

**UNIVERSIDAD GALILEO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
LICENCIATURA EN QUÍMICA BIOLÓGICA**

**“Determinación de los valores de referencia de espermograma en pacientes de 18-60 años que acudieron a su evaluación en el laboratorio de andrología de la Clínica de reproducción Humana, ubicada en la zona 10 de la ciudad de Guatemala en el año 2021”**



**TESIS**

**PRESENTADO A LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD PREVIO A  
CONFERIRSE EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO BIÓLOGO  
EN EL GRADO ACADÉMICO DE  
LICENCIADO**

**GUATEMALA, JUNIO 2023**

**INTEGRANTES:  
LESLIE ROSEMARIE DE LEÓN AVILA 11002920  
MANUEL EDUARDO MÉNDEZ GÓMEZ 15002059**

**MIEMBROS DE HONOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA  
UNIVERSIDAD GALILEO**

DECANA  
COORDINADOR ACADÉMICO  
COORDINADOR ÁREA DE TESIS

Dra. Vilma Judith Chávez de Pop  
Licda. QB, M.Sc Glenda Marina Escalante Paz  
Lic. Gustavo Adolfo Barrios Sánchez

## JURADO QUE PRACTICÓ EL EXAMEN PRIVADO DE TESIS

PRESIDENTE:

SECRETARIO:

EXAMINADOR:

Guatemala, 20 de enero de 2022

Doctora  
Vilma Chávez de Pop  
Decana  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Presente.

Señora Decana, Dra. Vilma Chávez de Pop:

Por este medio nosotros: MANUEL EDUARDO MENDEZ GOMEZ y LESLIE ROSEMARIE DE LEON AVILA, nos dirigimos a usted como estudiantes de la carrera de Licenciatura en Química Biológica, para solicitar su aprobación del punto de tesis:

**"Determinación de los valores de referencia de espermograma en pacientes de 18 - 60 años que acuden a su evaluación en el laboratorio de andrología de la -CLÍNICA DE REPRODUCCIÓN HUMANA CER- ubicada en la zona 10 de la ciudad de Guatemala"**

Agradeciendo su atención a la presente y en espera de una respuesta afirmativa, me despido de usted.

Atentamente,

  
MANUEL EDUARDO MENDEZ GOMEZ  
15002059

  
LESLIE ROSEMARIE DE LEON AVILA  
11002920

Aprobado  
  
Vilma Chávez



Guatemala, 20 de febrero de 2023

**Doctora**  
**Vilma Chávez de Pop**  
**Decana**  
**Facultad de Ciencias de la Salud**  
**Presente.**

Estimada Dra. Chávez de Pop:

Tengo el gusto de informarle que he realizado la revisión del trabajo de tesis titulado: **“Determinación de los valores de referencia de espermograma en pacientes de 18-60 años que acudieron a su evaluación en el laboratorio de andrología de la -CLINICA DE REPRODUCCION HUMANA CER- ubicada en la zona 10 de la ciudad de Guatemala en el 2,021”** de los alumnos LESLIE ROSEMARIE DE LEÓN AVILA con carnet 11002920 y MANUEL EDUARDO MÉNDEZ GÓMEZ con carnet 15002059 de la **Licenciatura en Química Biológica.**

Después de realizar la revisión del trabajo final he considerado que cumple con todos los requisitos técnicos solicitados, por lo tanto, los autores y asesor se hacen responsables del contenido y conclusiones de la misma.

Atentamente,

Lic. Angel Hernández  
Químico Biólogo  
Colegiado No. 6042

Lic. Angel Arturo Hernández Hernández  
Asesor de Tesis

Cristian Reymundo  
20/02/2023

7 avenida, calle Dr. Eduardo Suger Cofiño, zona 10. anexo Torre I  
PBX: 2423-8000. Ext. 7430 a la 7438. Email: salud@galileo.edu

Guatemala, 16 de junio de 2023

Doctora:  
Vilma Chávez de Pop  
Decana  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Universidad Galileo

Respetable Dra. Chávez:

De manera atenta me dirijo a usted para manifestarle que los alumnos: Leslie Rosemarie de León Avila carné 11002920 y Manuel Eduardo Méndez Gómez carné 15002059, de la Licenciatura en Química Biológica, culminaron su informe final de tesis titulado:

**“Determinación de los valores de referencia de espermograma en pacientes de 18-60 años que acudieron a su evaluación en el laboratorio de andrología de la Clínica de Reproducción Humana, ubicada en la zona 10 de la ciudad de Guatemala en el año 2021”**

Ha sido objeto de revisión gramatical y estilística, por lo que puede continuar con el trámite de graduación.

Atentamente,



Mcs. QB. Angela André Bentzen de Córdón  
Químico Biólogo  
Maestría en Productividad en Ciencias de la Salud  
Colegiado: 5018

## **DEDICATORIA**

**Leslie Rosemarie de León Ávila**

### **A DIOS:**

Por haberme guardado bajo la sombra de su ala, guiarme y acompañarme a lo largo de mi carrera, por fortalecerme en mis momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de experiencias y aprendizaje.

### **A MIS HIJOS:**

Jeremy Alexander e Isaías Alejandro, quienes son mi motor de vida y mi inspiración para luchar cada día por ser mejor, agradezco su amor, paciencia y el tiempo que me regalaron para poder alcanzar esta meta.

### **A MI ESPOSO:**

Guillermo Alexander, quien me ha apoyado a lo largo de este camino, quien nunca corto mis alas, más me ayudo a extenderlas.

### **A MI MAMI:**

Norma Judith, quien con mucha determinación nunca me permitió rendirme, quien me ha enseñado que cada esfuerzo tendrá una recompensa y que los sueños se cumplen cuando se trabaja duro por ellos.

### **A MI FAMILIA:**

Mis hermanos Madeleine Judith y John Paul, mi padre Edgar Sowa, por su amor, paciencia y sobre todo apoyo para poder alcanzar mi meta.

### **A MIS CATEDRÁTICOS:**

Por toda la sabiduría y experiencia compartida, en especial a Licda. Meneses, Licda. Egly Álvarez y Dr. Díaz profesionales que me han enseñado a amar esta profesión.

### **A MIS JEFES:**

Por todo el apoyo brindado, por los consejos y la experiencia compartida, en especial a Licda. Tabarini, Licda. Ozuna y Lic. Luarca, profesionales que con su experiencia me han enseñado a trabajar bajo altos estándares de calidad.

**A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE CARRERA:**

Por haber recorrido este camino juntos, en especial a Manuel Méndez, Claudia Gatica y Licda. Jessica Sánchez, quienes me compartieron sus experiencias y me brindaron su cariño y amistad.

**A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE TRABAJO:**

Por su apoyo y amistad, en especial a Roberto Carvajal quien más me apoyo para poder alcanzar esta meta.

**A MIS ASESORES DE TESIS:**

Lic. Ángel Hernández y Licda. Ángela Bentzen, por su paciencia y sabiduría para finalizar con tan importante proyecto.

## Dedicatoria

Manuel Eduardo Méndez Gómez

- Mi agradecimiento a Dios por haberme permitido la oportunidad de concretar mi carrera, de darme sabiduría y fuerza.
- A mi mama María Regina que es un ángel que me cuida desde el cielo, que me enseñó lo que es el amor al prójimo. Sin ella no hubiera podido llegar a este momento tan especial. La pienso cada día y la extraño mucho, desde el cielo sé que ella me acompaña y se siente orgullosa de mí. Gracias a mi papa Silverio por siempre estar conmigo.
- Gracias a mis hermanos Julio, Mildred y Brenda que me dieron palabras de aliento y por su sincero cariño.
- A mis sobrinos Diego, Joseline, Marcos, David, Víctor, José Carlos y Brendita; a mis sobrinas nietas Ximena y Emma. Que los quiero muchísimo y veo en sus ojos tanta ilusión por un futuro que será muy prometedor.
- A mi novia Ada gracias por ser parte de mi vida, estar conmigo apoyándome, dándome aliento y regalarme tantos momentos felices.
- Gracias a mis catedráticos que me enseñaron no solo clases teóricas, si no la pasión por esta profesión tan bella y el compromiso con nuestros pacientes.
- Mis agradecimientos de todo corazón y mi aprecio a la Licenciada Ozuna que fue mi mayor inspiración para estudiar esta carrera. Muchas gracias por todo su apoyo que si ella no hubiera cumplido mi sueño.
- Muchísimas gracias Licenciada Tabarini por sus palabras de ánimo, por su apoyo motivación, la admiro muchísimo su profesionalismo, pero más que toda su calidad humana su entrega al paciente y a su personal.
- Muchísimas gracias a la Licda Lorenzana por su guía y por sus consejos.
- A mis amigos gracias por su apoyo y amistad Leslie, Antonio y Julio.
- Gracias a mis compañeros de clase Brenda, Jacky, Claudia, Mario, Ana María, Joseline, Jenny, Luis Fernando, Diego.
- Gracias a los lugares que me abrieron las puertas para realizar mis practicas: Intecfa, IGSS zona 5, POC DX, Hospital Roosevelt (Muchísimas gracias Licda Egly).

- Gracias Centro de Reproducción Humana por la oportunidad de laborar y por permitirme realizar mi tesis con ustedes.
- Muchísimas gracias a mi asesor Licenciado Ángel Hernández y mi revisora Licenciada Ángela Bentzen sin ustedes no hubiese sido posible este proyecto.
- Y tantas personas que me ayudaron he hicieron posible que este sueño, se los agradezco de todo corazón.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE IMÁGENES.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xiii
INTRODUCCIÓN .....	xiv

### CAPITULO 1

MARCO METODOLÓGICO	1
1.1 JUSTIFICACIÓN:	1
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:	2
1.2.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA:	2
1.3 ESPECIFICACIÓN DE PROBLEMA:	2
1.4 DELIMITACIÓN DE PROBLEMA:	2
1.4.1 UNIDAD DE ANÁLISIS:	2
1.5 TAMAÑO DE LA MUESTRA:	3
1.6 ÁMBITO GEOGRÁFICO:	3
1.7 ÁMBITO TEMPORAL:	3
1.8 HIPÓTESIS:	3
1.9 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN:	3
1.9.1 OBJETIVO GENERAL:	3
1.9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	4
1.10 MÉTODOS, TÉCNICAS E INSTRUMENTOS:	4
1.10.1 MÉTODO ANALITICO	4
1.10.2 MÉTODO DOCUMENTAL:	9
1.10.3 TÉCNICAS:	10
1.10.4 INSTRUMENTOS:	10
1.11 RECURSOS:	10
1.11.1 RECURSOS HUMANOS:	10
1.11.2 RECURSOS MATERIALES:	10

1.11.3	RECURSOS FINANCIEROS:	11
2	MARCO TEÓRICO	13
2.1	Antecedentes	13
2.2	Antecedentes del Manual de Procesamiento y análisis de Semen de la Organización Mundial de la Salud	15
2.3	2.3 Clínica de reproducción Humana CER	15
2.4	2.4 Importancia Clínica del Análisis de Semen en la Pareja Infértil	16
2.4.1	Coherencia Biológica	17
2.4.2	Coherencia analítica	17
2.5	Anatomía del Aparato Reproductor Masculino	19
2.5.1	Testículo	20
2.5.2	Epidídimo	23
2.5.3	Conductos eferentes	24
2.5.4	Próstata	26
2.5.5	Conducto eyaculatorio	27
2.5.6	Glándulas de Cowper	27
2.5.7	Cuerpos cavernosos	27
2.5.8	Uretra	28
2.6	Líquido Seminal composición y Función	28
2.7	El espermatozoide	29
2.7.1	Antecedentes históricos	29
2.7.2	Anatomía del espermatozoide	30
2.7.3	Espermatogénesis	33
2.8	Causas de Infertilidad Masculina	39
2.8.1	Hipogonadotropismo Primario	39
2.9	Principios del análisis de espermograma:	44
2.9.1	Obtención de la muestra	44
2.9.2	Obtención y transporte de la muestra:	44
2.9.3	Examen Macroscópico	45
2.9.4	Examen Microscópica:	48
2.9.5	Concentración espermática	50

2.9.6	Morfología espermática	52
2.9.7	Vitalidad	53
2.10	Valores de referencia de Espermograma según el Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud.	55
2.11	Infertilidad masculina:	57
2.12	Reporte análisis de espermograma	57
2.13	Análisis Espermático Asistido por Computadora	58
2.14	Control de calidad de los parámetros del líquido espermático	60
2.14.2	Fase analítica:	63
2.14.3	Calidad de la fase post analítica:	64
2.14.4	Recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud en el Manual de Procesamiento de líquido espermático de la sexta edición.	65

## INDICE DE IMAGENES

IMAGEN 1 : Cuadrícula para conteo de espermatozoides en cámara de Makler.	5
IMAGEN 2 : Corte sagital de estructuras que conforman el aparato reproductor masculino.	18
IMAGEN 3: Corte sagital histológico del túbulo seminífero.	20
IMAGEN 4: Corte sagital del Epidídimo	22
IMAGEN 5: Conductos del Sistema Reproductor Masculino.	25
IMAGEN 6: Anatomía del espermatozoide.	32
IMAGEN 7: Mecanismo de producción espermatogénica el eje Hipotalámico	35
IMAGEN 8: Fase proliferativa de la espermatogénesis.	36
IMAGEN 9. Aglutinación espermática.	49
IMAGEN 10. Cámara de Neubauer	52
IMAGEN 11. Gráfica X Control de Calidad	68
IMAGEN 13: Aglutinación de espermatozoides:	99
IMAGEN 14: Coloración Eosina-Nigrosina.	103
IMAGEN 15: La gráfica representa el cuadro grande de la rejilla central.	106
IMAGEN 16: Preparación de Frotis.	110
IMAGEN 17: Espermatozoide ideal	113
IMAGEN 18: Espermatozoides con defecto de cabeza.	114
IMAGEN 19: Espermatozoides con defecto de cuello.	115
IMAGEN 19: Espermatozoides con defecto de cola.	115
IMAGEN 20: Espermatozoide con exceso de citoplasma residual.	116

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1 Valores de referencia de Espermograma, según El Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud en su sexta edición publicado en el año 2,021	57
TABLA No 2 Distribución de pacientes incluidos en el estudio, por grupo etario.	71
TABLA No. 3 Distribución de la clasificación de exclusión de pacientes por patologías, tomar medicamentos y/o fumadores:	73
TABLA No. 4. Determinación de valores atípicos del total de la población.	75
TABLA No. 5 Determinación de la desviación estándar de las variables del análisis de espermograma por grupo etario:	76
TABLA No. 6 Medias de volumen clasificado por días de abstinencia sexual.	77
TABLA No. 7. Comparación de límite inferior y límite superior por grupo etario obtenidos y los valores de decisión de la Organización Mundial de la Salud	78
TABLA No. 8: Medias distribuidas por grupos etarios:	79

## INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1: Porcentaje de la clasificación por grupo etario De pacientes según tabla <b>No.1</b> .....	71
Gráfica No. 2 Porcentaje de la clasificación de exclusión de pacientes por patologías, tomar medicamentos y/o fumadores según tabla No 2.....	72

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento para el análisis espermograma según el Manual de la Organización Mundial de la Salud sexta edición año 2021	94
Anexo 2: Procedimiento de para tinción de Giemsa	118
Anexo 3: Inserto reactivo utilizado para el análisis de la vitalidad en el espermograma.	120
Anexo 4 Inserto de reactivo utilizado para el análisis de pH en el espermograma.	122
Anexo 5: Gráficos	123
Anexo 6: Cuestionario para la inclusión o exclusión de muestras para estudio de determinación de valores de referencia.	127
Anexo 7: Manual de operaciones Cámara de Makler	128

## INTRODUCCIÓN

Uno de los principales anhelos de las parejas es el ser padres y concebir hijos, esto hace la unión matrimonial más fuerte y crea vínculos paternales que son de por vida. Este sueño a veces es truncado por la incapacidad masculina de producir espermatozoides de calidad y llegar a un embarazo exitoso. Lo que hace que la pareja sienta frustración ante esta incapacidad. Pero, existen alternativas y tratamientos ante este inconveniente, por lo cual el espermograma es vital para poder diagnosticar la infertilidad masculina.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo principal determinar los valores de referencia para el análisis del espermograma, en pacientes entre las edades de 18-60 años que asistieron al laboratorio de andrología de la Clínica de Reproducción humana CER en el año 2,021 y compararlos a los proporcionados por el manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud en su sexta edición.

El principal objetivo del espermograma es determinar la calidad del espermatozoide, por medio de una serie de pruebas de laboratorio (movilidad, morfología y vitalidad) que ayudan en la toma de decisiones para el seguimiento de diferentes tratamientos de fertilidad y crío preservación de espermatozoides.

Actualmente no se cuentan con valores de referencia para el análisis de espermograma específico para la población guatemalteca. La Organización Mundial de la Salud realizó el estudio con poblaciones de diferentes países en cuatro continentes (Europa, África, Asia, América) de los cuales no se incluyó a Guatemala ni otro país de Centroamérica. Las poblaciones que fueron tomadas en cuenta para el estudio son muy distintas a la guatemalteca en genética, costumbre, hábitos alimenticios y características físicas; por consiguiente, los valores de referencia pueden ser distintos.

Es de interés en el área de la salud aportar datos estadísticos actualizados sobre esta problemática, en el ámbito profesional el principal objetivo es obtener valores de

referencia sobre un tema muy poco estudiado y así proponer nuevos estudios en base a este tema.

En el marco de la metodología se excluyen todos aquellos pacientes que no cumplen con ciertos requisitos, tales como: toma de medicamentos, tabaquismo o tener diagnosticado una patología que interfiera con la calidad del espermatozoide.

Se analizaron los datos de un total de 408 participantes de los cuales fueron incluidos para cada variable los siguientes: pH 320(88%), volumen 267(65%), concentración 153(37%), vitalidad 116 (28%), concentración total 110(27%), movilidad 100 (25%), morfología 72 (17%) y estos datos excluyen todos aquellos valores atípicos.

De los 408 participantes el 17% pertenece al grupo etario entre los 18-30 años, el 60% entre los 31-40 años y por último mayores de 41 años que constituyen el 23%.

En el estudio se excluyen a 100 pacientes por las variables: 43% azoospermia (ausencia de espermatozoides en el semen), 25% criptoospermia (conteo de espermatozoides debajo de 100,000 espermatozoides por mililitro), 22% uso de medicamentos, 9% fumadores y 1% de necrozoospermia (presencia mayor al 42% de espermatozoides muertos).

En anexos se puede encontrar un manual de procesamiento de espermograma según las especificaciones de la Organización Mundial de la Salud en su sexta edición publicado en el año 2021.

# 1 MARCO METODOLÓGICO

## 1.1 JUSTIFICACIÓN:

El espermograma es una prueba de laboratorio que tiene la finalidad de determinar la cantidad y calidad de los espermatozoides contenidos en el semen, por lo tanto, es una prueba básica para evaluar la fertilidad. Puede ayudar a determinar si existe un déficit en la producción, alguna anomalía en su morfología o funcionalidad que cause infertilidad.

El espermograma se utiliza después de una vasectomía para constatar la ausencia de espermatozoides en el semen y con esto se puede confirmar el éxito del procedimiento y también para determinar patologías que afecten la fertilidad como azoospermia, criptozoospermia y/o necrozoospermia.

En Guatemala, no se cuentan con estudios que determinen intervalos de referencia de espermograma para su población, dada la falta de información, según el Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de La Salud en su sexta edición indica que cada laboratorio debe determinar valores normales propios.

El presente trabajo tiene la finalidad de determinar los valores de referencia de espermograma en hombres que acuden al laboratorio de andrología de la Clínica de Reproducción Humana, posteriormente los resultados serán comparados con los intervalos de referencia utilizados por la Organización mundial de la Salud y así determinar si hay diferencias significativas.

Con esta investigación se pretende aportar los intervalos de referencia de espermograma, propios para la población guatemalteca que se adapten a sus características.

## **1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

### **1.2.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA:**

En el ámbito de la salud, el análisis de espermograma es de vital importancia para: diagnóstico, tratamiento, seguimiento y verificación de procedimientos de fertilidad. La toma de decisión de los médicos se basa en los resultados que proporciona el laboratorio y su interpretación con los intervalos de referencia. Por lo tanto, es esencial la calidad y fiabilidad de los resultados, desde la recolección de la muestra hasta la emisión de resultados con valores de referencia aplicables a su población.

¿Existen en Guatemala valores de referencia para el análisis de espermograma aplicables a su población?

## **1.3 ESPECIFICACIÓN DE PROBLEMA:**

La falta de intervalos de referencia en la población guatemalteca para el análisis de espermograma ha llevado a los laboratorios a utilizar los proporcionados por la Organización Mundial de la Salud. La población que fue sujeta al estudio difiere, por genética, hábitos alimenticios, calidad de vida, etc.

## **1.4 DELIMITACIÓN DE PROBLEMA:**

### **1.4.1 UNIDAD DE ANÁLISIS:**

Se determinarán los valores de referencia de espermograma en pacientes entre 18-60 años que asistieron a realizarse el análisis al laboratorio de andrología de la Clínica de Reproducción Humana, en el año 2021.

### **1.5 TAMAÑO DE LA MUESTRA:**

Se analizarán los resultados de 512 pacientes entre 18-60 años que acudieron a realizarse el análisis de espermograma en el Laboratorio de andrología de la Clínica de Reproducción Humana en el año 2021.

### **1.6 ÁMBITO GEOGRÁFICO:**

Los valores de referencia de espermograma se analizarán de los pacientes que acudieron a realizar el análisis de espermograma en el año 2021, en el laboratorio de andrología de la Clínica de Reproducción Humana, ubicada en la zona 10 de la capital de Guatemala, estos datos abarcan todos los departamentos de país.

### **1.7 ÁMBITO TEMPORAL:**

El procesamiento de las muestras de semen se realizó en el año 2021, el análisis de los datos para la determinación de valores de referencia se realizará durante los años 2022 y 2023.

### **1.8 HIPÓTESIS:**

¿Es factible determinar los valores de referencia para el análisis de espermograma con los resultados obtenidos de pacientes entre los 18-60 años, que se presentaron a realizar la prueba de espermograma en el Laboratorio de andrología de la Clínica de Reproducción Humana, ubicada en la zona 10 de Guatemala, durante el año 2021?

## **1.9 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN:**

### **1.9.1 OBJETIVO GENERAL:**

- Determinar los valores de referencia de espermograma en pacientes de 18 - 60 años que acuden a su evaluación en el laboratorio de andrología de la Clínica de Reproducción Humana, ubicada en la zona 10 de la ciudad de Guatemala.

### **1.9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Actualizar el procedimiento para el análisis de Espermograma, según el Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud en su sexta edición, publicado en el año 2,021.
- Incorporar el procedimiento para el control de la calidad en el análisis espermograma, según el Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud en su sexta edición, publicado en el año 2,021.
- Comparar los valores de referencia otorgados por el manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud en su sexta edición, publicado en el año 2,021 con los obtenidos en este estudio.

## **1.10 MÉTODOS, TÉCNICAS E INSTRUMENTOS:**

### **1.10.1 MÉTODO ANALÍTICO:**

#### **Análisis de las muestras:**

El procedimiento descrito a continuación es el utilizado en el Laboratorio de Andrología de la Clínica de Reproducción Humana.

Evaluación de los parámetros seminales:

- Toma de muestra según protocolo. (Ver anexo No. 1)

- Colocar el frasco colector con la muestra de semen en la incubadora a 37° Centígrados durante 30 minutos hasta verificar que presente una licuefacción total (muestra en estado líquido), al no observar licuefacción después de la primera hora hacer pasar la muestra de semen por una aguja número 21 con la ayuda de una jeringa.

### **Evaluación macroscópica:**

Observar la muestra de semen los siguientes parámetros:

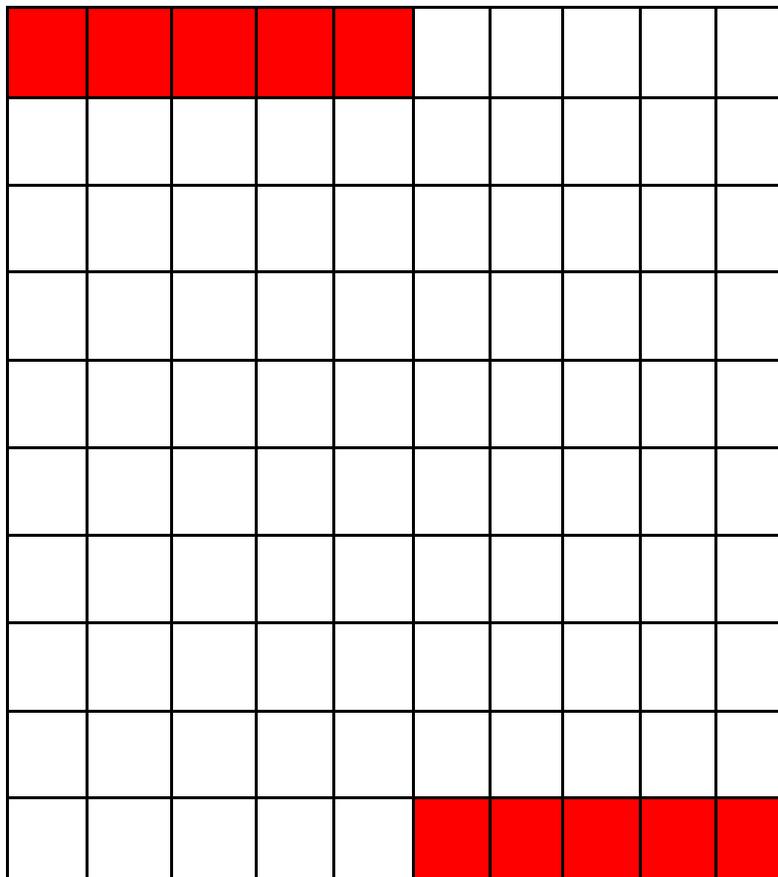
- **Licuefacción total:** Determinar en minutos el tiempo que le tome a la muestra llegar a un estado líquido y sin rastros de grumos. Si no se observa licuefacción después de 45 minutos reportar como “Licuefacción extendida”
- **Volumen:** Aspirar la muestra con una jeringa de 10 mililitros y medir su volumen.
- **Viscosidad:** Introducir un palillo de madera, tomar una porción de la muestra. Observar el filamento de moco y medirlo en centímetros.
- **Color:** Observar el color de muestra puede ser: Blanco opalescente, gris opalescente, amarillo, rojo o marrón.
- **pH:** Medir con papel pH e interpretar visualmente. (ver anexo 3)
- **Aspecto:** Evaluar visualmente puede ser: homogéneo, líquido o grumoso.

### **Evaluación microscópica:**

- **Concentración espermática:**
  - Tomar 25 uL de la muestra de semen con una pipeta calibrada y dispensarla en cámara de Makler. (Ver Manual de Operaciones de la Cámara de Makler en inserto No. 7)
  - Enfocar en objetivo 20 x, contar los espermatozoides en 10 cuadrículas, realizar los conteos en 5 cuadros de la parte superior y los otros 5 en la parte inferior de la cámara (ver Tabla 1: Cuadrícula para conteo de espermatozoides en cámara de Makler)
  - Determinar el número de espermatozoides por mililitro, multiplicando el número de espermatozoides contados por un millón (No tomar en cuenta los espermatozoides incompletos.)  
Si no se observan espermatozoides en la cámara de Makler se procede a centrifugar la muestra en un tubo cónico de plástico a 2500 revoluciones por minuto por 10 minutos.  
Aspirar el botón de sedimento con una pipeta de Pasteur y observar en objetivo 20x. Si se observan espermatozoides estos se cuantifican en 20 campos y se realizará un promedio. Se reportará: “En muestra centrifugada

se observaron (número de espermatozoides contados) por campo “. Si no se observan reportar azoospermia.

**IMAGEN 1:** Cuadrícula para conteo de espermatozoides en cámara de Makler.



Tomada y adaptada: Manual para el procesamiento de líquido seminal del laboratorio de Clínica de Reproducción Humana.

- **Motilidad**
  - La motilidad o movilidad se evalúa al mismo tiempo que el recuento espermático.
  - Contar 200 espermatozoides clasificándolos como: Progresivos rápidos, progresivos lentos, no progresivos e inmóviles. Se reporta en porcentaje.
  - La movilidad total es la suma de los espermatozoides progresivos rápidos, progresivos lentos y no progresivos.
  
- **Presencia de células redondas y/o leucocitos:**

- Si se observan leucocitos o células redondas se deben reportar como escasa, regular o abundante y puede sugerir infección o prostatitis (inflamación de la próstata).
- **Morfología:**
    - Realizar dos extendidos con la muestra de semen, uno será analizado y el otro se guardará como registro. (ver procedimiento de extendido en anexo No. 1)
    - Ambas láminas se deben teñir con Giemsa. Dejarlas secar para evaluar la morfología al microscopio en objetivo de inmersión (100x).
    - Contar 200 células de 5 campos distintos, realizar una diferenciación entre espermatozoides: normales, defecto de cabeza, defecto de cuello, defecto de pieza principal y defecto de cola
    - Reportar en porcentaje.
- **Vitalidad:**
    - Agitar la botella de Sperm VitalStain (Eosina-nigrosina) (ver anexo No. 2, inserto)
    - Tomar 50 microlitros de Sperm VitalStain y 50 microlitros de semen, en un tubo de vidrio homogeneizar e incubar por 5 minutos a 37 ° Centígrados.
    - Transferir una gota con una pipeta Pasteur a un portaobjetos y realizar un extendido de forma suave.
    - Dejar secar al aire y examinar usando el objetivo de inmersión.
    - Contar 200 espermatozoides, los blancos o sin tinción son clasificados como vivos (los que tengan tinción sólo en el cuello se consideran vivos) y los rojos o rosados son clasificados como muertos
    - Reportar el porcentaje de vivos.
  - **Informe:** Se trasladan los datos al informe final.

### 1.10.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se detectaron los valores atípicos o valores extremos para cada variable de análisis de espermograma con el método no-paramétrico de Tukey. El método consiste en calcular los cuartiles: Inferior (Q1= percentil 25%) y superior (Q3 percentil 75%)

obtenido de la sustracción  $Q3 - Q1$  (Boyd, 2010; Díaz et al, 2012), posteriormente se calcularán los límites superior e inferior de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned}\text{Límite inferior} &= Q1 - 1.5 \times \text{RIC (Rango intercuartílico)} \\ \text{Límite superior} &= Q3 + 1.5 \times \text{RIC (Rango Intercuartílico)}\end{aligned}$$

Los valores ubicados fuera de los límites de los Cuartiles 2 y 3 serán considerados como valores atípicos y no se utilizarán en la determinación de los valores de referencia (Boyd, 2010; Díaz et al, 2012).

Para la determinación de los valores de referencia se excluirán valores atípicos, por lo que se utilizarán los valores encontrados entre el rango abarcado por los límites de método de Tukey para cada variable de análisis de espermograma (López, 2019).

Luego de la determinación de los valores atípicos según el método no-paramétrico de Tukey, se realizará una estimación de la proporción de los valores atípicos para cada variable, mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Proporción} = \frac{\text{Valores atípicos}}{\text{Casos por rango etario}} * 100$$

Se utilizará el método no paramétrico recomendado por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) en su guía C28-A3. El método consiste en ordenar el número de observaciones por magnitud en orden descendente (Boyd, 2010; Díaz et al, 2012).

Posteriormente se determinarán los límites de referencia inferior (percentil 2.5 %) y superior (97.5%) a través de las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned}\text{Límite de referencia inferior (r1)} &= 0.025 \times (n + 1) \\ \text{Límite de referencia superior (r2)} &= 0.975 \times (n + 1)\end{aligned}$$

Los valores de referencia se establecerán por grupos etarios (por edad) los cuales fueron definidos tomando en consideración a las etapas de la vida reproductiva masculina, según la Organización Mundial de la Salud (Equipo editorial, Etecé Mayo 6

2022) y por la influencia de la edad en la calidad de semen (García, 2017). Los cuales fueron divididos en 3 grupos (18- 30 años, 31-40 años y mayores de 41 años).

Se realizará una comparación entre los valores obtenidos con los valores que utiliza la Organización mundial de la salud. Con esto se evaluará la semejanza o diferencia significativa entre los valores de referencia propuestos por la literatura y los valores obtenidos en esta investigación.

### ■ 1.10.3 MÉTODO DOCUMENTAL:

A través de este método, se recopila información necesaria y adecuada para la elaboración de un marco teórico.

Se realizará una filtración en la base de datos de todos los pacientes que asisten al laboratorio de Andrología de la Clínica de Reproducción Humana, entre las edades de 18-60 años a realizarse un análisis de espermograma.

#### **Criterios de exclusión:**

Se excluirán del estudio los resultados de pacientes que presentaron uno o más de los siguientes criterios:

- Azoospermia
- Necrozoospermia
- Criptozoospermia
- Consumo de tabaco
- Consumo de medicamentos
- Enfermedades crónicas: diabetes, hipertensión, hipotiroidismo, hipertiroidismo, enfermedades renales, hepáticas etc.

#### **Criterios de inclusión:**

Todos los resultados de espermograma obtenidos de pacientes sanos entre las edades de 18-60 años que acudieron al laboratorio de Andrología de la Clínica de Reproducción Humana en el año 2021.

### **1.10.2 TÉCNICAS:**

- Análisis de contenido
- Subrayado
- Estadística
- Recopilación de datos

### **1.10.3 INSTRUMENTOS:**

- Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud, sexta edición publicada en el año 2021.
- Libros
- Computadoras
- Base de datos de los resultados de análisis de espermograma analizados en el laboratorio de Andrología de la Clínica de Reproducción Humana en el año 2021.
- Unidad de almacenamiento externo
- Programa de Excel

## **1.11 RECURSOS:**

### **1.11.1 RECURSOS HUMANOS:**

- Investigadores

### **1.11.2 RECURSOS MATERIALES:**

- Materiales de oficina
- Computadoras
- Textos bibliográficos
- Hojas de papel

- Impresora

### 1.11.3 RECURSOS FINANCIEROS:

- Propios de los investigadores

## 1.12 Cronograma

CRONOGRAMA 2022												
Actividades	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE
Selección de tema	■											
Planteamiento del problema		■										
Elaboración de Justificación y objetivos		■										
Busqueda y descripción de bibliografía			■	■								
Diseño de hipótesis		■										
Desarrollo del marco teórico e histórico					■	■	■					
Planteamiento de la metodología del trabajo			■									
Elaboración de cronograma de trabajo		■										
Definición de recursos			■									
Entrega de anteproyecto o plan de trabajo										■		
Revisión de anteproyecto y autorización											■	
Recolección de datos		■	■	■	■							
Elaboración de resultados								■				
Desarrollo de discusión de resultados									■			
Descripción de conclusiones y recomendaciones									■			
Entrega de documento final a revisión											■	
Realización de correcciones											■	
Entrega del documento final												■

## CAPÍTULO II

### 2 MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes

El tema de la infertilidad tiene diferentes facetas: biológicas, sociales, bioéticas, jurídicas, religiosas y políticas, que lo convierten en un tema de investigación novedoso y desafiante para el ser humano.

El fenómeno de la infertilidad ha acompañado al ser humano desde sus inicios, dependiendo de las concepciones socioculturales que existen en torno al significado de la paternidad. Los egipcios fueron pioneros en la predicción de los problemas de fertilidad y el diagnóstico del embarazo temprano. (Díaz, 2007).

En Mesoamérica los Aztecas utilizaban el árbol de Yoloxochitl (uno de los árboles más atesorados en los jardines de Moctezuma), por sus propiedades aromáticas, mágicas y curativas contra la esterilidad femenina. Al mismo tiempo en Europa se utilizaba el *Corpus Hippocraticum* (conjunto de tratados especializados en fisiología y etimológicos redactados entre 350 y 420 años antes de Cristo, contenidos en la Biblioteca de Alejandría, desconociéndose su autor), el cual muy era utilizado en el siglo XVIII, incluía una serie de procedimientos para el diagnóstico y el tratamiento de la fertilidad. (Díaz, 2007) (Martínez, 1996)

La idea de transferir un embrión de un humano a otro data desde la antigüedad en la religión Jain, (de origen hindú) en el libro de Kappa-Sutra este contiene pasajes o Jinas el cual habla del líder religioso Mahavira. Quien en una de sus reencarnaciones fue concebido por Devananda (una mujer casta), que por órdenes del Dios *Sakra*, el embrión de Devananda fue transferido al vientre de Tisala (esposa del rey Kchatry); esta historia ha sido celebrada en pinturas y esculturas. (Bergua, 1964)

La historia de la primera Fertilización In vitro data del año 1890, el profesor Walter Heape de la Universidad de Cambridge Inglaterra, reportó el primer trasplante de embriones exitoso, en conejo angora a un conejo ciervo belga dando como resultado el nacimiento de 6 conejos sanos. (Shah & SM, 2017)

En el siglo XX se sostenía la teoría de que el simple hecho de la unión del espermatozoide y el óvulo tenía como resultado un embarazo. En el año de 1951 Austin Colin Russell descubrió lo que hoy conocemos como “Capacitación espermática”, cambios que puede sufrir un espermatozoide para llegar a la fecundación del óvulo. (Johnson, 2019)

En 1920 se estudió la hiperestimulación ovárica, como el mejor método para la obtención de los óvulos maduros en animales, pero no fue hasta 1960 que se empezó a utilizar en humanos. En 1980 en el Instituto Jones en Virginia, se inició el tratamiento de estimulación ovárica, para la obtención de múltiples ovocitos con gonadotrofinas como la FSH y LH para los procedimientos de fertilizaciones In Vitro. Este tratamiento aumentó la incidencia de embarazos en un 23.8% en 1982. (Larregle & Young, 2021)

En 1949 el científico Hammond logró un gran avance en la fertilidad, pudo obtener embriones a partir de ratones de 4 y 8 células e incubarlos, hasta llegar al estadio de blastocisto incubado en una solución de bicarbonato de Krebs-Ringer con clara de huevo. (Larregle & Young, 2021)

El primer embarazo humano mediante Fertilización In vitro fue en 1973 realizado por: Carl Wood y John Leeton en Melbourne, Australia. Desafortunadamente, terminó en muerte embrionaria temprana en menos de una semana. (Brisden, 2009)

El primer embarazo llevado a término en seres humanos se logró el 25 de julio de 1978 por el ginecólogo Patrick C. Steptoe y el biólogo Robert G. Edwards a más de un cuarto de siglo del perfeccionamiento de la técnica de fecundación In Vitro. (Evers, 2003)

## **2.2 Antecedentes del Manual de Procesamiento y análisis de Semen de la Organización Mundial de la Salud**

El manual de la Organización Mundial de la Salud para el procesamiento del análisis de semen humano y moco cervical se publicó por primera vez en 1980, en respuesta a la creciente necesidad de estandarizar los procedimientos. Posteriormente el manual se revisó cuatro veces del año de 1987 al 2021. (Organización Mundial de la Salud, 2021)

El manual es un documento de referencia para los métodos de análisis y procesamiento de espermograma en el laboratorio. Que tienen como objetivo sustentar la calidad del análisis y la compatibilidad de los resultados de diferentes laboratorios. En los últimos años el manual ha de convertirse en un estándar reconocido y ampliamente utilizado en los laboratorios. (Organización Mundial de la Salud, 2021)

La metodología utilizada para el cálculo de los diferentes valores de corte ha variado con los años, los límites inferiores de referencia en los parámetros de semen se obtuvieron a partir de varios estudios retrospectivos sobre la calidad seminal y la fertilidad de las parejas. Muestras obtenidas a partir de hombres que embarazaron a su pareja en un tiempo máximo de 12 meses sin el uso de ningún tratamiento anticonceptivo. (Organización Mundial de la Salud, 2021).

Las muestras incluidas para el cálculo de los límites inferiores de referencia de los diferentes parámetros seminales cumplieron con los siguientes requisitos: Muestras una por cada hombre obtenida con un tiempo de abstinencia comprendidos entre 2 a 7 días. Se analizaron aproximadamente 1,800 muestras en 8 países pertenecientes a 4 continentes. (Organización Mundial de la Salud, 2021).

### **2.32.3 Clínica de reproducción Humana CER**

El Centro de Reproducción Humana es una clínica especializada en procedimientos para la procreación en pacientes con problemas de fertilidad. Cuenta con tratamientos como Inseminación Intrauterina, Fertilización In Vitro, Screening Genético de preimplantacional, eclosión asistida, tratamiento clínico para nivelación hormonal, nutrición e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

Cuenta con programa de Banco de óvulos y espermatozoides, siendo una solución para pacientes que por situaciones de salud o por otros motivos desean preservar sus celulares germinales.

Fue fundada en el año 1976, siendo la primera Clínica especializada en fertilidad en Centro América. Entre sus logros podemos destacar:

- Primer embarazo por fertilización In vitro en Centro América, año 1990.
- Primer embarazo por el método ICSI en Centro América, año 2000.
- Obtención de esperma quirúrgicamente para ICSI en Centro América.
- Únicos y primeros en Centro América en ser Acreditados por La Red Latinoamericana de Reproducción Asistida. (CER, 2022).

Actualmente, cuenta con un equipo de profesionales entre Médicos especializados en fertilidad humana, embriólogos, nutricionistas, químicos biólogos y anestesiólogos; cuenta con la tasa más alta de embarazos por Inseminación Artificial a nivel nacional. (CER, 2022)

### **2.42.4 Importancia Clínica del Análisis de Semen en la Pareja Infértil**

El análisis de espermograma nos indica el estado funcional de la secreción exocrina de las glándulas sexuales masculinas y nos orienta sobre patologías del sistema genital. Para que sea clínicamente útil debemos asegurarnos de la coherencia biológica y analítica de los resultados, de tener presente determinadas limitaciones del análisis de semen y sus valores de referencia. Para todo esto, será fundamental tener en cuenta las fases del procesamiento: preanalítica, analítica y postanalítica. La aplicación correcta de

las técnicas y los procedimientos sean descritos por guías internacionalmente reconocidas, por ejemplo: El manual de la Organización Mundial de la Salud en su última versión. (Organización Mundial de la Salud, 2010)

#### **2.4.1 Coherencia Biológica**

Conocer por qué se produce el semen y los factores (clínicos analíticos), que afectan la calidad es la clave para realizar interpretaciones fisiopatológicas coherentes. Las fracciones de semen durante la eyaculación no son homogéneas: la primera fracción del eyaculado que proviene del testículo y el epidídimo es la que contiene la mayor concentración de espermatozoides. Por lo tanto, cualquier resultado que obtengamos al analizar la muestra incompleta no refleja un resultado confiable en cuanto a la concentración total del eyaculado; por lo que no se debe analizar muestras incompletas. Será un resultado incoherente en muestras con una alta concentración espermática y escaso volumen y no se podrá realizar una comparación con espermogramas anteriores normales. (Manual, Organización Mundial de la Salud, 2021)

Debemos interpretar una posible influencia negativa principalmente ante el déficit de movilidad espermática si existe retraso en la entrega de la muestra en el laboratorio, conservación inadecuada de la muestra, periodos de abstinencia prolongados, colección inadecuada como el coito interrumpido, posible contaminación con agua, jabón y orina. (Manual, Organización Mundial de la Salud, 2010)

#### **2.4.2 Coherencia analítica**

La obtención de determinados resultados puede llevar a la imposibilidad de valorar otras magnitudes del espermograma, por ejemplo: En casos de una azoospermia no se puede realizar el análisis de movilidad o morfología. En otras ocasiones los resultados se deben interpretar según la condición de la muestra de semen, por ejemplo, la presencia de agregaciones o aglutinaciones. Su presencia puede interferir en la valoración de la movilidad, ya que se podría interpretar como no progresivo a un elevado número de espermatozoides progresivos que se encuentran capturados. De esta manera, si el porcentaje de espermatozoides atrapados es mayor al 25%, la valoración de la motilidad se realizará exclusivamente con espermatozoides libres, debiéndose anotar el porcentaje

de espermatozoides que se encuentran atrapados. (Björnadah, Mortimer, & Barratt, 2010).

La obtención de algunos resultados no obligará a repetir procedimientos analíticos o no invalidará el análisis de semen y no será necesario solicitar nueva muestra, por ejemplo: cuando el porcentaje de espermatozoides móviles sea superior al porcentaje de espermatozoides vivos, o la suma de espermatozoides móviles total, sea mayor o menor que la suma de espermatozoides progresivos y no progresivos. (Manual, Organización Mundial de la Salud ,2021).

En función de los resultados obtenidos en el espermograma, el manual de la Organización mundial de la Salud 2010, distingue las siguientes patologías:

- **NORMOZOOSPERMIA:** Número total de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y con morfología normal igual o por encima del límite inferior de referencia.
- **ASPERMIA:** Ausencia de semen eyaculado o eyaculación retrógrada.
- **ASTENOZOOSPERMIA:** Porcentaje de espermatozoides móviles por debajo del valor de referencia.
- **ASTENOTERATOZOOSPERMIA:** Porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y morfología normal por debajo del valor de referencia.
- **AZOOSPERMIA:** Ausencia de espermatozoides en el eyaculado.
- **CRIPTOZOOSPERMIA:** Ausencia de espermatozoides en la muestra en fresco y presencia de un sedimento tras la centrifugación de la muestra.
- **HEMOSPERMIA:** Presencia de eritrocitos en el eyaculado.
- **LEUCOSPERMIA:** Presencia de leucocitos en el eyaculado por encima del valor normal.
- **NECROZOOSPERMIA:** Bajo porcentaje de espermatozoides vivos y alto porcentaje de espermatozoides inmóviles en el eyaculado.
- **OLIGOASTENOZOOSPERMIA:** Número total de espermatozoides y porcentaje de espermatozoides móviles progresivo por debajo del límite inferior de referencia.

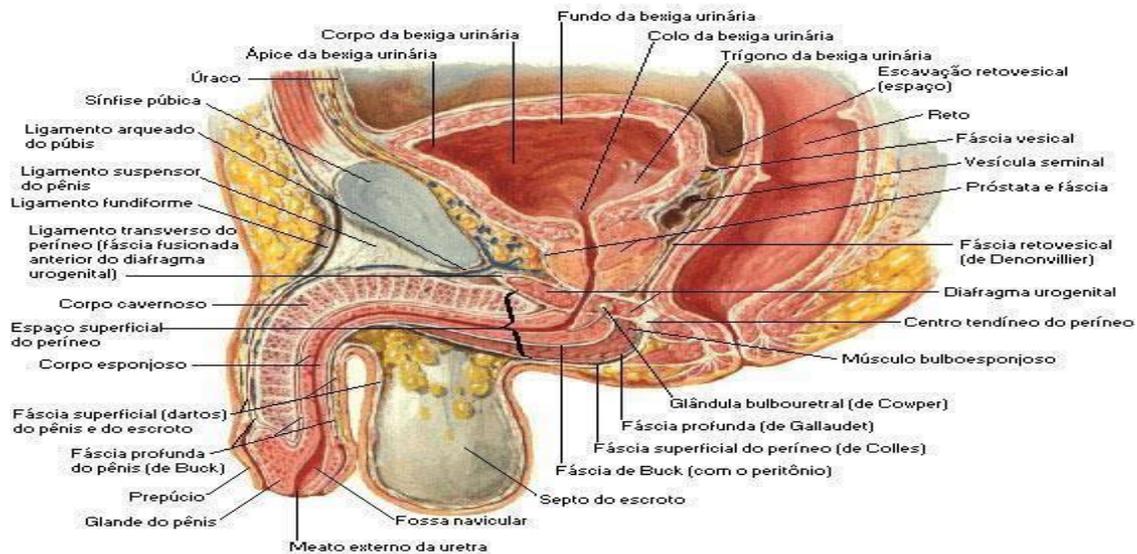
- **OLIGOASTENOTERATOZOOSPERMIA:** Número total de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y espermatozoides con morfología normal por debajo del límite inferior de referencia.
- **OLIGOTERATOZOOSPERMIA:** Número total de espermatozoides y porcentaje de espermatozoides con morfología normal por debajo del límite inferior de referencia.
- **OLIGOZOOSPERMIA:** Número total de espermatozoides por debajo del límite inferior de referencia.
- **TERATOZOOSPERMIA:** Porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales por debajo del límite inferior de referencia. (Björnadah, Mortimer, & Barratt, 2010)

## 2.5 Anatomía del Aparato Reproductor Masculino

La función principal del aparato reproductor masculino es producir, transportar y almacenar gametos o células reproductoras, que se fusionan con los gametos femeninos para crear un nuevo ser humano, logrando así la supervivencia de la especie. En el caso del varón el gameto es llamado espermatozoide. (Ingraham & Ingraham, 1998).

El aparato reproductor masculino se compone de dos testículos, dos conductos deferentes, vesículas seminales, dos conductos eyaculadores, dos cordones espermáticos, escroto, pene, uretra, glándulas prostáticas y dos glándulas de Cowper. (Gutiérrez, 2004).

**IMAGEN 2:** Corte sagital de estructuras que conforman el aparato reproductor masculino.



Adaptada y tomada: Basulto, M. 2006, urología clínica (pág. 212)

### 2.5.1 Testículo

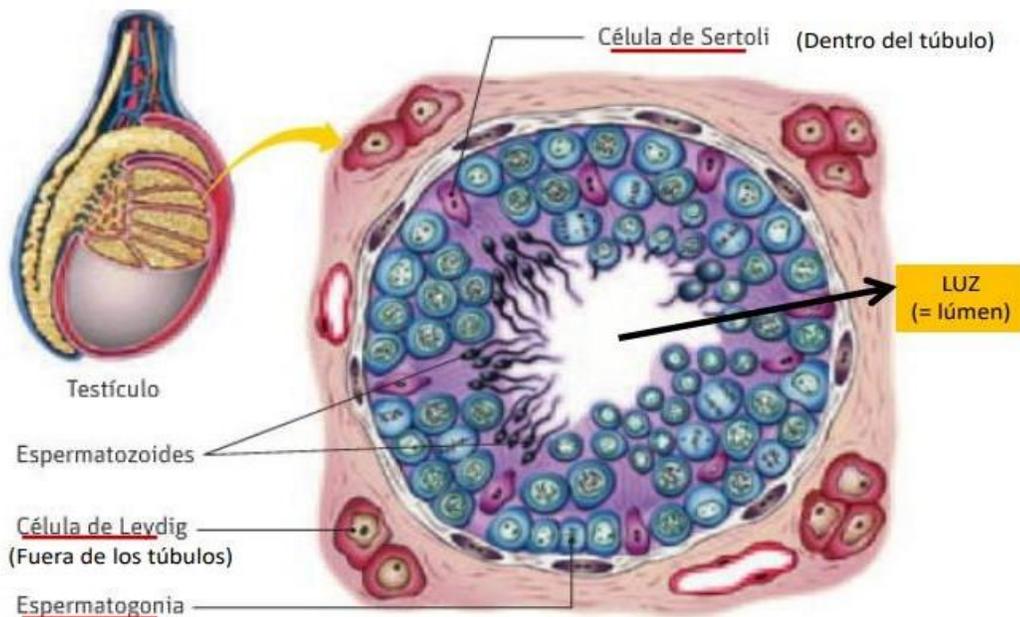
Los testículos constan de dos glándulas ovoides, se calcula que miden unos 5 centímetros de largo y unos 2.5 centímetros de diámetro con un peso aproximado de 10 a 15 gramos, se encuentran suspendidos dentro del escroto por el cordón espermático, son productores de las células reproductoras masculinas o espermatozoides y las hormonas sexuales masculinas especialmente la testosterona. (Reiriz, 2005)

Están rodeados por una capa de tejido conjuntivo llamado albugínea, está formada en su interior por tabiques que dividen al testículo llamados lobulillos, estos contienen unos tubos denominados seminíferos. En el interior de estos túbulos seminíferos, tenemos las células espermatogénicas y las células de los túbulos seminíferos o de sustentación también llamadas Sertoli, se encargan de la nutrición de las células espermáticas. Un último tipo de células denominadas células intersticiales como las células de Leydig que se encarga de la fabricación de hormonas. (Almagiá & Lizana, 2009)

### 2.5.1.1 Histología testicular

El interior del testículo histológicamente está constituido por una serie de estructuras de forma redonda, que albergan las células espermáticas germinales (espermatozonias, espermatozonitos, espermátidas y espermatozonides), la maduración de los espermatozonides se lleva a cabo desde el borde externo donde se encuentran la células más primitivas llamadas espermatozonias hasta la luz que se encuentra en el medio del túbulo Seminífero donde encontramos los espermatozonides maduros en el interior están las células de Sertoli y en la parte exterior las células de Leydig . (Gal, López, Martín, & Prieto, 2005).

**IMAGEN 3:** Corte sagital histológico de un túbulo seminífero.



Adaptada y tomada: Tafalla, Juan. 2,013. Web consultas, revista de Salud y bienestar, <https://www.webconsultas.com/salud-al-dia/cancer-de-testiculo/cancer-de-testiculo-12178>

### **2.5.1.2 Células de Sertoli**

Las Células de Sertoli son células piramidales cuyo citoplasma se extiende desde la membrana basal que está en el borde hasta la luz del tubo seminífero, tiene un núcleo basal triangular con cromatina laxa y nucléolo muy evidente. Son estructuralmente muy importantes y cumplen con las siguientes funciones:

- Soporte mecánico y nutricional: Constituye la barrera hemato-testicular y regula la espermatogénesis.
- Síntesis de Inhibina (Hormona cuya función es parar la producción de la Hormona Folículo estimulante) y Activina (Hormona activadora de la síntesis de la FSH), síntesis de proteínas ligadoras de Andrógenos. (Cwi, Frydman, Rondinone, & Tzal, 2007) (Ruiz, Búrguez, Ozonas, & Piza, 2010)

Las células de Sertoli tienen gran importancia en el desarrollo de las células germinales mediante tres mecanismos:

- Crea un microambiente especializado nutritivo para las células espermatogénicas dentro de los tubos seminíferos.
- Proporciona sostén a las células germinales mediante estrecha relación entre estas y las de Sertoli.
- Facilita la migración de las células germinales en desarrollo en el tubo seminífero. (Cwi, Frydman, Rondinone, & Tzal, 2007)

### **2.5.1.3 Células de Leydig**

Se encuentran inmersas en tejido conectivo de colágeno peritubular, se ubica cerca de las estructuras vasculares. Contiene un citoplasma acidófilo, inclusiones lipídicas, núcleo redondo de cromatina laxa y nucléolo evidente. Se encuentran dentro de los Túbulos Seminíferos y son estimuladas por la hormona Folículo Estimulante.

Tiene como función:

- La síntesis de testosterona
- Desarrollo de genitales internos y externos
- Estimulación de la formación ósea
- Favorece los caracteres sexuales secundarios
- Permite la espermiogénesis. (Welsch, 2006)

## 2.5.2 Epidídimo

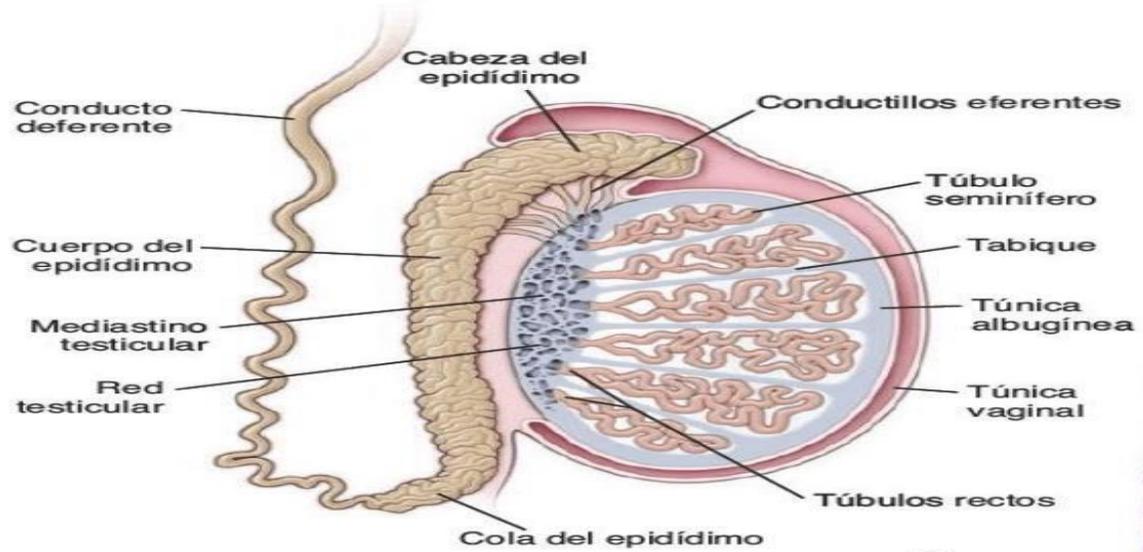
Es un conducto muy fino y plegado, que conecta a los testículos por medio de los tubos eferentes. Su función es llevar a los espermatozoides de estado inmóvil a su completa maduración en la cual sea capaz de fertilizar. El epidídimo secreta proteínas y otras moléculas que componen el líquido epididimario que entra en contacto con los espermatozoides y contribuye a su maduración. (Annam, 2010)

El conducto epididimario es un órgano altamente ordenado y segmentado en donde cada uno de estos segmentos representa un compartimento fisiológicamente único. Cada uno de ellos posee distintos perfiles de expresión génica dentro del epitelio, el cual dicta una secreción segmento-específica de proteínas hacia el espacio luminal impactando directa o indirectamente la maduración espermática. (Carrete, 2022)

El epidídimo consta de tres partes:

- **Cabeza del epidídimo:** La parte superior se ensancha y está formada por dos lóbulos con una terminación de 12 a 14 conductillos eferentes enrollados.
- **Cuerpo del epidídimo:** Formado por un conducto plegado.
- **Cola del epidídimo:** Es el encargado de conducir el esperma desde el epidídimo hasta el conducto eyaculador para su expulsión a través de la uretra durante la eyaculación. (Moore & Dalley, 2006).

**IMAGEN 4:** Corte sagital del Epidídimo



Adaptada y tomada: Histología, Biología Molecular, embriología y Genética;  
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES 2,021. (p 256)

### 2.5.2.1 Histología del epidídimo

El epidídimo está formado por cuatro tipos de células:

- **Las células principales:** Su función es la secreción de iones solutos y proteínas, se ha descrito también la función de endocitosis.
- **Las células claras y angostas:** Tienen codificadores del líquido seminal.
- **Las células basales:** Producen proteínas y antioxidantes, las células de halo son una mezcla de linfocitos T, monocitos y linfocitos T citotóxicos. (Annam, y otros, 2010).

### 2.5.3 Conductos eferentes

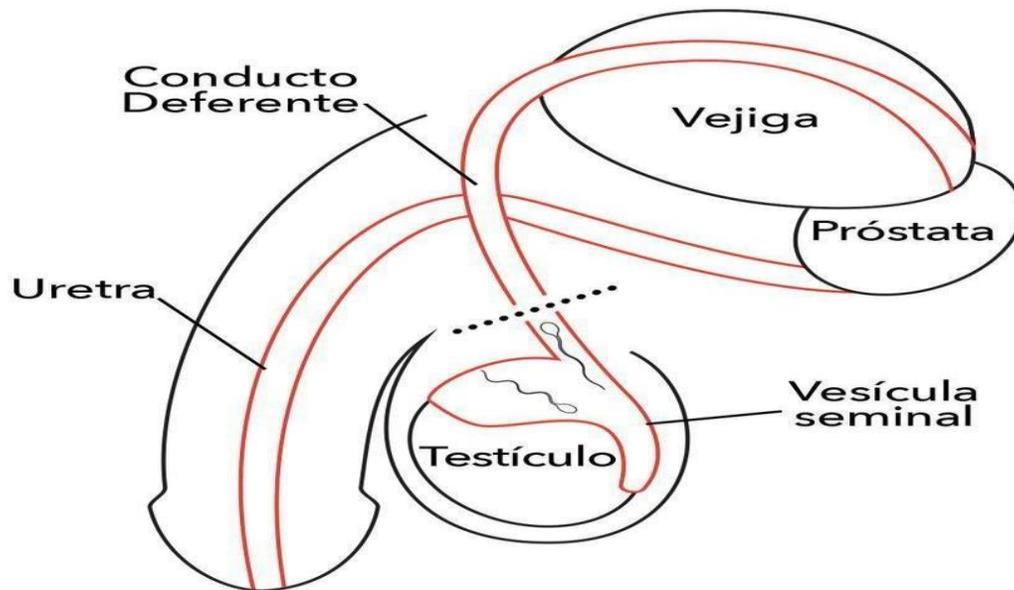
Los conductos eferentes se conectan con la red de Testis (Red de tubos pequeños en el testículo por donde transitan los espermatozoides, desde el testículo al Epidídimo) y el conducto del Epidídimo. La porción distal del conducto mesonéfrico, adquiere una

gruesa cubierta de músculo liso y se convierte en el conducto eferente. El extremo del conducto mesonéfrico distal da origen al conducto eyaculador y a la vesícula seminal. Los conductillos están compuestos por un epitelio pseudoestratificado cilíndrico. (Ross & Pawlina, 2006) (Institutos Nacionales de salud de Estados Unidos, 2021)

El hombre cuenta con unos 20 conductillos eferentes conectados a los conductos de la red de Testis en el borde superior testicular con la porción proximal del conducto del epidídimo. Conforme los conductillos eferentes abandonan el testículo sufren un enrollamiento pronunciado y forman de 6 a 10 masas cónicas llamados los conos eferentes o conos del epidídimo cada uno cuenta con 10 mm de largo, contienen conductos muy contorneados. (Ross & Pawlina, 2006)

En la base de los conos de los conductillos eferentes desembocan en el conducto del epidídimo, los conductillos eferentes están tapizados por un epitelio pseudoestratificado cilíndrico en el que hay cúmulos de células altas y bajas, los cuales tienen un aspecto de dientes. (Ross & Pawlina, 2006).

**IMAGEN 5:** Conductos del Sistema Reproductor Masculino.



Adaptada y tomada: de Planned Parenthood, <https://www.plannedparenthood.org/es/temas-de-salud/anticonceptivos/vasectomía>, 2020).

#### **2.5.4 Próstata**

Es un órgano desarrollado alrededor de la parte inicial de la uretra, si bien su posición y relación la une a la vejiga y la uretra está compuesto por una porción glandular que ocupa aproximadamente dos terceras partes del tejido contenido dentro de la cápsula prostática y el resto es fibromuscular produce el 20% del volumen del semen. (Letarjet & Ruiz, 2008)

Está situada debajo de la vejiga urinaria detrás de la sínfisis del pubis (articulación formada por la unión de los dos huesos púbicos y un disco fibrocartilaginoso, reforzado por los ligamentos púbicos) delante del recto, arriba de la membrana y espacio perineales profundo. Rodea la uretra masculina y está atravesada por los conductos eyaculatorios. (Letarjet & Ruiz, 2008)

Es la responsable de la fabricación de líquido prostático, el cual protege al espermatozoide, favoreciendo su movilidad y aumentando las posibilidades de fecundar el óvulo. También posee funciones valvulares; durante las relaciones sexuales previene

el paso de la orina de la vejiga y la composición muscular de la próstata permite expulsar el semen hacia el exterior. (Wein, 2007)

### **2.5.5 Conducto eyaculatorio**

Tiene como función principal transportar el semen almacenado en la ampolla del conducto eferente hasta la próstata durante la eyaculación, son tubos delgados que se forman de la unión de los conductos de las glándulas seminales con los conductos eferentes, miden aproximadamente de 2.5 centímetros de largo. Aparecen cerca del cuello de la vejiga y pasan por la parte anterior de la próstata, los conductos eyaculadores se unen para abrirse sobre los conductos seminales mediante pequeños orificios en forma de ranuras justo dentro del utrículo prostático. (Mejía, 2006) (Moore & Dalley, 2006)

### **2.5.6 Glándulas de Cowper**

Se encuentran anatómicamente debajo de la próstata en el compartimiento perineal profundo a los lados de la uretra membranosa y terminan en la uretra bulbar, también llamadas bulbouretrales. Tienen como función principal la lubricación uretral, la secreción de glicoproteínas, incluyendo el PSA y constituye en gran parte al plasma seminal. (Dellavedova, Olmedo, Ruiz, & Minuzzi, 2008)

### **2.5.7 Cuerpos cavernosos**

Los cuerpos cavernosos están compuestos por estructuras parecidas a una esponja por espacios sanguíneos muy juntas, en él entra sangre arterial a través de la arteria helicina y sale por las venas que conforman la túnica albugínea. La arteria profunda del pene tiene una trayectoria por el medio de los cuerpos cavernosos, la arteria helicina es una ramificación de ella. Estas reciben una cantidad significativa de sangre que es estimulada por el sistema parasimpático. (Welsch, 2006)

La arteria helicina tiene su final en el segmento terminal de las almohadillas íntimas con el músculo liso que en el pene flácido están cerradas. Se encuentran conformada por endotelio y se encuentran separadas por las denominadas trabéculas. (Álvarez, 2000)

Durante la erección las almohadillas íntimas se abren dando paso a la sangre proveniente de la arteria helicina, tras un estímulo erótico y las cavernas se llenan de mucha presión de sangre, las contracciones musculares de las trabéculas constituyen el endurecimiento del pene. (Welsch, 2006)

### **2.5.8 Uretra**

La uretra consta de un tubo fibromuscular que tiene como función principal conducir la orina de la vejiga al orificio uretral externo, en el hombre también es la encargada de expulsar el semen, tiene un diámetro de 20 centímetros y se divide en 3 porciones. (Ross & Pawlina, 2006)

- **Uretra prostática:** Se extiende más o menos de 3 a 4 centímetros desde el cuello de la vejiga, a través de la glándula prostática se encuentra constituida por epitelio de transición. Los conductos eyaculatorios se terminan en la parte posterior de este segmento y muchos conductos excretores prostáticos desembocan en la uretra. (Flores & Uribe, 2002)
- **Uretra membranosa:** Se extiende desde el vértice de la glándula prostática hasta el bulbo del pene, atraviesa el diafragma urogenital del piso de la pelvis cuando entra en el periné. Está formado por epitelio estratificado cilíndrico. (Flores & Uribe, 2002)
- **Uretra esponjosa:** Se extiende por todo el pene, está tapizado por epitelio estratificado y pseudoestratificado cilíndrico. En la uretra esponjosa desembocan los conductos excretores de las glándulas de Cowper y las glándulas uretrales mucosecretantes. (Flores & Uribe, 2002)

## **2.6 Líquido Seminal composición y Función**

El volumen promedio de una eyaculación oscila entre 1.5 a 5 mL, dependiendo del tiempo de abstinencia sexual. Es de color blanco opalescente normalmente variando, dependiendo de la ingesta de algunos medicamentos o presencia de infecciones del tracto urinario o de la parte baja de la próstata. Tiene un pH promedio de 7.5, menos del

10% corresponde a espermatozoides y la mayor parte es líquido seminal. Los espermatozoides necesitan un soporte nutricional que les brinda el líquido seminal. (López, Urbano, & Cárdenas, 2012)

Las vesículas seminales contienen entre el 40 y el 60% del volumen seminal, sus secreciones contienen principalmente: Fructosa, semenogelina, prostaglandinas, aminoácidos, fósforo, potasio, ácido fólico y hormonas. La próstata aporta del 15 al 20% del plasma seminal y contiene: ácido cítrico, colesterol, fosfolípidos, carnitina, fosfatasa alcalina, calcio, zinc, magnesio, sodio, potasio, cloro, enzimas para la separación de proteínas como fibrolisina y fibrogenasas. (Eynard, Valentich, & Rovasio, 2008)

Las glándulas de Cowper que están ubicadas bajo la próstata también participan en un 3 a 6%, ellas segregan una proteína espesa y clara que sirve como lubricante llamada moco, por último las glándulas de Littre, segregan una sustancia mucosa y la hormona oxitocina. (Eynard, Valentich, & Rovasio, 2008)

## **2.7 El espermatozoide**

Los espermatozoides son células gaméticas haploides, extremadamente especializadas con cambios genéticos, moleculares, fisiológicos; son las únicas células móviles del cuerpo humano. Su función principal es llevar la información genética masculina compactada en su núcleo, atravesar el moco cervical y la zona pelúcida; llegar a las trompas de Falopio alcanzar el ovario y por acción de enzimas ingresar en él y fecundarlo. Dando así lugar a una nueva vida. (Bedolla y otros, 2002) (Miller & Levine, 2010)

### **2.7.1 Antecedentes históricos**

Desde hace aproximadamente 125 años se conoce la importancia del papel del espermatozoide en la fecundación, Anton Van Leeuwenhoek fue el microscopista que descubrió el espermatozoide en 1,678, al principio pensó que eran parásitos que vivían en el semen de ahí el nombre espermatozoide que significa “Animales en el semen” asumió que no tenían ninguna relación con la reproducción. (Scott, 2003)

Después de varias observaciones dedujo que cada espermatozoide tenía un embrión preformado, pensaba que la mujer sólo contribuía con el útero para la formación del feto,

como se siembra una semilla en la tierra. Esta idea de un embrión preformado fue desechada por los colegas de Van Leeuwenhoek. (Ríos & Fuentes, 2018)

En 1700 Spallanzani demostró que el semen de sapo filtrado carente de espermatozoides no tenía la facultad de fecundar al gameto femenino, pero concluyó que el líquido viscoso, el semen que se quedó en el filtro y no los espermatozoides eran los responsables de la fecundación, el mismo tenía la creencia de que los espermatozoides eran parásitos. (Scott, 2003)

En 1824 L. Prevost y J.B Dumas, con ayuda de lentes de microscopía más potentes, llegaron a la conclusión de que los espermatozoides no eran parásitos sino agentes de fertilización activos. Describieron la presencia de estos en machos sexualmente activos, así como su ausencia en machos inmaduros y ancianos, su asociación a su falta en la mula estéril. (Scott, 2003)

En 1840 A. Von Kölliker, descartó la importancia del espermatozoide en el embarazo y afirmó que él tenía la única acción de excitar al gameto femenino, tal como un imán comunica su presencia al hierro.

Fue hasta el año de 1876 cuando el científico Oscar Hertwig y Hermann Fol, utilizaron erizos del mediterráneo los cuales tienen óvulos femeninos transparentes los cuales después de suspenderlos con espermatozoides observaron que los espermatozoides entran dentro de los huevos (óvulos), y se fusionan los dos núcleos. (Scott, 2003) (Ríos y Fuentes, 2018).

### **2.7.2 Anatomía del espermatozoide**

Cada espermatozoide consta de un núcleo haploide, un sistema de propulsión para trasladar el núcleo y un sistema de enzima que permite que el espermatozoide penetre al gameto femenino. Cada espermatozoide tiene una cabeza que consta de dos partes el núcleo que contiene el ADN que se combina con el ADN del óvulo, el acrosoma tiene enzimas que digieren las barreras que rodean al óvulo; la pieza media contiene una gran cantidad de mitocondrias que suministran la energía para moverse, la cola que tiene una forma de látigo para la locomoción. (Audesirk, Audesirk & Byers, 2017).

### **2.7.2.1 Cabeza del espermatozoide**

El espermatozoide normal tiene una forma ovalada de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  de largo y 3  $\mu\text{m}$  de ancho, contiene un núcleo haploide cubierto por un acrosoma y un par de centriolos detrás del núcleo. El acrosoma es un ente secretor de enzimas como la hialuronidasa y la acrosina; cuya función es la separación de las células que se encuentran rodeando el ovocito femenino mediante la hidrólisis del ácido hialurónico que las mantiene unidas. (King & Schaub, 2008) (Toro, 2009)

El ADN en el núcleo está inactivo, altamente compactado hasta seis veces más que cualquier otra célula del cuerpo humano. Este empaquetamiento del ADN permite que la cabeza sea de un diámetro que le permita transportarse de manera altamente eficiente por los fluidos hasta llegar al óvulo. (Santizo, 2013).

La cromatina está unida a protaminas la mayoría se encuentran compactadas en histonas que contienen 40 kb de ADN. Las protaminas tienen grandes extensiones de residuos de arginina, cargados positivamente que neutralizan las cargas negativas del ADN. La unión entre el ADN y las proteínas es tan fuerte que aportan a este componente del ADN espermático, un estado semicristalino resistente a la digestión de las nucleasas. Las protaminas contienen cisteínas que aumentan la estabilidad de la cromatina mediante puentes de disulfuro intramoleculares. (Santizo, 2013)

### **2.7.2.2 Pieza media**

Une a la cabeza el flagelo, es más engrosada que la cola debido a que está rodeado por un complejo sistema de mitocondrias, que provee energía para el transporte. (Smith Agreda, 2002)

La pieza media contiene un gran número de mitocondrias que participan con los brazos de dineína y con otras enzimas dependientes de calcio, son las encargadas de suministrar energía al microtúbulo lo que permite el movimiento del flagelo, además de que posee enzimas necesarias para realizar reacciones bioquímicas, proveer energía a través de la glucólisis; permite el uso de las vías que el espermatozoide elija para obtener energía las cuales van a depender de las condiciones del medio en que se encuentre, así como la actividad que está desarrollando la célula espermática en el momento que se analiza su estado metabólico. (Eddy, Takashi, & O'Brien, 2006).

### **2.7.2.3 Axonema, flagelo o cola**

El axonema tiene una función muy importante en el sistema reproductivo, es el encargado de transportar al espermatozoide y su codificación de ADN al óvulo femenino. (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2017)

El flagelo del espermatozoide se divide en cuatro porciones anatómicas; cuello o pieza de unión, pieza intermedia, pieza principal y la pieza terminal, todas ellas rodeadas por la membrana básica común. (Björnadah, Mortimer, & Barratt, 2010)

Está formado por nueve microtúbulos periféricos y un central está rodeado por nueve fibras densas, contiene proteínas ricas en zinc y puentes de disulfuro que le confieren flexibilidad, unidos por una proteína que se proyecta hacia delante llamada Nexina que forma puentes y permite conexiones. Contiene una proteína llamada Dineína, encargada de convertir el ATP en energía mecánica, por último, contiene en su parte central una estructura llamada Radio que da firmeza al Axonema. (Cerezo, 2021)

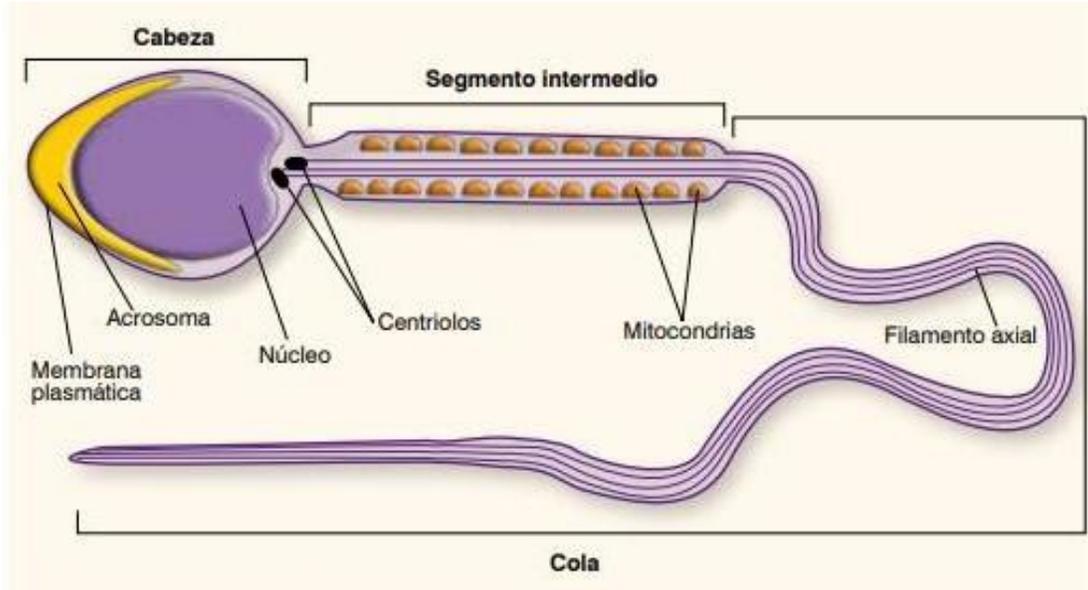
Entre los pares externos de microtúbulos y el par central, hay uniones estructurales llamados radios que también participan en el movimiento de la cola. (Amelar, Dublin, & Schoenfeld, 2005)

Cuando el axonema se asocia con las fibras densas, constituye un haz de fibras axiales, cuya función es la de otorgar direccionalidad y flexibilidad de movimiento al flagelo. (Eddy, Takashi, & O'Brien, 2006)

El movimiento rotacional que experimenta el flagelo se transmite a través de la cabeza del espermatozoide por medio del cuello esto le da movimiento al espermatozoide y lo impulsa hacia delante. (Mortimer, 2000)

La pieza terminal, es la región más distal del flagelo y comienza en el punto en que desaparece la envoltura fibrosa y donde comienza el axonema. (Mortimer, 2000)

**IMAGEN 6:** Anatomía del espermatozoide.



Adaptada y tomada: Toro, Anabella; Espermograma. Medicina y Laboratorio Programa de Educación Médica Continúa Certificada de la Universidad De Antioquia (2009.)

### 2.7.3 Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso por el cual se crean y capacitan a los espermatozoides maduros, ocurre a lo largo de la vida del hombre, son necesarios aproximadamente de 75 a 90 días en los seres humanos. Los espermatozoides son los gametos humanos masculinos, son células haploides, quiere decir que contienen la mitad de la información genética y durante la espermatogénesis pasan de células somáticas de 46 cromosomas diploides a células haploides con 23 cromosomas. (Caballeros & Reus, 2018)

Esto se logra por medio de la meiosis, esta función reduce el número de cromosomas en los gametos que durante la concepción logran fusionarse en un cigoto resultante con un número de 46 cromosomas. (Caballeros & Reus, 2018).

El espermatozoide masculino se forma en el testículo a través de un proceso de división de las células germinales o espermatogonias. Las células germinales primordiales se forman en el epiblasto, durante la segunda semana del desarrollo embrionario y se desplazan a la pared del saco vitelino. Durante la cuarta semana de desarrollo del

embrión estas células empiezan a migrar hacia las gónadas, las cuales se encuentran en proceso de formación, de esta forma en la quinta semana las células germinales se encuentran en el primordio gonadal. (Sadler, 2009).

Cuando llegan a la gónada, las células germinales primordiales se incorporan a los túbulos seminíferos y se convierten en espermatogonias, este proceso está controlado por las hormonas que forman parte del eje hipotálamo hipófisis-gónadas. Cada espermatogonia diferenciada, dará lugar a la formación de cuatro espermatozoides maduros durante este proceso llamado espermatogénesis. (Parra, Castilla, & Rodríguez, 2014).

Antes de la pubertad los cordones sexuales se tornan huecos y se transforman posteriormente en tubos seminíferos igual que las células germinales primordiales, que dan origen a las espermatogonias troncales. Alcanzada la pubertad por acción de la hormona testosterona, las espermatogonias "A" llamadas oscuras, que señalan el comienzo de la espermatogénesis, se transforman en espermatogonias "A" claras que se dividen por mitosis para dar origen a espermatogonias tipo B. Cada espermatogonia tipo "B" se divide por mitosis dando origen al espermatozocito primario. (Sadler, 2,009) (Cerezo, 2021)

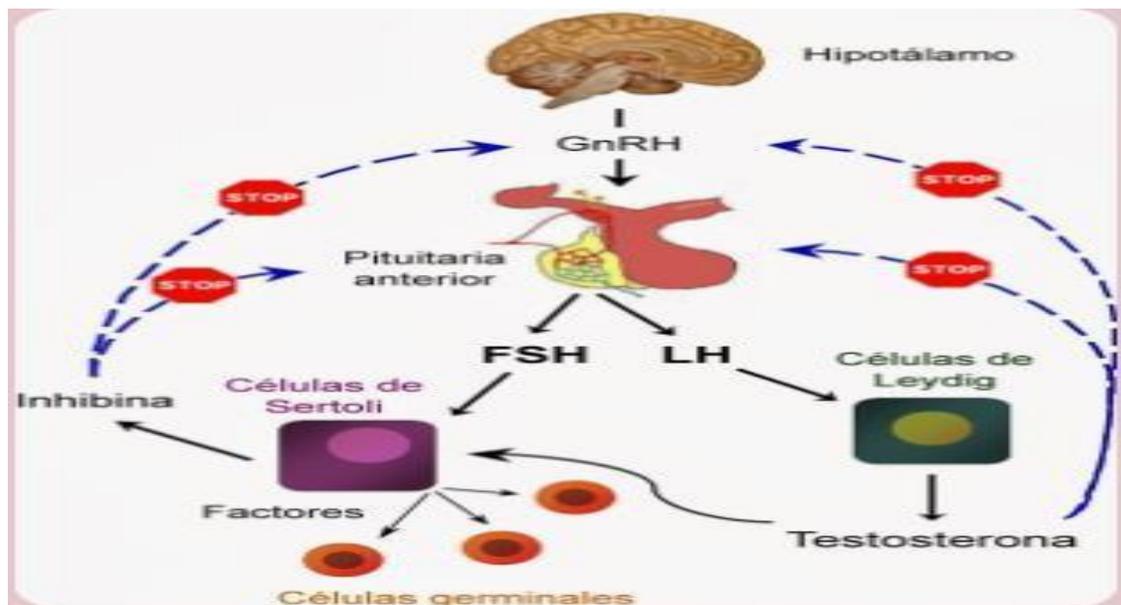
### **2.7.3.1 Regulación Hipotalámica**

El Hipotálamo es la unidad principal integradora de la espermatogénesis, secreta de forma pulsátil de la Hormona Liberadora de gonadotrofinas del Hipotálamo (GnRH) que es llevada a hipófisis por el sistema sanguíneo portal hipotálamo-hipofisario. Esta liberación pulsátil de GnRH proporciona señales de liberación de LH y FSH el cual en condiciones normales se produce aproximadamente cada 60 a 90 minutos. (Annam y otros, 2010)

El proceso de regulación de la LH y FSH es el resultado de acción de retroalimentación inhibitoria del componente hipotálamo-hipofisario por la secreción testicular de las células de Leydig y de Sertoli. En tanto a la testosterona es producida por las células de Leydig estimulada por la presencia de la LH y la FSH. (Parra, Castilla, & Rodriguez, 2014) Por lo contrario, la presencia elevada en suero se inhibe la producción de las hormonas LH y FSH a través de la acción de la hormona inhibina, la espermatogénesis es

regulada por la hormona LH que se une a los receptores de las células de Leydig y estimulan las células de Sertoli para promover la espermatogénesis. De igual forma la hormona FSH se une a las células de Sertoli estimulando la producción de líquido testicular y las síntesis de proteína intracelular que constituyen a los receptores androgénicos. (Annam, y otros, 2010) (Parra, Castilla, & Rodriguez, 2014).

**IMAGEN 7:** Mecanismo de producción espermatogénica el eje Hipotalámico



Adaptada y tomada: (<https://quizlet.com/ar/305644813/gametogenesis-espermatogenesis-y-ovogenesis-diagram/>)

### 2.7.3.2 Mecanismo de producción y maduración del espermatozoide

La maduración del espermatozoide se lleva a cabo en unas estructuras especializadas de forma redonda que se encuentran dentro de los testículos llamados tubos seminíferos. Los cuales contienen en su interior células importantísimas para la producción espermática como las células de Leydig. Las células de Sertoli encargadas de la espermatogénesis, así como las células espermatogonias que al madurar dan como resultado un espermatozoide maduro. (Málaga, Ortiz, Hernández, Tobar, & Ayala, 2005)

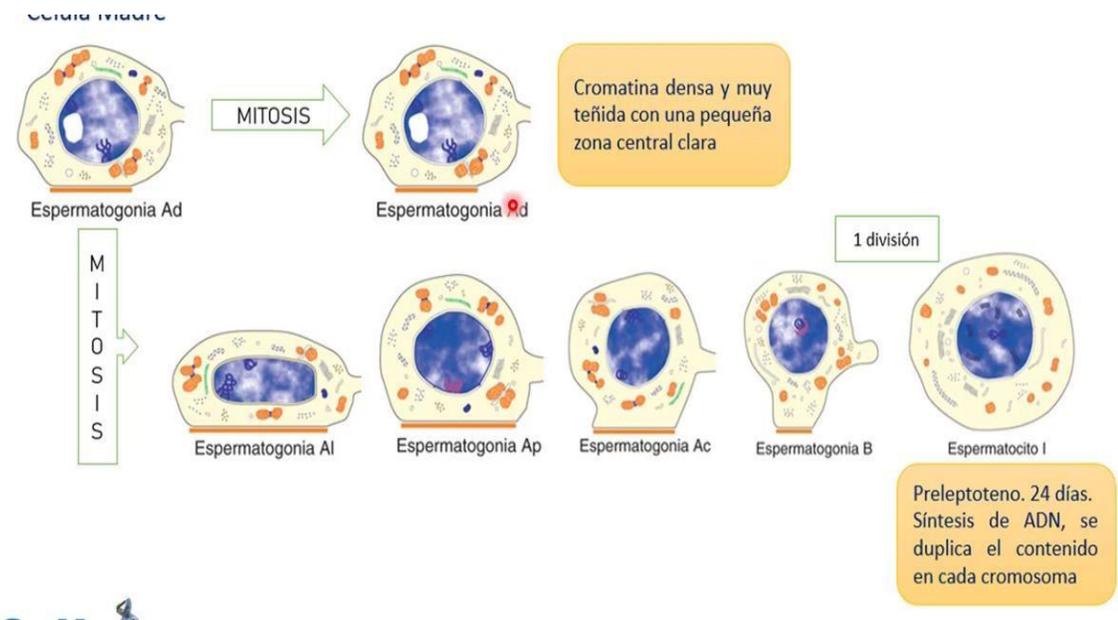
Las células Sertoli que estimuladas por la FSH dirigen la espermatogénesis sirven como soporte y nutrición de las células. Así como formar la barrera Hematotesticular la cual sirve como barrera inmunológica separando las células espermáticas inmaduras de los glóbulos blancos. Realiza intercambio de las sustancias del torrente sanguíneo con el interior de los tubos seminíferos y las células de Leydig activa la espermatogénesis por la estimulación de la LH, produciendo testosterona iniciando así la espermatogénesis. (Málaga, Ortiz, Hernández, Tobar, & Ayala, 2005)

La espermiogénesis consta de 3 fases: 1) Fase Proliferativa, 2) Fase Meiótica y 3) Espermiogénesis. (Caballeros & Reus, 2018)

### **2.7.3.3 Fase Proliferativa**

También llamada fase espermatogonia, a partir de una célula madre germinal se forman espermatogonias tipo "A" estas células por acción mitótica dan lugar a espermatogonias tipo "A" y "B". El tipo A se siguen dividiendo para formar más células tipo A y B, mientras el tipo B darán lugar a un espermatocito primario que dará lugar a 4 espermatozoides. (Carlson, 2019)

IMAGEN 8: Fase proliferativa de la espermatogénesis.



Adaptada y tomada: Acosta, Layonal. Curso Online de Andrología, según las normas Manual de la Organización Mundial de la salud. Lima (2,022.)

Se denomina como proliferativa por la cantidad masiva de mitosis que se producen, los cuales tienen como fin primordial la producción de gran cantidad de espermatozoides. (Carlson, 2,019)

#### 2.7.3.4 Fase Meiótica:

En esta etapa el mecanismo de división celular en la meiosis la cual reduce la información genética de 46 cromosomas a 23 convirtiéndose en célula haploide llamadas espermátidas. (Málaga, Ortiz, Hernández, Tobar, & Ayala, 2005) (Caballeros & Reus, 2018)

La fase meiótica consta de dos sub-etapas:

- **Meiosis 1:** Cada uno de los espermatozoides primarios (diploide) dan lugar a 2 espermatozoides secundarios haploides. En esta subetapa se divide en: Leptoteno, Zigoteno, Paquiteno, Diacinesis, Diploteno. (Parra, Castilla, & Rodríguez, 2,014)

- **Meiosis 2:** Cada uno de los espermatocitos secundarios dan lugar a dos espermatidas, por lo que en total cada espermatocito primario diploide tiene cuatro espermatidas haploides. Esta Subetapa se divide en: Metafase I, Anafase I, Telofase I luego se da una segunda meiosis dando lugar a Metafase II, Anafase II y Telofase II. (Carlson, 2019)

### 2.7.3.5 Fase de Espermiogénesis

Es la fase donde la espermatida se diferencia a espermatozoide dando lugar a cambios entre los que podemos mencionar:

- Aparición de flagelo o cola, desarrollo de acrosoma.
- Condensación de los cromosomas.
- Condensación de nucleoproteínas.
- Formación de la cabeza del espermatozoide.
- Eliminación del exceso citoplasmático.
- Liberación del espermatozoide al lumen. (Acosta, 2022)

La fase de espermatogénesis consta de cuatro sub-fases:

- **La fase de Golgi:** Los gránulos proacrosomales se fusionan formando un único gránulo dentro de una vesícula de mayor tamaño. (Acosta, 2022)
- **Fase de Capuchón:** La vesícula acrosómica se extiende sobre la mitad anterior del núcleo. Forma un casquete que se envuelve por la envoltura nuclear, pierde sus poros y sufre engrosamiento, el núcleo se condensa. (Acosta, 2022)
- **Fase acrosoma:** Se completa la formación del acrosoma, el flagelo crece y aumenta su longitud.
- **Fase de maduración:** Se reduce el exceso de citoplasma para formar el espermatozoide maduro, todos los residuos celulares son fagocitados por las células de Sertoli. (Acosta, 2022)

### **2.7.3.6 Capacidad espermática epididimal**

El epidídimo es un órgano accesorio masculino, en el cual se desarrolla la movilidad espermática y su capacidad para fertilizar el óvulo, desde un punto de vista funcional los conductos epididimarios son responsables de la maduración y capacitación espermática. Su importancia radica en la protección, el transporte y almacenamiento de los espermatozoides. (Ruiz, 2002)

El transporte de los espermatozoides requiere de 2 a 12 días, pero el tiempo de tránsito en el epidídimo es regido por la producción espermática, el mecanismo responsable del transporte espermático son las contracciones rítmicas espontáneas de las células contráctiles que rodean el epidídimo. (Wein, 2007)

Después de la migración espermática a través de la cabeza y el cuerpo del epidídimo permanece en la cola durante distintos periodos dependiendo de la actividad sexual, si los espermatozoides no son expulsados por eyaculación son fagocitados por los espermiófagos o son reabsorbidos por acción epididimaria. (Ruiz, 2002)

En el proceso los espermatozoides adquieren la maduración y la movilidad progresiva. Un tiempo prolongado en el epidídimo afecta en gran manera la movilidad espermática debido al efecto de los radicales dependientes de oxígeno. (Díaz, Fernández, & Paredes, 2006)

Durante el paso a lo largo del epidídimo se produce una gran variedad de cambios moleculares y químicos en el entorno de la luz del túbulo, estos cambios incluyen la liberación como la absorción de fluidos, iones, antioxidantes y los exosomas. (Díaz J. A., 2007)

La testosterona y la Dihidrotestosterona (DHT) se encuentran en el epidídimo del ser humano en concentraciones muy altas, la presencia de la DHT y los niveles de 5 alfa reductasa confirman la importancia de este andrógeno en la función de maduración espermática. (Wein, 2007)

Luego de la maduración los espermatozoides suben por el conducto eferente hacia la uretra, se mezcla con el líquido seminal proporcionado por la próstata y glándula de Cowper para ser expulsados al exterior por acción de la presión ejercida por la próstata. (Bassas, 2009)

## **2.8 Causas de Infertilidad Masculina**

Se ha determinado que los hombres son los causantes de la infertilidad en la pareja hasta un 40 %, los problemas más comunes en la infertilidad son los que conllevan a un mal funcionamiento de los testículos; entre otros problemas podemos contar con desequilibrios hormonales, la obstrucción o ausencia de algunos conductos de los órganos reproductivos masculinos, la edad y factores relacionados con el estilo de vida también tienen un rol muy importante en la infertilidad masculina. (American Society Reproductive Medicine, 2016) (Miller, Boyden, & Frey, 2007)

Se puede presentar por causas como un daño testicular intrínseco (Hipogonadotropismo primario), anomalía en el eje hipotalámico-hipófisis (Hipogonadotropismo secundario): en estos casos la producción hormonal está disminuida pero la respuesta hormonal es normal. Y el último caso es una respuesta disminuida o ausencia de los órganos blanco a los andrógenos, en este caso la producción hormonal es normal pero la respuesta es deficiente. (Jubiz & Cruz, 2007)

### **2.8.1 Hipogonadotropismo Primario**

#### **2.8.1.1 Etimología genética**

- **Síndrome de Klinefelter:**

Se caracteriza por contener en su cariotipo más de un cromosoma X (80 %), es la causa más frecuente en el fallo testicular primario. El cariotipo 47 XXY se ha identificado en el 11% de los pacientes azoospermicos y el 3% de los infértiles. (López J., 2014)

Es afectado con este síndrome 1 de cada 660 varones recién nacidos, la degeneración de las células germinales se presenta en las fases tardías de la vida fetal, progresa durante la infancia y de manera rápida durante la pubertad. En adultos se encuentra una agresiva fibrosis e hialinización de los tubos seminíferos e hiperplasia del intersticio. (López, 2014)

El diagnóstico de este síndrome está acompañado por niños con retraso leve y en adultos comportamiento inmaduro, tímido, inseguridad, la masa muscular es poco desarrollada, los caracteres sexuales se desarrollan poco. El coeficiente intelectual de estos pacientes

es ligeramente inferior, presentan enfermedad varicosa, úlcera en las extremidades inferiores, tiene una posibilidad muy alta en contraer enfermedades de carácter autoinmunes como artritis reumatoide, tiroiditis, lupus eritematoso. Tienden a tener mayor riesgo de contraer enfermedades como diabetes mellitus tipo 2, ginecomastias y cáncer de mama. (Sotos, 1997) (Smith & Bremner, 1998).

- **Síndrome de Reifenstein:**

Es conocida como síndrome de Insensibilidad Androgénica es una enfermedad caracterizada por la resistencia de los tejidos diana a la acción de las hormonas masculinas, lo que frena el desarrollo masculino normal de los genitales internos y externos de los varones. (Guirao, Ladrón, Salamanca, & Mozas, 2013)

Se trata de un trastorno causado por un gen que codifica el receptor de andrógenos localizado sobre el cromosoma X a nivel Xq11-Xq12, es un síndrome hereditario y por estar en el gen X la mujer solo es portadora, pero si afecta al hombre. (Guirao, Ladrón, Salamanca, & Mozas, 2013)

La testosterona sirve como sustrato para la producción de estrógenos en el hígado y tejido graso apareciendo así la ginecomastia, esto se suma al hecho de la deficiencia de los receptores de andrógenos en la Hipófisis. (Guirao, Ladrón, Salamanca, & Mozas, 2013)

- **Síndrome de las Células de Sertoli:**

Se caracteriza por ausencia de células germinales, testículos pequeños, azoospermia, testosterona normal, FSH aumentada, LH en límites normales. Este síndrome se debe a una microdelección de la secuencia AZFa del gen localizado en Xq11. (Jubiz & Cruz, 2007)

- **Deficiencia de 5 -alfa-reductasa:** Esta enzima tiene como principal función convertir la testosterona en Dihidrotestosterona, su deficiencia causa pene pequeño, estos pacientes se pueden crear como niñas pues los testículos pueden estar situados en el abdomen o en escroto. En la pubertad la producción de testosterona produce efectos como engrosamiento de la voz, aumento del tamaño del pene. Esta deficiencia se debe a un defecto por la mutación en el gen SRD5A2 que codifica la síntesis de esta enzima. (Jubiz & Cruz, 2007)

- **Lesiones destructivas:** Entre estas lesiones podemos contar con traumatismos, estas pueden producir déficit de testosterona, daño en los órganos accesorios o rompimiento de los conductos que detienen el tránsito tanto los espermatozoides como el líquido espermático. La radiación para cáncer de próstata puede dañar los testículos y los tubos seminíferos que son más frágiles y por último la quimioterapia frena la mitosis de las células dejando sin efecto la espermatogénesis. (Jubiz & Cruz, 2007)
- **Enfermedades virales o bacterianas como:** *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, orquitis producida por el virus de las paperas (*Paramyxoviridae*), pueden causar inflamación repetitiva con la aparición de granulomas por lo consiguiente infertilidad y la disminución de hormonas sexuales masculinas. También son causantes de infertilidad, las enfermedades de transmisión sexual como *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema Palladium*, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*. (Puerta, Cadavi, & Cardona, 2014).
- **Azoospermia obstructiva:** Consta de la ausencia de espermatozoides o células espermatogénicas en el semen o en la orina debido a la obstrucción de los conductos seminales es causante del 15 al 20% de la azoospermia en el varón. Se puede presentar por causas congénitas, adquirida o debido a afecciones, entre las obstrucciones podemos contar obstrucciones epididimarias, obstrucción epididimaria idiopática, obstrucción post epididimitis, quistes epididimarios, obstrucción de conductos eferentes, ausencia congénita de los conductos eferentes, post vasectomía, obstrucción de conductos eyaculadores, quistes prostáticos, post cirugías y post infecciones. (Dohle, Diemer, Giwercman, Jungwirth, & Kopa, 2010)
- **Varicocele:** Es un síndrome anatómico por resultado de la dilatación del plexo venoso, aparece como resultado de un mal funcionamiento de las válvulas que normalmente se encuentran en las venas o es causada por una compresión de una vena por aquello que tiene a su alrededor, esta obstrucción deja sin afluencia de sangre a los testículos. Este síndrome no tiene síntomas, pero causa disminución en la cantidad y calidad de espermatozoides, teniendo como

desenlace la infertilidad. (Vásquez, Díaz, Carmona, & Vásquez, 2009) (Corral & Ballezca, 2012)

En la población en general se calcula que un reporte del 10 al 15%, en pacientes con infertilidad primaria un 30 a 50 % mientras en la infertilidad secundaria hasta un 80 %. (Vásquez, Díaz, Carmona, & Vásquez, 2009)

#### **- Cáncer testicular:**

Las neoplasias testiculares se dividen en tumores de las células germinales y células no germinales, las células germinales se originan de las células espermatogonias y son causantes del 95% de las neoplasias. En su mayoría son malignos. Los tumores de células no germinales se originan en el cordón sexual más específico en las células Sertoli y las células de Leydig. (Saavedra y otros, 2009)

Los tumores no primarios como es el linfoma, leucemias o metástasis también pueden afectar a las células testiculares formando masas cancerosas. (Saavedra, y otros, 2009)

#### **- Diabetes:**

Se ha evidenciado la asociación entre la diabetes y la infertilidad, se basa en el metabolismo de la glucosa durante el proceso de espermatogénesis. Esto debido a que durante los episodios de hipoglucemia puede haber cambios en la función de los genes en las proteínas involucradas en la espermatogénesis. (Morales & García, 2021).

También se ha asociado con la infertilidad en personas diabéticas debido a la desregularización del sistema endocrino, la elevación de la temperatura del escroto, el estrés oxidativo, alteraciones en las funciones eréctil y eyaculatoria. Afectando así a la espermatogénesis y llegando así a la infertilidad masculina. (Morales & García, 2021)

#### **-Tabaquismo:**

Los químicos contenidos en los cigarrillos como la nicotina, el cianuro y el dióxido de carbono producen efectos nocivos en la calidad espermática como baja en el volumen seminal, baja en el conteo, movilidad y morfología espermática. Producen un desequilibrio hormonal principalmente en la testosterona. Se ha demostrado que causa

apoptosis en las células de Leydig. La actividad oxidativa afecta grandemente al ADN espermático llegando a la infertilidad. (Balitan, Blanco, Cabrera, & Hernández, 2015)

### **-Obesidad:**

La obesidad puede afectar la fertilidad masculina por diferentes mecanismos, puede provocar disfunción eréctil y deterioro en la calidad espermática. Entre dichos mecanismos podemos encontrar: disfunción en la fisiología de eje hipotálamo hipófiso-testicular, disminución en la concentración de testosterona en sangre, liberación de hormonas derivadas del tejido adiposo, entre ellas la Leptina que podría afectar directamente la fisiología de las células de Leydig. Aumento de las adipoquinas, aumento en la temperatura escrotal y acumulación de disruptores endocrinos causantes del estrés oxidativo, causante de la apnea del sueño en obesos suprimiendo el pico nocturno de la testosterona. No se tiene muy claro, pero podría estar involucrado en la fragmentación del ADN por interferir en la maduración espermática. (Martini, Molina, Ruiz, & Fiol, 2012)

## **2.9 Principios del análisis de espermograma:**

### **2.9.1 Obtención de la muestra**

Durante la eyaculación se pueden distinguir 4 fracciones:

- **Fracción pre eyaculatoria:** Consta de una concentración mucosa, transparente y se concentran muy pocos espermatozoides; se procede en las glándulas de Cowper y Litre. Su principal función es limpiar la uretra y hacer el canal resbaladizo para el paso de los espermatozoides
- **Fracción previa:** Es un fluido que no presenta espermatozoides contiene un pH ácido, esto se debe a su elevada concentración de fosfatasa alcalina y ácido cítrico que procede de la próstata.
- **Fracción principal:** Presenta elementos líquidos y gelatinosos, procede del Epidídimo y conductos deferentes; es la fracción mayor número de espermatozoides.
- **Fracción terminal:** tiene una consistencia gelatinosa procedente de la vesículas seminales, tiene un pH alcalino; presenta espermatozoides en menor cantidad que la fracción principal (Kumar, Kalthur, & Mascarenhas, 2011).

### **2.9.2 Obtención y transporte de la muestra:**

La muestra ideal para el procedimiento de espermograma es el semen obtenido por la masturbación. Para algunos pacientes el método de masturbación no es el conveniente por cuestiones religiosas, culturales o porque no se logra llegar al orgasmo. En estos casos se recomienda obtener el semen de relaciones sexuales, con el uso de un condón especial no tóxico para los espermatozoides. Una vez eyaculado el semen, se debe retirar el condón cuidadosamente, cerrarlo y llevarlo al laboratorio antes de una hora desde que se obtuvo la muestra. (Organización Mundial de la Salud, 2010).

Los recipientes donde se recolecta el semen deben ser recipientes de plástico o vidrio y en algunos casos condones como se mencionó anteriormente. Estos deben ser siempre estériles, no debe contener ningún agente tóxico para los espermatozoides y tener a temperatura ambiente para evitar el choque térmico de los mismos. (Lania, Grasso, & Fortuna, 2006)

El electro eyacuación se utiliza en casos muy puntuales en la que los pacientes están inhabilitados para la eyacuación, consiste en insertar una sonda en el recto cerca de la próstata, la sonda emite una corriente eléctrica que estimulan los nervios cercanos y la contracción de los músculos pélvicos provocan la eyacuación. Este procedimiento utiliza anestesia local, es utilizado para pacientes con paraplejia. (Harold, Martin, & Perakash, 1986)

Existen casos en que los pacientes presentan problemas de erección, se puede utilizar la ayuda de fármacos para corregir el problema el más utilizado es el Sildenafil; cuando se consigue la erección el semen debe ser obtenido por masturbación. (Jeyendran, 2003)

### **2.9.3 Examen Macroscópico**

Los parámetros macroscópicos se deben evaluar lo más pronto posible, los análisis macroscópicos incluyen:

- Evaluación de la apariencia
- Licuefacción
- Viscosidad
- Determinación de pH.
- Volumen

#### **2.9.3.1 Licuefacción**

Se considera un tiempo normal de licuefacción entre 5 a 60 minutos a 37° Centígrados después de la eyaculación, la muestra se presenta como una masa gelatinosa y coagulada. Dentro de pocos minutos a temperatura (37°C), la muestra de semen empieza a licuarse y al minuto 15 ya debería estar licuada. Se debe tener en cuenta que la presencia de moco puede interferir en el resultado y muy rara vez la muestra no licua antes de los 60 minutos; si esto ocurre se debe hacer la anotación en el resultado “Licuefacción incompleta a la hora “. (Organización Mundial de la Salud, 2010)

En el caso de que la muestra ya esté licuada debe mezclarse suavemente con un movimiento rotatorio para homogeneizar y evitar errores en la determinación de la concentración espermática. El semen normal puede contener cuerpos gelatinosos de origen prostático, no son de significancia clínica. (Toro, 2009)

Algunas muestras no licuan en los primeros 60 minutos en estos casos se debe de realizar un procedimiento adicional mezclando mecánicamente o por digestión de enzimas. En la mezcla mecánica se toma la muestra con una jeringa y se expulsa suavemente por la aguja número 18 o 19, de 6 a 10 veces. Esto hará que el moco se disuelva y la muestra llegue al estado líquido. (Organización Mundial de la Salud, 2010)

La licuefacción del semen es un proceso de proteólisis catalizado por enzimas hidrolíticas secretadas por la próstata y el epidídimo; estas enzimas incluyen al activador del

plasminógeno específico (PSA) así como algunas proteasas, peptidasas y alfa amilasas. Las enzimas que participan en la licuefacción del semen se activan cuando se unen al calcio presente en la primera porción del eyaculado y presentan una activada en presencia de un pH de 6.8 – 8.8. (Lucac & Koren, 1979) (Lilja, Oldbring, & Rannerevik, 1987)

### **2.9.3.2 Viscosidad**

Cuando el proceso de licuefacción del semen es completado, algunas proteínas del plasma seminal son totalmente degradadas a aminoácidos, como los carbohidratos que constituyen ciertas glucoproteínas, son desintegrados para facilitar la proteólisis en caso de una licuefacción incompleta existe una proteólisis incompleta. (Lee, Keefer, Wen Zhao, & al, 1989)

Los problemas en la viscosidad del semen pueden reflejar anomalías de las glándulas sexuales accesorias y reducir la movilidad espermática (Lee, Keefer, Wen Zhao, & al., 1989)

La viscosidad está relacionada a cómo fluye la muestra desde una pipeta, la muestra debe formar pequeñas gotas; se forma un hilo el cual en condiciones normales tiene una longitud de 2 centímetros. Se dice que hay una viscosidad aumentada cuando el hilo es mayor a 2 cm. (Organización Mundial de la Salud, 2010)

### **2.9.3.3 Apariencia y color**

Se debe evaluar a temperatura ambiente dentro de la primera hora después de emitida la muestra, normalmente es homogénea de color blanco opalescente a gris amarillento y un olor característico. Un aspecto translúcido se relaciona con baja concentración espermática y con ausencia de células espermáticas, leucocitos, hematíes o microorganismos.

Un color amarillo intenso denota presencia de leucocitos, rojo indica la presencia de sangre se conoce como hemospermia y puede ser causado por traumatismo o neoplasias

en las vías seminales, el color verdoso se asocia a infección bacteriana de *Pseudomonas* spp. (Organización Mundial de la Salud, 2010)

#### **2.9.3.4 Volumen**

El volumen del eyaculado puede variar desde 0.5 a 5 mL, sin embargo, el Manual de la Organización Mundial de la Salud establece que una cantidad igual o superior a 1.5 mL de semen es considerado dentro de los límites normales. (De Jenge, LaFromboise, Bosmans, & al., 2004)

Varios estudios realizados de acuerdo a la densidad de semen reflejan ser 1g/mL (Auger et.al., 1995), La densidad de semen ha sido reportada entre 1.03 y 1.04 g/mL. (Brazil C, Swan SH, Drobnis EZ, Liu F, Wang C, Redmon JB et al J Androl, 2004).

#### **2.9.3.5 pH**

Refleja el balance entre las diferentes secreciones de las glándulas accesorias, principalmente alcalino de las vesículas seminales y ácido de la próstata. El pH varía en un rango muy estrecho, pocos son los trastornos capaces de alterar el mismo puede ser alcalino y no denotar ninguna patología. (Toro, 2009).

A medida que transcurre el tiempo, la muestra se va alcalinizando por pérdida de anhídrido carbónico, por lo que se mide en preferencia en los primeros 30 minutos después de la eyaculación y en casos excepcionales antes de la hora. (Toro, 2009).

Es de vital importancia que el laboratorio cuente con un papel pH de calidad con un rango de 6.4 a 10.1, de otra manera las lecturas pueden ser erróneas. (Toro, 2009).

### **2.9.4 Examen Microscópica:**

#### **2.9.4.1 Movilidad**

El grado de motilidad progresiva de los espermatozoides está relacionado con la tasa de embarazo, el número total junto con la movilidad son los principales predictores del éxito en el embarazo. La velocidad de los espermatozoides depende en gran medida

de la temperatura, por lo que se hace importante estandarizar la temperatura durante el examen de movilidad del semen.

A menudo es más fácil controlar esta variante a temperatura corporal (37°C), se recomienda la utilización de placas calefactadas o la estandarización y la incorporación de protocolos en los cuales se calienten las cámaras. (Organización Mundial de la Salud, 2021).

#### **2.9.4.2 Evaluación de aglomeraciones espermáticas:**

##### **Agregación espermática:**

- Adhesión de espermatozoides inmóviles entre sí
- Adhesión de espermatozoides móviles a hilos de moco
- Adhesión de espermatozoides a células no espermáticas
- Agregaciones no específicas

##### **Aglutinación espermática:**

Se refiere a los espermatozoides móviles que se adhieren entre sí ya sea cabeza a cabeza, cabeza a cola o cualquier forma mixta.

La movilidad suele ser vigorosa con un movimiento frenético, pero a veces los espermatozoides aglutinados pueden tener una movilidad limitada.

**IMAGEN 9.** Aglutinación espermática: aglutinación cabeza con cabeza (A), cola con cola (B) cola con cola (C) Mixto cabeza con cola y cabeza con cabeza (D) agregación de espermatozoide completo.

Parts Involved	Degree of agglutination			
	1. Isolated (< 10 sperm/agglutinate, many free sperm)	2. Moderate (10-50 sperm/agglutinate, free sperm)	3. Large (agglutinates >50 sperm, some sperm still free)	4. Gross (all sperm agglutinated, and agglutinates interconnected)
A. Head-to-head				
B. Tail-to-tail heads are seen to be free and move clear off agglutinates				
C. Tail-tip-to-tail-tip				
D. Mixed (clear head-to-head and tail-to-tail agglutinations)				
E. Tangle (heads and tails enmeshed. Heads are not clear of agglutinates as they are in tail-to-tail agglutination)				

Tomada y adaptada: Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la salud sexta edición, 2021.

El tipo principal de aglutinación que refleja el grado y el lugar de adhesión debe registrarse.

### Grados de aglutinación:

- **GRADO 1:** Aislado (10 espermatozoides aglutinados, algunos espermatozoides libres).
- **GRADO 2:** Moderado (de 10 a 50 espermatozoides aglutinados)
- **GRADO 3:** Largo (Más de 50 espermatozoides aglutinados)
- **GRADO 4:** Denso (Todos los espermatozoides están aglutinados y las aglutinaciones están interconectadas).

La presencia de aglutinación no es suficiente evidencia para deducir una causa inmunológica de infertilidad, pero es sugestivo la presencia de anticuerpos anti-espermatozoides, por lo que se requiere de pruebas adicionales.

La aglutinación severa puede afectar la evaluación de la movilidad y concentración espermática.

### **2.9.5 Concentración espermática**

La concentración espermática es un parámetro que refleja la eficiencia del proceso espermatogénico, así como el funcionamiento de todas las estructuras anatómicas que promueven la formación del eyaculado, se trata de un parámetro que por su significado permite considerarlo como una de las variables más importantes que se asocian con la fertilidad masculina, que junto con otros parámetros seminales evalúan la posibilidad de concepción de una pareja. También está relacionado con el porcentaje de gestaciones que pueden presentarse en un determinado tiempo. (Bonde, Ernest, & Kold, 1998)

La concentración de los espermatozoides en un eyaculado depende de varios factores en los que podemos enumerar los siguientes:

- Las características anatómicas del testículo, especialmente la longitud de los tubos seminíferos.
- La cantidad de células germinales primordiales.
- La cantidad de células de Sertoli que se encuentran en dichos túbulos.
- Factores fisiológicos que intervienen en la duración del ciclo espermatogénico.
- Pérdida de células germinales durante la espermatogénesis.
- Baja producción hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas que estimulan la producción de espermatozoides.
- La secreción de las glándulas accesorias y tejido asociado también tiene una influencia sobre la concentración espermática. (Cerezo, 2021)

La concentración espermática disminuida puede variar según la edad, sector geográfico y época del año; También juega un papel muy importante la presencia de patologías

relacionadas con el aparato genitourinario, como las infecciones bacterianas y virales estas también puede alterar este parámetro; alteraciones bioquímicas causada por la exposición a fármacos (esteroides y hormonas como la testosterona) y químicos tóxicos son los causantes de la baja concentración espermática. (Acosta, 2022).

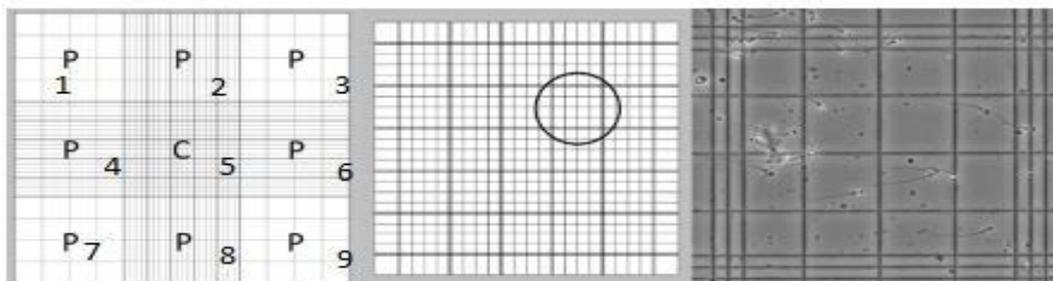
### 2.9.5.1 Cálculo de Concentración espermática por Mililitro

Existen múltiples procedimientos y equipos para realizar el conteo espermático de una muestra de semen, el recomendado por el manual de la Organización Mundial de la Salud en su sexta edición es la Cámara de Neubauer.

La cámara de Neubauer o hemocitómetro consta de dos cámaras (A y B) de 10 microlitros de profundidad; Cada cámara contiene 9 cuadrículas de 10 nanólitos (nL) de capacidad. Cuatro de estas cuadrículas (1,3,7 y 9) contienen 4 filas con cuatro cuadros con capacidad de 6.25 nL cada una. Las cuadrículas 2 y 8 contienen 4 filas con 5 cuadros de capacidad de 5 nL cada una; y las cuadrículas 4 y 6 contienen 5 filas con 4 cuadros con capacidad de 5nL cada una. (Organización Mundial de la Salud, 2010)

La cuadrícula central (número 5) contiene 5 filas, con 5 cuadros de capacidad de 4nL cada una; Cada cuadro de los 25 centrales (cuadrícula 5) es subdividido en 16 cuadros pequeños de 250 Picolitros, las cuadrículas 1,2,3,7,8 y 9 tiene 4 filas de 25 nL cada una . Las cuadrículas 4, 5, y 6 tienen 5 filas de 20 nL cada una. (Organización Mundial de la Salud, 2010).

**IMAGEN 10.** Cámara de Neubauer



Tomada y adaptada: Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud en su sexta edición, 2021.

### **2.9.5.2 Cálculo para la Concentración Total de Espermatozoides**

Es esencial calcular y reportar el número total de espermatozoides por eyaculado, ya que este parámetro provee una medida exacta de la producción de espermatozoides testiculares y del número de espermatozoides transferidos a la mujer durante el coito.

Es obtenido multiplicando la concentración espermática por el volumen total del eyaculado. El número total de espermatozoides debe ser reportado como un número entero (sin decimales) de millones de espermatozoides. Con excepción a los números menores a 10 millones, en las que puede aceptarse un decimal en aras de la claridad en el rango inferior de resultados; Aunque la variabilidad analítica justifica el uso de un decimal.

Si no se observan espermatozoides en las preparaciones repetidas (azoospermia). Aunque se ha sugerido que la definición debería cambiar, la azoospermia sigue siendo una descripción de los hallazgos en el eyaculado y no un diagnóstico o una base para la terapia.

En general, se acepta que el término azoospermia sólo puede utilizarse si no se encuentran espermatozoides en el sedimento de una muestra centrifugada.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la presencia o ausencia en el sedimento con espermatozoides depende del tiempo, la velocidad de centrifugación y de la cantidad de semen.

La centrifugación a 2500 rpm por un tiempo de 15 minutos no es garantía de que se encuentren espermatozoides, la movilidad puede perderse y la concentración puede subestimarse. Si los recuentos se han realizado en una muestra centrifugada, se debe reportar en el informe. (Organización Mundial de la Salud, 2021)

### **2.9.6 Morfología espermática**

Un espermograma de rutina debe incluir la evaluación del porcentaje de espermatozoides con forma ideal. Esta práctica tiene su origen en los trabajos de MacLeod y Gold quienes describieron que las formas presentes en el semen varían ampliamente. Durante los últimos 30 años las distintas ediciones del Manual de la

Organización Mundial de la Salud para la evaluación de la calidad seminal han puesto especial interés en establecer criterios homogéneos en el momento de hacer la descripción morfológica del espermatozoide. (Cerezo, 2021)

Debido a la necesidad de buscar un indicador que permita identificar en forma simple y confiable que individuos tienen posibilidades de fecundar, surge el criterio de morfología estricta como uno de los principales marcadores de la capacidad fecundante del espermatozoide. (Acosta & Simmons, 1988)

La evaluación de la morfología ha sido correlacionada con la capacidad de los espermatozoides para unirse a la zona pelúcida del ovocito, sobrellevar la reacción acrosomal y finalmente a la fecundación. (Franken & Bastiaan, 2010)

Los espermatozoides morfológicamente anormales, producirán especies reactivas del oxígeno, los cuales al sobrepasar los sistemas de regulación dañan el ADN celular debido al estrés oxidativo. (Ford, 2004)

La Organización Mundial de la Salud presenta sus criterios en base a investigaciones sobre la morfología de espermatozoides capaces de penetrar el moco cervical y unirse a la zona pelúcida.

La Organización Mundial de la Salud nos menciona que el término espermatozoide "Normal" es en cierto modo, ambiguo lo que provoca malos entendimientos y conflictos académicos. Un significado general de "normal" es una cualidad que es un común ejemplo en una población; y esto no es cierto para la morfología espermática "normal" en humanos. Otro significado es que indica que la célula o el individuo no está afectado por una enfermedad, pero una morfología normal no significa que el espermatozoide no sea portador de una causa patológica, por ejemplo, cola inmóvil o ADN dañado.

La morfología variable del espermatozoide humano hace dificultoso su evaluación, pero observaciones de espermatozoides recuperados a partir del tracto reproductor femenino especialmente en el moco endocervical post coital y también en la superficie de la zona pelúcida han ayudado a definir el aspecto potencialmente fertilizante del espermatozoide. Por ello se le denomina a un espermatozoide con la capacidad para procrear como ideal. (Organización Mundial de la Salud, 2021)

### **2.9.7 Vitalidad**

La membrana de una célula muerta no está intacta. Esto significa que los colorantes pueden pasar a través de su membrana, lo contrario sucede con una célula viva el colorante se le hace imposible atravesar dicha membrana. (Cerezo, 2,021)

Una tinción (con frecuencia denominada tinción supra vital) de este tipo es la eosina, para poder distinguir una tinción de color rosa pálido o roja en el espermatozoide, se recomienda utilizar una tinción que no le dé el color a la cabeza del espermatozoide y tiña el fondo para un mejor contraste. (Cerezo, 2021)

La vitalidad espermática se evalúa en los primeros 30 minutos inmediatamente después licuada la muestra, pero en algunos casos se puede evaluar hasta dentro de una hora cuando la muestra no ha sido licuada completamente. No se debe evaluar después de la hora para encontrar un alto número de espermatozoides muertos por efectos de deshidratación o cambios en el pH o temperatura que pueda afectar la muestra. (Organización Mundial de la Salud, 2010)

El manual para procesamiento de Semen de la Organización Mundial de la Salud 2,021, sugiere se utilice la técnica con colorante Eosina-Nigrosina el cual permite almacenar la muestras evaluación y control de calidad en un momento posterior al del análisis. (Organización Mundial de la Salud, 2010)

Con esta técnica de tinción los espermatozoides muertos se tiñen de rojo o rosado obscuro y los vivos de color claro o no se tiñen. (Organización Mundial de la Salud, 2010)

La vitalidad espermática estimada mediante la evaluación de la integridad de la membrana de la célula puede ser determinada rutinariamente en todos los eyaculados, pero no es necesario cuando al menos el 40% de los espermatozoides son móviles. (Organización Mundial de la Salud, 2021)

En muestras con pobre movilidad, el test de vitalidad es importante para poder discriminar entre espermatozoides inmóviles muertos y espermatozoides inmóviles vivos. La presencia de un gran porcentaje de espermatozoides vivos inmóviles puede ser indicativo de defectos estructurales en el flagelo. Un alto porcentaje de espermatozoides inmóviles

y muertos puede ser indicativo de patología epididimaria o una reacción inmunológica debido a una infección. (Organización mundial de la Salud, 2021)

La vitalidad del espermatozoide es solamente de interés clínico para evaluar las muestras con muy pocos o sin espermatozoides móviles. (Cerezo, 2021)

Síndrome de cilios inmóviles es una enfermedad genética poco común, espermatozoides vivos con la imposibilidad de moverse, los cilios del cuerpo son afectados incluyendo el cuerpo del espermatozoide. (Cerezo, 2021)

La presencia de espermatozoides vivos pero inmóviles se asocian a infecciones respiratorias crónicas y situs inversus (Síndrome de Kartagener) (Cerezo, 2021)

Si los espermatozoides inmóviles están muertos existe la posibilidad para sospechar de la presencia de anticuerpos citotóxicos anti-esperma u otros efectos negativos de reacción inflamatoria activa. (Cerezo, 2021)

## **2.10 Valores de referencia de Espermograma según el Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud sexta edición año 2021**

Los valores de referencia varían según varios factores que incluyen características demográficas de la población sana donde se tomaron las muestras y los métodos específicos y/o los instrumentos usados para estudiar dichas muestras. Lo más recomendado es que los laboratorios establezcan sus propios valores de referencia al menos una vez al año. Por lo tanto, todos los resultados deben ser interpretados según los valores de referencia del laboratorio en el que se realizó el estudio; el laboratorio debe proporcionar estos valores junto con los resultados del estudio. (Padilla, 2018)

<b>Tabla 1. Valores de referencia según el Manual de Procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud, Sexta edición (2021)</b>		
<b>Parámetro</b>	<b>Valor de referencia</b>	<b>Dimensionales</b>
<b><u>Examen macroscópico</u></b>		
Volumen	Mayor o igual a 1.4	mL
Licuefacción	15 a 60	Minutos
Viscosidad	Hasta 2	Centímetros
pH	7.1-8.2	Potencial Hidrógeno
<b><u>Examen microscópico</u></b>		
Concentración espermática por mililitro	Mayor o igual a 16	Millones/mililitro
Concentración espermática total	Mayor o igual a 39	Millones
Movilidad total (movilidad progresiva +movilidad no progresiva)	42	%
Movilidad Progresiva	30	%
Movilidad no progresiva	1	%
Espermatozoides inmóviles	20	%
Vitalidad	54	%
Espermatozoides Ideales	4	%

Tomado y adaptado: Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud sexta edición año 2021.

## **2.11 Infertilidad masculina:**

La infertilidad por factor masculino se debe a una amplia gama de causas conocidas y desconocidas, lo que significa que es necesario mejorar la evaluación diagnóstica de los hombres en las parejas infértiles.

La prueba de espermograma puede ser útil para el diagnóstico y tratamiento, por ejemplo, para los tratamientos endocrinos, selección de pacientes para estudios genéticos tales como los síndromes de Klinefelter o microdeleciones del cromosoma "Y", translocaciones, inversiones, mutaciones de fibrosis quística y discinesia ciliar.

Clínicamente es útil los límites de decisión para estas investigaciones. Un límite de decisión se basa en consideraciones clínicas y estadísticas que apuntan a la necesidad de un determinado diagnóstico o intervención terapéutica.

## **2.12 Reporte análisis del espermograma:**

Un reporte básico de espermograma debe contener en su reporte:

- Datos generales
- Fecha
- Edad del paciente
- Nombre del médico que lo refiere

Cuestionario clínico:

- Toma de medicamentos: Importante anotar cualquier medicamento que el paciente consume.
- Toma de vitaminas o suplementos vitamínicos
- Enfermedades

Cuestionario sobre la recolección de la muestra:

- Hora de recolección
- Dificultades para obtención de muestra
- Lugar donde se realizó la obtención de muestra

Examen macroscópico de Semen:

- Licuefacción total (minutos)
- Volumen (mililitros)
- Aspecto (Homogéneo, líquido etc.)
- Color (Blanco opalescente-Amarillo, etc.)
- pH

Examen microscópico de semen:

- Concentración Espermática (Millones/mL)
- Concentración Total (Millones)
- Movilidad progresiva rápida (%)
- Movilidad Progresiva Lenta (%)
- Movilidad No progresiva (%)
- Inmóviles (%)
- Vitalidad (% de vivos)

Observaciones: Se anotarán si se presentan aglutinaciones, agregaciones, presencia de células redondas, presencia de bacterias, presencia excesiva de glóbulos blancos, eritrocitos etc.

El reporte debe contener los valores del examen más los valores de referencia de la Organización Mundial de la Salud.

## 2.13 Análisis Espermático Asistido por Computadora

Sperm Class Analyzer (SCA) es un sistema CASA (Computer Aided Semen Analysis) que permite el manejo y análisis de muestras de semen siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud.

Las principales ventajas que se obtienen con el uso del sistema son:

- Elevada precisión en el análisis.
- Repetibilidad en el resultado.
- Fiabilidad en los resultados.
- Rápido análisis y manejo de la información obtenida

SCA es un sistema muy fiable para la obtención de datos objetivos necesarios en la investigación médica de semen. Los resultados obtenidos con el SCA son muy apropiados, tanto para la realización de publicaciones científicas, como para los controles de calidad externos.

Componentes del Sistema:

- Microscopio Biológico
- Cámara Digital
- Uno ordenado con el software SCS instalado.

SCA, Movilidad y concentración es un programa de análisis automático de la concentración y los parámetros de movilidad del espermatozoide. A partir de la muestra, el Software detecta automáticamente los espermatozoides, realiza el recuento y proporciona los datos de concentración, al mismo tiempo que se realiza el recuento. En los espermias móviles analiza su trayectoria y velocidad, teniendo en cuenta todos los parámetros de movilidad según los criterios de la Organización Mundial de la Salud.

Detecta parámetro codificados en su sistema como VCL (Velocidad curvilínea) es la velocidad media de todas las fotos tomadas de una sola imagen, VAP es la velocidad promedio de la trayectoria Ez, VSL es la velocidad rectilínea entre su posición inicial y su posición final, ALH es la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; es el desplazamiento de la cabeza respecto de la trayectoria promedio.

Los actuales avances en la tecnología no han permitido contar eficientemente espermatozoides marcando el ADN y el algoritmo que detecta la cola de este. De esta manera, se descarta el detritus o las células redondas propias del líquido seminal.

El uso de sistemas computacionales para la determinación de la movilidad depende de la concentración espermática, del debris de la muestra (que puede ser confundida con espermatozoide motil) y la tasa de imágenes obtenidas por segundo. Aunque la mayoría de las compañías fabricantes recomiendan una adquisición entre 50 y 60 Hz actualmente esa tasa de adquisición es mayor y se recomienda especialmente para muestras de espermatozoides de baja sensibilidad y/o hiperactividad e incluso para los más rápidos, conocidos como los espermatozoides pez cebra.

Sin embargo, el sistema entrega resultados reproducibles, la Organización Mundial de la Salud recomienda que al menos 200 espermatozoides sean analizados y en lo posible 400. El sistema debe estar unido a un Software que permita el análisis estadístico de los resultados. También es necesario estandarizar las determinaciones de motilidad de los espermatozoides, como son las temperaturas a 37 grados Centígrados y de preferencia realizar una determinación en muestras sin diluir.

Se ha determinado que la motilidad se puede realizar sin dificultad, con muestras que tienen concentración espermática de 2 millones y 50 millones por mL. En muestras que superan los 50 millones las colisiones pueden ocurrir con alta frecuencia y puede ser probable que induzca en errores; Tales muestras deben ser diluidas con plasma seminal del mismo paciente, obteniendo una alícuota centrifugada a 2500 rpm por un tiempo de 6 minutos, también debe disponerse de cámaras dobles, el sistema generalmente hace recomendaciones para una adecuada grabación en cuanto a la intensidad de luz, contraste y aumento. (Organización Mundial de la Salud, 2010)

## **2.14 Control de calidad de los parámetros del líquido espermático**

En los aspectos de estandarización y control de calidad en los que se manejan espermatozoides, surgen una gran variedad de dificultades debido a la gran cantidad de factores que pueden intervenir en su resultado.

La amplia aceptación del manual de Organización Mundial de la Salud ha incrementado en gran manera la estandarización de las técnicas de análisis de semen, sin embargo, se hace importantísimo el entrenamiento adecuado del personal que realizan los procedimientos. Se ha evidenciado que, utilizando la misma técnica, los mismos instrumentos, pero distintos operadores se presentan resultados diferentes. (Cerezo, 2021)

Es preciso hacer énfasis en los sistemas de Calidad en los laboratorios con un mayor reconocimiento que el liderazgo de la dirección y el compromiso del personal son esenciales para garantizar la calidad de todas las actividades como los procesos en el laboratorio. (Westgard, 1997)

El proceso de análisis de semen consta de tres fases: Preanalítica, analítica y postanalítica. La variabilidad de los procedimientos se debe a variaciones o cambios que sufren dichos procesos en cualquiera de estas tres fases. La variabilidad de las técnicas es un fenómeno propio de los procesos de medida y por tanto de los procesos químico-analíticos por el cual los resultados obtenidos al medir repentinamente una magnitud del mismo espécimen suelen ser diferentes entre sí. (Haeckel, 1993)

### **2.14.1.1 Control de calidad de la fase Preanalítica**

Esta etapa inicial en la que el médico llena la solicitud del análisis de espermograma, hasta la llegada de la muestra al puesto de trabajo donde se llevará a cabo el análisis. Esto incluye la preparación del paciente, la recolección de la muestra, su conservación y su correcta rotulación.

Es preciso normar todas actividades que lo integran y controlar todos los instrumentos propios de esta fase. (Corado y otros 2014)

Los factores que suelen influir en la fase preanalítica se clasifican:

- Variabilidad biológica intraindividual, estos factores con influencia en parámetros seminales son clasificados como:
  - **Fisiológicos:** provocan que los parámetros, seminales de un individuo puedan variar independientemente de la salud del paciente, pueden clasificarse como aleatorios (estrés, dieta, ejercicios, abstinencia sexual, estímulo sexual) o sistemático (Edad).
  - **Patológicos:** En caso del semen puede referirse a fiebre, varicocele, obstrucción de los canales seminales, disfunción hormonal etc. (Fraser, 2001).
  - **Variabilidad biológica interindividual:** Es un fenómeno por el cual los parámetros seminales varían dentro de una población específica, se puede tomar como variantes diferentes grupos de edad o entre países. Una población se puede dividir en subconjuntos de poblaciones homogéneas, si se tienen en cuenta factores que aumentan la variabilidad biológica interindividual; así se recomienda que cada laboratorio haga su esfuerzo por tener sus propios valores de referencia para los diferentes parámetros en función de los diferentes grupos. (Cerezo, 2021)

Una muestra de semen para cualquier determinación debe obtenerse en la forma de la cual se describe en el Manual de la Organización Mundial de la Salud 2021, la calidad en la fase preanalítica debe garantizarse implantando un sistema de control de calidad. Las variables preanalíticas incluyen la petición de análisis, la identificación y preparación adecuada del paciente, la exactitud de la recolección de la muestra, la manipulación y su transporte al laboratorio si fuese necesario. (Cerezo, 2021).

#### **2.14.1.2 Control de la correcta identificación de las muestras:**

Cuando se obtiene la muestra de espermograma de preferencia se genera una etiqueta o en su defecto se rotula con un marcador indeleble. Este proceso se debe

realizar antes de la colecta de la muestra y se le entrega al paciente, indicando que revise la correcta escritura de su nombre. (Cerezo, 2021)

El mecanismo por el cual una muestra se asocia con el paciente y la petición del examen del laboratorio de andrología es de vital importancia, cuando la asociación de estos datos debe ser comprobada por efectos legales, puede que cada paso de las actividades del proceso tenga que ser verificado por terceros. La llamada Cadena de custodia empieza con la identificación de los pacientes y continúa a través de todo el proceso operativo hasta que se emite el informe. (Hawcroft & Hector, 1987)

#### **2.14.2 Fase analítica:**

El control de calidad analítica es el término más utilizado para describir los pasos encaminados a asegurar que los errores en los datos analíticos estén dentro de un margen de error aceptable. Esto quiere decir que los errores inevitables cometidos son cuantificados para permitirnos decidir si son de una magnitud aceptable y qué errores inaceptables son descubiertos para decidir la acción correctiva que puede ser tomada.

Las técnicas y actividades implicadas en el control de calidad analítico pueden dividirse en 3 niveles de acción:

- Control de calidad de primera línea (Control de instrumentos/calibraciones)
- Control de calidad de segunda línea (Control de calidad Interno)
- Control de calidad de tercera línea (Control de calidad externo) (Delgadillo, Romero, & Arias, 2009)

El valor verdadero de una magnitud se obtiene con una medición perfecta, pero tal valor verdadero no se conoce. En la teoría se usa el valor verdadero, en la práctica se pueden utilizar otros valores que se pueden utilizar provisionalmente como verdaderos. (Stockl, Franzini, & Kratchovila, 1996)

La variabilidad analítica puede desglosarse en:

- **Error sistemático:** Es la diferencia entre la media que se obtendría de un número infinito de mediciones de mismo circunspecto y el valor verdadero.
- **Error aleatorio:** Es la diferencia entre el resultado de una medición y la media que se obtendría de un número infinito de mediciones. El error total es el concepto que integra la variabilidad aleatoria y la sistemática de manera que es la diferencia entre el resultado de una única medición y el valor verdadero. (Stockl, Franzini, & Kratchovila, 1996)

### ***2.14.3 Calidad de la fase post analítica:***

Comprende todas las actividades, desde la obtención del resultado de la medición de una magnitud, hasta la llegada del paciente o la entrega al médico.

El informe de los resultados ha de ser claro y simple, debe incluir la determinación o examen realizado en este caso es análisis de semen; la unidad de medida y los límites de referencia. (Cerezo, 2021)

Es importante que los laboratorios tengan personal especializado que pueda asesorar a los clínicos en la evaluación e interpretación de las pruebas y las técnicas de laboratorio, de la precisión de la exactitud y eficacia de los métodos utilizados.

El término elaboración de informes, incluye tanto el contenido del informe y la validación de los datos, como la información en sí misma. Se describen dos tipos de validación: La técnica y la clínica. (Cerezo, 2021)

En las rutinas administrativas se debe manejar valores de alarma en los cuales los médicos deben de actuar como valores de alarma por ejemplo azoospermia en hombres. (Cerezo, 2021)

El manual de la Organización Mundial de la Salud 2,021 considera al examen de semen excepcionalmente complicado y difícil de estandarizar desde el punto de vista de procedimiento, lo que puede dar lugar a grandes discrepancia en la evaluación de los

recuentos, la movilidad y la morfología de los espermatozoides en diferentes laboratorio. (Organización Mundial de la Salud, 2021)

Los laboratorios clínicos se rigen bajo la norma Internacional ISO 15189 y se aplican para laboratorio andrológicos. Las normas del Manual de procesamiento de Semen de la Organización Mundial de la Salud 2,021 está basado bajo dicha norma de calidad. (Organización Mundial de la Salud, 2021)

#### ***2.14.4 Recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud en el Manual de Procesamiento de líquido espermático de la sexta edición.***

##### **Manual de laboratorio:**

- Todos los procedimientos que se realizan regularmente en el laboratorio deben estar descritos en un manual.
- Todo el personal técnico involucrado en los procedimientos con respecto al espermograma debe ser capacitados constantemente en base a este manual.
- Los procedimientos operativos estándar deben ser claros y ser consultados en cualquier momento que se necesite. El mismo debe ser revisado y modificado periódicamente.

##### **Control de calidad Interno:**

- Se debe velar por la calidad de los resultados y la reproducibilidad de estos.
- Se debe revisar periódicamente los procedimientos utilizados por cada técnico.
- Deben incorporar normas de control de calidad Interno, así como mejorar el monitoreo de las técnicas utilizadas.

##### **Muestras de Control de Calidad Externas:**

- Existen muestras disponibles comercialmente que contienen valores conocidos y tienen límites permisibles de desempeño. La ventaja de estas es que nos permite evaluar tanto la precisión como la exactitud de cada operador.

- Con estas muestras el laboratorio puede comparar sus resultados con los de otros laboratorios inscritos en el mismo programa y esto puede ser incluso con laboratorios de otros países (Control de Calidad Externo)
- Muestras fabricadas por el laboratorio: La ventaja de estas muestras son el costo reducido, cumpliendo el cometido de tener un valor conocido y teniendo un valor por cada operador el cual se describe en una gráfica y se observa la dispersión de cada resultado. Este tipo de muestras se puede aplicar para conteo espermático, vitalidad con Eosina Nigrosina, morfología. (Organización Mundial de la Salud, 2021)
- Videos y fotografías: El uso de videos o fotografías son excelentes herramientas para capacitar al personal y evaluar su juicio a la hora de reportar o realizar conteos espermáticos.
- Gráficos de control de calidad con valores numéricos: Creación e interpretación de gráficos de control de calidad en el laboratorio, de forma ordenada, con datos claros y fáciles de entender. La ventaja de estos nos ayuda a evidenciar la exactitud de cada operador y al final evaluar su progreso. (Organización Mundial de la Salud 2021)
- Utilización del gráfico X xar: Este gráfico tiene como finalidad detectar resultados que no son muy diferentes de valor objetivo o detectar un aumento general de variación. Los errores sistemáticos se pueden detectar mediante una medición secuencial de la misma muestra.

### **Gráfico X xar**

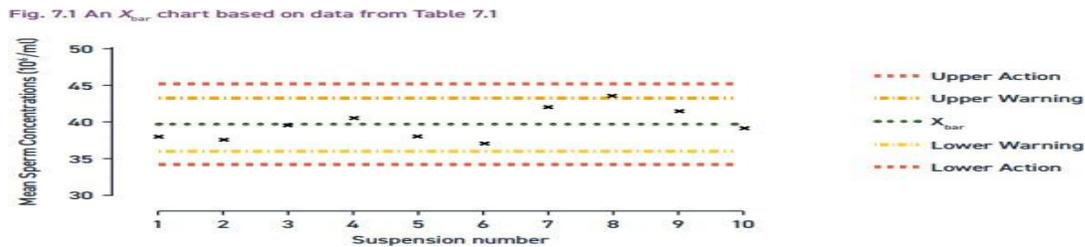
Se realizan mediciones repetidas en una muestra y se grafica el valor medio frente al tiempo o se examina la suspensión de la prueba. Se utilizan muestras con un valor conocido real u objetivo que puede ser de Control de Calidad Externo. (Organización Mundial de la Salud, 2021)

El Gráfico X es un tipo de gráfico de Shewhart que se utiliza para monitorear los valores medios de análisis repetidos de un número constante de la muestra de la prueba. Por ejemplo, en 10 suspensiones provenientes de la misma muestra todos los miembros del

personal realizan un conteo de espermatozoides. A cada una de las suspensiones se calcula el promedio evaluado individualmente.

Luego se realiza un gráfico de los diez valores obtenidos de cada suspensión se calcula el valor objetivo, los límites de advertencia y los límites de acción. Los límites se basan en la variación de las evaluaciones y el número de personas que lo realizaron. Se expresan como límites por debajo o encima del valor  $\bar{X}$ . (Organización Mundial de la Salud 2021).

**IMAGEN 11.** Gráfica  $\bar{X}$  describe los límites de acción, límites permitidos y el valor promedio  $\bar{x}$ .



Tomada y adaptada: Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud 6ta. Edición, 2021.

### **Especificaciones de calidad:**

La gestión moderna de la calidad incluye mucho más que el simple control estadístico realizado cada día en el puesto de trabajo. Los elementos esenciales de la práctica de la calidad en el laboratorio, la garantía de la calidad y la planificación deben ser incluidos en la gestión de la calidad. De hecho, estos son elementos básicos de la gestión de la calidad total en el laboratorio. (Cerezo, 2021)

Todas las definiciones de la calidad, pueden ser interpretadas como el establecimiento de condiciones tales como que los resultados de todas las pruebas realizadas en el laboratorio ayuden a los clínicos en la práctica de una buena medicina. Por lo tanto, antes de que podamos controlar, practicar, asegurar, manejar la calidad del laboratorio,

debemos conocer exactamente qué nivel de calidad es necesario que se haga satisfactoriamente. (Cerezo, 2021)

Las especificaciones numéricas de la calidad analítica (también llamadas objetivos de la calidad, estándares de la calidad, estándares deseables, objetivos analíticos y objetivos de la prestación analítica), son requerimientos en el laboratorio clínico cuando este proyecta especificaciones o prepara documentos para nuevos métodos y equipos analíticos. (Cerezo, 2021).

### **VALIDACIÓN DE RESULTADOS:**

Para los laboratorios clínicos es de suma importancia la gestión en la calidad de los resultados según su definición “está relacionado con las actividades generales de gestión, la provisión y gestión de los recursos; Los procesos de preanálisis, análisis, post análisis, la evaluación y la mejora continua (NTG/ISO 15189:2012)”, por lo que parte del post análisis es la adecuada interpretación con la ayuda de los valores referencia.

La validación y la verificación son una confirmación que se ha cumplido los requisitos para el uso o aplicación prevista de un método, mediante el suministro de evidencias objetivas (NTG/ISO 15189:2012), por lo que sus registros son primordiales en la gestión de la calidad y la validación de sus valores.

Según la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) ha elaborado recomendaciones para la producción de valores de referencias biológicas poblacionales, siguiendo las recomendaciones de la IFCC, para la obtención de valores de referencia biológicos poblacionales es necesario:

- Disponer de un procedimiento de medida de calidad suficiente y de un procedimiento de obtención.
- Traslado y manipulación de especímenes normalizado a tener de la variabilidad pre metrológica de la magnitud en estudio
- Conocer los factores de variabilidad biológica que permitirán definir inicialmente los criterios de exclusión y participación.
- Los criterios de exclusión servirán para que en la muestra de referencia no exista variabilidad iatrogénica ni variabilidad patológica, mientras que los criterios de

participación permitirán la selección de individuos de referencia que formen grupos homogéneos, es decir, grupos en los que la variabilidad biológica interindividual sea la menor posible (Intervalos de referencia biológicos 1 Cataluña España; NOTICONAQUIC 2011;54:46-51).

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS

En este estudio se determinaron los valores de referencia de pacientes comprendidos entre 18-60 años que acudieron a realizarse el análisis de espermograma en el laboratorio de la clínica de Reproducción Humana en el año 2021.

Los valores del espermograma obtenidos se estratifican por grupo etario (por edad) los cuales fueron definidos tomando en consideración las etapas del ciclo reproductivo masculino según la Organización Mundial de la Salud (Equipo editorial, Etecé mayo 6 2022) y por la influencia de la edad del hombre en la calidad de semen (García, 2017), (18-30, 31-40 y 41-60 años), para estimar la frecuencia y el porcentaje de muestras obtenidas por cada grupo etario.

En la tabla 2 se presenta la distribución de los 408 pacientes que fueron incluidos en el estudio por rango de edad.

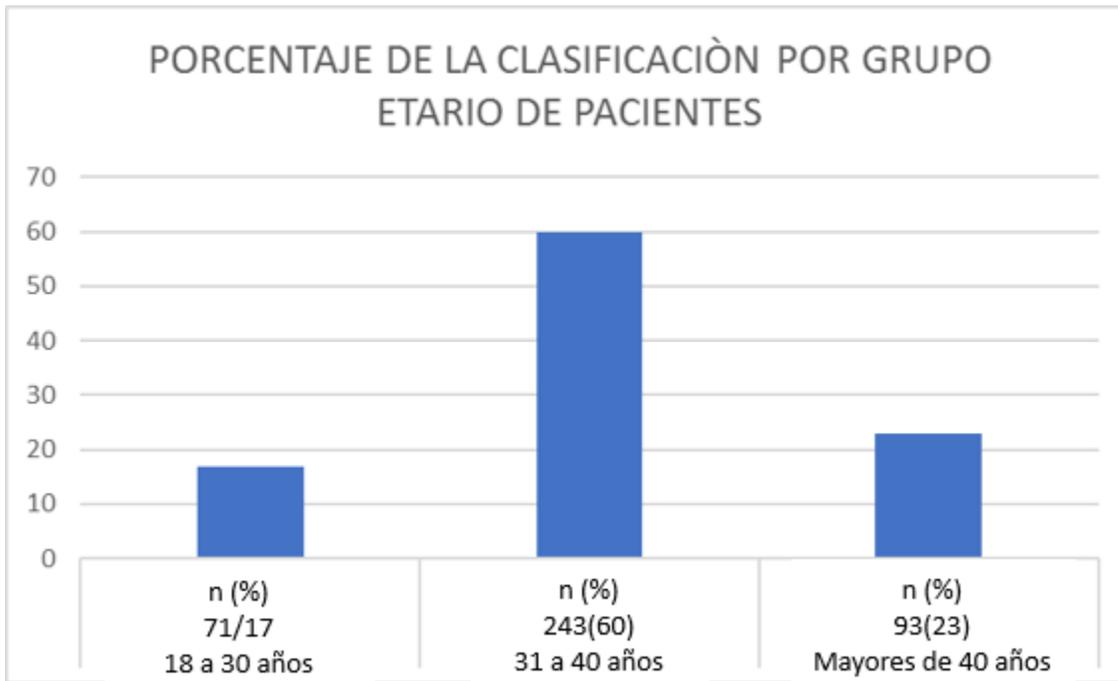
**Tabla No 2 Distribución de pacientes incluidos en el estudio, por grupo etario.**

<b>Distribución de grupo etario y años</b>			
<b>18 a 30</b>	<b>31 a 40</b>	<b>Mayores de 41</b>	<b>Total</b>
<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>71 (17)</b>	<b>243 (60)</b>	<b>95 (23)</b>	<b>408 (100%)</b>

n= Frecuencia, % = Porcentaje

Fuente: Adaptación propia de recolección de datos en Laboratorio de Andrología de Clínica de reproducción en el año 2021.

Gráfica 1: Porcentaje de la clasificación por grupo etario de pacientes según tabla **No. 1**



Fuente: Adaptación propia de recolección de Datos en Laboratorio de Andrología de Clínica de reproducción en el año 2021.

En la tabla 3 se presenta la distribución de los 100 pacientes que fueron excluidos del estudio por patologías, medicamentos y/o fumadores.

**Tabla No. 3 Distribución de la clasificación de exclusión de pacientes**

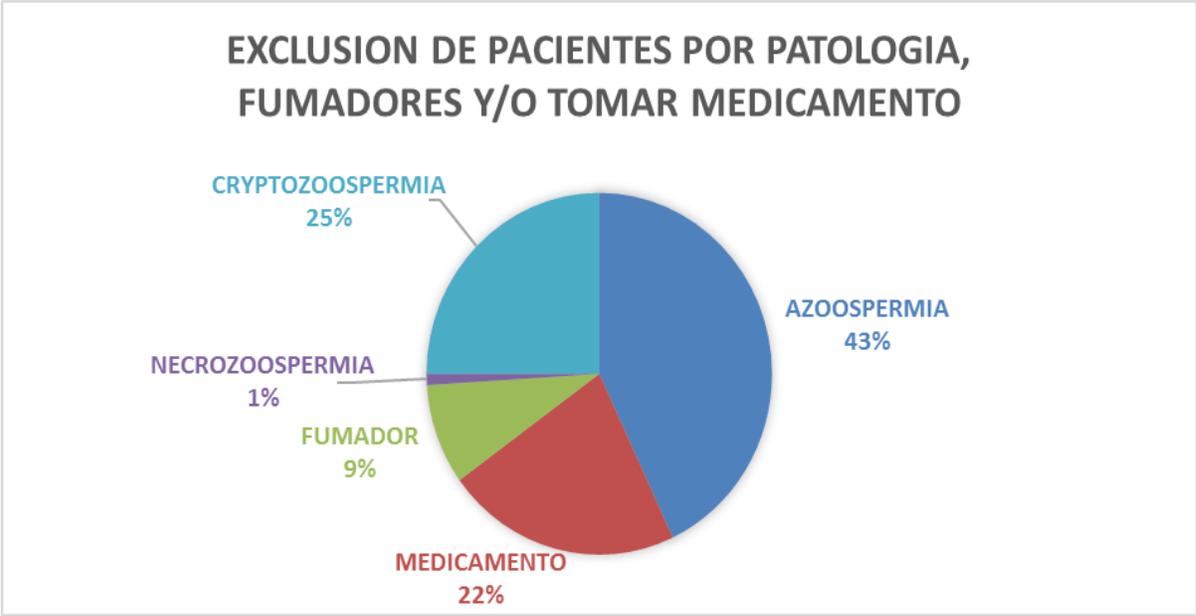
<b>EXCLUSIÓN POR</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
AZOOSPERMIA	43	43
MEDICAMENTO	22	22
CRIPTOZOOSPERMIA	25	25
FUMADOR	9	9
NECROZOOSPERMIA	1	1
TOTAL	100	100

n= frecuencia

% = porcentaje

Fuente: Adaptación propia de recolección de Datos en Laboratorio de Andrología de Clínica de reproducción en el año 2021.

Gráfica No. 2 Porcentaje de la clasificación de exclusión de pacientes por patologías, medicamentos y/o fumadores según tabla No 3.



Fuente: Adaptación propia de recolección de datos en Laboratorio de Clínica de Reproducción Humana, en el año 2021.

En la tabla 4 se presenta la determinación de los valores atípicos para cada variable, utilizando el método no paramétrico de Tukey recomendado por el CLSI en su guía C28-A3; los valores atípicos no fueron incluidos dentro de la muestra que sirvió para determinar los valores de referencia.

**Tabla 4. Determinación de valores atípicos del total de la población.**

Variables	Valores Atípicos	Valores incluidos
	n (%)	n <sup>a</sup>
Volumen (mL)	141(35)	267
pH	88(22)	320
Concentración(mL)	255(63)	153
Concentración total (Millones)	298(73)	110
Movilidad Total (%)	308(75)	100
Morfología (Ideales)	336(83)	72
Vitalidad (%)	292(72)	116

mL= Mililitro

Nota: n= Absoluto %= porcentaje n<sup>a</sup>=Número de valores incluidos para determinar los valores de referencia mL= mililitro

Fuente: Adaptación propia de recolección de Datos en Laboratorio de Clínica de Reproducción Humana año 2021.

En la Tabla 5, se presentan los valores de desviación estándar de cada variable. Se basó en la guía C28-A3 del CLSI, la cual indica que, una vez eliminados los valores atípicos, puede definirse la media y desviación estándar para comunicar la dispersión de los valores (CLSI, 2000).

**Tabla 5 Determinación de la desviación estándar de las variables del análisis de espermograma por grupo etario**

<b>VARIABLES</b>	<b>18-30 años</b>	<b>31-40 años</b>	<b>mayores de 40 años</b>
Volumen (mL)	1.06	1.43	1.50
pH	0.17	0.17	0.20
Concentración(mL)	39.86	48.18	48.91
Concentración total (Millones)	187.63	161.83	198.4
Movilidad Total (%)	6.94	10.24	12.53
Morfología (Ideales)	1.77	1.99	1.73
Vitalidad (%)	6.03	8.00	10.19

Fuente: Adaptación propia de recolección de datos en Laboratorio de Clínica de Reproducción Humana, año 2021.

En la tabla 6 se representa la media obtenida del volumen de cada uno de los rangos de días de abstinencia entre 2 - 3 días, 4 - 5 días y 6 - 7 días, En el porcentaje de aumento se evidencia que al tener más días de abstinencia el volumen va aumentando gradualmente pero no es considerable.

**Tabla 6 Medías de volumen clasificado por días de abstinencia sexual**

<b>Abstinencia</b>	<b>Media</b>	<b>Porcentaje de aumento</b>
2 - 3 días	2.17 mL	--
4 - 5 días	2.58 mL	(0.41 mL) 16%
6 - 7 días	2.88 mL	(0.29mL) 10%

n= número total por mL

%= porcentaje de aumento

Fuente: Adaptación propia de recolección de datos en Laboratorio de Andrología de Clínica de Reproducción Humana, año 2021.

En la Tabla 7, se presentan los valores de espermograma obtenidos en este estudio. Estos valores se estratifican por edad; se realizó una comparación entre grupos etarios y con los valores proporcionados por la Organización Mundial de la Salud. Puede observarse con más detalle en las gráficas de caja de las figuras que se encuentran en el Anexo 6 “Comparación de las distribuciones de los datos observados y los valores de referencia proporcionados de la Organización Mundial de la Salud (OMS)

<b>Tabla 7. Comparación de límite inferior y límite superior por grupo etario obtenidos, y los valores de decisión de la OMS.</b>				
Variable	Límites obtenidos por: <b>Grupo etario en años</b>			Valores de referencia otorgados por Organización Mundial de la Salud
	n= 18 a 30	n= 31 a 40	n = 41 - 60	
Volumen (mL)	1.95-2.37	2.4-2.8	2.2-3.2	Mayor o igual a 1.4
pH	8.0-8.1	8.1-8.13	8.0-8.1	Mayor a 7.2
Concentración(mL)	88-110.1	88.-100.0	92.8- 111.9	Mayor o igual a 16
Concentración total (Millones)	215.4-298.1	210.3-254.9	197.3-268.7	Mayor o igual a 39
Movilidad Total (%)	68.5-73.4	66.2-68.9	65.3-69.5	Mayor o igual a 42
Morfología (Ideales)	6.0 - 7.0	6.0-6.0	5.0-6.0	Mayor o igual a 4
Vitalidad (%)	74 -78	73-75	71-74	Mayor o igual a 54%

Fuente: Adaptación propia de recolección de Datos en Laboratorio de Clínica de Reproducción Humana, año 2021.

**Tabla 12 Medias distribuidas por grupos etarios**

<b>Medías distribuidas por grupo etarios</b>			
<b>Variable</b>	<b>Edad = 18 a 30</b>	<b>Edad = 31 a 40</b>	<b>Edad = 41 - 60</b>
Volumen (mL)	2.16	2.6	2.7
pH	8.0	8.1	8.0
Concentración(mL)	99.05	94	102.35
Concentración total (Millones)	256.75	232.6	233
Movilidad Total (%)	70.95	67.55	67.4
Morfología (Ideales)	6.5	6.0	5.5
Vitalidad (%)	76	74	72.5

Fuente: Adaptación propia de recolección de datos en Laboratorio de Andrología de Clínica de Reproducción Humana, año 2021.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La importancia de obtener los valores de referencia de espermograma radica en la utilidad que se tiene para la interpretación de los resultados que se adecuen a la población a la cual pertenece el paciente, con fin de que el médico especialista en reproducción pueda tomar una decisión en el tipo de tratamiento o procedimiento que conlleve a un embarazo exitoso. Según el diccionario de Cáncer del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) en el campo de la medicina un valor de referencia es el conjunto de valores que él médico utiliza para interpretar los resultados de las pruebas de un paciente, estos son determinados con base en los resultados del analito con una confiabilidad de un 95% en una población sana, estos pueden variar en distintos grupos poblacionales con variaciones en sexo o edad, también pueden ser denominados como: Intervalo de Referencia, Limite de Referencia y/o Límite normal.

Cada laboratorio debe establecer y validar sus propios intervalos de referencia y por lo tanto existen diferencias entre laboratorios, los valores de referencia ayudan a describir lo que es similar o característico para un grupo en particular. Algunos laboratorios o clínicas médicas han establecido límites de decisión los cuales son más útiles que los valores de referencia para determinar la evolución clínica y el pronóstico de los pacientes de acuerdo con los tratamientos.

El manual de la Organización Mundial de la Salud en su sexta edición proporcionó valores de referencia para las variables espermáticas comúnmente medidas en base a los datos que caracterizan el espermograma, los valores de referencia fueron establecidos de hombres cuyas parejas tuvieron un tiempo de embarazo de hasta 12 semanas.

Los valores de referencia determinados en este estudio no debieran ser utilizados como tal, ya que durante su desarrollo demostró tener variables que pueden afectar la toma de decisión de los médicos en cuanto a la calidad de espermatozoides de cada paciente o su tratamiento asistido. Los datos obtenidos en este estudio no discriminan entre hombres fértiles y subfértiles, no se cuentan con datos de los factores femeninos que puedan obstaculizar su interpretación y tiempo de embarazo. Por lo tanto estos datos tampoco pueden ser comparados con los valores de referencia otorgados por la OMS, ya que como se observa en la tabla número 5 "Comparación de los límites inferiores y límites

superiores por grupo etario obtenidos y los valores de decisión de la Organización mundial de la Salud”, todos los límites inferiores superan a los valores de decisión de la OMS, observándose mejor su comportamiento en el anexo 5 “Gráficos”, ya que en el laboratorio de la Clínica de reproducción CER, se analizan muestras de semen de diferentes tipos de pacientes, entre estos: evaluación de la calidad de semen para proceso de fecundación asistida, tratamiento hormonal y para donación de espermias. La clínica ya cuenta con valores de decisión que son evaluados por cada médico ante diferentes tipos de pacientes.

Medición del volumen fue realizada con una jeringa de 10 ml y lo recomendado por el manual de la Organización Mundial de la Salud es que se realice con balanza electrónica, por lo que esta prueba no se ajusta a lo dictado por dicho manual.

Medición de pH: los valores obtenidos en el estudio fueron analizados con tiras reactivas una medida entre 0.0 - 14.0, siendo el límite inferior 8.0 para todos los grupos etarios, siendo satisfactorio el resultado ya que el pH del semen debe ser alcalino ya que este favorece a los espermatozoides cuando se encuentra en la vagina donde el pH es ácido.

Actualmente muchos laboratorios ya utilizan la cámara de Makler para medir la concentración, está agiliza el conteo de espermogramas y con ella se logran obtener resultados más rápidos, el manual en su sexta edición no contempla el uso de esta cámara, aunque ya se cuentan con diversos estudios donde demuestra ser tan eficiente como la cámara de Neubauer, habiendo otros que demuestran no ser tan eficientes en concentraciones por debajo de los 40 millones por lo que se considera importante validar su uso.

Morfología: el Manual de la Organización Mundial de la Salud en su sexta edición recomienda la tinción de Papanicolau, actualmente en muchos laboratorios se utilizan otras tinciones entre estas Giemsa y Wright el manual recomienda estudios comparativos con la tinción de Papanicolau para su validación. (Este estudio fue realizado con coloración Giemsa)

Ya habiendo realizado los estudios de validación para el uso de la cámara de Makler y las tinciones de Wright o Giemsa con resultados satisfactorios se recomienda realizar nuevamente el estudio para la determinación de valores de referencia para este estudio recomendamos utilizar el anexo número 6 “Cuestionario para la inclusión o exclusión de muestras para estudio de Determinación de Valores de Referencia”, este tiene como objetivo principal categorizar y discriminar los diferentes tipos de pacientes que pueden llegar a necesitar una prueba de espermograma, siendo primordial obtener datos de pacientes fértiles y subfértiles para su preciso diagnóstico o tratamiento. (Cardona, Berdugo, & Cadavid, 2008)

Aunque este estudio no cumpla con su principal objetivo de determinar los valores de referencia si nos deja datos que nos permiten mediante la media de cada analito de cada grupo etario identificar en donde se encuentra la mayoría de nuestra población masculina guatemalteca a nivel nacional ya que este estudio abarca datos de pacientes de diferentes departamentos del país, como podemos observar en la tabla número 6 “Medias distribuidas por grupo etario”, entre otros.

El objetivo principal para realizar una prueba de espermograma es evaluar la calidad del semen, a la vez esta prueba se realiza con un doble propósito análisis cuantitativo que nos da una serie de valores como volumen espermático, concentración, vitalidad, pH, morfología normal y el análisis cualitativo que nos da otra serie de valores como viscosidad, apariencia, color etc., es la primera prueba de carácter diagnóstica que se lleva a cabo en tratamientos de reproducción asistida además de ser una herramienta básica para detectar ciertas patologías.

Según un artículo actualizado el 09 de abril del 2021 Cúdate Plus, Roció Núñez, subdirectora y embrióloga de la clínica Tambre en Madrid el espermograma se emplea como estudio básico de fertilidad, problemas urológicos o control luego de la vasectomía. Este estudio no se realiza como preventivo de alguna enfermedad, pero sí puede detectar en algunos casos enfermedades que afectan el sistema reproductivo, Esta prueba no es recomendada a una edad determinada, según Jorge Alonzo Zafra, del Instituto para el estudio de la Esterilidad, en ocasiones se puede detectar defectos que esconden

enfermedades más graves como prostatitis, orquitis, varicocele, hidroceles e incluso tumores testiculares. (Redacción cuídate Plus, 2021)

No se encontraron datos de prevalencia distribuidos por grupo etario que refiera en que tiempo de la vida los hombres requieren realizar una prueba de espermograma, ya que por no ser prueba de diagnóstico puede ser requerida en cualquier momento. En este estudio se refleja una mayor prevalencia a una edad entre 31 y 40 años del 60%, en un artículo publicado el 19 de junio del 2,019 en la revista GQ Biológicamente, la edad ideal para procrear del hombre se encuentra entre los 35 a 40 años ya que a una edad mayor los espermatozoides están sujetos a presentar alteraciones en cantidad, morfología y movilidad. En un estudio realizado en 2017 estima que la edad en la que se obtiene una mejor calidad del semen es en hombres menores de 40 años, este estudio demuestra que los hombres mayores de 40 años empiezan a tener un recuento espermático menor.

Estos factores son independientes de la edad materna, a partir de los 35 años y aún más a los 45 años se habla de una APA acrónimo de Advanced Paternal Age explica el profesor Salvatore Sansalone, especialista en Andrología e Investigador de la Universidad Tor Vergata, la posibilidad de completar la fecundación de un embarazo aumenta si el hombre tiene menos de 41 años, el profesor Salvatore comenta que la edad del padre tiene un influencia fundamental en la salud del feto debido a las mutaciones genéticas, los hombres de 45 años tienen un 14% más de probabilidades de tener un bebe prematuro y los mayores de 50 tienen un 28% . No se cuenta con datos que sugieran a qué edad los hombres prefieren comenzar su vida reproductiva en Guatemala. (Siranni, 2019)

En este estudio se excluyen a todos los hombres que indicaron ser fumadores ya que si bien es cierto no se conoce con precisión los mecanismos por los cuales los componentes del humo de tabaco afectan a la espermatogénesis si se conoce a raíz por medio de varios estudios realizados que fumar reduce la producción de estrona y estradiol, estos dos tipos de estrógenos se excretan en los testículos y que su principal función es evitar la muerte de las células seminales por lo que se observa una incidencia negativa en el recuento y motilidad de los espermatozoides, en un estudio realizado en Alemania se demostró que los hombres que fuman más de una caja diaria de cigarrillos

tienen un 14% menos de protaminas siendo esta una proteína fundamental en la formación del semen. Sin embargo, no hay estudios que indiquen que cause infertilidad en el hombre.

Otra patología interesante que no se tomó en cuenta para realizar este estudio es la obesidad, la cual se ha demostrado con múltiples estudios que el sobrepeso y un mayor perímetro abdominal se relacionan directamente con un menor volumen seminal y en una menor concentración espermática, mas no se ha determinado con evidencia concluyente de cómo podría afectar a la movilidad y a la morfología, los hombres obesos tienen una disminución de testosterona en sangre (hipogonadismo), por lo cual se merma la producción espermática la cual afecta directamente a la concentración espermática, motilidad, morfología, y fragmentación del ADN; un estudio realizado en los laboratorios de la Universidad de Stanford demostró que los hombres con una cintura mayor a los 100 centímetros obtuvieron un volumen seminal del 22% menor a los que tenían un perímetro normal, los que tenían obesidad mórbida tienen una media de 2,8 mL y los de peso normal 3,3 mL. (Facultad de medicina de Stanford University, 2014)

De acuerdo con la representación de la calidad de los valores obtenidos, se normaliza la distribución a través de la determinación y eliminación de valores atípicos del estudio en cada variable, los cuales se obtuvieron empleando el método no paramétrico de Tukey recomendado por el CLSI en su guía C28-A3 con esta misma guía se definieron los valores de referencia con un 95% de confianza. La proporción de los valores atípicos siempre fue mayor a un 50% a excepción de las variables volumen y pH como podemos observar en la tabla número 3 “Determinación de los valores atípicos de total de la población”, esto se debe a que la población en estudio tiene muchas variables que no fueron determinadas como datos de exclusión, ya que no se cuenta con ese tipo de información en cada ficha de los pacientes tales como mencionamos anteriormente: la obesidad, diabetes, diagnóstico, motivo por el cual se realiza el examen etc.

En la tabla número 5 “Medias de volumen clasificados por días de abstinencia sexual” observamos un leve incremento del 16% entre los hombres que tenían una abstinencia entre 2-3 días con los que tenían de 4-5 días y un 10% entre estos últimos y los que tenían 6-7 días de abstinencia, siendo estos en conjunto el parámetro recomendado por

la Organización mundial de la Salud para un análisis de semen, la mayoría de los especialistas recomiendan mantener un período de abstinencia sexual entre 2-5 días ya que han observado que al tener una abstinencia de eyaculación prolongada este muestra una serie de cambios en el análisis de semen entre las cuales podemos mencionar:

- Recuento espermático: aumento en la cantidad de espermatozoides en el eyaculado.
- Volumen: aumenta con el aumento de los días sin eyacular.
- Morfología: No varía.
- Movilidad: Empeora con la abstinencia por el aumento en el recuento.
- Vitalidad: el porcentaje de espermatozoides vivos disminuye.

A pesar de que pareciera que el aumento en el recuento espermático es de beneficio, un exceso de espermatozoides es perjudicial para la movilidad; la vitalidad y movilidad de los espermatozoides es fundamental para conseguir la gestación, en un artículo actualizado el 28/12/2021 “Cómo afecta la abstinencia sexual en la calidad del espermatozoides” una prueba más compleja como lo es la fragmentación de ADN espermático se observa un aumento cuando la abstinencia sexual es prolongada perjudicando así el logro de la gestación. (Ochoa, Barranguero, Fabra, & Reus, 2021)

Los valores de referencia de los pacientes que se realizaron evaluación por problemas de fertilidad de la Clínica de Reproducción Humana según el método no paramétrico de Tukey arrojaron estar muy por arriba de los del límite bajo de los proporcionados por la Organización Mundial de la Salud, se consideran según la OMS a todos los pacientes como fértiles.

La fertilidad de los mismo no se puede corroborar pues no existe un seguimiento si en verdad se logró un embarazo exitoso con sus espermatozoides, y se desconoce si se presenta otra patología que interfiera en el embarazo que no esté relacionada con los valores de un espermograma como fragmentación de ADN, falta de fijación al Ácido Hialurónico ovárico etc.

Algunos de los métodos utilizados en los espermogramas como el conteo espermático, la morfología y el volumen no fueron realizados con lo dictado por la Organización

Mundial de la Salud por lo que se consideran inválidos como para tomarse como valores de referencia.

Los datos proporcionados por la presente Tesis únicamente se pueden tomar como pura estadística, no es aconsejado por sus editores que sean tomados como referencia para valores normales, mucho menos para valores de decisión para algún tratamiento de reproducción.

## CONCLUSIONES

- Se determinaron los valores de referencia para el análisis de espermograma, los cuales no deben ser utilizados para interpretación de valores normales; ni para toma de decisión para tratamiento de fertilidad ya que no discriminan entre grupos de hombres fértiles, sub fértiles e infértiles. Los datos obtenidos pueden ser utilizados únicamente para estadística y como referencia para próximos estudios
- Se actualizó el manual del procedimiento de espermograma de la Clínica de Reproducción Humana según el Manual para el procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud en su sexta edición, obteniendo resultados satisfactorios y aplicables en cualquier laboratorio de andrología o laboratorio clínico.
- Según los datos obtenidos en este estudio estos no deben ser comparados con los otorgados por la Organización Mundial de la Salud, ya que los grupos poblacionales en estudio son completamente diferentes (No se puede demostrar que los pacientes sometidos al estudio son fértiles)
- Según los resultados obtenidos de la revisión bibliográfica el análisis de semen no es una prueba de diagnóstico, en la mayoría de los casos es utilizada para seguimiento de pacientes en vasectomías, evaluación de fertilidad, seguimiento de tratamiento de inseminación asistida, crio preservación de espermatozoides. Por lo que se evidenció que en este análisis en particular los valores referencia son únicamente accesorios y que cada caso debe de evaluar individualmente.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda para los próximos investigadores obtener sus muestras para el procesamiento de espermograma de una población masculina sana, los cuales tengan parejas que estén en periodo de gestación de mínimo 6 meses. Aplicando los criterios de exclusión recomendados en este estudio, se recomienda extender el estudio a los distintos departamentos y clasificar por grupo etario regional.

No utilizar los valores (Límites inferiores y medias) determinados en este estudio para el análisis de espermograma, pues no se determinó si los pacientes estudiados en verdad son fértiles.

Registrar, verificar y validar: Los métodos, los equipos, los reactivos y materiales que se utilicen en la determinación de valores de referencia de los distintos parámetros del espermograma para asegurar la calidad de los resultados.

El procedimiento de espermograma sea realizado de preferencia por el mismo técnico o con sistema Computarizado de conteo espermático para evitar variaciones en los conteos espermáticos.

En futuros estudios se recomienda validar la cámara de Makler para el análisis de espermograma y compararla con el Gold Standard que es la cámara de Neubauer recomendada por la Organización Mundial de la Salud.

## BIBLIOGRAFÍA

1. American Society Reproductive Medicine. (2016). Quick facts about infertility. Obtenido de <http://connect.asrm.org/srs/about/new-item9?ssopc=1>
2. Acosta, L. (15 de marzo de 2022). Curso Online de Andrología, Sexto Manual de la Organización Mundial de La Salud. Testículo y Espermatogénesis. Chiclayo, Perú.
3. Almagiá, A., Lizana, P. (2009). Anatomía del Sistema Reproductor. Valparaíso: Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
4. Álvarez, E. (2000). Andrología, teoría y práctica. Madrid: Díaz Santos S.A.
5. Amelar, J., Dublin, L., & Schoenfeld, L. (2005). Sperm motility fertil steril. Kansas: Medical Production.
6. Annam, R. A., Bayley, J., Brenner, W., Brown, T., Burnett, A., Crougham, M., & Delbes, G. (2010). Manual de Andrología, American Society of Andrology. Toronto: McGill University.
7. Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, G. (2017). Reproducción Animal. Biología, La vida en la tierra (págs. 798-799). México: Pearson.
8. Balitan, C., Blanco, S., Cabrera, A., & Hernández, Y. (2015). Factores asociados a la baja calidad del espermatozoide. Universidad y Ciencia, p 13-26. Obtenido de <https://www.lamjol.info/index.php/UYC/article/download/4524/4248>
9. Bassas, L. (2,009). Espermatogénesis e infertilidad. Revista Iberoamericana de fertilidad, 12-13.
10. Bedolla, P., Sanmartí, N., Torres, M. D., Mingo, B., Fernández, M., Boixaderas, N., & De la Rubia, M. E. (2002). Biología 2. Barcelona: Ediciones Vicens Vives, S.A.
11. Bergua, J. (1964). Historia de las religiones. España.
12. Björnadah, L., Mortimer, D., & Barratt, C. (2.010). Practical guide to basic laboratory andrology. United Kingdom: Cambridge University Press.
13. Bonde, E., Ernest, E., & Kold, J. (1998). Relation Between semen quality and fertility: a population based study of 430 first-pregnancy planners. LANCET, 1172-1177.

14. Brisden, K. (2009). Thirty years of IVF: the legacy of Patrick Steptoe and Robert Edwards. . Hum Fertil.
15. Caballeros, M., & Reus, R. (8 de Julio de 2018). Reproducción Asistida ORG. Obtenido de <https://www.reproduccionasistida.org/espermatogenesis/#que-es-la-espermatogénesis>.
16. Cardona, M., Berdugo, J., & Cadavid, A. (2008). *Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer*. Medellín: Actas Urol.
17. Carlson, B. (2019). Embriología Humana y Biología del desarrollo. Barcelona: ELSEVIER.
18. Carrete, A. (marzo de 2022). Contribución del epidídimo a la fertilidad humana. Curso de Manual de Andrología sexto Manual de la OMS. Lima.
19. CER, C. R. (2022). Quien somos. Obtenido de [https://www.cerivf.com/quienes\\_somos.php](https://www.cerivf.com/quienes_somos.php)
20. Cerezo, G. (2021). Anatomía y Fisiología del espermatozoide humano. Actualización del Manual de la Organización Mundial de Salud, Sexta Edición año 2021. México: Laboratorio de Fertilidad MEGAFERTIL.
21. Corado, Y., Carballo, M., Abreu, M., Garbosa, K., Fariñas, O., & García, A. (2014). Importancia de la fase pre-analítica en el laboratorio clínico de la Atención Primaria de Salud. Revista de Medicina Isla de Juventud, 3-21.
22. Corral, J. M., & Ballezca, J. L. (2012). Varicocele, Diagnóstico, Fisiopatología y tratamiento. Revista Latinoamericana de fertilidad, 129-132.
23. Cwi, S., Frydman, J. K., Rondinone, S., & Tzal, C. (2007). CAMPBELL-WALSH UROLOGY. Madrid España: Panamericana.
24. De Jenge, C., LaFromboise, M., Bosmans, E., & al., e. (2004). Influence of the abstinence period on human sperm quality. Fertil Steril, 57-65.
25. Delgadillo, H., Romero, M., & Arias, J. (2009). Calidad interna en la evaluación de glucemia en un laboratorio clínico especializado en la ciudad de Bolívar. SABER, revista multidisciplinaria del consejo de investigaciones de la Universidad de Oriente, p5-6.
26. Dellavedova, T., Olmedo, J., Ruiz, P., & Minuzzi, G. (2008). Siringocele de Cowper. Fundación Urología de Córdoba para la docencia e investigación Médica, 144-145.

27. Díaz, J. A. (2007). Historia contemporánea: las técnicas complejas de reproducción asistida. Medigraphic Artemisa en Línea, 293-295.
28. Díaz, J., Fernández, M. T., & Paredes, F. (2006). ASPECTOS BÁSICOS DE BIOQUÍMICA CLÍNICA (segunda ed.). MADRID: Díaz de Santos.
29. Dohle, G., Diemer, A., Giwercman, A., Jungwirth, Z., & Kopa, C. (2,010). Guía clínica sobre la infertilidad masculina.
30. Eddy, E., Takashi, K., & Brien, O. (2006). Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. The physiology of reproduction, 29-62.
31. Evers, J. (2003). The future role of using the natural cycle IVF programs. IFSS Newsletter, 3:9-10.
32. Eynard, A., Valentich, M., & Rovasio, R. (2008). HISTOLOGIA Y EMBRIOLOGIA, del ser humano. Bases Celulares y Moleculares (Cuarta ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
33. FACULTAD DE MEDICINA DE STANFORD UNIVERSITY. (30 de diciembre de 2014). El peso influye en la calidad del semen. Obtenido de [www.abc.es/salud/noticias/201312301307.html](http://www.abc.es/salud/noticias/201312301307.html)
34. Femia, V. (2021). Corte Sagital del Epidídimo; HISTOLOGÍA, GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR. Obtenido de <https://filadd.com/doc/sistema-masculino-y-oido-docx-histologia-biologia>.
35. Flores, E., & Uribe, M. d. (2.002). Atlas de Histología de Vertebrados (Primera edición.). México: Universidad Nacional Autónoma de México.
36. Ford, W. (2004). Regulation of Sperm function by reactive oxygen species. Human Reprod Update, 387-399.
37. Franken, D., & Bastiaan, H. (2010). Zona pellucida mediated acrosome reaction and sperm morphology. Andrology Clinic, 311-317.
38. Fraser, C. (2,001). Biological Variation: From principles to practice. AACC Press.
39. Gal, B., López, M., Martín, A., & Prieto, J. (2005). Bases de la Fisiología. Madrid: Tebar.
40. Guirao, M., Ladrón, N., Salamanca, A., & Mozas, J. (2,013). Síndrome de Insensibilidad Androgénica. Grupo de trabajo sobre cánceres síndromes genéticos Poli Formativos, 7-9.

41. Gutiérrez, G. (2004). Principios de Anatomía, Fisiología e Higiene. México: Limusa.
42. Haeckel, R. (1,993). Evaluation method in laboratory medicine. Weinheim: VCH.
43. Harold, W., Martin, D., & Perlash, I. (1986). Electro Stimulation of erection and ejaculation and collection of semen in spinal cord injured humans.
44. Hawcroft, R., & Hector, T. (1987). Clinical Specimens (Analytical chemistry by open learning). Chiseter.
45. Ingraham, J., Ingraham, K. (1998). Introducción a la Microbiología. Barcelona: Reverté.
46. INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos. (2021). Diccionario Corporativo.
47. Jeyendran, R. (2003). Sperm collection and processing methods, a practical guide. Cambridge University Press.
48. Johnson, M. (2019). A short history of in vitro fertilization (IVF). Michigan.
49. Jubiz, W., & Cruz, E. A. (2007). Hipogonadismo Masculino: Causas, genética, diagnóstico, y tratamiento. Colombia Médica, 85-86.
50. King, S., & Schaub, M. (2008). Análisis de orina y líquidos corporales (Novena ed.). Madrid: Médica Panamericana S, A.
51. Kumar, D., Kalthur, G., & Mascarenhas, C. (2011). Ejaculated fractions of asthenozoospermia and teratozoospermia patients have differences in the sperm DNA integrity. Andrología, 43: 416-421.
52. Lania, C., Grasso, M., & Fortuna, F. (2006). Aspiración espermática epididimaria abierta: Técnica quirúrgica mínimamente invasiva para la obtención de espermatozoides.
53. Larregle, M Young, P. (2021). Fertilización In vitro: un recorrido por la historia. Fronteras en medicina, 137.
54. Lee, H., Keefer, M., Wen Zhao, Z., & al., e. (1989). Demonstration of the role of prostate-specific antigen in semen liquefaction by Two -dimensional electrophoresis. Androl, 281-285.
55. Letarjet, M., & Ruiz, A. (2008). Anatomía Humana. Hidalgo: Medica Panamericana.
56. Licea, M., & Padrón, R. (1986). Disfunción testicular en enfermedades endócrino-metabólicas. Cuba Med, 57.

57. Lilja, H., Oldbring, J., & Rannerevik, G. (1987). Seminal Vesicle -secreted proteins and their reaction during gelation and liquefaction of human semen. *J Clin Invest*, 281-287.
58. López, J. (2014). Síndrome de Klinefelter. *Revista Española de Endocrinología Pediátrica*, 98-103. Obtenido de <https://www.endocrinologiapediatrica.org/modules.php?name=articulos&idarticulo=229&idlangart=ES>
59. López, M. J., Urbano, A., & Cárdenas, M. (2012). *Manual de Laboratorio para el Análisis de Semen (Segunda ed.)*. México Distrito Federal: Omnia Science.
60. Lucac, J., & Koren, E. (1979). Mechanism of liquefaction of the human ejaculate, Rolle of collagenase like peptidase and seminal proteinase.
61. Málaga, Y., Ortiz, D., Hernández, I., Tobar, M. J., & Ayala, A. (2005). Detección de la espermatogénesis. *GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DE MÉXICO*, 500-503.
62. Martínez, F. (1996). La *Ilíada* y el *Corpus Hippocraticum*. *Espacio, tiempo y forma. Historia Antigua*, 169-172.
63. Martini, A. C., Molina, R. I., Ruiz, R. D., & Fiol, M. A. (2,012). Impacto de la obesidad en la fertilidad. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*.
64. Mejía, G. (2006). *SALUD Y SEXUALIDAD, Guía didáctica para adolescentes*. San José: Universidad estatal a distancia.
65. Miller, J., Boyden, A., & Frey, K. A. (2,007). Infertility. *American Family Physician*, 849-856.
66. Miller, K., & Levine, J. (2010). *Biología (Tercera ed.)*. Providencia: Pearson.
67. Moore, K., & Dalley, A. (2,006). *Anatomía con Orientación Clínica*. Toronto, Canadá: Panamericana.
68. Morales, A., & García, M. (2021). Efecto de la diabetes en la espermatogénesis. *Revista Cubana de Endocrinología*, 31-45. Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1561-29532021000100008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-29532021000100008)
69. Mortimer, S. (2000). *CASA Prácticas aspecto*. *Androl*, 515-524.
70. Ochoa, C., Barranguero, M., Fabra, P., & Reus, R. (28 de diciembre de 2021). Como afecta la abstinencia sexual en la calidad del esperma. Obtenido de [www.reproduccionasistida.org/abstinencia-calidad-semen/](http://www.reproduccionasistida.org/abstinencia-calidad-semen/)

71. Organización Mundial de la Salud. (2010). Manual de Laboratorio para el procesamiento y análisis de semen (Quinta ed.). Geneva.
72. Organización Mundial de la Salud. (2021). Manual de laboratorio para el procesamiento y análisis de Semen (6ta edición ed.). Geneva.
73. Padilla, O. (septiembre de 2018). Manual MS, Versión para profesionales. Obtenido de <https://www.msmanuals.com/es/professional/recursos/valores-normales-de-laboratorio/valores-normales-de-laboratorio>
74. Parra, G., Castilla, J., & Rodriguez, H. (2014). Manual para Análisis Básico de Semen: Una guía Práctica (Primera ed.). México: Prado S.A de C.V.
75. Puerta, J., Cadavi, Á., & Cardona, W. (2014). Infecciones bacterianas del tracto reproductivo masculino y su papel en la fertilidad. Revista de Obstetricia Ginecológica, 209-211.
76. Redacción Cúidate Plus. (9 de abril de 2021). Obtenido de Seminograma: Que es y cuál es su finalidad: <//cuidateplus.marca/reproduccion/fertilidad/2016/04/09/semiograma-cual-finalidad-112319.html>
77. Reiriz, J. (2005). SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO: ANATOMÍA. Barcelona: Enfermeres.
78. Ríos, E., & Fuentes, G. (2,018). El espermatozoide, una mirada desde México (Primera ed.). México: Universidad Autónoma de México.
79. Ross, M., & Pawlina, W. (2006). Histología Texto y Atlas de color con Biología Celular y Molecular. Madrid: Médica Panamericana.
80. Ruiz, J. (2002). Anatomía y tipografía, con uso de nómina nacional. Juárez: Academia Anatómica Humana.
81. Ruiz, X., Búrguez, J., Ozonas, M., & Piza, P. (2010). Utilidad de la Inhibina B en el varón infértil. Actas Urológicas Españolas, 781-787.
82. Saavedra, J., Ramírez, C., Peña, G., Rommeti, M., Voullard, V., & Fujimaki, Y. (2009). Cáncer de Testículo. Anales de Radiología México, 47-49.
83. Sadler, T. (2,009). Langman Embriología médica, con orientación clínica. Buenos Aires: Médica Panamericana.

84. Santizo, R. (2013). Análisis de la fragmentación de ADN de los espermatozoides, mediante el test de la dispersión de la cromatina espermática; causas e impacto en la reproducción asistida. La Coruña: Tesis Doctoral, Universidad de La Coruña.
85. Siranni, S. (2019 de agosto de 2019). ¿Soy mayor o estoy en edad ideal de los hombres para tener hijos? Revista GQ.
86. Scott, G. (2003). *Developmental Biology* (Septima ed.). Massachusetts: Sunauern Associates Inc.
87. Shah, S., & SM, C. (2,017). *Embryo transfer technology*. Nation Press.
88. Smith Agreda, V. F. (2002). *Manual de embriología y anatomía general*. Valencia: Servei de Publicaciones, Universidad de Valencia.
89. Smith, C., & Bremner, W. (1998). Klinefelter syndrome. *Arch Intern Med*, 1.309-1.314.
90. Sotos, J. (1997). Genetic disorders associated with overgrowth. *Clinic pediatric*, 36-49.
91. Stockl, D., Franzini, C., Kratochvila. (1996). Analytical Specification of reference method; compilation and critical discussion (from the members of the European EQA-Organizers). *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 319-317.
92. TF, K., Acosta, A., & Simmons, K. (1988). Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 112-117.
93. Toro, A. (2009). Espermograma. *Medicina & Laboratorio*. Programa de Educación Médica continua. 145-147.
94. Vásquez, D., Díaz, C., Carmona, Z., & Vásquez, F. (2009). Varicocele testicular en adolescentes. *Salud UniNorte Barranquilla*, 245-257.
95. Wein, A. (2007). *CAMPBELI WALSH UROLOGY* (Vol. Novena edición). Madrid: MÉDICA PANAMERICANA.
96. Welsch, U. (2006). *Sobotta Welsch Histología*. München: Médica Panamericana S.A.
97. Westgard, J. (1997). *Sistemas de Gestión de la Calidad en el Laboratorio Clínico*. Madison: QC Westgard Inc

## ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento para el análisis “ESPERMOGRAMA” Según el Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud sexta edición año 2031

### ANALISIS DE LIQUIDO (ESPERMOGRAMA)

#### 1. Preparación de paciente:

Se le brinda información al paciente sobre preparación previa al análisis de espermograma, colección de la muestra, recepción de la muestra, manipulación inicial de la muestra.

##### 1.1. Requisitos y preparación de paciente para análisis de espermograma:

- 1.1.1. Tener de 2 a 7 días de abstinencia sexual.
- 1.1.2. Las muestras se deben obtener preferentemente por masturbación.
- 1.1.3. Eyacular dentro del recipiente de plástico de boca ancha y tapa hermética estéril.
- 1.1.4. No se debe perder ninguna fracción del eyaculado.
- 1.1.5. Si el paciente no puede obtener la muestra en el laboratorio puede hacerlo en un lugar cercano al laboratorio.
- 1.1.6. Si el paciente no puede obtener la muestra de semen por masturbación, puede hacerlo por relaciones sexuales utilizando condones especiales (sin espermicida). Una vez eyaculado el semen, se debe retirar el condón cuidadosamente, cerrarlo y colocarlo dentro de recipiente plástico y llevarlo al laboratorio antes de una hora desde que se obtuvo la muestra (No aplica si la muestra será utilizada para cultivo.)
- 1.1.7. Coito interrumpido no es una medida aceptable para obtención de muestra de semen.
- 1.1.8. Entregar frasco con la siguiente etiqueta y solicitar al paciente llenar los datos hasta (Hora recolección)

**IMAGEN 12:** Etiqueta para identificación general de la muestra.

Tomada y adaptada: Propia de la recolección de datos necesarios para la identificación de muestras de líquidos seminales, en el año 2022.

Nombre de paciente: _____	
Edad: _____	Abstinencia: _____ días.
Fecha de recolección: _____	Hora recolección: _____
Hora entrega de muestra en laboratorio: _____	
Peso de frasco: _____	gramos.
Peso frasco final: _____	gramos.
Temperatura frasco: _____	°C

**1.1.9.** El laboratorio deberá entregar la etiqueta con el peso del frasco (los frascos deberán ser pesados antes de la toma de la muestra de semen).

**2. Recepción de muestra:**

**2.1.** El recipiente debe ser rotulado cuidadosamente con todos los datos del paciente (según etiqueta de punto 1.1.8.)

**2.2.** Si la muestra no es obtenida en el laboratorio es indispensable que sea transportada lo más rápido posible entre 30 minutos o un máximo de 60 minutos conservando la temperatura de 20 a 37°C, se debe pegar al cuerpo para mantener esta temperatura.

**2.3.** La muestra deberá ser colocada inmediatamente en la incubadora a 37°C.

**3. Examen Macroscópico**

Los parámetros macroscópicos se deben evaluar lo más pronto posible (entre los primeros 30-60 minutos), los cuales deben realizarse en el siguiente orden.

- 3.1. **Volumen:** Calcular el peso de la muestra por peso antes de que la muestra licue, asumiendo que la densidad de semen es de 1 gr/mL, con la siguiente fórmula:

Volumen de semen gramos: Peso frasco final - peso de frasco

Volumen seminal 1 mL= 1 gr

- 3.2. **Evaluación de la apariencia:** La apariencia debe evaluarse con un eyaculado licuado la cual debería ser homogénea. Se puede reportar como homogénea y líquida.
- 3.3. **Licuefacción:** La licuefacción completa de eyaculado es normalmente entre 15 - 30 minutos a temperatura ambiente. Si la licuefacción no es completada después de 60 minutos también debe incluirse en el reporte.
- 3.4. **Viscosidad:** Después de la licuefacción, la viscosidad de eyaculado puede ser evaluado al aspirarlo suavemente con una jeringa (aproximadamente 1.5 mm de ancho), dejando caer el semen por gravedad y observando la longitud de cualquier hilo.
- 3.5. **Olor de eyaculado:** Este puede variar entre individuos por lo que solamente tiene relevancia clínica si se percibe un fuerte olor a orina o putrefacción, que deberá ser anotado en el informe final.
- 3.6. **pH de eyaculado:** Las tiras bioquímicas para medir el pH de eyaculado deben tener un rango entre 6.0 - 10.0.

3.6.1. Mezclar bien la muestra.

3.6.2. Colocar una gota sobre la tira bioquímica.

**3.6.3.** Esperar por lo menos 30 segundos para que el color de la muestra impregnada sea uniforme.

**3.6.4.** Comparar el color con la calibración de la tira y leer el pH.

#### **4. Preparación de la muestra para análisis en el microscopio:**

**4.1. Homogenizar la muestra:** La homogeneización de la muestra debe realizarse en el mismo frasco que se recibe, no vigorosamente para evitar la formación de burbujas, debe hacerse de forma circular durante 15 - 30 segundos.

#### **4.2. Alícuotas de muestra representativa:**

**4.2.1.** Realizar alícuota por duplicado de mínimo 50 uL para el análisis de conteo de espermias.

**4.2.2.** Realizar alícuota por duplicado de mínimo 10 uL para el análisis de motilidad.

**4.2.3.** Todas las alícuotas deben ser colocadas en la incubadora a 37°C.

**Nota:** La comparación de cada alícuota por replicado es necesaria para reducir el riesgo de errores.

#### **4.3. Hacer una preparación en húmedo:**

**4.3.1.** Colocar 10 uL de muestra precalentada a 37°C sobre un portaobjetos, colocar un cubreobjetos y revisar dentro de 1 minutos que la muestra esté estable (que no existan corrientes).

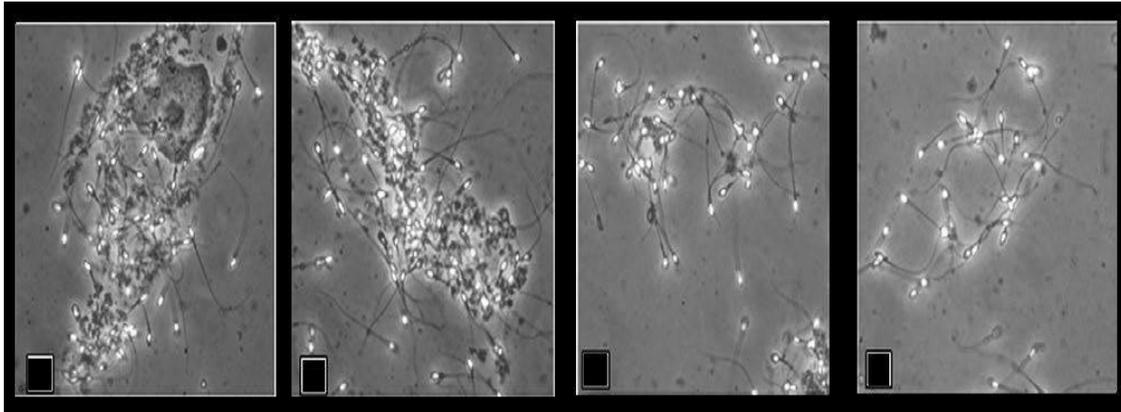
#### **4.3.2. Revisar en bajo aumento (10x):** Provee los siguientes datos:

**4.3.2.1.** Revela si los espermatozoides están igualmente distribuidos en la preparación.

**4.3.2.2.** Observación de hebras de moco.

**4.3.2.3.** Agregación de espermias o aglutinación. Los cuales pueden observarse:

IMAGEN 13: Aglutinación de espermatozoides:



Tomada y adaptada: Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud 6ta edición, 2021

- En casos de distribución desigual las razones pueden ser: Mezcla insuficiente, viscosidad alta, insuficiente licuefacción o aglutinación de espermatozoides.

#### 4.3.3. Revisar en aumento alto (40x): Provee los siguientes datos:

- Movilidad
- Determinación de la dilución requerida para el conteo de espermatozoides.
- Presencia de otro tipo de células para análisis.

#### 5. Movilidad espermática:

- Realizar una inspección general de la muestra en el aumento más bajo.
- Evitar evaluar áreas cercanas al borde de la cámara o del cubreobjetos.
- Elegir un área aleatoria para realizar la movilidad.
- Realizar movilidad de al menos 200 espermatozoides.
- Inicie el conteo en una determinada posición.
- Cuente sistemáticamente, comenzando por los espermatozoides de progresión rápida y lenta para evitar sobrestimar el número de

espermatozoides progresivamente móviles en la sección de cuadrícula durante el conteo.

- En el segundo recuento se cuentan los espermatozoides no progresivos e inmóviles en la misma sección de la cuadrícula.
- Si se logra un conteo de 200 espermatozoides antes de que se hayan cubierto un área determinada se continúa hasta terminar dicha área, aunque se cuenten más de 200 espermatozoides.
- Compare los valores de las réplicas para verificar si son aceptables, así se procederá a los cálculos de lo contrario prepare y cuente nuevas muestras. Con un comentario en el informe final que el resultado es el promedio de evaluaciones altamente variable.

#### 5.1. **Categorización de los espermatozoides según su movilidad:**

- **Progresivos rápidos:** (225  $\mu\text{m/s}$ ) espermatozoides que se mueven activamente, ya sea en línea recta o en círculo, cubriendo una distancia desde el punto inicial hasta el punto final de al menos 25 $\mu\text{m}$  en un segundo.
- **Progresivo lento:** (5 a 25  $\mu\text{m/s}$ ) Espermatozoides que se mueven activamente, ya sea linealmente o en círculos cubriendo una distancia desde el punto inicial hasta el punto final con una velocidad de 5 a 25  $\mu\text{m}$  en un segundo.
- **No Progresivo:** Todos los movimientos activos de la cola con ausencia de progresión, es decir nadan en círculos pequeños, la fuerza flagelar no desplaza la cabeza del espermatozoide.
- **Inmóvil:** Sin movimiento activo de la cola.

#### 5.2. **Comparación de réplicas y cálculo de resultados**

- Calcule los porcentajes de las cuatro categorías de motilidad, de dos réplicas por separado.
- Luego calcule el promedio de las dos réplicas para el grupo dominante.
- Calcule la diferencia entre las dos réplicas del grupo dominante.

- Determine la aceptabilidad de la diferencia en la tabla, la diferencia máxima entre dos porcentajes que se espera es del 95% de las muestras debido a las causas aleatorias. Si la diferencia es mayor que el valor de la tabla es menor que el 5% de probabilidades de que la diferencia se deba a causas aleatorias.

Diferencias aceptables, basadas en un intervalo de confianza de un 95 % de confiabilidad.

Average (%)	1	2-3	4-6	7-9	10-13	14-19	20-27	28-44	45-55	56-72	73-80	81-86	87-90	91-93	94-96	97-98	99
Acceptable difference	2	3	4	5	6	7	8	9	10	9	8	7	6	5	4	3	2

Tomada y adaptada: Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud sexta Edición ,2021.

Ejemplo:

Réplica 1	Réplica 2
Espermatozoides Movilidad tipo A=10.2 %	Espermatozoides Movilidad tipo A = 13.1%
Espermatozoides Movilidad tipo B= 42.2%	Espermatozoides Movilidad tipo B= 43.6%
Espermatozoides Movilidad tipo C=27.1 %	Espermatozoides Movilidad tipo C=22.2 %
Espermatozoides Movilidad tipo D= 21.1%	Espermatozoides Movilidad tipo D= 21.1%

- Determinamos que el grupo dominante es el espermatozoide Movilidad tipo (Movilidad progresiva lenta).

Promedio R1 (42.2) +R2 (43.6) /2=42.9 %

Diferencia: 43.6-42.2= 1.4%

- Se determina que con este promedio (42.9%), la diferencia aceptable es 9, y se ha obtenido 1,4%. Por lo tanto, es aceptable estos valores. (Ver tabla 2 diferencia aceptables)

- **Obtención de valores:**

$$A = (10,2+13,1) /2=11,65 \quad \sim 12$$

$$B = (42,2+43,6) /2=42,9 \quad \sim 43$$

$$C = (21,7+22,2) /2=21,95 \quad \sim 22$$

$$D = (25,9+21,1) /2=23,5 \quad \sim 24$$

$$\text{Sumatoria} \quad 101$$

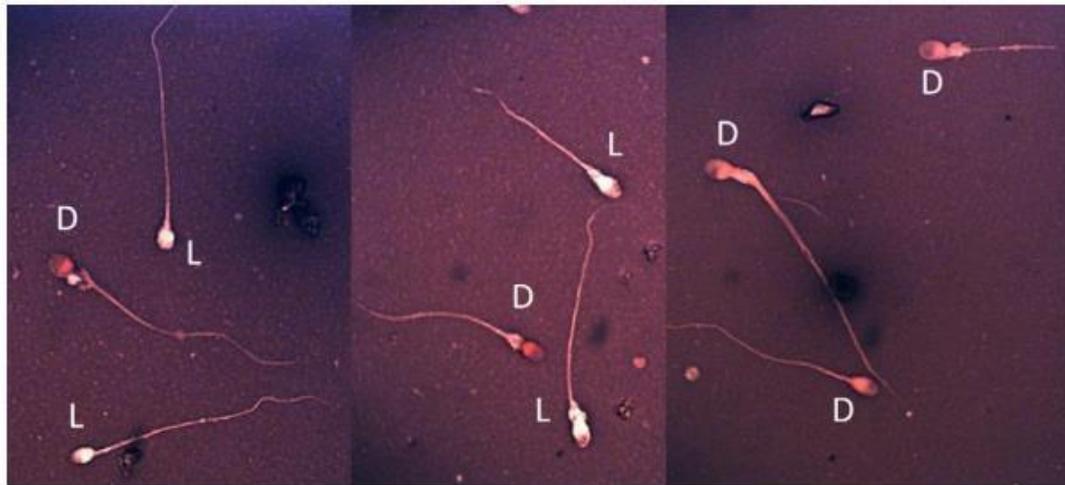
- Se ajusta al grupo dominante para llevarlo a 100. Colocamos los progresivos lentos de 43 a 42.  
Informe: (a)=12%, (b)=42%, (c)=22%, (d)=24%

- Si la diferencia entre los porcentajes es aceptable, informe el porcentaje promedio de cada grado de motilidad. Si la diferencia es demasiado alta tome dos nuevas alícuotas de las muestras de semen, realice nuevos conteos. El conteo no debe ser realizado más de 2 veces, al final se debe de realizar el promedio de las evaluaciones, junto con el comentario de que el resultado es incierto debido a la alta variabilidad entre las evaluaciones repetidas.
- Informe el porcentaje promedio de cada una de las categorías de movilidad.
- La sumatoria de los cuatro grados debe ser 100. Si es 99 o 101, el valor del grupo dominante se ajusta para dar una suma de 100, si la suma es menor de 99 se debe ajustar también.

## 6. Vitalidad:

- La muestra de semen deberá estar completamente licuada (idealmente 30 minutos después de la eyaculación).
- Homogenizar la muestra de semen.
- Colocar 50  $\mu$ L de la muestra y 50 $\mu$ L de reactivo (Eosina-Nigrosina) e incubar por 30 segundos a 37° C en un tubo cónico.
- Transferir de 12 a 15  $\mu$ L de la mezcla a un portaobjetos limpio y realizar un frotis uniforme sobre el área del portaobjetos.
- Después de dejar secar al aire, el portaobjetos.
- Examinar por lo menos 200 espermatozoides, las cabezas teñidas de color blanco se consideran como vivas. Cualquier tinte rojo de la cabeza del espermatozoide se considera como muerto, excepto los espermatozoides que muestran solamente un tinte rosa en la región del cuello.

IMAGEN 14: Coloración Eosina-Nigrosina, los espermatozoides identificados con la letra D son: muertos y los espermatozoides identificados con una L son: vivos.



Tomada y adaptada: Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud 6ta edición, 2021.

- Se debe observar en un microscopio de campo claro con un objetivo de buena resolución de 100x con aceite de inmersión.
- La vitalidad es expresada en porcentajes de espermatozoides vivos

- Se obtiene el porcentaje de vitalidad dividiendo el número de espermatozoides vivos entre el número total de espermatozoides evaluados y multiplicarlo por 100.
- El resultado se dará en números enteros sin decimales.

### 6.1. Interpretación:

- Calcular el porcentaje de células vivas.
- Informar el porcentaje de espermatozoides vivos, redondeando al número entero más próximo.

## 7. Concentración espermática:

### 7.1. Preparación de la dilución:

- Calcular dilución para el recuento de espermatozoides según punto 4.3 y correlacionar con la siguiente tabla (No. 1)

Estimación de la dilución para conteo de espermatozoides:

Espermatozoide en 40X	Espermatozoide en 10X	Dilución	Muestra (uL)	Diluyente (uL)
> 200	> 800	1:50	50	2 450
40 - 200	160 - 800	1:20	50	950
16 - 40	64 - 160	1:10	50	450
2- 15	8- 64	1:5	50	200
< 2	< 8	1:2	100	100

Tomada y adaptada Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud 6ta edición, 2021

### 7.2. Llenado de la cámara de Neubauer

- Homogeneizar la dilución y cargar en cada una de las cámaras del hematocitómetro, con la dilución previamente determinada.

- Evitar hacer burbujas en el llenado de la cámara, si fuera necesario repetir una nueva preparación.
- Colocar el cubreobjetos que se adhiere a la cámara, asegurarse que no se moverá al moverlo con la punta de la pipeta.
- Dejarla en una cámara húmeda (aprox. 10 - 15 minutos), para que se asienten los espermatozoides.
- Evaluar el número de espermatozoides inmediatamente después de retirarla de la cámara húmeda (para evitar los efectos negativos de la evaporación de la cámara de recuento)

### **7.3. Principios para el conteo de espermatozoides para el conteo en la cámara de Neubauer:**

- Contar solo los espermatozoides enteros (Cabeza y Cola)
- Si hay muchas colas de espermatozoides sin cabeza, los llamaremos cabezas de alfiler, su presencia se debe reportar. La concentración se puede estimar en relación a los espermatozoides enteros, deberá indicar la frecuencia relativa.
- El límite de un cuadro grande se indica con la línea central de los tres.
- Se cuentan todos los espermatozoides sin contacto con el límite (centro de la línea triple) de un cuadro grande.
- Solo se cuentan los espermatozoides en contacto con límites inferiores o izquierdos; no con los que están en contacto con los límites superior o derecho.

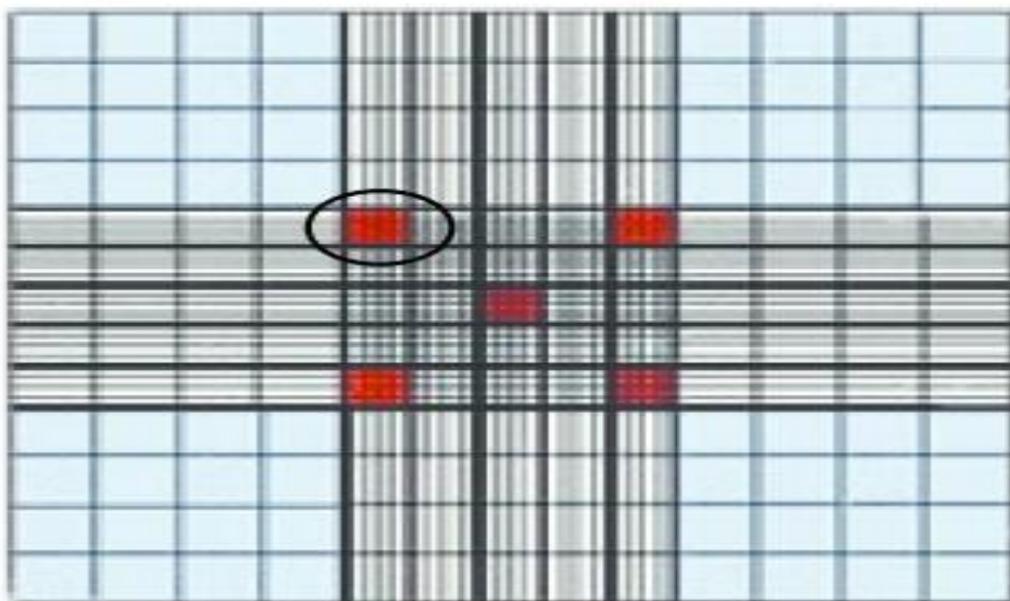
### **7.4. Conteo en la cámara de Neubauer:**

- Examinar en el objetivo 40x.
- Evaluar el cuadrante grande superior de la rejilla central.
- Contar por lo menos 200 espermatozoides por replicado, se deberán contar los mismos cuadros tanto en la réplica 1 como en la 2
- Comparar los recuentos para verificar si son aceptablemente cercanos.
- Calcular la concentración de espermatozoides por mL.
- Calcular la concentración de espermatozoides por el volumen eyaculado.

**7.4.1.** Dependiendo del número de espermatozoides contados se decidirá cuántos cuadros contar:

- Menor de 10 espermatozoides: Contar 25 cuadros grandes.
- De 10 a 40 espermatozoides: Contar 10 cuadros grandes.
- 40 espermatozoides o más: contar 5 cuadros (ejemplo 4 cuadros de la esquinas y el centro.)
- Anotar el número de espermatozoides evaluados
- Calcular las suma y diferencia entre las dos cámaras.

**IMAGEN 15:** La gráfica representa el cuadro grande de la rejilla central, en el cual se cuentan los espermatozoides y para determinar los cuadros que se tomarán en cuenta para el conteo de espermatozoides.



Tomada y adaptada: Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud 6ta edición ,2021.

## **7.5. Diferencias aceptables en el conteo de espermatozoides**

Si la diferencia es aceptable, entonces calcular la concentración espermática y el número total de espermatozoides por eyaculado.

Si la diferencia es demasiado alta, carga de nuevo una cámara de Neubauer; a partir de nuevas diluciones, si la diferencia sigue alta contar una tercera vez. Incluir un comentario en el resultado final.

#### **7.5.1. Comparación de las diferencias de los recuentos de las réplicas**

- Determinar la suma y la diferencia de los recuentos.
- Determinar si se aceptan las evaluaciones de las réplicas.
- Determinar la incertidumbre en el resultado final, según la siguiente tabla: (No. 3)

Rango de sumas para determinar el límite de diferencia aceptable entre réplicas y la incertidumbre de resultado:

Range of sums	Limit difference	Error of final result based on number of observations
301-318	34	5.8%
284-300	33	5.9%
267-283	32	6.1%
251-266	31	6.3%
235-250	30	6.5%
219-234	29	6.8%
206-218	28	7.0%
190-205	27	7.3%
176-189	26	7.5%
163-175	25	7.8%
150-162	24	8.2%
138-149	23	8.5%
126-137	22	8.9%
115-125	21	9.3%
105-114	20	9.8%
94-104	19	10.3%
85-93	18	10.8%
76-84	17	11.5%
67-75	16	12.2%
59-66	15	13.0%
52-58	14	13.9%
44-51	13	15.1%
38-43	12	16.2%
32-37	11	17.7%
27-31	10	19.2%
22-36	9	21.3%
17-21	8	24.3%
13-16	7	27.7%
10-12	6	31.6%
7-9	5	37.8%
5-6	4	44.7%
3-4	3	57.7%
2	2	70.7%
1	1	100.0%

Range of sums	Limit difference	Error of final result based on number of observations
969-1000	61	3.2%
938-968	60	3.3%
907-937	59	3.3%
876-906	58	3.4%
846-875	57	3.4%
817-845	56	3.5%
788-816	55	3.6%
760-787	54	3.6%
732-759	53	3.7%
704-731	52	3.8%
678-703	51	3.8%
651-677	50	3.9%
625-650	49	4.0%
600-624	48	4.1%
576-599	47	4.2%
551-575	46	4.3%
528-550	45	4.4%
504-527	44	4.5%
482-503	43	4.6%
460-481	42	4.7%
438-459	41	4.8%
417-437	40	4.9%
396-416	39	5.0%
376-395	38	5.2%
357-375	37	5.3%
338-356	36	5.4%
319-337	35	5.6%

Tomada y  
adaptada: Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud  
6ta edición, 2021.

- La suma de los dos conteos repetidos “aceptados” se divide por un factor que se determina por la dilución y el número de cuadrados grandes o cuadrículas evaluados tanto en el conteo de las cámaras (si se han hecho tres intentos sin llegar a un acuerdo suficiente entre recuentos repetidos, se utiliza el promedio de las tres sumas).

Cálculo para la concentración de espermatozoides a partir del conteo de espermatozoides.

Dilution	Number of <i>large squares</i> counted in each chamber			Number of <i>grids</i> counted in each chamber								
	5	10	25	2	3	4	5	6	7	8	9	
	Correction factor values											
1 : 2	20	40	100	200	300	400	500	600	700	800	900	
1 : 5	8	16	40	80	120	160	200	240	280	320	360	
1 : 10	4	8	20	40	60	80	100	120	140	160	180	
1 : 20	2	4	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
1 : 50	0.8	1.6	4	8	12	16	20	24	28	32	36	

Tomada y adaptada: Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud 6ta edición, 2021.

#### 7.6. Cálculos concentración espermática:

- La suma de los 2 conteos aceptados es dividida por un factor que es determinado por la dilución y el número de cuadrados grandes o cuadrículas evaluadas en ambos conteos de las cámaras (ver tabla No. 4).
- Cálculo de concentración de espermatozoides cuando el conteo es menor de 25 espermatozoides
- Si contamos menos de 25 espermatozoides por cada cámara, utilizando una dilución 1:2, la concentración será menor a 55 ,555 espermatozoides por mL con un estimado error del 14 %.
- Reportar: Muy pocos espermatozoides contados para la determinación precisa de la concentración (Menor a 56, 000 /mL).
- Si no se observan espermatozoides se debe centrifugar la muestra a 3000 rpm por 15 minutos, esto debe reportarse en el informe final con la observación: Recuento de espermatozoides (dato obtenido), con muestra centrifugada.
- Si no se observan espermatozoides en el Pellet se deberá reportar azoospermia.

**Nota:** El término azoospermia sólo puede utilizarse si no se encuentran espermatozoides en el sedimento de una muestra centrifugada.

## 8. Cálculo de número total de espermatozoides:

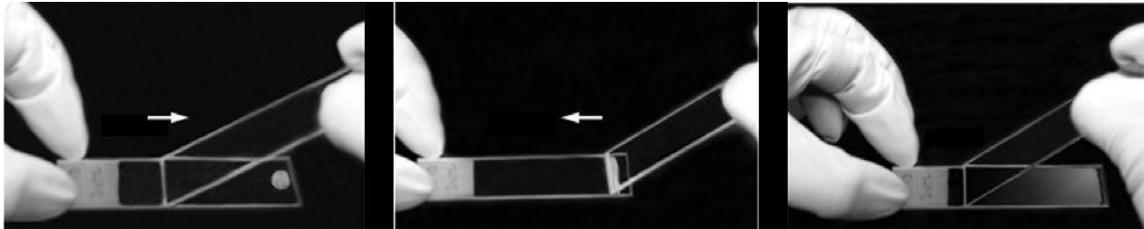
- Es fundamental calcular y reportar el número total de espermatozoides por eyaculado, ya que este parámetro proporciona una mejor medida de la producción de los espermatozoides testiculares.
- Se obtiene multiplicando la concentración de espermatozoides por el volumen de eyaculación. Este debe informarse como número entero (sin decimales).

## 9. Morfología:

- La muestra de semen debe ser mantenida a 37° C hasta su licuefacción total.
- Una vez el eyaculado haya licuado, se debe tomar una gota no mayor a 5 o 10  $\mu\text{L}$ , depositar sobre un portaobjetos limpio, extender con la ayuda de otro portaobjetos, realizar dos extendidos de la muestra.

### Preparación de un frotis de semen.

IMAGEN 16: Preparación de Fortis.



Tomada y adaptada: Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial 6ta edición ,2021.

### 9.1. Tinción de Papanicolau

- Etanol al 80 % por 30 segundos para rehidratar gradualmente el frotis.

- Etanol al 50 % por 30 segundos.
- Agua purificada durante 30 segundos.
- Hematoxilina de Harris por 4 minutos.
- Agua purificada por 30 segundos
- Etanol Ácido de 4 a 8 inmersiones
- Agua purificada por 30 segundos
- Agua corriente del grifo por 5 minutos
- Etanol al 50 % por 30 segundos
- Etanol al 80% por 30 segundos
- Etanol al 95 % al menos 15 minutos
- G-6 Colorante Naranja por 1 minuto
- Etanol al 95 % 30 segundos
- EA -50 mancha verde por 1 minuto
- Etanol al 95 % por 30 segundos
- Etanol al 100 % por 15 segundos
- Xileno por 2 minutos
- Dejar secar el Frotis
- Observar en 100 X

## 9.2. Observación del frotis

Una vez que el frotis se ha secado al aire libre, debe fijarse y colorearse para resaltar las características del espermatozoide:

Se recomienda el uso del Papanicolaou ya que el criterio estricto de Tygerberg se realizó utilizando este tipo de tinción. El uso de otro tipo de coloración debe validarse comparándola con Papanicolaou.

## 9.3. Características del espermatozoide en tinción de Papanicolau:

- **Cabeza:** se tiñe de azul pálido en la región acrosomal y azul oscuro en la región post acrosomal.
- **Pieza media:** se tiñe de color rojo

- **Cola:** se tiñe de azul o rojizo
- **Exceso de residuo citoplasmático:** Se tiñe de verde, si se tiñe de rojo puede mostrar otras anomalías.

Solo se cuentan los espermatozoides completos con cabeza y flagelo (cola), no se cuentan los cabezas de alfiler, se debe abarcar la mayor parte del preparado. No volver sobre las zonas ya evaluadas y contarlas más de una sola vez. Se sugiere evaluar por lo menos 200 espermatozoides por duplicado.

#### 9.4. Clasificación de los Espermatozoides según su morfología:

##### 9.4.1. Espermatozoide ideal:

- **Cabeza:** La cabeza debe ser lisa, contorneada de forma oval, debe tener una región acrosomal bien definida que comprenda del 40 al 70 % del área de la cabeza.  
La región acrosomal no debe de contener vacuolas grandes, no más de 2 vacuolas pequeñas y que no ocupen más de la quinta parte de la cabeza del espermatozoide. La región post acrosomal no debe tener ninguna vacuola.
- **Pieza Media:** La pieza media debe ser esbelta regular y tener la misma longitud de la cabeza del espermatozoide.  
El eje mayor de la pieza intermedia debe estar alineado con el eje mayor de la cabeza del espermatozoide.
- **Cola:** La cola debe ser uniforme en toda su longitud y ser más delgada que la pieza intermedia y tener aproximadamente 45µL de longitud el aproximado de 10 veces la longitud de la cabeza.
- **Residuo citoplasmático:** La gota citoplasmática debe ser menor a un tercio del tamaño de la cabeza se considera normal.

#### Espermatozoide ideal

IMAGEN 17: Espermatozoide ideal



Tomada y adaptada: de Cerezo y Rodríguez, Manual para Análisis de semen; Una guía práctica, año 2,014. Página 48.

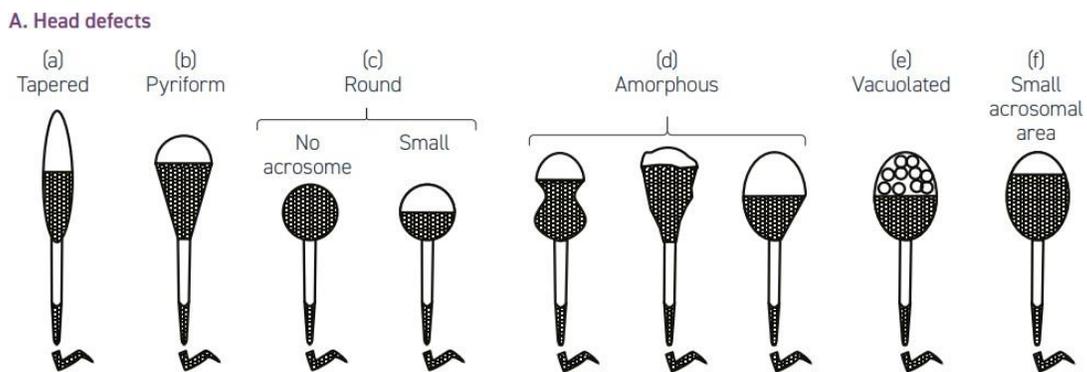
## 9.5. Defectos en su morfología:

### 9.5.1. Espermatozoides con defecto de cabeza:

- Zona acrosomal menor al 40% y mayor al 70%.
- Radio de longitud, anchura menor de 1.5 o más grande de 2  $\mu\text{m}$ .
- Forma Piriforme, amorfos, asimétricos, forma no ovalada.

### Defectos en cabeza del espermatozoide:

#### IMAGEN 18: Espermatozoides con defecto de cabeza.



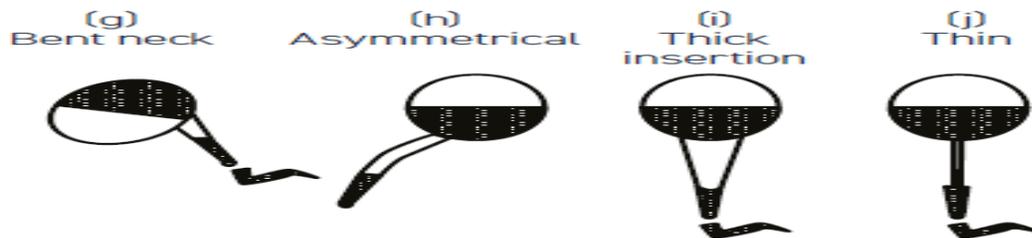
(a) Cónica; (b) piriforme; (c) Redonda (1 sin acrosoma, 2 pequeña); (d) amorfa; (e) vacuolada; (f) área acrosomal pequeña.

Tomada y adaptada: Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud 6ta edición, 2021.

### 9.5.2. Defecto de pieza media:

- Forma irregular, delgada o gruesa.
- Inserción asimétrica en la cabeza o doblada.
- **Espermatozoides con defectos en la pieza media (cuello)**

IMAGEN 19: Espermatozoides con defecto de cuello.



(g) cuello doblado; (h) asimétrica; (i) inserción gruesa; (j) delgada

Tomada y adaptada: Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud 6ta edición, 2021.

### 9.5.3. Defectos en cola:

- Curvas muy anguladas o curvas de horquillas, en espiral o cortos, de anchura irregular, múltiples colas o cualquier combinación.

### Espermatozoides con defectos en la cola:

IMAGEN 19: Espermatozoides con defecto de cola.



(k) corta; (l) doblada; (L) enroscada

Tomada y adaptada: Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud 6ta edición, 2021.

#### 9.5.4. Anormalidades del residuo citoplasmático.

Es considerado anomalía sólo cuando supera un tercio del tamaño de la cabeza.

IMAGEN 20: Espermatozoide con exceso de citoplasma residual.

#### D. Excess residual cytoplasm

(n)  
> one third  
head



(n) una tercera cabeza

Tomada y adaptada: Manual de procesamiento de semen de la Organización Mundial de la Salud 6ta edición, 2021.

## 9.6. Identificación y clasificación de espermatozoides según su morfología:

### 9.6.1. Clasificar y realizar porcentaje de espermatozoides normales y anormales

Identificar y clasificar a los espermatozoides según su morfología en los siguientes parámetros:

- Ideales
- Defecto de cabeza
- Defecto de pieza media
- Defecto de cola
- Exceso de gota citoplasmática
- Según el conteo y la clasificación realizar un porcentaje de cada uno de los parámetros, Con la siguiente fórmula:

$$\text{Clasificación} = \frac{\text{(n) * 100}}{\text{número de espermatozoides contados (200)}}$$

Ejemplo:

Clasificación	(n) número	% Porcentaje
Ideales	10	5
Defecto de cabeza	85	35
Defecto de pieza media	63	15
Defecto de cola	50	45
Exceso de citoplasma residual	14	2

## **Anexo 2: Procedimiento de para tinción de GIEMSA**

### **TINCIÓN DE GIEMSA**

Principio usado en hematología, la tinción de Giemsa permite la diferenciación de las distintas células sanguíneas. La solución de Giemsa colorea y revela eritrocitos, basófilos, eosinófilos, polimorfonucleares, linfocitos, plaquetas y la cromatina de los núcleos.

#### **Reactivos:**

- Azur-Eosina-Azul de Metileno
- Metanol
- Tampón
- Solución pH 7,2

#### **Procedimiento:**

1. Preparar una extensión de sangre bien fina en una porta limpio, dejar secar (1-2 horas aproximadamente).
2. Cubrir la preparación con metanol durante 3 minutos.
3. Dejar escurrir y secar al aire.
4. En el momento de empezar la segunda fase de la tinción, tomar 0,2 ml de Azur-Eosina-Azul de Metileno solución según Giemsa (lento) y diluir en 2 ml de solución tampón pH 7,2. Homogeneizar.
5. Cubrir la preparación con esta solución diluida durante 25 minutos.
6. Lavar durante dos minutos con solución tampón pH 7,2.
7. Dejar secar la preparación al aire, en posición vertical.
8. Observar la preparación con objetivo de inmersión.

#### **Resultados:**

- Eritrocitos Rosa-asalmonado
- Plaquetas Violeta
- Núcleo Citoplasma Granulaciones Neutrófilo Violeta a rojizo

- Eosinófilo Violeta a rojizo
- Basófilo Violeta a rojizo
- Monocito Violeta a rojizo Azul-grisáceo
- Linfocito Violeta Azul

### **Nota técnica**

El microscopio usado debería corresponder a los requisitos de un laboratorio de diagnóstico clínico. Si se utiliza un aparato automático de tinción, deben tenerse en cuenta las instrucciones de empleo del fabricante del aparato y del software.

#### Preparación de las muestras

Todas las muestras deben tratarse de acuerdo con el estado de la tecnología. Todas las muestras deben estar rotuladas inequívocamente.

#### Diagnóstico

Los diagnósticos deberán ser establecidos solamente por personas autorizadas y calificadas. Cada aplicación debería implicar controles adecuados para descartar resultados erróneos.

#### Almacenamiento

La solución de tinción debe almacenarse a temperatura ambiente.

#### Caducidad

El producto almacenado a temperatura ambiente y en envase bien cerrado, es utilizable hasta la fecha de caducidad indicada en el envase.

#### Notas sobre el empleo

Para evitar errores, la tinción ha de ser realizada por personal especializado. Solamente para uso profesional. Deben cumplirse las directivas nacionales sobre seguridad en el trabajo y aseguramiento de la calidad. Indicaciones para la eliminación de residuos Las soluciones usadas y las soluciones caducadas deben eliminarse como desecho peligroso, debiéndose cumplir las directivas locales de eliminación de residuos.

Fabricante Panreac Química S.L.U. an ITW Company C/Garraf, 2 – Polígono Pla de la Bruguera, Castellar del Vallès (Barcelona) España Tel. (+34) 937 489 400 Fax (+34) 937 489 40

**Anexo 3: Inserto reactivo utilizado para el análisis de la vitalidad en el espermograma.**

# Sperm VitalStain™

## Vitality

Sperm VitalStain™ is an optimised staining technique for assessment of sperm vitality, which is one of the basic tools used in semen analysis. The technique is based on the principle that dead cells (i.e. those with damaged plasma membrane) will take up the eosin and stain red. Nigrosin is used as a counterstain to facilitate visualization of the unstained (white) live cells.



An optimised one-step staining technique for assessment of sperm vitality during semen analysis.

 **Nidacon**  
SVA 2015 000 08

# Sperm VitalStain™



#### Technical Information

Sperm VitalStain™ is a salt solution containing the historical colouring agents eosin and nigrosin, the eosin being taken up by dead sperm through porous membranes, and the nigrosin providing a dark contrast background to emphasise the unstained cells.

#### Performance characteristics

pH 7.3 - 9.5

#### Components

Sodium Chloride  
Eosin Y  
Water  
Nigrosin  
Formalin

#### Storage conditions and shelf life

Store at ambient temperature. Under these conditions Sperm VitalStain™ has a shelf-life of 24 months. The expiry date is shown on both bottles and cartons.

#### Ordering Information

Volume	Article No.
2 x 10 mL	SVS-010

## One-Step

Sperm VitalStain™ is a one-step vital staining technique containing eosin and nigrosin. The concept of using eosin uptake to mark dead cells, and nigrosin background stain, increasing the contrast between stained cells and otherwise bright background, is well known and widely used.

Sperm VitalStain™ can be stored at room temperature for up to 2 year from production date, ensuring minimal wastage.

24 months shelf life



[www.nidacon.com](http://www.nidacon.com)

Nidacon International AB  
E-mail [contact@nidacon.com](mailto:contact@nidacon.com)

Tel: +46 31 703 06 30 Fax: +46 31 40 54 15

## Anexo 4: Inserto de reactivo utilizado para el análisis de pH en el espermograma.



### FICHA TECNICA INDICADOR DE PH MERCK



#### DENOMINACIÓN TÉCNICA DEL BIEN O SERVICIO

Tiras De Prueba De Ph

#### PRESENTACIÓN

Caja x 100 tiras

#### DESCRIPCIÓN GENERAL

Tiras reactivas portátiles, fáciles de usar, para la detección semicuantitativa de iones y sustancias orgánicas o inorgánicas en una variedad de muestras.

MColorHast™ hace que la medición del pH sea incluso más fácil. Sin instrumentos, preparación de la muestra, mantenimiento ni limpieza de electrodos. Basta con leer el color. El método rápido ofrece una escala de color exacta para resultados claros y fiables. Es adecuado para todos los tipos de medios en análisis medioambientales y en controles internos de los procesos industriales, incluso para líquidos muy turbios.

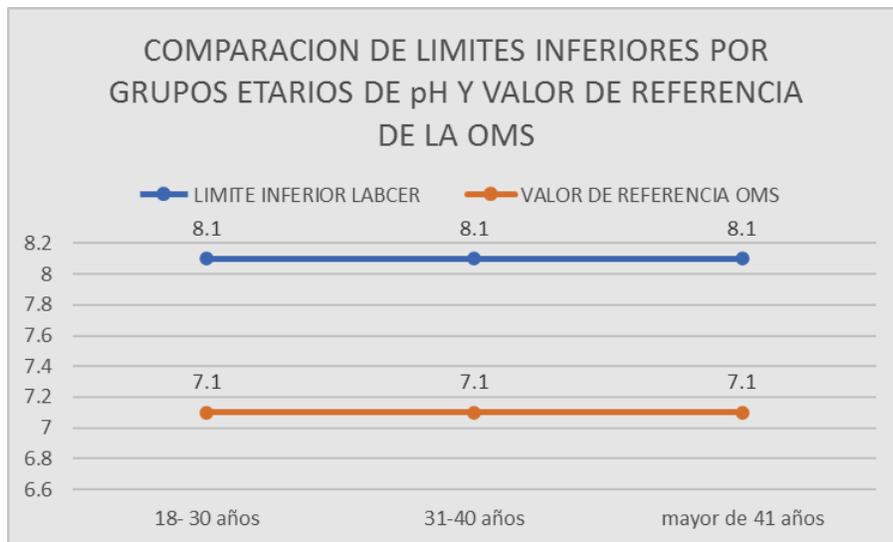
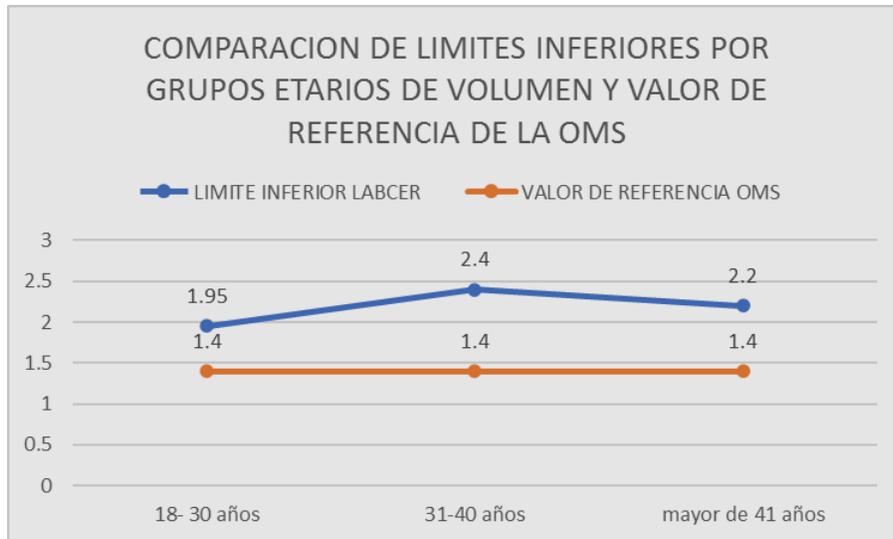
Con nuestra amplia gama de tiras de pH, siempre tendrá la solución óptima para su aplicación.

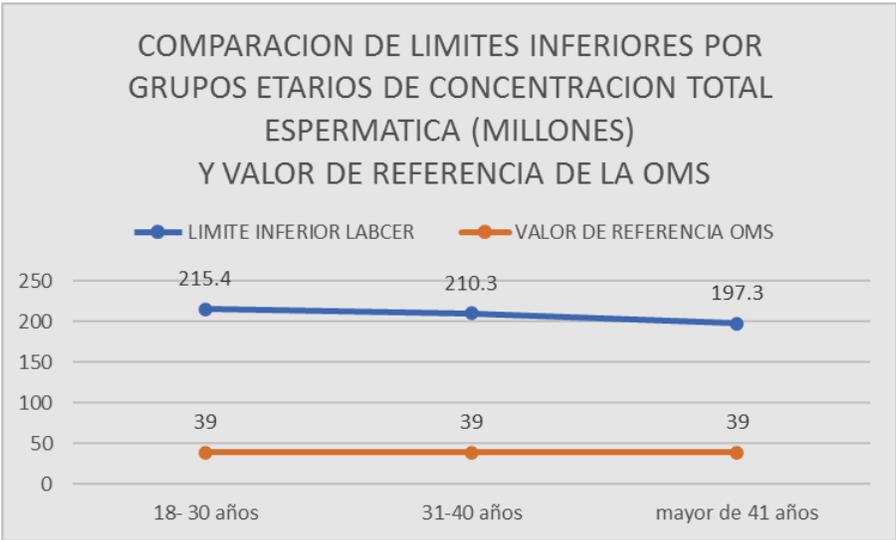
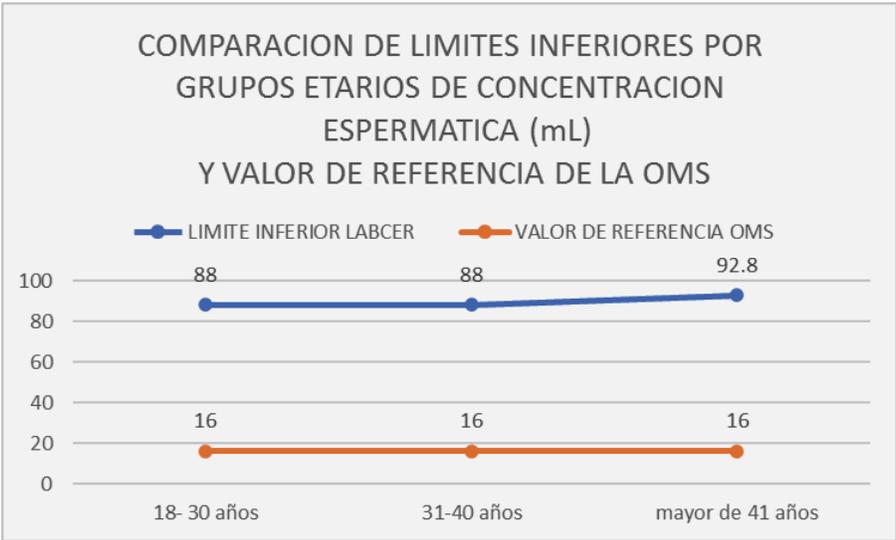
**RANGO DE MEDICION DEL PH:** 0-14

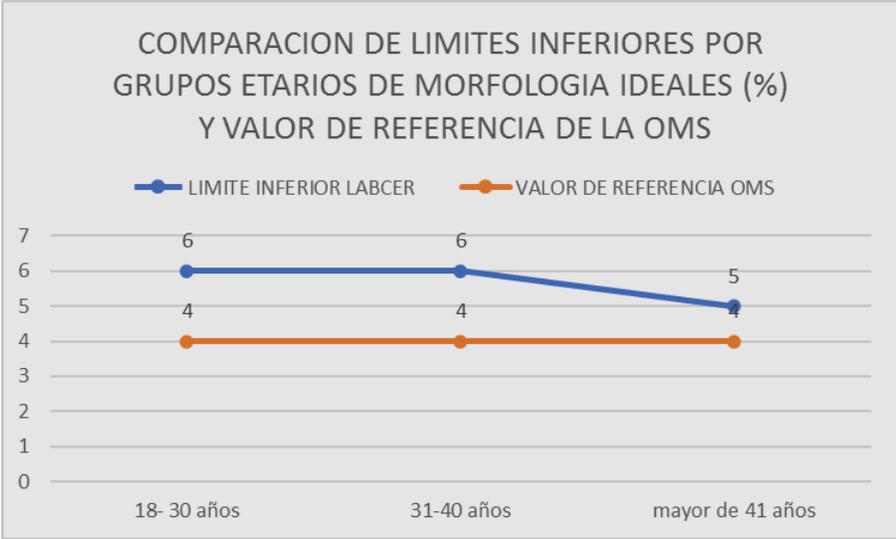
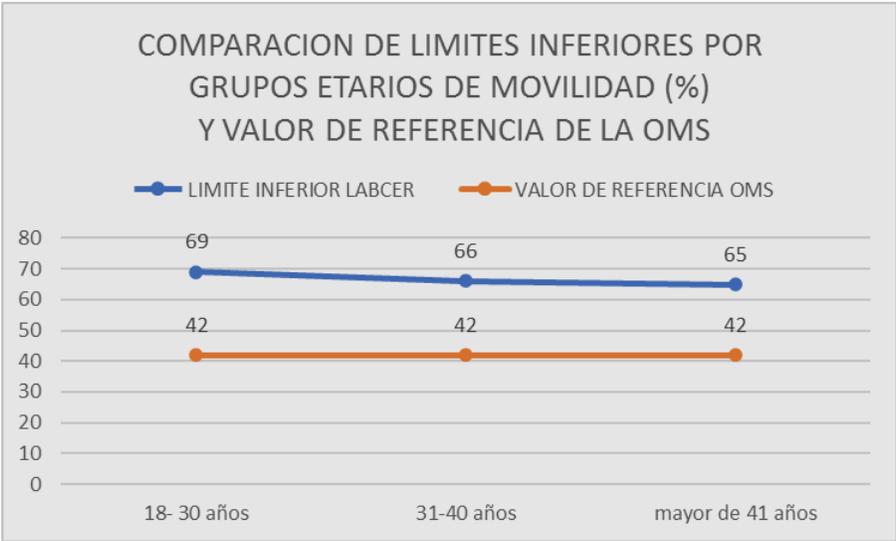
#### MARCA DE ENTREGA

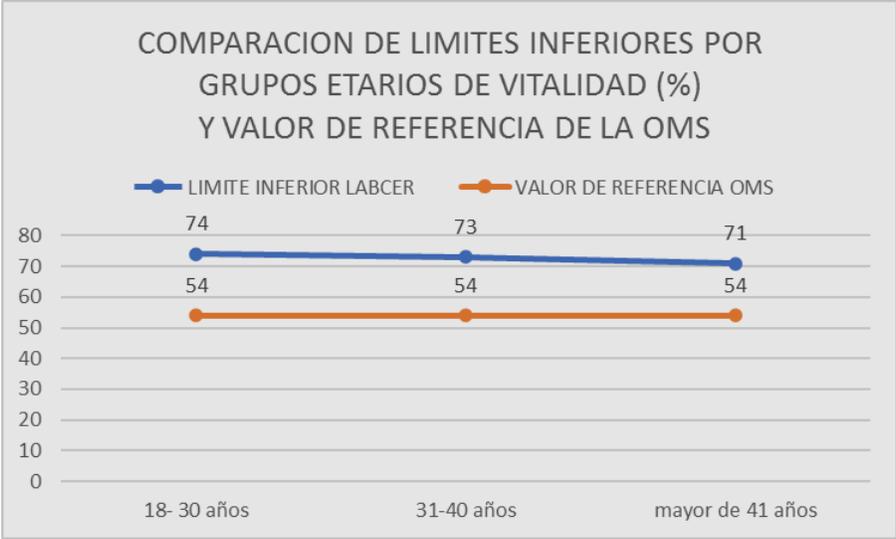
Merck

Anexo 5: Gráficos









**Anexo 6: Cuestionario para la inclusión o exclusión de muestras para estudio de Determinación de Valores de Referencia.**

---

Número de ficha:

DATOS DEL PACIENTE

---

Fecha día/mes/año:

Edad del paciente:

Origen (País/Departamento):

Motivo de su análisis:

Tiene diagnóstico SI NO: Especifique: \_\_\_\_\_.

Enfermedades crónicas:

Hipertensión \_\_\_\_\_ Diabetes \_\_\_\_\_ Obesidad \_\_\_\_\_ Otros: \_\_\_\_\_.

Su pareja tiene sufre alguna enfermedad crónica:

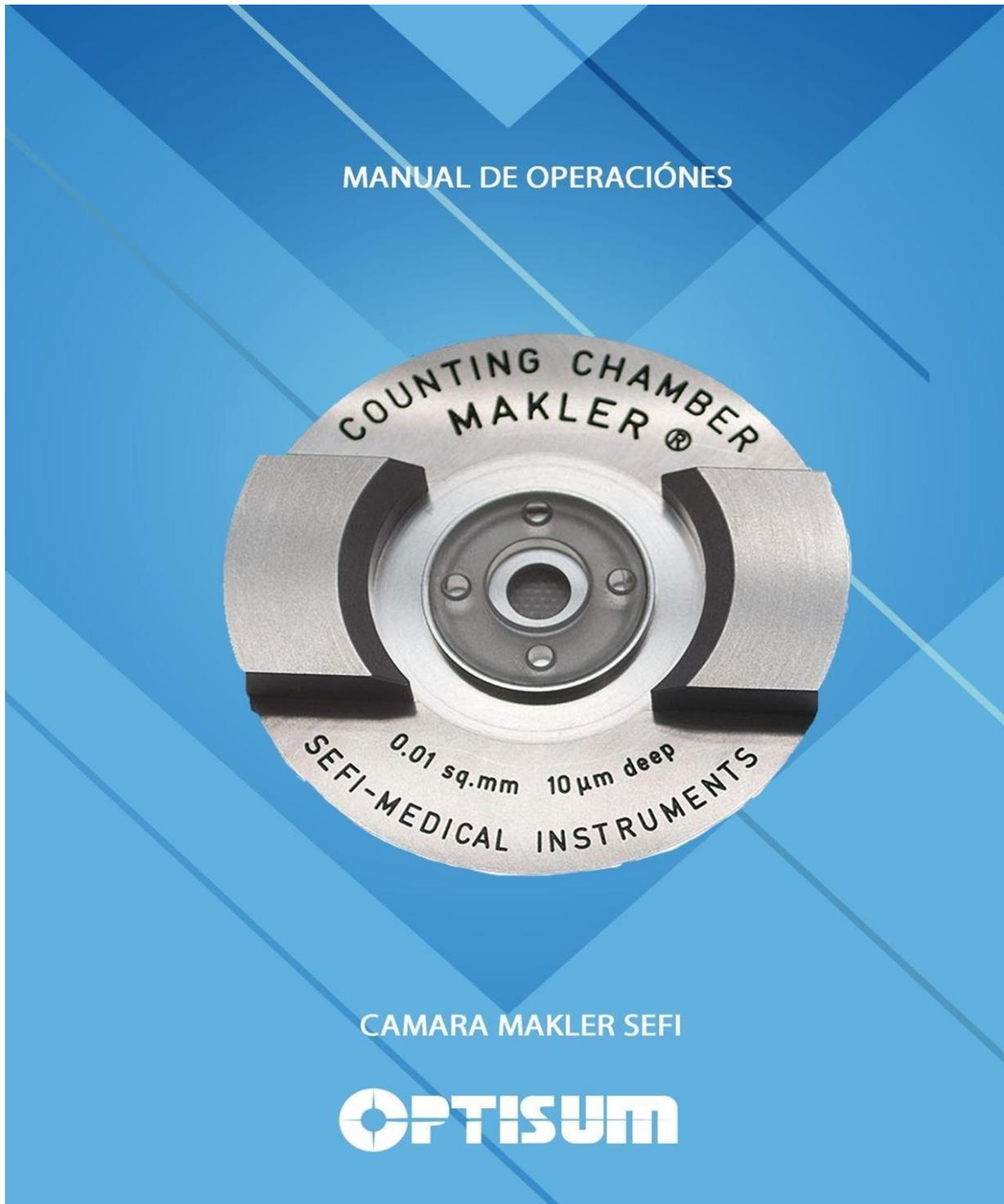
Hipertensión \_\_\_\_\_ Diabetes \_\_\_\_\_ Obesidad \_\_\_\_\_ Otros: \_\_\_\_\_.

Su pareja tiene algún diagnóstico, asociados a infertilidad:

Su pareja tiene algún tratamiento de fertilidad, SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_.

indique cual es:

## Anexo 7. Manual de operaciones de la cámara de Makler



## INSTRUCCIONES DE USO

### 1. Principio:

La cámara de recuento Makler es un dispositivo simple de usar para el recuento rápido y preciso de espermatozoides, la motilidad y la evaluación de la morfología, de la muestra diluida.

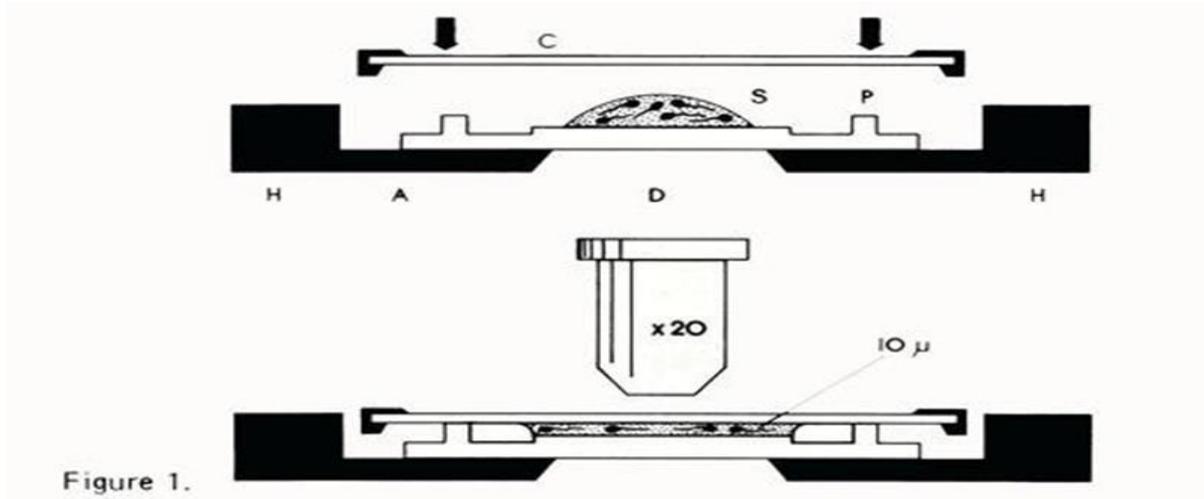
### 2. La Cámara se compone de dos partes: (Fig. 1).

2.1. La parte principal inferior tiene una base de metal (A) y dos asas (H). En el centro de la base hay un disco plano (D) hecho de vidrio plano óptico en el que se coloca la muestra (S). Alrededor del disco hay cuatro pasadores (P).

2.2. La parte superior es la cubierta de vidrio (C) rodeado de un anillo de metal. En el centro de su superficie inferior hay una rejilla de 1mm<sup>2</sup>, subdividida en 100 plazas, cada una de 0,1 x 0,1 mm. Cuando la cubierta de vidrio se coloca en las cuatro extremidades, el espacio delimitado en una fila de 10 plazas es exactamente una millonésima de mL. Por lo tanto, el número de cabezas de los espermatozoides en 10 casillas indica su concentración en millones/mL.

### 3. ACCESORIOS:

- Cepillo de limpieza.
- Papel para lentes sin pelusa.
- Grip Cámara - este dispositivo debe ser colocado en la platina del microscopio durante el análisis de espermatozoides. Se agarra la cámara herméticamente y permite el desplazamiento suave de la Cámara en el escenario.



Cuando el análisis de espermatozoide está completo, mantenga el agarre y deslice la Cámara a cabo. Deslice la Cámara de nuevo en la empuñadura de un nuevo análisis de esperma.

#### 4. PREPARACIÓN DE LA CÁMARA:

Antes de colocar la muestra en el disco, asegúrese de que las superficies opuestas son absolutamente limpias y libres de polvo, ya que el tamaño de la mayoría de las partículas es mayor que el espacio muy delgado entre las copas. Para ello, utilice el papel de lentes para limpiar ambas superficies.

La limpieza se puede probar mediante la colocación de la cubierta de vidrio en las cuatro extremidades y en busca de franjas de color en los cuatro puntos de contacto (fenómeno de Newton). Pueden ser mejor vistos contra la luz fluorescente.

#### 5. MÉTODO DE ANÁLISIS DE SEMEN:

Mezclar la muestra así, teniendo cuidado de evitar la formación de burbujas. Con la ayuda de una varilla de madera o una pipeta, colocar una pequeña gota en el centro de la zona del disco. Sujete la cubierta de cristal con los dedos opuestos los puntos negros y coloque inmediatamente a la cubierta de vidrio en las cuatro patas. Presione suavemente, mirando de nuevo por la aparición de las franjas de color. La caída se extenderá sobre toda el área del disco en un espesor de 10.



Algunos excedentes no interfieren con el análisis adecuado, siempre que los consejos no se inundan. Una vez que la cubierta de vidrio está en su lugar, evite tocar, levantar y cubrir de nuevo, ya que esto puede cambiar la propagación uniforme de los espermatozoides dentro de la Cámara.

Levante la Cámara por sus asas y colóquelo sobre la platina de microscopio. Usted puede utilizar el Grip Cámara de encajar correctamente.

**IMPORTANTE:**

Nunca utilice un objetivo x40 con esta Cámara. La cubierta de cristal puede ser dañados al tratar de centrar. Incluso cuando se están utilizando el correcto x20 objetivo, tenga cuidado de no presionar sobre la tapa de vidrio. La imagen por lo general se observa claramente cuando la punta del objetivo es de alrededor de 1 mm por encima de la superficie. No nos hacemos responsables de cualquier daño a la cubierta de cristal, consecuencia de un uso inadecuado del microscopio.

Es recomendable utilizar un objetivo x20 y x10 unidad óptica con esta Cámara.

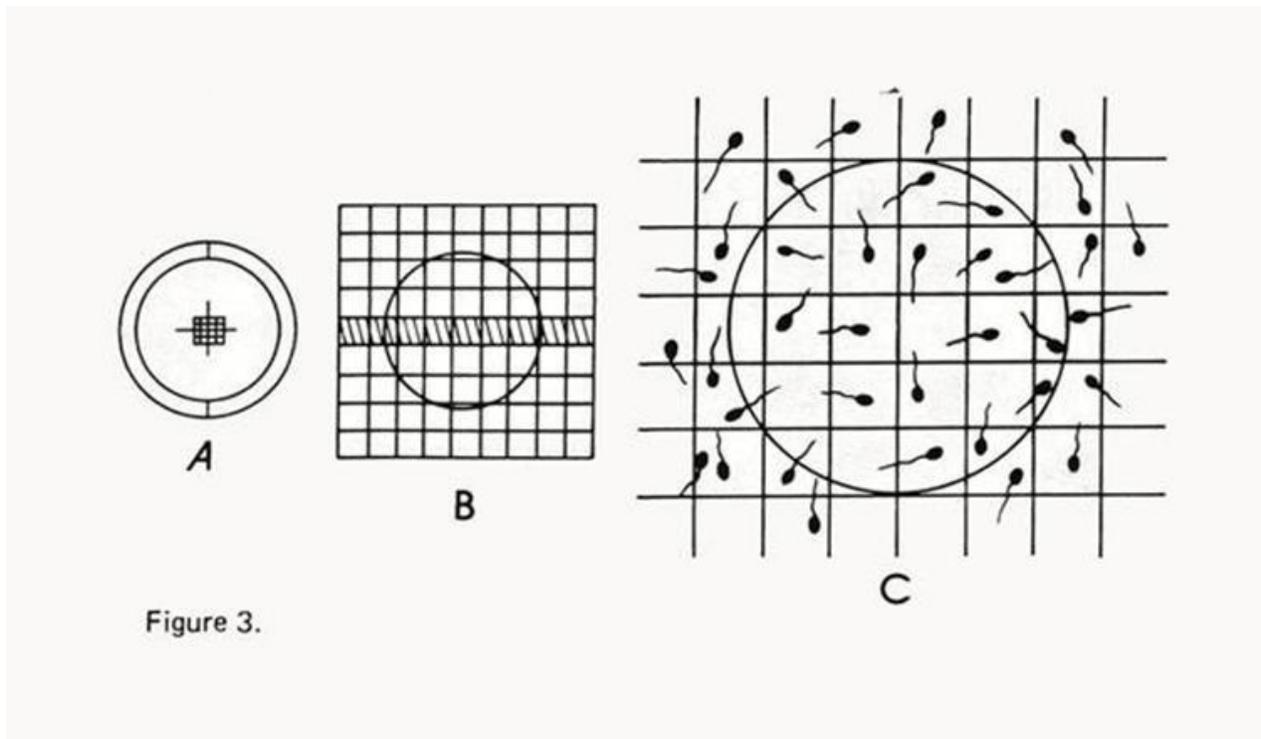
UN x10 objetivo no es recomendado debido a que el semen se verá demasiado pequeño, a menos que x20 ocular se utiliza. Un objetivo x40 no se puede utilizar debido al espesor de la cubierta de cristal.

- **CONTEO DE ESPERMATOZOIDES:**

Si los espermatozoides son demasiado densos y colores vivos, deben ser inmovilizados en primer lugar. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante la transferencia de una parte de la muestra en otro tubo de ensayo. El tubo de ensayo se inserta en el agua caliente del grifo 50oC- 60oC, durante unos 5 minutos. Una gota de un bien mezclada, espécimen precalentado se coloca en la Cámara y se cubre con la cubierta de vidrio. Las cabezas de los espermatozoides dentro de los cuadrados de la cuadrícula se cuentan en la misma celda manera la sangre se cuentan en hemocitómetro (Fig. 3).

En el caso de que el número de espermatozoides es sustancial, contar su número en una franja de 10 plazas. Este número representa su concentración en millones por ml.

Repita este conteo en otra tira o dos, para determinar el promedio. Alternativa u opcionalmente, se recomienda que el recuento de hacerse a partir de 2 o 3 otras gotas de la muestra para aumentar la fiabilidad de determinación de recuento. En el caso de la muestra oligospermicos, se sugiere contar esperma en toda el área de la cuadrícula. Cinco ceros se añaden entonces a el número contado y el resultado es la concentración en millones por millones



Después de que el espermatozoide se puso sobre la mesa, mueva la platina del microscopio y localizar la rejilla en el centro del área de visualización. A continuación, ajuste la Cámara para que las líneas de la cuadrícula aparecerán en la posición vertical y horizontal.

Durante esta búsqueda usted tendrá la oportunidad de observar las siguientes:

- Los espermatozoides están distribuidos uniformemente? Si no es así, la muestra no fue lo suficientemente bien mezclada.
- Están todos los espermatozoides en un plano focal sin confusión? Si no, quizás las superficies no estaban limpias y las partículas grandes han intervenido entre las dos superficies de la cámara

En cualquier caso, repita este procedimiento breve desde el principio.

- EVALUACIÓN MOTILIDAD:**

Se sugiere realizar evaluación motilidad en 3-5 minutos después de la aplicación de la muestra para evitar errores debido a la tendencia de los espermatozoides de migrar desde la periferia. Contar todos los espermatozoides residuales dentro de 9 o 16 plazas. A continuación, contar los espermatozoides residuales en la misma zona y estimar el

grado de motilidad de 1 a 4. Repita este procedimiento en otra área de la cuadrícula, así como de otros 3 a 4 gotas y calcular el promedio.

Esta estimación es mucho más exacta que la que realiza de la diapositiva cuando el esperma puede ser comprimido por la cubierta deslizante y su incapacidad de movimiento. Sala de Cómputo Makler ofrece condiciones estándar para todos los análisis muestra que los espermatozoides pueden moverse libremente en un plano horizontal sin rozamiento.

- **MORFOLOGÍA**

Una rápida evaluación de morfología de los espermatozoides puede llevarse a cabo sin manchas húmedas de una muestra que contiene espermatozoides inmovilizados. Un microscopio de contraste de fase es la preferida para este fin. Contar todos los espermatozoides normales y anormales en una determinada área de la cuadrícula y repita el procedimiento de otras muestras para hacer un recuento total de 200.

Es evidente que en los casos de oligospermia espécimen capturado el número de espermatozoides puede ser menor. La cámara no es adecuada para determinación de morfología muestra manchas secas.

- **CASOS ESPECIALES:**

Burbujas: si aparecen burbujas en la zona de la rejilla, se recomienda que la caída fuera sustituida por otro, a menos que las burbujas son demasiado pequeños para interferir en el análisis.

Las partículas grandes de polvo, hilos, etc., también pueden interferir con el recuento, por cambiar la profundidad del espacio y la caída se debe sustituir.

Variaciones importantes en cuenta entre la caída de la misma muestra se producen cuando las muestras no se mezclan bien, en los casos de alta viscosidad, o cuando la superficie de la Sala no estaba limpia de partículas o polvo.

Agrupamiento: a veces el esperma se agrupa dentro de la Cámara si transcurre demasiado tiempo hasta que se cuentan. En este caso, sustituir la gota con un nuevo modelo mezclado adecuadamente. En algunos casos, aglutinado cúmulos puede estar presente dentro de la zona de la rejilla, y en este caso la caída debe ser sustituido.

- **Cristales:**

Los especímenes que se dejan para un largo período de tiempo pueden contener cristales que no pueden interferir con el recuento de votos, sino que sea más difícil.

A veces, estos cristales son demasiado grandes y pueden dañar la superficie. Por lo tanto, se debe tener especial cuidado cuando las muestras que contienen cristales son analizadas.

- **LIMPIEZA Y PREPARACIÓN PARA SU REUTILIZACIÓN:**

No enjuague o sumerja la cámara en el agua del grifo. Sumergir la brocha en agua o en solución antiséptica no corrosivo y simplemente limpie ambos lados de las gafas. A continuación, presione el cepillo y esponja de los restos de agua. Secar la superficie con el papel de lente que no deje pelusa.

Evite tocar las puntas de las patas en la medida de lo posible. La cámara está ahora lista para su reutilización.

En general, no es necesario cambiar el enfoque una vez que se ha establecido para el examen. Simplemente deslice la Cámara en o fuera de la sala de control sin elevar el objetivo.

Referencias:

1. Makler A. The improved 10 mic. Chamber for rapid sperm count and motility evaluation. Fertil Steril 33:337-338, 1980.

2. Ludwig G. and Frick J. (eds) Spermatology - Atlas and Manual, Springer-Verlog. Berlin, Heidelberg, New York etc. 1990.
3. Anne M. Jequier: Male Infertility, a Guide for the Clinician. Blackwell Science Ltd. Oxford U.K. 2000 p. 9-58.
4. Makler A. Human Seminology. Chapter 7: 115 -130, In: Biotechnology of Human Reproduction,
5. Editors: A. Ravelli, I. Tur-Kaspa, JG Holte, M. Massobrio, Parthenon Publishing Group, 2003.