el sobrenadante. Para los lavados se utilizó 5 ml de Carnoy (3:1) agitando durante el proceso, después se centrifugo durante 5 min a 3500 rpm eliminando el sobrenadante. El lavado con Carnoy se repitió de 3 a 5 veces o hasta que la muestra quedo transparente o lo más clara posible. Después de los lavados el botón celular debe de estar claro y se re-suspende en 0.5 ml de fijador fresco.

Elaboración de preparaciones cromosómicas:

Se elaboraron las laminillas por goteo del botón celular obtenido a una altura mayor a 1.6 m, para el buen esparcimiento de los cromosomas, las laminillas fueron previamente refrigeradas a -4°C durante 20 min.

Para la observación de estas laminillas se tiñeron con Giemsa durante 10 min, lavando con agua destilada para quitar el exceso de colorante, después se dejaron secar y por último se revisaran al microscopio con un objetivo de 100X.

En este momento se obtuvo el **Índice Mitótico**, evaluando mil células totales (tomando en cuenta mitosis e interfaces), donde se aplicará la siguiente fórmula:

$$\text{Índice Mitótico: } \frac{\text{Total de células en mitosis}}{1000 \text{ células totales}} \times 100$$

Observación de los cromosomas

Por donante se analizaron 25 células en metafase, observando si existen anomalías en los cromosomas, tanto numéricas como estructurales. Se reportó el tipo de aberración y con qué frecuencia se presenta.



Análisis estadístico

Las aberraciones cromosómicas y los parámetros espermatobioscopicos de se analizaron por la prueba de t-Student y los Índices Mitóticos mediante una prueba de "Z". En todos los casos se consideró como significativo cuando $p < 0.05$.

Resultados y análisis de resultados

Teniendo las espermatobioscopias analizadas de todos los donantes se observó que ninguna de estas presentaban una Morfología Espermática por debajo del valor límite establecido por la OMS 2010 (4% de EN), por lo tanto se tomó el parámetro de la OMS de 1999 para el análisis de la morfología. Los valores obtenidos en las espermatobioscopias se muestran en la Tabla 1.

Calidad seminal: Espermatobioscopias

De las 100 muestras analizadas, mediante la espermatobioscopia directa solo 94 fueron tomadas para el presente estudio, los resultados están registrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados obtenidos de las espermatobioscopias de los donantes de la FES Zaragoza. NL= normal, NN= anormal, para densidad o morfología.

Donante	Volumen (ml)	Viscosidad	Licuefacción	Color	pH	Progresión (%)	Viabilidad (%)	Morfología (Normales, %)	Densidad ($\times 10^6$ /esp*ml)
NL-6	1	Hilo	completa	amarillento	8	72	73	34.3	52.75
NL-7	4.3	Gota	completa	opalescente	8	51.5	61.5	27	35.25
NL-8	3.5	Gota	completa	amarillento	8	65	65	43	89.25
NL-9	2	Gota	completa	opalescente	9	62	72.5	37	44.73
NL-10	1	Hilo	completa	amarillento	9	55.25	58.75	60.25	48.25
NL-11	1	Gota	completa	opalescente	8	33	80.09	29	18.35
NL-12	2	Hilo	completa	opalescente	10	51	72	54	10.65
NL-15	2	Gota	completa	opalescente	8	82	78	41	163.5
NN-16	1.6	Gota	completa	opalescente	9	16	74.75	57.75	12.7
NL-17	4	Gota	completa	opalescente	8	75	81.46	31.05	113.166
NN-18	4	Gota	completa	amarillento	8	72.75	70	47.75	255.7
NL-20	1.5	Gota	completa	opalescente	8	39.21	63.18	40.59	222.33
NL-21	4.1	Hilo	completa	amarillento	8	62	68.25	52	47.625
NL-22	1	Hilo	completa	opalescente	9	47	60.25	34.5	57.25



Continuación Tabla 1



Donante	Volumen (ml)	Viscosidad	Licuefacción	Color	pH	Progresión (%)	Viabilidad (%)	Morfología (Normales, %)	Densidad (x10 ⁶ /esp*ml)
NL-23	1.5	Gota	completa	amarillento	9	68.25	70.75	60.5	38.63
NL-24	0.9	Gota	completa	opalescente	9	68.3	83.25	17	48
NL-25	2	Gota	completa	opalescente	8	77	72.5	23.5	136
NL-26	6.4	Gota	completa	amarillento	8	65.75	70.25	48	136
NL-29	2	Hilo	completa	opalescente	8	74.35	78	31.37	61.5
NN-30	6	Hilo	completa	amarillento	8	57.4	72	30.73	14.45
NL-31	1	Hilo	completa	opalescente	8	57.3	84.57	23.9	58.37
NL-32	1	Gota	completa	opalescente	8	48.06	60.25	31	69
NL-33	0.5	Hilo	completa	opalescente	8	50	63.36	23.3	21.8
NL-34	0.5	Gota	completa	opalescente	8	54.5	78	30	29.35
NL-35	8.2	Gota	completa	amarillento	9	64.5	88	44.5	82.75
NL-36	3.6	Gota	completa	amarillento	8	72.5	83	52.25	50.125
NL-37	2.5	Hilo	completa	opalescente	8	63.13	79.03	15.7	105.25
NN-38	1	Hilo	completa	amarillento	9	21.5	72.75	15.75	13.9
NL-39	1	Gota	completa	opalescente	9	55.75	79.25	37	68.37
NL-40	2.5	Hilo	completa	amarillento	8	46.25	79.5	45.75	28.5
NL-41	2	Gota	completa	opalescente	8	72.49	90.65	22.29	70
NL-43	5.5	Hilo	completa	amarillento	8	51.72	64.43	35.02	39.87
NN-44	1.5	Hilo	completa	opalescente	8	39.14	48.5	29.55	4.6
NL-45	3	Gota	completa	amarillento	9	61.5	71.25	42	108.25
NL-46	3	Gota	completa	amarillento	8	62.75	75.75	49.5	49
NL-47	3.8	Hilo	completa	opalescente	8	35.5	74.2	17.64	118.33
NL-48	5.5	Hilo	completa	opalescente	8	59.99	70	42.3	100.5
NL-49	1	Gota	completa	opalescente	8	55.49	53.73	32.21	31
NL-51	3.8	Hilo	completa	opalescente	8	65.55	76.3	55.7	58.75
NL-52	5.8	Hilo	completa	opalescente	8	69.98	62.5	56.75	134.5
NL-53	1.5	Hilo	completa	opalescente	8	42.84	77	40.5	164.6
NL-54	2	Hilo	completa	opalescente	8	72	53.9	27.67	46.91
NL-55	3.7	Hilo	completa	opalescente	8	42.53	60.75	32.56	87.25
NL-56	2	Hilo	completa	opalescente	8	55.59	90.2	36.5	80.5
NL-57	0.8	Gota	completa	opalescente	8	60.25	65.5	51.75	118.5
NN-58	2.3	Hilo	completa	opalescente	8	16.25	43.23	25.5	16.8
NL-59	4.5	Gota	completa	opalescente	8	66.82	76.11	40.97	119.5
NL-60	2.3	Hilo	completa	opalescente	8	46.5	80	35.35	144
NL-61	2	Hilo	completa	opalescente	8	65.1	78.6	17.5	68.25
NL-62	2.4	Gota	completa	opalescente	8	51.16	83.25	67.75	159.75
NL-63	3.5	Gota	completa	opalescente	8	29.19	73.8	21.54	30.125
NL-64	1	Hilo	completa	opalescente	8	65.34	58.41	28	169.16
NL-65	3.5	Gota	completa	opalescente	8	60	69.06	45.39	79
NL-66	4.9	Gota	completa	opalescente	8	62.09	72.75	30	179



Continuación Tabla 1

Donante	Volumen (ml)	Viscosidad	Licuefacción	Color	pH	Progresión (%)	Viabilidad (%)	Morfología (Normales, %)	Densidad (x10 ⁶ /esp*ml)
NN-67	2.8	Gota	completa	opalescente	8	26	40.25	33.25	6.15
NL-68	1	Hilo	completa	opalescente	8	55.95	70.5	41.5	57.75
NL-69	2.5	Hilo	completa	opalescente	8	42.74	63.09	32.17	120.75
NL-70	2.1	Gota	completa	opalescente	8	57.25	76.25	36.75	124.25
NL-71	1.8	Hilo	completa	opalescente	8	34.69	41.14	25.11	25.33
NL-72	2.8	Gota	completa	opalescente	8	70.75	69.36	53.06	119.75
NL-73	2.5	Hilo	completa	opalescente	8	47.25	71	29	38.125
NL-74	3.5	Gota	completa	opalescente	8	50.35	79.5	56.25	45.25
NL-75	2	Gota	completa	opalescente	8	82.39	78.08	25.84	115.25
NL-76	1.3	Hilo	completa	opalescente	8	40.25	58.5	21.25	31.52
NL-77	2.5	Hilo	completa	opalescente	8	57	62.5	39	71.87
NL-78	1	Hilo	completa	opalescente	8	63.5	70	43.8	54.87
NL-79	2	Hilo	completa	opalescente	8	51	83	17.5	60.62
NL-80	1.9	Hilo	completa	opalescente	8	63.25	77	20.5	60.87
NL-81	2	Gota	completa	amarillento	9	71.25	68.25	48.75	120.75
NL-82	2	Hilo	completa	opalescente	8	38.06	79.04	22.48	36.87
NL-83	0.5	Gota	completa	opalescente	8	68.99	75.53	19.62	103.66
NL-85	5	Gota	completa	amarillento	9	69.75	73.75	23.25	103.5
NL-86	2.5	Hilo	completa	opalescente	8	20.25	63.25	18	29.37
NL-87	6	Hilo	completa	opalescente	9	62	77.5	38.25	98.25
NN-88	1	Gota	completa	opalescente	8	39.25	59.75	11.75	71.75
NL-89	4	Gota	completa	opalescente	8	54.3	80.08	23.87	155.37
NN-90	1	Hilo	completa	opalescente	8	57.85	81	11.5	33.12
NN-91	1.5	Hilo	completa	opalescente	8	17.5	55	31.25	87.37
NN-92	2.9	Gota	completa	opalescente	8	30	69.25	45	127.5
NN-93	2	Hilo	completa	opalescente	8	50.75	81.25	12.25	36
NN-94	3	Gota	completa	opalescente	8	34.25	78	26.25	20
NN-95	3.5	Gota	completa	opalescente	8	39.5	63	17.75	38
NN-96	2.5	Hilo	completa	opalescente	8	27.37	74.5	33.25	186.5
NN-97	0.8	Hilo	completa	opalescente	8	55	64.21	50.4	153
NL-98	8.4	Hilo	completa	opalescente	8	49.25	82.25	30.5	197.5
NN-99	4.3	Hilo	completa	opalescente	8	57.15	80.75	8.1	180.5
NN-100	4	Hilo	completa	opalescente	8	41.5	71.5	11.25	71.125
NL-101	4.1	Hilo	completa	opalescente	8	50	81.5	17.65	77.37
NN-102	4.2	Hilo	completa	opalescente	8	78	68	14.75	66.87
NL-103	5.1	Gota	completa	opalescente	8	66.3	66	35.7	125.5
NL-105	2	Hilo	completa	opalescente	8	78.75	86.25	37	30.62
NL-107	5	Hilo	completa	opalescente	8	66.5	77.75	19.75	156.75
NL-108	4.7	Hilo	completa	opalescente	8	78	58.5	16.5	200.15
NL-109	3.3	Hilo	completa	opalescente	8	82.75	72.75	19.75	136.25



Donante	Volumen (ml)	Viscosidad	Licuefacción	Color	pH	Progresión (%)	Viabilidad (%)	Morfología (Normales, %)	Densidad ($\times 10^6$ /esp*ml)
Medias/E.S	2.76 \pm 0.17				8.16 \pm 0.04	54.94 \pm 1.64	71.18 \pm 1.05	33.22 \pm 1.39	83.91 \pm 5.71
OMS 1999	>2				7.5-8.5	>50	>75	>15	20-200
OMS 2010	>1.5					>40	>58	>4	15-200
Desviación Estándar	1.68				0.39	7.23	10.23	1.39	32.61

Muestra los resultados de las Espermatozoides directas, tanto resultados físicos como citológicos, los donadores marcados con color rojo son aquellos que el valor de su morfología espermática está por debajo del rango establecido por la OMS 1999 y OMS 2010; Mientras que los donadores marcados con azul muestran algún parámetro fuera del rango normal establecido por la OMS 1999 y OMS 2010.

Nota: las primeras 5 muestras (donantes 1-5) de donantes se utilizaron para estandarizar la metodología de la Espermatozoides directa, además se descartaron muestras por una mal concordancia de los datos teniendo 94 muestras espermáticas como total.

Parámetros físicos seminales

Volumen seminal

Del total de donantes sólo 29 de estos tienen un volumen de eyaculado inferior del valor estándar y 2 por arriba del límite superior, pero el promedio del volumen muestral ($\bar{x}=2.76 \pm 0.17$) cae dentro del rango normal establecido por la OMS 1999, >2 ml (Figura 14) de igual manera para el valor de volumen establecido por la OMS 2010 (>1.5 ml).

En términos de número de donantes, 63 de ellos tuvieron un volumen de eyaculado normal. Los donantes fueron divididos en tres grupos: **volumen normal** ($\bar{x}=3.35\pm 0.15$), **volumen bajo** ($\bar{x}=1.1\pm 0.06$) y **volumen alto** ($\bar{x}=8.3\pm 0.1$).

Mediante el análisis estadístico con una $p < 0.05$, se determinó que existen diferencias significativas entre los grupos, **volumen normal** contra **volumen bajo** y **volumen normal** contra **volumen alto** (Tabla 4).

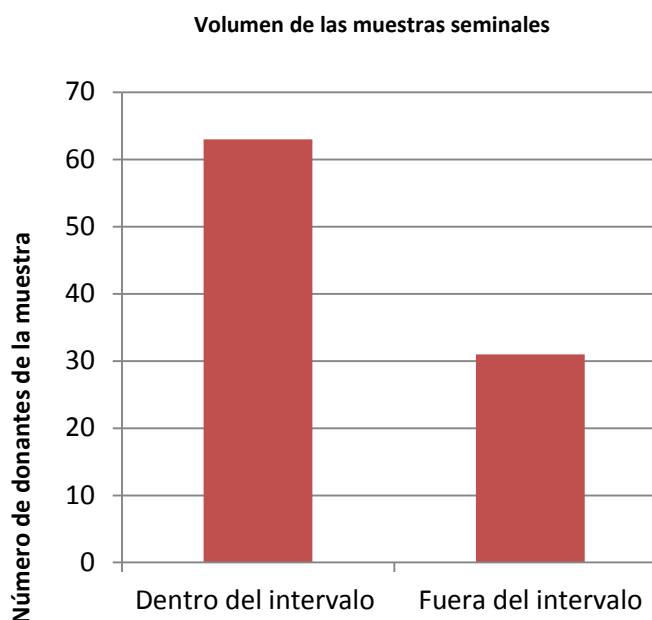


Figura 14. Muestra los donantes que están dentro del rango de volumen seminal permisible por la OMS y los que están fuera del rango.

Viscosidad seminal

Es un parámetro que solo tiene dos variables apreciables a simple vista, **Gota** o **Hilo**, la muestra no mostró una tendencia entre estas dos variables. En total se tiene 44 casos con viscosidad en Gota mientras que 50 la presentan en Hilo (Figura 15), siendo la viscosidad de tipo Gota la normal según lo establecido por la OMS. Si la viscosidad aumenta tendiendo a formar un hilo puede aumentar la dificultad para determinar otras características espermáticas como la movilidad y la concentración de los espermatozoides (Poirot *et. al.*, 2005). Cuando la muestra es altamente viscosa, puede ser debido a una disfunción prostática o eyaculación frecuente por parte del donante (OMS, 1999).

Viscosidad de las muestras seminales

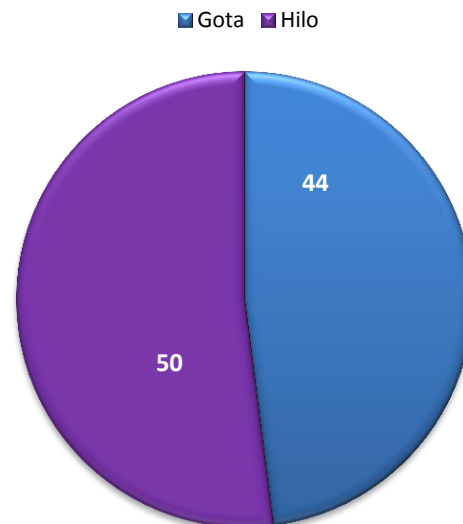


Figura 15. En la muestra total se presentan 50 donantes con viscosidad seminal en Hilo mientras que 44 son de tipo Gota.

pH de las muestras seminales

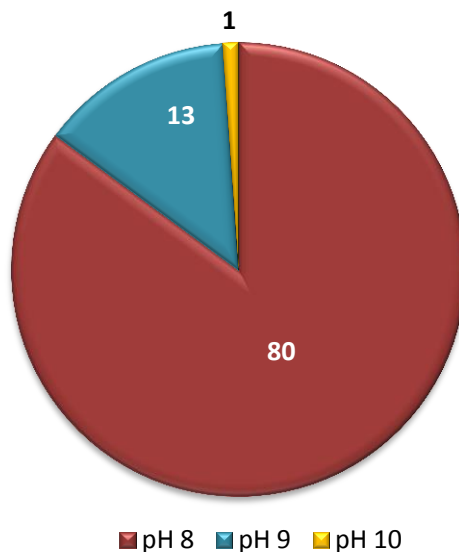


Figura 16: Muestra la cantidad de donantes que presentan cada tipo de pH en toda la muestra seminal, observándose que el pH de 8 es el más frecuente con 80 casos.

pH seminal

Este parámetro puede variar mucho dependiendo del individuo, pero se puede observar que permanece en un rango que va de 8 a 10, siendo un pH de 8 el valor que se presenta con más frecuencia. En toda la muestra se presentan 80 casos con pH 8, 13 casos con pH 9 y un caso con pH 10 (Tabla 1; Figura 16). Los donantes se dividieron en dos grupos: **pH=8** con 80 casos ($\bar{x}=8\pm 0.0$) y **pH>8** con 14 casos ($\bar{x}=9.07\pm 0.07$).

Mediante el análisis estadístico con una $p<0.05$ se presentó que existe diferencia significativa entre los grupos **pH=8** y **pH>8** (Tabla 4).

Color seminal

Dependiendo de los hábitos del donante este puede tener muchas variantes, sin en cambio este rubro en nuestra muestra se observó poco variable, solo dos coloraciones. En la muestra se presentaron solo 15 casos con una coloración amarillenta y 79 casos con una coloración opalescente (Figura 17). La coloración opalescente se considera como normal según lo establecido por los manuales para el análisis de la calidad seminal de la OMS 1999 y 2010. En el caso de presentar una coloración parda/amarillenta se puede sugerir en una hemospermia (presencia de sangre en el líquido seminal) y puede incluso que aparezca sangre en la orina y semen; causado por micro-traumatismos o intensa actividad sexual. En este caso es aconsejable una consulta urológica (Poirot *et al.*, 2005; García *et al.*, 2012).

Color del semen de los donantes

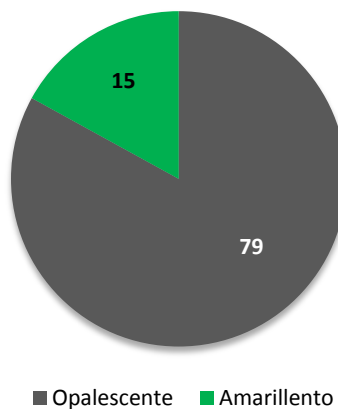


Figura 17. En la muestra 15 casos presentaron una coloración seminal amarillenta y 79 casos con una coloración opalescente.

Parámetros Citológicos seminales

Viabilidad Espermática

El promedio de viabilidad espermática de la muestra total es de 71.618 ± 1.05 (Tabla 1), el cual está fuera del rango normal establecido por la OMS 1999 (75%, Tabla 1) y dentro del la OMS 2010 (58% Tabla 1); 56 donantes tienen un valor de viabilidad por debajo del rango estándar de la OMS 1999, pero al compararlos con los valores establecidos por la OMS 2010, el número de

donantes por debajo de lo estándar disminuye (a 6 donantes), lo que nos indica que la calidad espermática va decayendo conforme al tiempo por lo cual los límites inferiores establecidos por la OMS son obligados a descender (Figura 18). La muestra de donantes se dividió en dos grupos: **donantes con viabilidad normal** ($\bar{x}=80.38\pm 0.6$) y **donantes con viabilidad baja** ($\bar{x}=64.94\pm 1.11$), los cuales con una $p<0.05$ mostraron diferencias significativas (Tabla 4).

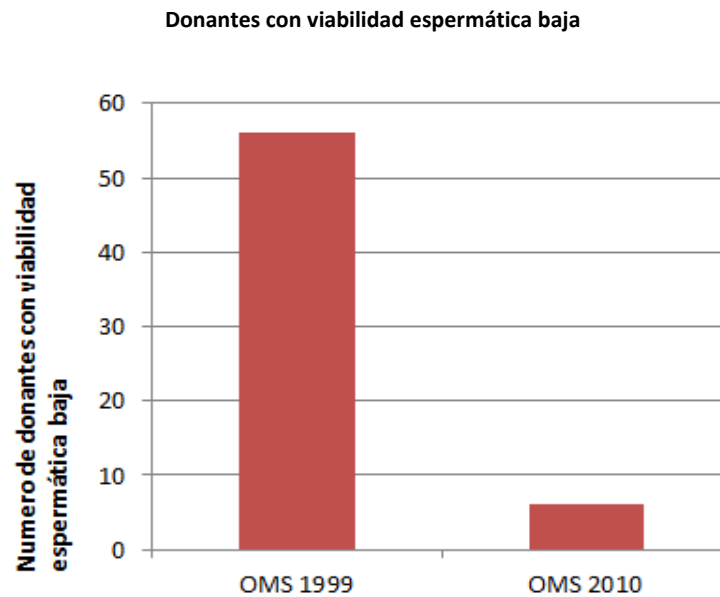


Figura 18. Muestra el número de donantes con baja viabilidad espermática, comprándolos entre los dos valores establecidos por la OMS 1999 y OMS 2010.

Viabilidad espermática

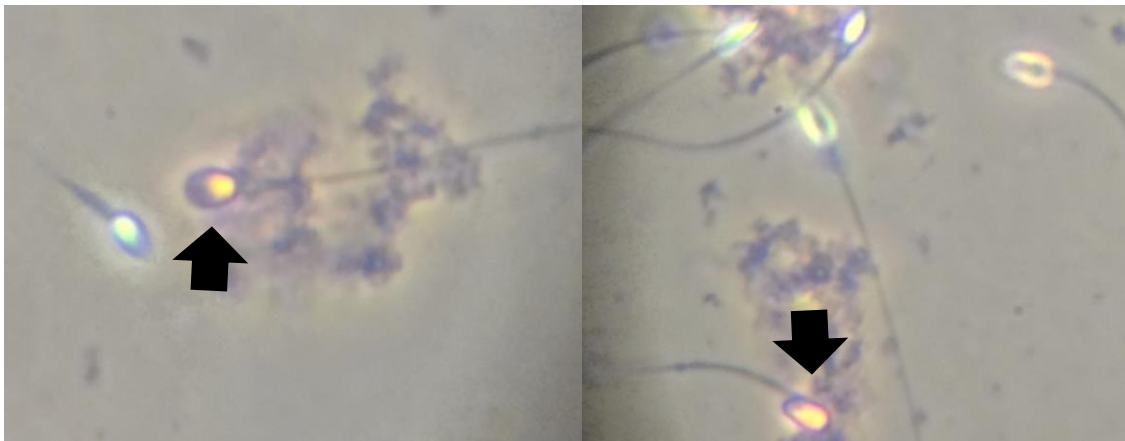


Figura 19. Evaluación de la viabilidad de los espermatozoides mediante la tinción de eosina, de rojo son los espermatozoides muertos, mientras que los blancos están vivos (100X).

Progresión Espermática

La media de la muestra total es de 54.94 ± 1.64 (Tabla 1) lo que nos dice que la muestra cae dentro del rango normal para este rubro según el valor de la OMS 1999 (+50%, Tabla 1), de igual manera para el valor de la OMS 2010 (+40%, Tabla 1). Solo 29 donantes están por debajo del rango mínimo establecido por la OMS 1999 y al compararlo con el establecido en el 2010 se encuentran 18 donadores están por debajo de los valores estándares (Tabla 1; Figura 20). La muestra se dividió en dos grupos: **donantes con progresión normal** ($\bar{x}=63.59 \pm 1.11$) y **donantes con progresión baja** ($\bar{x}=54.54 \pm 1.87$), los cuales con una $p < 0.05$ mostraron diferencias significativas (Tabla 4).

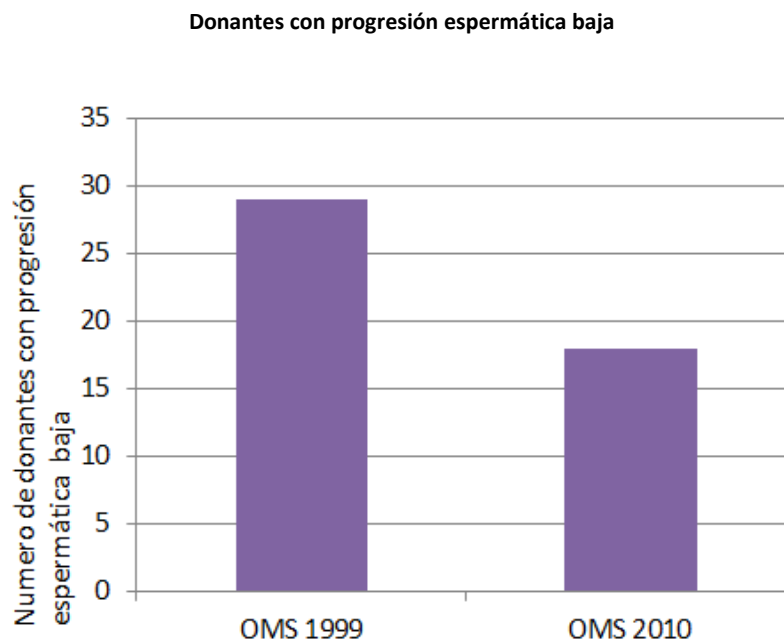


Figura 20. Muestra el número de pacientes con progresión espermática baja, comprándolos entre los dos valores establecidos por la OMS 1999 y OMS 2010.

Densidad Espermática

La media muestral de este rubro es de 83.91 ± 5.71 que está dentro de los límites inferior y superior considerados como normales por la OMS 1999 ($20-200 \times 10^6$ espermatozoides/ml), y al compararlo con el valor más reciente del 2010 de la OMS ($15-200 \times 10^6$ espermatozoides/ml) se sigue considerando estándar la media de la muestras (Tabla 1). Al observar las densidades espermáticas de cada individuo podemos observar que 1 donante sobrepasó el límite superior y 8 estuvieron por debajo del límite inferior según la OMS 1999 y para la OMS 2010 el número de donantes se modificó, teniendo 6 debajo del límite y 1 por arriba del límite (Figura 21).

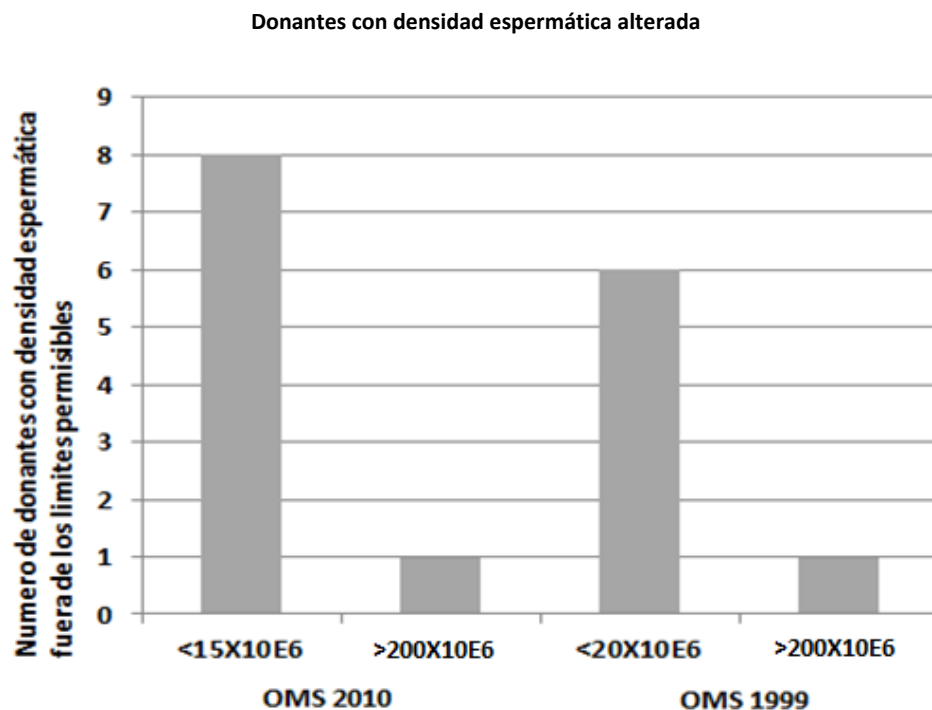


Figura 21. Muestra a los donantes con densidad espermática alterada, tanto mayor al límite superior y por debajo al límite inferior.

Las muestras fueron divididas en dos grupos según su valor de densidad espermática: **donantes con densidad baja** ($\bar{x}=12.42 \pm 2.22$) y **donantes con densidad normal** ($\bar{x}=89.67 \pm 7.19$), como solo se presentó un donante con densidad alta, por lo que no fue viable para análisis. Mediante pruebas estadísticas se determinó, con una $p < 0.05$, que el grupo con **donantes con densidad baja** y el grupo de **donantes con densidad normal** tiene diferencias significativas (Tabla 4).



Las muestras con una densidad menor al límite inferior (15×10^6 espermatozoides/ml., OMS 2010) nos indican oligozoospermia (pocos espermatozoides en el líquido seminal), las casusas pueden ser múltiples, pero a menudo son desconocidas. En algunos casos son por causas obstructivas y son determinadas por bioquímica seminal y en otros casos puede ser debido por causas secretoras, que son determinadas por estudios hormonales (Poirot et. al., 2005). En otros estudios se ha observado que la baja densidad espermática puede estar ligada a deleciones parciales o completas en el cromosoma Y y en el gen AZF (factor de azoospermia) (Martínez *et al.*, 2008).

De la Tabla 1 se tomaron a los donantes con valores de densidad y morfología espermática alterados según establecido por la OMS 1999 y 2010, esto para una mejor perspectiva de los datos de los donantes con estos dos parámetros alterados enfocándonos en la morfología espermática. En la Tabla 2 se aprecia que se encontraron solo 9 donantes con un valor de densidad alterado, de estos 8 donantes tiene una densidad baja y solo 1 donantes con densidad alta.

En cuanto a la morfología espermática cuando se consideró solo el valor de la OMS 2010 (<4% de EN) no se obtuvo ningún donante con teratozoospermicos, en cambio si se considera el valor para morfología espermática de la OMS 1999 (<15% de EN) se encontraron 6 donantes con este valor alterado, el primer dato nos permite pensar, en primera instancia, en considerar el valor de la OMS 1999 como punto de corte para considerar a un donante con teratozoospermia (Tabla 2).

Tabla 2. Donantes con los parámetros de densidad y morfología espermática alterados.

Donante	Morfología de Espermatozoides normales (%)	Densidad ($\times 10^6$ /esp*ml)
NN-11	29.00	18.35
NN-12	54.00	10.65
NN-16	57.75	12.70
NN-18	47.75	255.70
NN-30	30.73	14.45
NN-38	15.75	13.90
NN-44	29.55	4.60
NN-58	36.75	16.80
NN-67	33.25	6.15
NN-88	11.75	71.75
NN-90	11.50	33.12
NN 93	12.25	36.00
NN-99	8.10	180.50
NN-100	11.25	71.12
NN-102	14.75	66.87
OMS 1999	>15	20-200
OMS 2010	>4	15-200

Tabla 2. Muestra a los donantes con densidad espermática alterada de color azul y a los donantes con morfología espermática por debajo del parámetro establecido por la OMS 1999 ya que con el parámetro del 2010 no se reportó ningún caso.



Morfología Espermática

Se puede observar que ninguno de los 94 donantes muestra indicios de teratozoospermia ya que su nivel de espermatozoides normales está por arriba del 4%, que es el límite permisible según la OMS 2010. Mientras que si se toma el parámetro establecido por la OMS 1999 se presentan 6 individuos teratozoospermicos (Figura 22, Tabla 1 y Tabla 2). Al analizar el promedio de la morfología espermática de la muestra total ($\bar{x}=33.22\pm 1.39$; Tabla 1) está dentro del rango de morfología espermática normal enmascarando a los teratozoospermicos haciendo creer que la morfología espermática está dentro del estándar. Sin embargo, al separar la muestra de donantes en dos grupos: **teratozoospermicos** ($\bar{x}=11.6\pm 0.8$) y **normozoospermicos** ($\bar{x}=34.69\pm 1.3$) se observó que existen diferencias significativas entre ellos (Tabla 4).

Los espermatozoides con morfología anormal nos hacen inferir un daño en su material genético, por lo que se consideró necesario realizar el cariotipo por individuo para analizar ese rubro (Zamudio *et al.*, 2008).

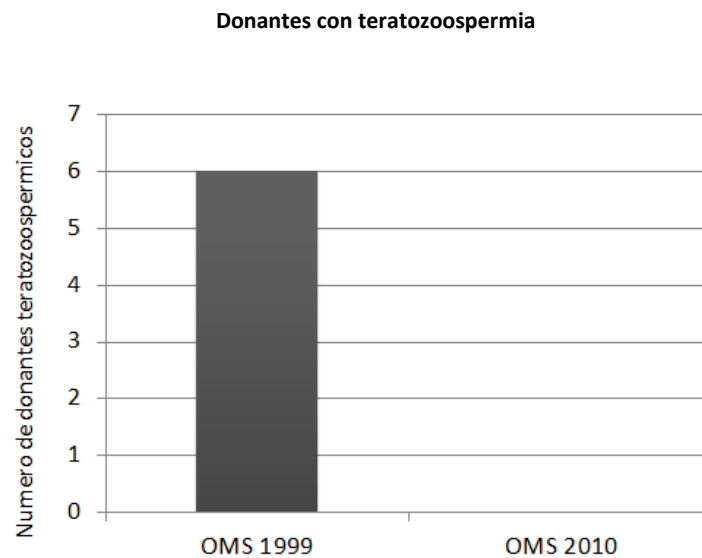


Figura 22. Número de pacientes diagnosticados teratozoospermicos, comprándolos entre los dos valores establecidos por la OMS 1999 y OMS 2010.



Porcentajes de los parámetros citológicos (Progresión, Viabilidad y Morfología) de la muestra de donantes

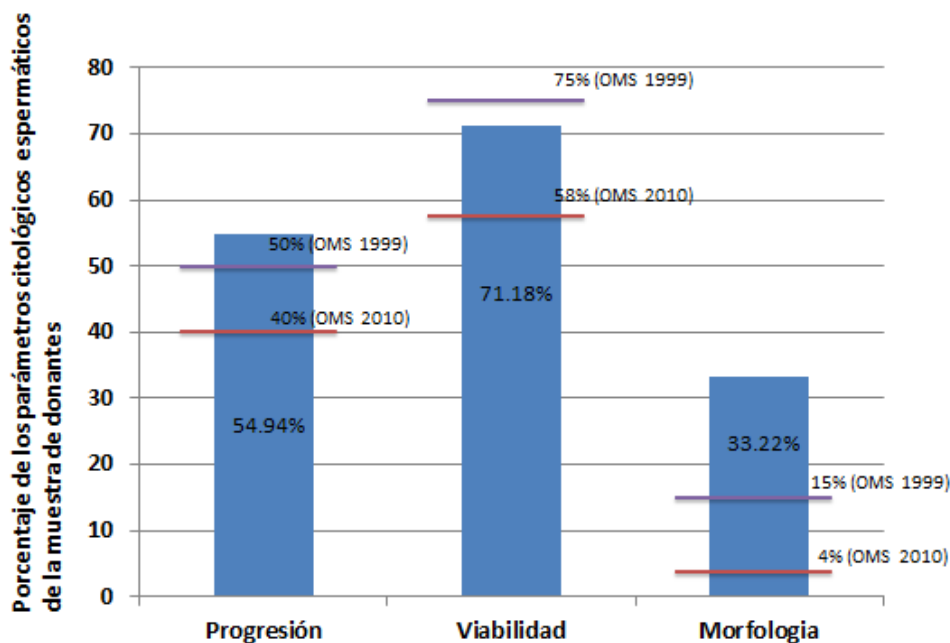


Figura 23. Porcentajes de los parámetros citológicos y comparación con los límites inferiores de cada parámetro establecidos por la OMS 1999 (morado) y OMS 2010 (rojo).

El comportamiento de las muestras indica una disminución en la calidad espermática, esto por el hecho de que la OMS bajó los límites inferiores de cada uno de los rubros que abarca la espermato-bioscopía, y aún con este hecho existen donantes que no cumplen con uno o más de estos rubros. En general los porcentajes para progresión y morfología espermática están por arriba de los límites establecidos por la OMS 1999 y OMS 2010, pero la viabilidad espermática solo está por arriba del límite de la OMS 2010 y por debajo del límite de la OMS 1999 (Figura 23). La morfología espermática, es el rubro que más bajo tiene sus estándares de calidad teniendo una disminución importante desde 1992 ya que la OMS tenía un parámetro de >30% de EN para considerarse normal, para 1999 este bajó a >15% de EN y en el 2010 éste volvió a descender a un valor mínimo de >4% de EN (OMS, 1992; 1999; 2010).

Cuando se observaron los espermatozoides con el microscopio de contraste de fases se identificaron solo 6 donantes con teratozoospermia, pero al utilizar la técnica de Hemacolor el número de donantes teratozoospermicos aumentó a 15 como se muestra en la Tabla 3.



Tabla 3: Resultados obtenidos de morfología espermática mediante la Técnica Hemacolor (Hematoxilina-Eosina).

Donante	Cabeza			PM			Flagelo			Normales		
	N°	A	G	SC	N°	SP	CP	N°	SF	CF	N°	% de espermatozoides normales
NL-6	101	4	1	9	15	2	14	9	2	1	75	37.5
NL-7	127	4	5	9	7	0	5	10	1	1	56	28
NL-8	117	5	1	14	20	3	12	9	4	1	56	28
NL-9	108	7	4	3	25	2	18	10	1	2	58	29
NL-10	89	21	0	3	12	1	2	8	3	1	91	45.5
NL-11	117	4	0	11	22	0	15	3	1	1	67	33.5
NL-12	104	2	8	2	11	2	6	10	2	2	75	37.5
NL-15	99	5	5	2	16	2	5	4	1	0	81	40.5
NL-16	116	11	5	9	10	3	7	9	2	2	65	32.5
NL-17	85	3	3	0	20	0	15	5	0	0	90	45
NL-18	100	2	12	0	17	10	8	8	0	1	68	37.5
NL-20	109	6	0	2	23	0	15	6	2	2	62	31
NL-21	100	7	0	1	22	0	10	3	2	1	75	37.5
NL-22	98	2	2	2	10	2	5	2	1	1	91	45
NL-23	74	3	2	2	11	0	6	3	1	1	112	56
NL-24	112	2	0	1	15	0	8	6	0	0	67	33.5
NL-25	66	2	0	0	24	0	4	10	0	0	110	55
NL-26	93	4	0	2	24	0	17	8	2	0	74	37
NL-29	116	2	4	1	14	0	8	2	1	1	68	34
NL-30	115	1	0	2	9	0	7	2	0	0	85	42.5
NL-31	90	1	2	1	17	0	7	15	3	0	78	39
NN-32	158	3	1	2	17	0	17	3	1	0	22	11
NL-33	150	9	5	0	12	0	5	7	0	4	31	15.5
NL-34	113	5	4	1	15	0	10	3	1	2	69	34.5
NL-35	52	2	3	1	18	0	6	2	1	0	128	64
NL-36	148	3	2	4	11	0	5	1	0	1	40	20
NL-37	77	2	2	2	14	0	5	1	1	0	108	54
NL-38	142	7	0	3	10	0	2	14	5	1	33	16.5
NL-39	102	0	0	3	17	8	2	12	8	0	54	27
NL-40	102	4	1	5	12	4	5	6	1	1	80	40
NL-41	65	1	0	2	16	0	6	3	1	0	116	58
NL-43	144	2	5	0	16	0	9	8	3	0	32	16
NL-44	9	6	2	0	15	0	7	3	2	0	84	42
NL-45	83	3	0	4	29	2	7	6	2	0	82	41
NL-46	111	2	0	0	20	11	3	11	0	0	55	27.5
NL-47	99	17	5	0	19	0	3	7	5	1	72	36
NL-48	110	3	0	2	23	1	6	3	0	2	64	32
NN-49	140	9	0	0	28	0	17	6	1	0	22	11
NL-51	50	2	0	0	21	0	8	2	0	1	127	63.5
NL-52	97	2	0	0	17	0	10	2	0	0	84	42
NL-53	84	3	0	0	10	0	6	11	1	0	95	47.5
NN-54	145	3	0	0	28	0	3	3	0	0	24	12
NN-55	149	3	2	0	21	1	8	8	3	0	22	11
NL-56	144	4	0	0	19	0	4	3	0	0	44	22
NL-57	137	5	0	0	19	0	6	16	3	0	32	16
NL-58	139	3	3	1	20	0	7	3	2	0	36	18
NL-59	51	3	0	2	20	0	7	3	1	0	126	63
NL-60	77	2	0	1	15	0	3	11	3	0	97	48.5



Continuación Tabla 3.



Donante	Cabeza	PM			PM			Flagelo			Normales	
	N°	A	G	SC	N°	SP	CP	N°	SF	CF	N°	% de espermatozoides normales
NL-61	70	5	0	1	10	0	10	10	0	1	115	57.5
NL-62	123	2	0	1	30	0	7	10	0	2	36	18
NN-63	128	3	0	2	33	0	9	23	2	2	24	12
NL-64	69	2	0	1	36	0	12	27	0	2	68	34
NL-65	91	2	1	2	30	0	5	23	0	2	56	28
NL-66	109	2	0	0	22	0	4	14	0	2	54	27
NL-67	70	2	0	0	40	0	4	16	1	0	74	37
NL-68	128	0	1	0	19	0	7	7	0	0	38	19
NL-69	65	3	1	2	40	0	10	20	3	2	75	37.5
NL-70	50	2	0	0	20	0	2	18	0	2	109	54.5
NL-71	126	4	1	2	31	0	4	15	4	3	30	15
NL-72	101	2	0	1	27	0	5	15	2	1	55	27.5
NL-73	103	3	3	4	42	4	14	11	2	0	38	19
NL-74	106	1	2	2	31	5	5	5	0	0	58	29
NL-75	96	3	2	0	23	0	7	19	2	0	55	22.5
NL-76	118	3	2	7	20	0	8	6	2	2	56	28
NL-77	98	2	2	6	31	4	5	7	4	1	64	32
NL-78	91	12	2	2	18	0	3	12	2	0	69	34.5
NL-79	87	2	1	2	8	0	8	7	2	2	79	39.5
NL-80	112	2	1	2	16	1	6	8	1	2	64	32
NL-81	76	2	1	2	24	2	11	10	2	1	90	45
NL-82	121	5	1	5	18	2	6	19	2	3	42	21
NL-83	140	3	3	2	14	2	10	20	1	2	36	18
NL-85	130	3	5	0	11	2	5	15	0	1	44	22
NL-86	92	0	2	0	40	1	5	8	1	1	60	30
NL-87	135	3	1	0	27	2	4	3	0	1	35	17.5
NN-88	148	2	3	2	29	2	4	3	0	1	20	10
NL-89	101	2	0	1	26	0	7	12	0	2	58	29
NN-90	127	2	0	2	29	0	10	22	2	5	22	11
NL-91	89	1	1	1	28	0	5	12	2	2	72	36
NL-92	112	0	1	0	20	0	5	7	1	2	61	30.5
NN-93	148	10	1	2	21	3	10	9	5	1	21	10.5
NL-94	113	3	2	0	27	2	10	9	5	1	51	25.5
NN-95	157	4	2	7	29	3	7	12	3	5	24	12
NL-96	121	5	1	1	18	4	7	3	3	2	54	27
NL-97	132	3	1	1	21	1	2	10	2	1	37	18.5
NL-98	112	3	1	0	22	2	2	6	2	0	60	30
NN-99	144	2	2	2	29	5	8	8	1	1	19	9.5
NL-100	144	4	4	2	11	0	3	10	0	0	34	17
NN-101	120	5	2	2	53	0	11	13	2	1	24	13
NN-102	122	5	2	1	43	5	12	11	0	5	23	11.5
NN-103	136	2	0	0	34	2	5	7	0	2	23	11.5
NN-105	131	2	2	0	46	0	3	5	1	1	18	14
NN-107	113	2	1	1	48	0	12	10	0	2	29	14.5
NL-108	116	4	2	2	35	1	10	16	1	0	33	16.5
NN-109	108	2	2	1	13	0	7	5	1	1	73	36.5
Porcentaje total	54.14%				11.10%			4.34%			30.42%	

NL: normozoospermico, NN: teratozoospermico. En Cabeza: A: espermatozoides con problemas en el acrosoma; G: espermatozoides globozoospermicos; SC: espermatozoides sin cabeza; En Pieza Media (PM); SP: espermatozoides sin pieza media; CP: espermatozoides con residuos citoplasmáticos; En flagelo; SF: espermatozoides sin flagelo; CF: espermatozoides con residuos citoplasmáticos en flagelo. De color rojo se presentan a los individuos teratozoospermicos tomando como referencia el parámetro de la OMS 1999.

La media muestral para la morfología espermática utilizando la técnica de Hemacolor fue de $\bar{x}=30.16\pm 1.44$, este valor es menor a la media de la morfología espermática obtenida anteriormente ($\bar{x}=33.22\pm 1.39$; Tabla 1). La muestra de donantes se dividió en dos grupos: **donantes normozoospermicos** ($\bar{x}=33.68\pm 1.4$) y **donantes teratozoospermicos** ($\bar{x}=11.63\pm 0.35$), los cuales presentan diferencias significativas entre ellos con una $p<0.05$ (Tabla 4).

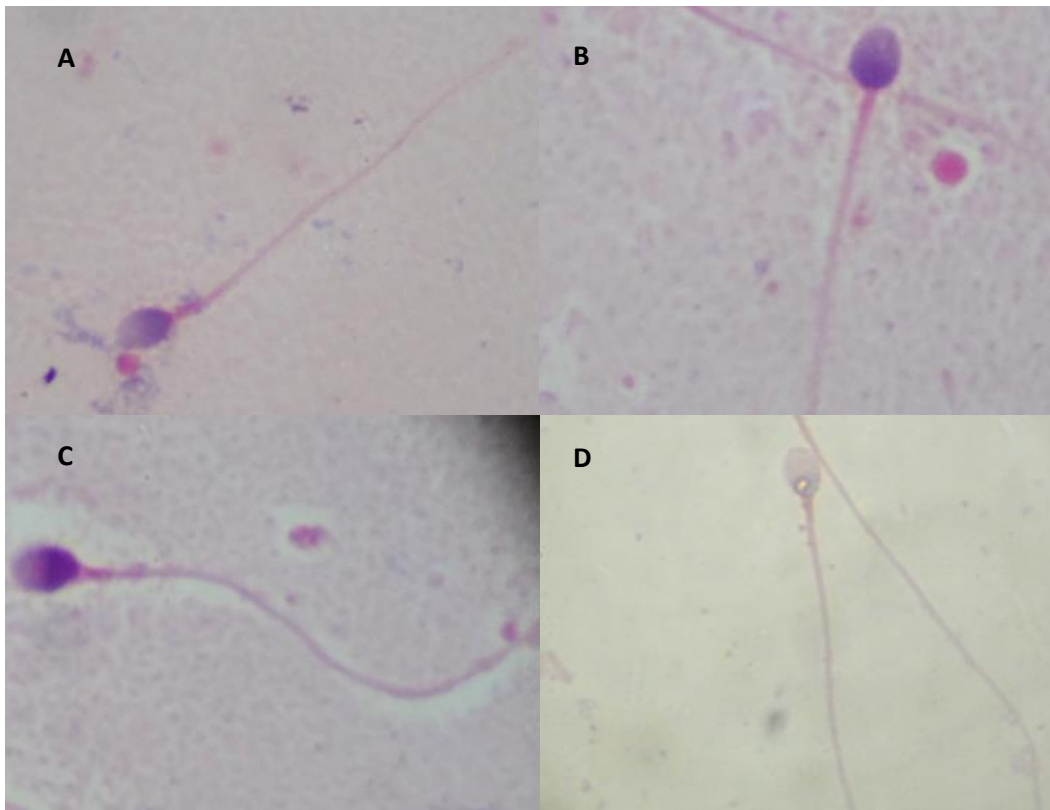


Figura 24. A-D Espermatozoides con morfología normal, Microscopio campo claro (100X).

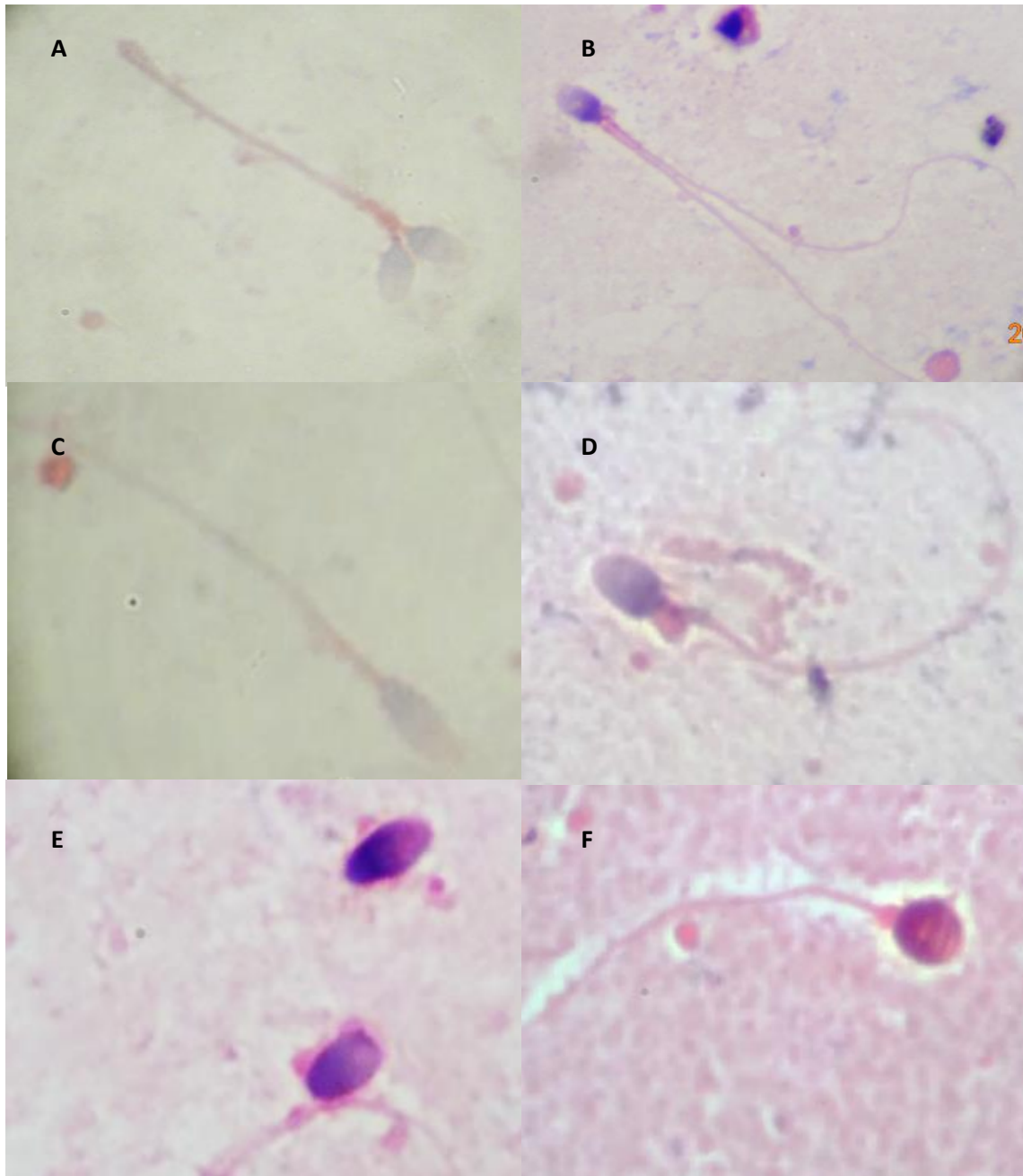


Figura 25. Espermatozoides con morfología anormal, Microscopio campo claro; A: Espermatozoide bicéfalo; B: Espermatozoide biflagelado; C: Espermatozoide con cabeza elongada; D: Espermatozoide con residuos citoplasmicos en la pieza media; E: Espermatozoide sin pieza media y flagelo; F: Espermatozoide globozoospermico (100X).

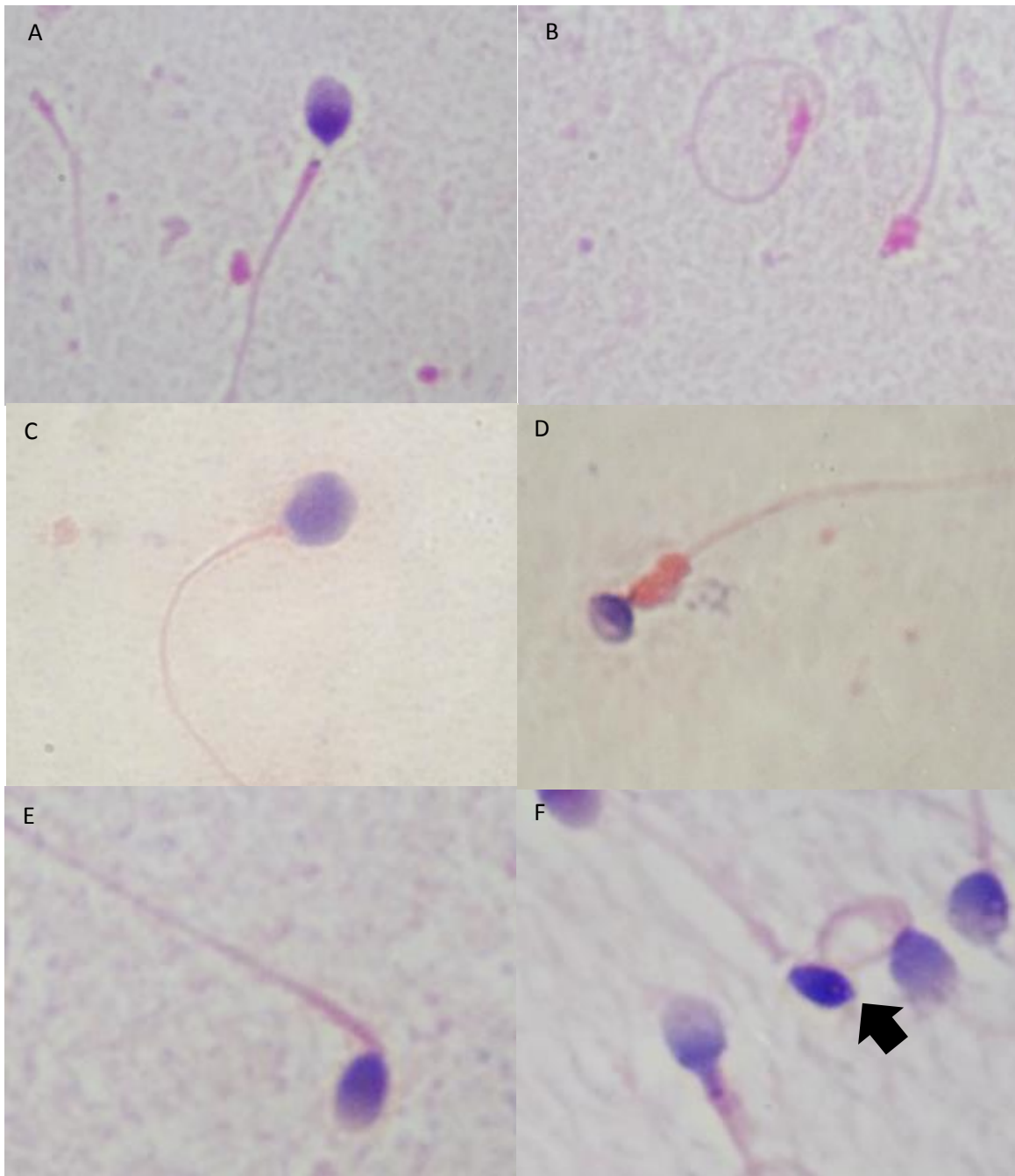


Figura 26. Espermatozoides con morfología anormal, Microscopio campo claro; A: Espermatozoide con pieza media delecionada; B: Espermatozoides sin cabeza; C: Espermatozoide globozoospermico; D: Espermatozoide con residuos citoplasmáticos en la pieza media y cabeza deforme; E: Espermatozoide doblado en la región de la pieza media; F: Espermatozoide sin región acrosomal (100X).

Con esta información el número de donantes teratozoospermicos aumentó a 15 demostrando que la técnica de Hemacolor es superior para detectar donantes con morfología espermática aberrante, con el valor de referencia de la OMS 1999 (<15% de EN). Aun así, no se encontró ningún individuo que esté por debajo del límite establecido por la OMS en el 2010 (<4% de EN), por lo cual se sugiere que este parámetro sea tomado como un límite de referencia inferior como antes ya había sido mencionado por Sarabia *et al.* en el 2011 (Figura 27).

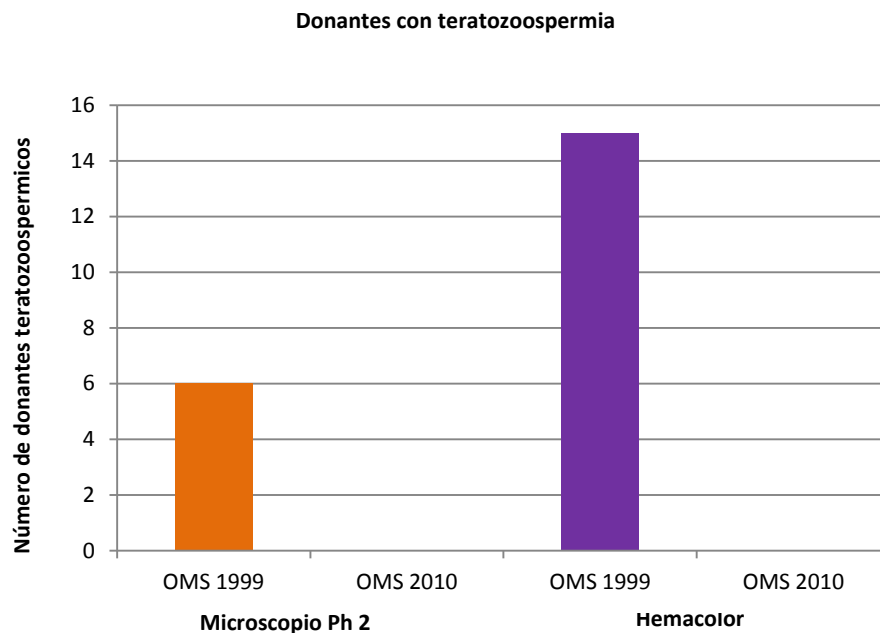


Figura 27. Muestra la diferencia entre las dos técnicas usadas para determinar la calidad de la morfología espermática, demostrándose así que la técnica de Hemacolor es más sensible ya que hubo un aumento de donantes teratozoospermicos según OMS 1999, pero sin cambios con el parámetro de la OMS 2010.

Las anomalías morfológicas más frecuentes en los espermatozoides de nuestra muestra son las de cabeza (54.14%), posterior a esta están las anomalías en la pieza media (11.10%) y por último las del flagelo (4.34%) (Tabla 3).



Tabla 4. Resume de los parámetros seminales.

Parámetro	No de Donantes	Grupos	Medias ± EE	Observaciones
Volumen Seminal (ml)	29	Vol. Normal	3.35±1.15	Vol. Entre 2-6 ml
	63	Vol. Bajo	1.1 ±0.06*	Vol. <2 ml- Infección, agenesia.
	2	Vol. Alto	8.3 ±0.1*	Vol. >6 ml- Varicocele
pH	80	pH=8	8±0.0	pH=7.5-8.5
	14	pH>8	9.07±0.07*	pH>8 Infección prostática
Viabilidad Espermática (%)	56	Viab. Normal	80.38±0.6	Viabilidad > 75%
	38	Viab. Baja	64.94±1.11*	Viabilidad <75% - Necrospérmia
Progresión Espermática (%)	29	Prog. Normal	63.59±1.11	Progresión >50%
	65	Prog. Baja	35.54±1.87*	Progresión <50% Astenospérmia
Densidad Espermática X10 ⁶ espermatozoides/ml	85	Den. Normal	89.67±7.19	20-200X10 ⁶ esp/ml
	8	Den. Baja	12.42±2.22*	<20X10 ⁶ esp/ml- Oligozoospérmia
	1	Den. Alta	-- ^a	>200X10 ⁶ esp/ml- Polispermia
Morfología-Ph2 (% de EN)	88	Morf. Normal	34.69±1.3	>15% de EN
	6	Morf. Baja	11.60±0.8*	<15% de EN- Teratozoospérmia
Morfología-HC (% de EN)	81	Morf. Normal	33.68±1.4	>15% de EN
	13	Morf. Baja	11.63±0.35*	<15% de EN- Teratozoospérmia

Para la formación de los grupos considero como criterio los valores estándar emitidos por la OMS 1999 y se comparó las medias de los grupos para cada parámetro.

* Aquellos grupos que tiene diferencia significativa contra su respectivo grupo normal, p<0.05, "t" Student

--^a Aquellos grupos que no se les pudo realizar análisis estadístico.

Con esta información se tomó un valor menor de 15% de EN como teratozoospermico y 4% como límite inferior (Sarabia *et al.*, 2011). Por este motivo para el análisis del posible daño en el material genético, se tomó a los individuos con morfología espermática por debajo del 15% de EN (teratozoospermicos) según la OMS 1999. A estos donantes se les realizó un análisis cromosómico e índice mitótico.

Análisis cromosómico

Desde años atrás, la OMS se ha dado la tarea de formalizar los parámetros estándares para las espermatozoscopías. Uno de los valores que ha causado mayor controversia es la morfología espermática, ya que este parámetro desde 1992 hasta el 2010 ha ido descendiendo cada vez más, teniendo un valor de morfología normozoospermica en 1992 de >30% de EN (espermatozoides normales), 1999 de >15% de EN y en el 2010 con > 4% de EN (valores obtenidos de la OMS de los correspondientes años). Por este motivo, de los donantes analizados en las espermatozoscopías, se obtuvo sangre de 4 donantes con morfología



espermática que estuviera por debajo de 15% de EN y como control a 12 donantes que estuvieran por arriba del 15% de EN (OMS, 1999). Con esto se los dividió en dos grupos, aquellos que están por arriba del valor límite: **>15%** de EN (normozoospermicos) y dentro de: **<15%-4%** de EN (teratozoospermicos, OMS 1999). Los resultados de los cultivos de linfocitos para el análisis de sus metafases se muestran en la Tabla 4. Para cada donante se analizaron 25 metafases, localizando daño al material genético compactado en forma de cromosomas observando la presencia de aberraciones tanto cromatídicas como cromosómicas. De igual manera se realizó el índice mitótico (Tabla 5).

Tabla 5. Aberraciones Cromosómicas e Índice Mitótico de donadores estándares y teratozoospermicos

Donante	Índice Mitótico (%)	n° de células Dañadas	Cromatídicas		Cromosómicas				Total de	
			Gs	B	Gs	B	Dc	Su	AC con Gs	Ac sin Gs
Normozoospermico										
≥15%										
NL-53	6.50	1	0	0	1	1	0	0	2	1
NL-60	9.45	1	0	0	1	0	0	0	1	0
NL-70	7.80	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NL-68	8.76	1	0	0	0	1	0	0	1	1
NL-109	9.56	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NL-50	12.48	1	0	0	1	0	0	0	1	0
NI-66	7.40	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NL-59	6.70	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NL-104	8.90	1	0	0	1	0	0	0	1	0
NL-73	19.75	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NL-74	6.00	1	1	0	0	0	0	0	1	0
NL-75	7.20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Media	9.2±1.93	0.5±0.52							0.5±0.66	0.1±0.38
Teratozoospermico										
<15%-4%										
NN-102	10.30	5	0	0	4	1	0	0	5	1
NN-105	15.70	3	0	3	0	1	0	0	4	4
NN-90	16.60	5	3	2	0	0	1	0	6	3
NN-93	6.90	8	3	4	0	2	0	0	9	6
Media	12.37±2.14	5.25±2.06*							6±2.16*	3.5±2.08*

Aberraciones cromosómicas presentes en las células obtenidas por el cultivo de linfocitos a partir de una muestra de sangre periférica de los donantes con una morfología espermática normal y alterada; Gs=gaps, B=Break, Dc= cromosomas dicéntricos, Su= unión entre cromátidas hermanas, AC con Gs = aberraciones con gaps y AC sin Gs= aberraciones sin Gs. De cada individuo se analizaron 25 metafases.

* Son los valores que tiene diferencia significativa en el grupo teratozoospermico con respecto a los normales con $P<0.05$.

Aberraciones cromosómicas (AC) e índice mitótico (IM).

El análisis estadístico realizado (*t-Student*), muestra una diferencia significativa con una $p < 0.05$, permite afirmar que los individuos teratozoospermicos presentan daño genético considerable en comparación con donantes normales ya que muestra un incremento notable tanto en el número de células dañadas como en el número de aberraciones cromosómicas presentes para cada donante. En relación con el Índice Mitótico (IM), ocurre lo contrario, el análisis estadístico con la *prueba de Z*, confirma que **no existe** relación entre el índice mitótico y la morfología espermática ya que con una $p < 0.05$ **no** muestra diferencia significativa entre el IM de los donantes teratozoospermicos y el IM de donantes normales.

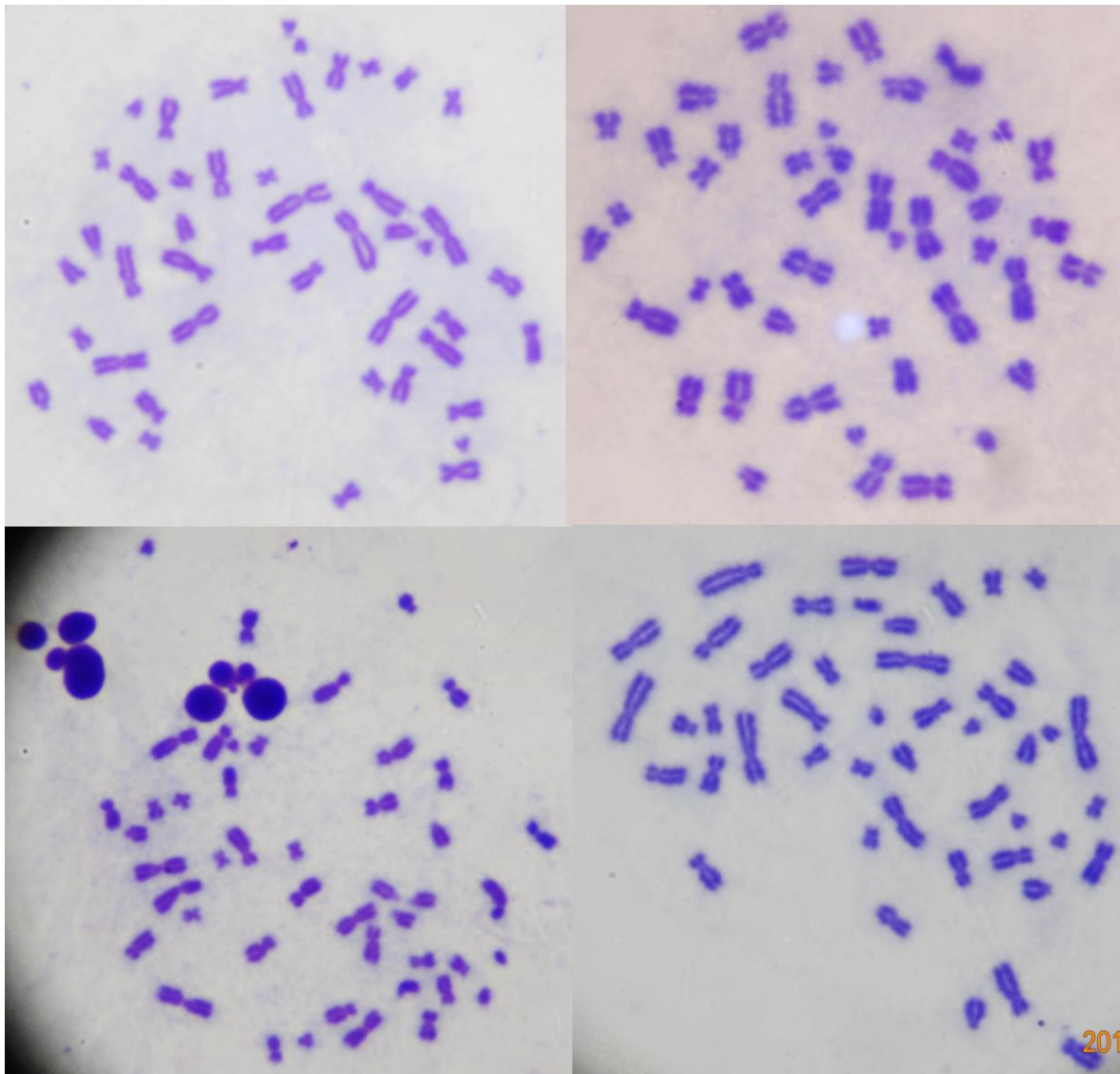


Figura 28. Fotomicrografías con microscopio de campo claro de Cariotipos normales de individuos sanos, sin indicios de teratozoospermia, 46; XY (100X).

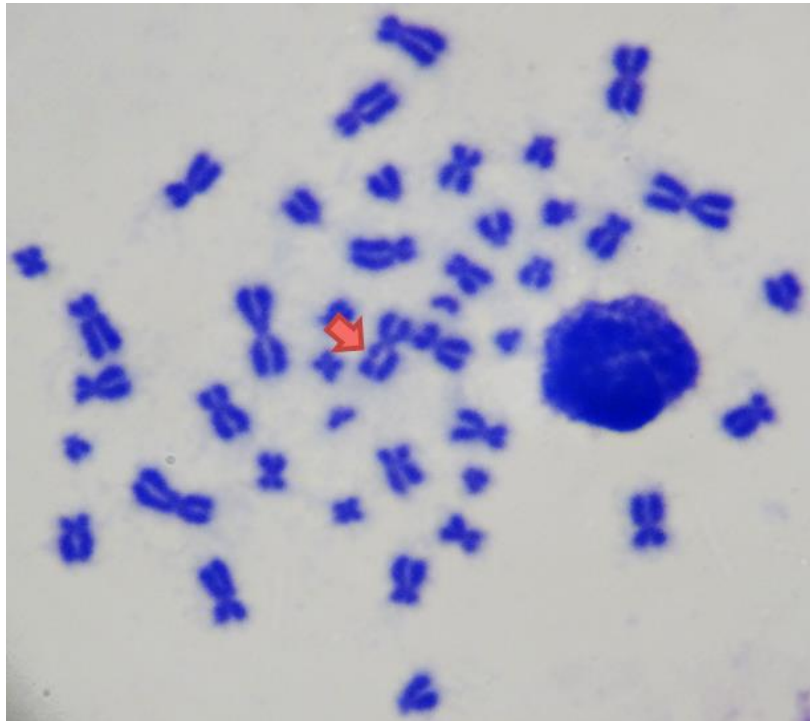


Figura 29. Fotomicrografía con microscopio de campo claro de Cariotipo con deleción del tipo cromatídico en un cromosoma metacéntrico, brazo q, 46; XY (100X).



Figura 30. Fotomicrografía con microscopio de campo claro de Cariotipo humano, gap de tipo cromatídico en cromosoma acrocéntrico, brazo q, 46; XY (100X).



En cuanto la morfología, que es el parámetro al cual está enfocado nuestro trabajo, puede observarse que en el grupo de donantes normales ($\geq 15\%$ de EN), no presenta daño cromosómico importante, ya que de los 12 donantes a los cuales se les realizó cultivo de linfocitos, solo 6 células de 300 analizadas presenta daño genético, el 2% de células dañadas (Figura 27). En comparación con el grupo teratozoospermico ($<15\%-4\%$] de EN), que en los 4 donantes se presentan alteraciones cromosómicas, teniendo un total de 21 células de 100 analizadas, con importante daño cromosómico, el 21% de células dañadas (Figura 31).

Porcentaje de células dañadas para cada grupo a partir de cultivo de linfocitos

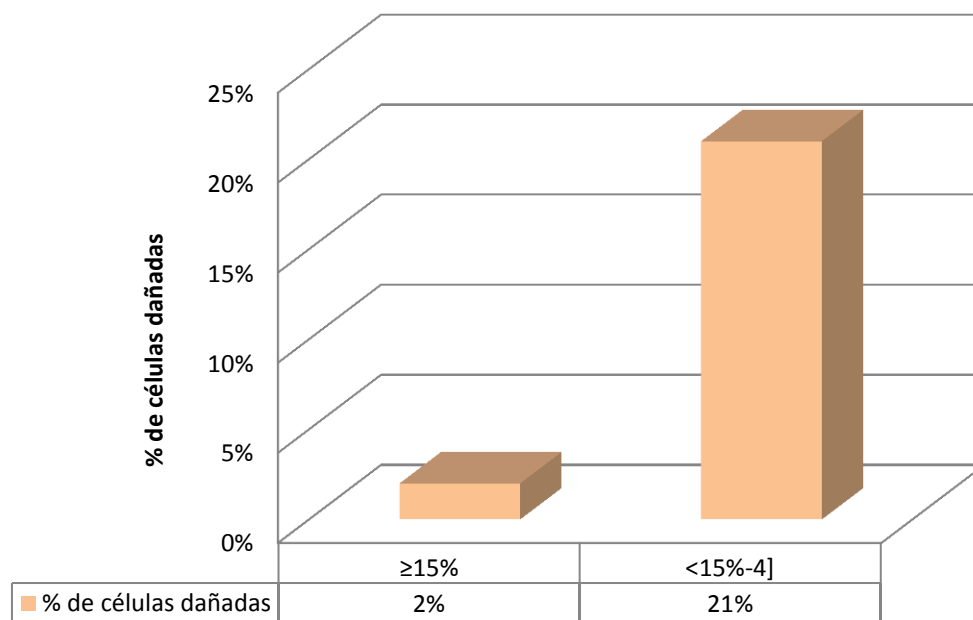


Figura 31. Muestra los porcentajes para cada grupo de las células dañadas, se observa que en el grupo $<15\%-4\%]$ es mayor el porcentaje en comparación con el grupo control, demostrando un daño en el material genético considerable.



Análisis y Discusión de Resultados

La realización de un espermograma es importante para diagnosticar la fertilidad de un individuo e identificar anomalías en cada uno de los parámetros en los que consiste esta prueba; en nuestra muestra no se encontró a ningún donante con problemas severos en sus parámetros físicos y citológicos seminales que nos permitan establecer algún grado de infertilidad, sin embargo, en muchos casos estos parámetros analizados se encuentran alterados indicando desde una posible infección hasta un posible problema genético.

- **Parámetros Físicos Seminales**

Color Seminal

Los donantes que tiene una coloración alterada nos permiten pensar en una posible hemospermia que altera el color de la muestra seminal y se les recomendó una consulta urológica ya que la presencia de una coloración amarillenta es indicativa de ictericia, o presencia de ciertas vitaminas. También es posible que se deba a presencia de altos niveles de flavoproteínas oxidadas, procedentes de vesículas seminales. Esto indica una elevada abstinencia. (Poirot *et al.*, 2005; García *et al.*, 2012). En la muestra esta condición no parece ser muy frecuente ya que solo se presentó en 17 casos.

Viscosidad Seminal

El parámetro de viscosidad es uno de los que no presentan alguna tendencia entre sus dos variables ya que el 44% de los donantes tuvo una viscosidad en forma de **Gota**, mientras que una viscosidad en forma de **Hilo** se presentó en un 50%. Este hecho hace pensar que aquellos donantes que tiene las viscosidad aumentada (**Hilo**), los espermatozoides presentaran alguna dificultad en cuanto a su movilidad o en su concentración (Poirot *et al.*, 2005). El semen una vez licuado debe ser ligeramente más viscoso que el agua. Cuando la muestra es altamente viscosa, puede ser debido a una disfunción prostática o eyaculación frecuente. Este aumento de viscosidad no es una causa directa de infertilidad, pero puede afectar a las posteriores evaluaciones del análisis del semen como su concentración y progresión espermática (OMS, 1999).

Volumen Seminal

El volumen de la muestras es un parámetro muy variable que depende mucho del individuo, existe la posibilidad de haber pérdidas al momento de la recolección de la muestras por el donante, pero esto solo pasó en 4 de los 23 casos con volúmenes bajos. Un volumen bajo, nos indica la posibilidad de una infección en la vía seminal profunda, una agenesia epidídimo deferente (mal desarrollo del epidídimo) o de una eyaculación retrograda parcial, mientras que un volumen aumentado, en este caso solo un donante, nos indica varicocele, que es dilatación de las venas del cordón espermático, situadas en el escroto (Poirot *et al.*, 2005).



pH Seminal

Con la información obtenida podemos inferir que aquellos donantes que superaron el valor de pH de 8 evoca a una infección de la próstata, por otro lado un pH menor a 7 (valor no encontrado en nuestra muestra) sugiere una insuficiencia o agenesis vesículo deferente (mal desarrollo de los túbulos vesículo-deferentes) y se le recomendó consulta urológica (Poirot *et al.*, 2005).

En general los parámetros físicos de la mayoría de los donantes de nuestra base de datos, se comparten de una manera normal ya que los en gran parte de los casos de cada uno de estos parámetros se encuentra con una tendencia a los valores estándar establecidos por la OMS de 1999 y 2010.

- **Parámetros Citológicos Seminales**

Viabilidad Espermática

Una disminución de la viabilidad de las muestras espermáticas nos indica necrospermia que es la condición en la cual la mayoría los espermatozoides se encuentran muertos, este padecimiento puede ser causado por una infección o por casusas citotóxicas (Poirot *et al.* 2005). Las causas de una viabilidad baja por el manejo fuera de tiempo de las muestras fueron descartadas debido a que la muestra fue procesada inmediatamente después del tiempo de licuefacción establecido en el manual de examinación y procesamiento de semen humano (OMS, 1999; 2010).

Progresión Espermática

En general este parámetro se comportó de manera similar al de la viabilidad, ya que cuando se utilizó el parámetro establecido en 1999 por la OMS para progresión (+50% de espermatozoides móviles), se encontraron 29 donantes por debajo de este porcentaje y cuando se utilizó el valor del 2010 de la OMS para el mismo parámetro (+40% de espermatozoides móviles), solo obtuvimos 18 donantes por debajo de este porcentaje. Los donantes que están por debajo del límite para la progresión nos hace inferir que padecen de astenospermia que es la disminución de espermatozoides móviles, esta puede ser causada por una infección, dando como resultado, disquinesia flagelar (Poirot *et. al.*, 2005) que son anomalías en el movimiento del flagelo, movimiento erráticos que impiden el desplazamiento del espermatozoide (García *et al.*, 2012).

Densidad Espermática

Aquellos donantes con densidad baja nos indican oligozoospermia, las casusas pueden ser múltiples, pero a menudo son desconocidas. En algunos casos son por causas obstructivas y son determinadas por bioquímica seminal y en otros casos puede ser debido por causas secretoras,



que son determinadas por estudios hormonales (Poirot *et al.*, 2005). En otros estudios se ha observado que la baja densidad espermática puede estar ligada a deleciones parciales o completas en el cromosoma Y en el gen AZF (factor de azoospermia) (Martínez *et al.*, 2008). Otras alteraciones cromosómicas, como las que implican a un autosoma y un cromosoma sexual, las translocaciones recíprocas, las translocaciones robertsonianas o la existencia de cromosomas en anillo están ligadas a la condición de oligozoospermia (Rajesh *et al.*, 2011; Pellestor *et al.*, 2011).

Morfología Espermática

Las alteraciones en la morfología del espermatozoide, afectan desde capacidad fertilizadora hasta la movilidad de éste, tal es caso de las anormalidades en el acrosoma, el tamaño y forma de la cabeza que afectaría la fertilización del óvulo, mientras que las anormalidades en la pieza media impediría la producción de energía necesaria para el movimiento del espermatozoide, por último en el flagelo dificultaría la locomoción o desplazamiento.

La morfología espermática de la muestra se comportó de manera normal pero existen donantes con este valor bajo, en la mayoría de los espermatozoides de los donantes con indicios de teratozoospermia (Tabla 3). En general las anormalidades se presentaron con una frecuencia relativa, para cabeza de **0.5414** seguido por la pieza media con una frecuencia de **0.1110** y por último en el flagelo con **0.0434** (Tabla 3).

Existen trabajos que han demostrado que algunos cambios en la morfología del espermatozoide son debidos a infecciones, como es en el caso de infección por micoplasma (*U. urealyticum*) demostrado por los estudios realizados por Toth y colaboradores en 1978 (Tomado de: López *et al.* 2008), que causa enrollamiento de los flagelos de los espermatozoides y de igual manera en los estudios realizados por Busolo y colaboradores en 1984 (Tomado de: López *et al.* 2008) confirmaron que infecciones por *U. urealyticum* causa deformaciones en la pieza media (López *et al.*, 2008).

En nuestra muestra inferimos este tipo de infecciones no son causantes de las deformaciones presentes, debido a que en la mayoría de los casos las deformidades de flagelo son pérdida completa o parcial del espermatozoide y con residuos citoplasmáticos (Tabla 3). Otro motivo por el cual descartamos una infección fue por la ausencia de partículas de forma esférica adheridas al espermatozoide, características cuando se da este tipo de infecciones.

Sin embargo se ha reportado que existe algunas especies de micoplasmas que producen peróxido de hidrógeno con actividad hemolítica, de esta manera se generan radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS), estos indican la peroxidación de los lípidos de membrana espermática afectando al acrosoma y por lo tanto a la reacción acrosomal (Potts *et al.*, 2000). De igual manera se descartó al observar los espermatozoides al microscopio y no detectar partículas en forma esférica.



La espermatogénesis es un proceso altamente regulado, que está controlado por mecanismos epigenéticos, y si existe alguna perturbación en estos puede resultar en infertilidad masculina. Alguno de los eventos que pueden ser afectados por estas perturbaciones en la epigenética de la formación del espermatozoide son: condensación de los cromosomas y empaquetamiento del DNA dentro del núcleo del espermátide. Este último evento tiene un gran impacto en la formación de la cabeza del espermatozoide y si existe un mal empaquetamiento puede producir globozoospermia (Zamudio *et al.*, 2008). Este hecho afectaría el desplazamiento del espermatozoide ya que una cabeza grande afectaría la dinámica de locomoción del espermatozoide.

Los resultados obtenidos muestran que la morfología espermática va a la baja ya que tomando en cuenta el los valores de referencia de la OMS, 1992, donde el 30% deben ser EN, el de la OMS 1999 es del 15% de EN, así lo señala, además esto concuerda con que no se encuentra daño cromosómico considerable en nuestro grupo de donantes catalogados como normales ($\bar{x}=0.5\pm0.52$ para normales y $\bar{x}=5.25\pm2.06$ para teratozoospermicos)(Tabla 5). Así mismo, el valor de 4% de EN, que la OMS 2010 establece como límite para considerar a un donante como teratozoospermico es muy bajo, ya que a 15% de morfología espermática ya presentó daño cromosómico, los que nos permite reafirmar que el valor de la OMS 2010 se debe tomar como un límite inferior (Sarabia *et al.*, 2011).

Los porcentajes de células dañadas, considerando el total de células analizadas para cada grupo, es más grande en el grupo <15%-4%] con el **21%** de células dañadas en comparación con el porcentaje de células dañadas para nuestro grupo de donantes normales con **2%** para el grupo por lo tanto la morfología espermática es un aspecto que nos indicaría la presencia de daño cromosómico. De igual manera las pruebas estadísticas nos permiten decir que al comparar los dos grupos, teratozoospermicos contra normales, tanto para aberraciones cromosómicas con gaps ($\bar{x}=0.05\pm0.66$ para normales y $\bar{x}=6\pm2.16$ para teratozoospermicos)(Tabla 5) y aberraciones cromosómicas sin gaps ($\bar{x}=0.1\pm0.38$ para normales y $\bar{x}=3.5\pm2.08$ para teratozoospermicos)(Tabla 5), que existen diferencias significativas entre los dos grupos corroborando nuestro objetivo de demostrar que la morfología espermática está ligada a un componente genético y si esta morfología espermática se presenta por bajo del 15% de EN, el donante presentará un aumento en la frecuencia de anormalidades en sus cromosomas.

Las aberraciones cromosómicas son un factor muy estudiado al analizar la calidad espermática, pero estos trabajos están enfocados a el parámetro de densidad espermática de la muestra seminal, tal es el caso de los trabajos de Cortés *et al.*, en el 2004, realizados en México que estudiaron hombres con densidad alterada, entre los cuales se encontraban donantes con azoospermia, oligozoospermia y normozoospermia, en sus resultados se observaron a 5 donantes oligozoospermicos con alteraciones cromosómicas [dos pacientes: 47, XXY, dos pacientes: 47,XY, inv(14) y uno 46,XY,t(16p;1p)]. También se encontró incremento en los polimorfismos de la heterocromatina y de los satélites del cromosoma Y en sujetos oligozoospermicos y azoospermicos con respecto a los normozoospermicos: con heterocromatina de 13.7% en los oligozoospermicos, de 21.8% en los azoospermicos y de 5.7% en los sanos, e incremento de tamaño de satélites de



7.3% en los pacientes oligozoospermicos, de 8% en los azoospermicos y de 2.8% en los sanos. Este trabajo demuestra que la integridad del material genético está relacionado con la calidad seminal, el aspecto que hay que resaltar de este trabajo es la presencia de aberraciones cromosómicas visibles con microscopio (47, XXY; 47,XY, inv(14); 46,XY,t(16p;1p) que son similares a las reportadas por Meza *et al.*, en el 2006, en donde estudiaron a 227 pacientes azoospermicos y encontraron que 43 casos (18.9%) tenían un cariotipo anormal, el más frecuente fue 47,XXY en 35 sujetos (15.4%) y en seis casos se encontraron alteraciones estructurales: dos translocaciones robertsonianas [(45,XY,t(13;22)(p11;p11) y (45,XY,t(13;15)(p11;p11)] y tres mosaicos que implicaban cromosomas sexuales [mos45,X/46,X, idic(Y)(q11)]. En general estos estudios hablan de alteraciones en el número de cromosomas y translocaciones que están altamente relacionados con la oligozoospermia, esto confirmado por O'Flynn *et al.*, en el 2010, estos datos y la tabla 2 nos permiten afirmar que el daño que nosotros reportamos en el material genético está relacionado con la morfología espermática debido a que ningún individuo catalogado como teratozoospermico tiene el parámetro de densidad espermática alterado.

Desde el punto de vista molecular, entre los trabajos más recientes sobre este tema se encuentran los realizados por Martínez *et al.* en el 2008, que se dieron a la búsqueda de microdeleciones en el cromosoma Y ya que en anteriores reportes realizados por Tiepolo y Zuffardi en el 1976 (Tomado de: Piña *et al.* 2013) propusieron la existencia de un gen de espermatogénesis, o "factor de azoospermia" (AZF), en Yq. En los estudios encontraron una frecuencia de microdeleciones del gen AZF del 12% en pacientes con Oligozoospermia y de 14.3% del mismo gen en Azoospermia no obstructiva (Martínez *et al.*, 2008). Estas microdeleciones afectan directamente al proceso de espermatogénesis ya que el gen AZF dividido en tres regiones específicas AZFa, AZFb y AZFc, son activados durante este proceso (Piña *et al.*, 2013). La existencia de estas microdeleciones presentes en el cromosoma Y que afectan el individuo causando oligozoospermia, hace pensar en posibles alteraciones a nivel de gen para las alteraciones en la morfología espermática. Algunos de los genes que podrían estar afectados son el *CDY* (involucrado en el reemplazamiento de histonas), el gen *TSPY* (regula el momento de la espermatogénesis) (O'Flynn *et al.*, 2010) y el gen *HR6B* (involucrado en la maduración germinal durante la espermiogenesis), este último ya se ha confirmado mutaciones en su homólogo en ratón por Blendy en 1996 (Tomado de: Bassas, 2001). Estos estudios dan pie a la búsqueda de microdeleciones y mutaciones que estén directamente relacionadas con la morfología espermática.

La importancia de la morfología del espermatozoide para estimar la calidad espermática está reconocida desde los primeros trabajos que realizaron MacLeod y Gold en 1951 (Tomado de: Maroto, 2012). Este tipo de evaluación espermática está incluida dentro del espermiograma convencional, siendo una de las pruebas más importantes (Maroto, 2012). En el caso de haberse presentado un individuo con morfología espermática menor a 4%, según lo establecido por la OMS 2010 como valor de referencia para este rubro, se esperaría que tuviera un daño cromosómico mayor ya que a una morfología menor a 15% ya se presenta con mayor frecuencia alteraciones cromosómicas.



Conclusiones

En la población muestreada de donantes clínicamente sanos de la FES Zaragoza, el 13% de ellos fueron catalogados como teratozoospermicos y el 10% como oligozoospermicos, ambos grupos fueron excluyentes.

Existe una correlación entre el estado de teratozoospermia y el aumento en el número de las aberraciones cromosómicas (con y sin gaps) de igual manera con el aumento de células dañadas, sin existir alguna relación con el índice mitótico (Tabla 5).

Se sugiere que valores de referencia espermatozoides establecidos por la OMS en el 2010 deben de tomarse como valores límite inferior de referencia, debido a la presencia de daño cromosómico en donantes catalogados como teratozoospermia tomando los valores de referencia de la OMS 1999.

Perspectivas

En la mayoría de los estudios realizados anteriormente, el punto de partida es la oligozoospermia como indicador de daño genético, pero en casi todos estos estudios se han enfocado en cuestiones “epigenéticas” ya que el proceso de espermatogénesis está regulado por una vía compleja de señalización regulatoria, donde si esta se encuentra modificada podría afectar el resultado de dicho proceso.

El hecho anterior nos hace pensar que la condición “teratozoospermia” puede tener aspectos epigenéticos alterados implicados, esto debido a la presencia de gaps, ya que son causados por un mal empaquetamiento de DNA (lo que implica modificaciones de histonas por posibles metilaciones, acetilaciones y fosforilación por mencionar algunos). Las alteraciones presentes en nuestras muestras son un panorama inicial del daño contenido en el material genético que contribuye a que un individuo sea teratozoospermico, por lo cual es conveniente realizar más estudios que contribuyan a este hecho, como podrían ser:

Metilación de genes implicados en la regulación de la espermiogénesis.

Microdeleciones en genes implicados en la regulación de la espermiogénesis.

Ensayos con FISH-multicolor (Hibridación *in situ* con fluorescencia).

Presencia de miRNAs, siRNAs, snRNA y largos no codificantes en semen.

Nivel de expresión de genes implicados en la regulación de la espermiogénesis.



Bibliografía.

- **Aitken R, Findlay J, Hutt K y Kerr J. 2010.** Apoptosis in the germ line. *Society for Reproduction and Fertility*; 141: 139-150.
- **Anguiano A, Wang B, Wang S, Boyar F, Mahon L, El Naggar M, Kohn P, Haddadin M, Sulcova V, Sbeiti A, Ayad M, White B y Strom C. 2008.** Spectral Karyotyping for Identification of Constitutional Chromosomal Abnormalities at a National Reference Laboratory. *Biomed Central*; 1: 1-6
- **Bassas Lluís. 2001.** Espermatogénesis e Infertilidad. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*; 18: 11-17
- **Cardona W y Cadavid A. 2005.** Cadavid. Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos de manosa y N-acetilglucosamina. Grupo Reproducción-Biogénesis, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. *Actas Urol Esp*; 29: 676-684.
- **Colombo M, Cornejo V y Raimann E. 2003.** Errores Innatos en el Metabolismo del Niño. 2da Edición. Editorial Universitaria. Santiago de Chile; 652: 32-37.
- **Cortés E, Cerda R, Dávila M, Hernández R. 2004.** Chromosomal abnormalities and polymorphisms in Mexican infertile men. *Arch Androl*; 50:261-265.
- **Evans HJ. 1984.** Peripheral Lymphocytes for the Analysis of Chromosome Aberrations in Mutagen Test. En: **Kilbey B, Legator M, Nichols W y Ramel C. 1984.** Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Segunda Edición. Elsevier. Amsterdam; 859: 405-428.
- **García M, Urbano A y Cárdenas M. 2012.** Manual de Laboratorio para Análisis del Semen. Omnia Science. 1^{er} Edición. Omnia Publisher SL.
- **Gabb Michel H. 1967.** Manual de soluciones de laboratorio. Bellaterra. Barcelona España. 92-93.
- **López M y Guerra F. 2008.** Avances en la interacción entre micoplasmas y espermatozoides de humano. Laboratorio de Investigación en Bioinmunología Celular del Dpto. de Infectología del Instituto Nacional de Perinatología. México. *Medigraphic Artemisa online*. 33: 115-121.
- **Martínez S, Gallegos M, Vargas M y Rubio J. 2008.** Genetic screening in infertile Mexican men: chromosomal abnormalities, Y chromosome deletions, and androgen receptor CAG repeat length. *J Androl*; 29: 654-660.
- **Maroto Morales Alejandro. 2012.** Evaluación objetiva de la morfometría de los espermatozoides de ovino (*Ovis aries*) relacionados con la fertilidad. Universidad de Castilla, La Mancha Instituto de Investigación de Recursos Cinegéticos. Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética. Tesis Doctoral.
- **Meza JP, Dávalos IP, Rivera H, Perez S, Rivas F. 2006** Chromosomal abnormalities in patients with azoospermia in Western Mexico. *Arch Androl*; 52:87-90.
- **O'Flynn K, Varghese A y Agarwal A. 2010.** The genetic causes of male factor infertility: A review. *Modern trends Fertility and Sterility*; 93:1-12.
- **Olivera M, Ruiz T, Tarazona A y Giraldo C. 2006.** El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. 1 *Fisiología y Biotecnología de la Reproducción*. Facultad de Ciencias



Agrarias. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Rev Col Cienc Pec; 19: 426-436.

- **Ortega García Alexis P. 2012.** Análisis de la fragmentación del DNA espermático en muestras del banco de semen y su capacidad de fertilización en técnicas de reproducción asistida. Tesis. FES Zaragoza. UNAM.
- **OMS. 1992.** Examination and processing of human semen. Third edicion.
- **OMS. 1999.** Examination and processing of human semen. Fourth edicion.
- **OMS. 2010.** Examination and processing of human semen. Fifth edicion.
- **Pellestor F, Anahory T, Lefort G y Puechberty J.** 2011. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. Hum Reprod Update; 17: 476-494.
- **Percy Bellido.** 1997. Mecanismo de fertilización. Ginecología y Obstetricia; 43: 183-90
- **Sarabia L y Munuce M.** 2011. Nuevos valores para el espermiograma OMS 2010. Cartas al editor. Revista de Medicina de Chile. 139: 548-549.
- **Sutovsky Peter.** 2010. Sperm proteosomal and fertilization. Society for Reproduction and Fertility; 124: 1-14.
- **Passarge Eberhard.** 2009. Genética Texto y Atlas. Ed. Médica Panamericana. 3ra Edición. NY, EEUU.; 486: 122-124.
- **Piña R, Chima M, Yerena M, Regalado M, Sánchez C, García L, Santillán Y y Moreno J.** 2013 Variantes genéticas asociadas con infertilidad masculina en pacientes mexicanos. Ginecol Obstet Mex; 81:245-258.
- **Poirot C y Cherruau B.** 2005. Infertilidad masculina, aspectos clínicos e investigaciones biológicas. Asociación Española de farmacéuticos Analistas. Madrid. España; 225-241.
- **Potts J, Sharma R, Pasqualotto F, Nelson D, Hall G y Agarwal A.** 2000. Association of Ureaplasma urealyticum with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytospermia. J Urol; 163: 1775-1778.
- **Rajesh H, Freckmann M, Chapman M.** 2011. Azoospermia and paternal autosomal ring chromosomes: case report and literature review. Reprod Biomed Online; 23: 466-470.
- **Ross M y Pawlina W.** 2008. Histología, Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. 5ta Edición. Panamericana. Argentina; 952: 789-804.
- **Ruiz María Fernanda.** 1988. Fundamentos de embriología y fisiología de la reproducción. UNAM. Primera edición. México. Distrito Federal; 44-66.
- **Yang Y, Wei X, Yuong-Joo Y, Sutovsky P and Oko R.** 2006. The extracellular protein coat of the inner acrosomal membrane is involved in zone pellucid binding and penetration during fertilization: Characterization of its most prominent polypeptide (IAM38). Developmental Biology; 290: 32-43.
- **Wlash Campbell.** 2008. Urología. 9° Edición. Panamericana. Buenos Aires; 1746: 1583-1586.
- **Zamudio N, Chong S. y O'Bryan M.** 2008. Epigenetic regulation in male germ cells. Society for reproduction and fertility. ISSN; 136: 131-146.