



TRABAJO PRÁCTICO Nº 5

FISIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

APARATO REPRODUCTOR MASCULINO

1. OBJETIVOS

Con los conocimientos de los contenidos de la clase teórica:

1.a. OBJETIVOS GENERALES

- Conocer la definición de "espermograma", qué evalúa y las condiciones establecidas por la OMS para una correcta interpretación de las determinaciones.

1.b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar las características macroscópicas del líquido seminal: aspecto, color, pH, viscosidad y volumen.
- Observar y describir los distintos movimientos de los espermatozoides y relacionarlos con el alcance de su función.
- Conocer el procedimiento para el recuento de espermatozoides en cámara de Neubauer.
- Observar microscópicamente la morfología de los espermatozoides y relacionarla con la funcionalidad de los mismos.

2. CONOCIMIENTOS NECESARIOS

- Principales hormonas del eje Hipotálamo Hipófisis Testicular.
- Regulación hipotalámica de la síntesis y secreción de la Testosterona.
- Hormonas Foliculoestimulante – Luteinizante – Inhibina. Testosterona. DHT. Funciones.
- Órgano reproductor masculino. Anatomía. Formación y desarrollo. Funciones.
- Testosterona: secreción, transporte, órganos blancos y funciones.

3. DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

3.a. Fundamento

EVALUACIÓN DEL LÍQUIDO SEMINAL – ESPERMOGRAMA

Se realizan determinaciones cuali y cuantitativas encaminadas a valorar la aptitud reproductiva masculina y a determinar funcionalidad de los testículos y glándulas accesorias. En la composición del semen intervienen las secreciones de Testículo y

Glándulas Anexas en diferentes proporciones siendo mayor la contribución de la vesícula seminal. El plasma seminal tiene propiedades buffer debida a carbonatos, citratos y fosfatos. Está formado por un 85-98% de agua y un 2-15% de materia seca que contiene elementos inorgánicos (oligoelementos – electrolitos – dióxido de carbono) y orgánicos (espermina – colina – creatina – glúcidos – citratos – compuestos fosforados – vitaminas y otros elementos).

La muestra a utilizar en el trabajo práctico es el líquido seminal, obtenido por masturbación. El sujeto deberá tener tres días de abstinencia sexual y no más de 5, recolectar en frasco estéril y remitir al laboratorio dentro de los 30 minutos.

3.b. Materiales

- Líquido seminal.
- Microscopio.
- Cámara de Neubauer.
- Baño térmico.
- Solución Macomber y Saunders
- Eosina 0,5% (en Solución Fisiológica)
- Portaobjetos – Cobreobjetos.
- Papel indicador de pH.
- Extendidos de semen coloreados con May Grundwal Giemsa.

Materiales de limpieza (por comisión): Detergente – Rejilla – alcohol gel – Cepillo – Rollos de papel

3.c. ANÁLISIS MACROSCÓPICO

El análisis seminal debe iniciar con una simple inspección inmediatamente luego de la licuefacción, preferentemente a los 30 minutos, pero no luego de 1 hora de obtenida la muestra, esto para prevenir deshidratación o cambios de temperatura que afecten la calidad del semen.

3.c.1 Licuefacción

Inmediatamente después de la eyaculación en el frasco colector, el semen se observa típicamente como una masa semisólida (coágulos). Luego de unos minutos a temperatura ambiente, el semen comienza a licuarse. A medida que transcurre el tiempo, el semen se vuelve más homogéneo y líquido, hasta que hacia el final de este

proceso, solo quedan pocas porciones con pequeños coágulos. Generalmente la licuefacción total de la muestra toma alrededor de 15 minutos a temperatura ambiente, aunque ciertas veces puede llegar a tardar 60 minutos o más. Si la muestra no se llega a licuarse en forma completa luego de 60 minutos, debe registrarse e informarse.

La presencia de gránulos gelatinosos en la muestra luego de la completa licuefacción, no tendrían significación clínica aparente. Sin embargo, la presencia de filamentos mucosos podría interferir con el posterior análisis seminal

Límite inferior de Referencia: total a los 60 minutos

3.c.2 Viscosidad

Se determina una vez finalizada la licuefacción de la muestra. Se aspira suavemente el semen con una pipeta plástica y se lo deja gotear. El semen normal cae en forma de gotas individuales, mientras que en una muestra con viscosidad aumentada, el semen cae formando un filamento mayor de 2 cm.

También se la puede evaluar introduciendo una varilla de vidrio en la muestra y observando la longitud del filamento que se forma al retirarla.

Hay que distinguir entre un período de licuefacción retardado (con una apariencia no homogénea) y un aumento de la viscosidad (aspecto homogéneo pero pegajoso). La viscosidad puede ser normal aún si la licuefacción es incompleta.

3.c.3 Aspecto y color del eyaculado

Una muestra normal de semen, luego de la licuefacción, presenta una apariencia homogénea gris-opalescente, pudiendo presentarse también de color débilmente amarillento. Si la concentración de espermatozoides es muy baja, puede presentar una apariencia menos opaca.

3.c.4 Volumen

Las vesículas seminales y la glándula prostática son las principales responsables del volumen del eyaculado, al que también contribuyen en menor medida, las glándulas bulbo-uretrales y epidídimo. (OMS 2010) cabe destacar la importancia que presenta el volumen seminal normal, ya que necesita una buena función buffer frente a la secreción ácida de la vagina.

La medición precisa de este parámetro es muy importante, debido a que con él se realizará posteriormente el cálculo de la cantidad total de espermatozoides y de células redondas de la muestra.

Medición:

- a) Con una pipeta graduada de vidrio, teniendo la precaución de aspirar la totalidad de la muestra.
- b) Pesando la muestra en un recipiente colector, y calculando luego el volumen suponiendo una densidad seminal de 1g/ml (la densidad del semen varía entre 1,043 y 1,102 g/ml).

Valores de referencia: (OMS 2010) el límite inferior es 1.5 ml

3.c.3 pH

Refleja el balance de pH entre las secreciones de las glándulas accesorias, principalmente la secreción alcalina de la vesícula seminal y la secreción ácida de la próstata. En condiciones normales y dentro de la hora de obtenido el esperma es ligeramente alcalino.

Medición: se coloca una gota del semen sobre un papel indicador de pH y este cambia el color según el pH de la muestra; y según el color que haya adquirido, se lee el valor de pH.

Valores de referencia (OMS 2010): ≥ 7.2

3.d ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Inicialmente se debe realizar un examen del semen en fresco para obtener información sobre grado de agregación o aglutinación espermática, la presencia de otras células diferentes a espermatozoides como ser células epiteliales, leucocitos, células de la progenie, cabezas y colas espermáticas aisladas y para tener una noción del recuento y de la movilidad de los espermatozoides presentes en la muestra.

Se coloca una gota de semen en un portaobjetos y se cubre con un cubreobjeto. Luego observar con objetivo de 40 x.

3.d.1 Agregación

Se define el término “agregación no-específica” como la adhesión de espermatozoides inmóviles entre sí o de espermatozoides móviles a restos espermáticos, leucocitos, fibras de mucus u otros elementos celulares. La misma debe ser reconocida como tal.

3.d.2 Aglutinación

Específicamente se refiere a la adhesión de espermatozoides móviles entre sí en lugares determinados como ser cabeza-cabeza, cola-cola, cabeza-cola o en la pieza media. Debe ser informado.

3.d.3 Motilidad

El objetivo de medir las características del movimiento espermático es conocer el comportamiento individual de las células que es predictivo del potencial fértil del hombre.

Se distinguen tres tipos:

1. Movilidad Progresiva (PR): los espermatozoides se mueven activamente, en forma lineal o describiendo un círculo amplio, prescindiendo de la velocidad.
2. Movilidad No Progresiva (NP): se incluyen todos aquellos modelos de movilidad con ausencia de progresión.
3. Inmóviles (I): gametas sin movimiento.

Sólo deben ser tenidos en cuenta para esta determinación aquellos espermatozoides completos (Cabeza-Pieza media- Cola).

Límites inferiores de referencia (OMS 2010):

- 1) **El límite de referencia inferior para la movilidad total (PR +NP) es 40%.**
- 2) **El límite de referencia inferior para la movilidad progresiva (PR) es 32%.**

El número total de espermatozoides móviles progresivos es de significancia biológica. Se obtiene multiplicando el número total de espermatozoides en la muestra por el porcentaje de células con movilidad progresiva.

3.d.4 Vitalidad

La vitalidad espermática es analizada mediante la identificación de aquellos espermatozoides que poseen una membrana celular intacta; esto se pone en evidencia mediante test de eosina sola.

Test de Eosina:

Colocar 5 µl de semen con 5 µl de solución de Eosina Y 0,5% (P/V) (se disuelven 0,5 g de Eosina Y en 100 ml de NaCl 0,9%) entre porta y cubreobjetos y observar al microscopio. Distinguir espermatozoides vivos (cabeza no coloreada o levemente coloreada rosa pálido) y espermatozoides muertos (cabeza coloreada de rosa más intenso).

Realizar una fórmula porcentual sobre 200 gametas.

Se basa en el principio de que las células muertas, cuyas membranas plasmáticas están dañadas, permiten la entrada del colorante. Esta técnica de tinción permite diferenciar los espermatozoides inmóviles pero vivos de los muertos.

Límite de referencia inferior: el límite inferior de referencia de vitalidad espermática (espermatozoides con membrana intacta) es 58%.

El resultado compara con el resultado de los SPTZ inmóviles, ya que el porcentaje de SPTZ muertos no debe ser mayor al de los inmóviles.

3.d.5 Recuento y concentración de espermatozoides

El recuento espermático, se refiere al número total de espermatozoides que se encuentra en el eyaculado. Se lo calcula con la concentración espermática, la cual se mide durante la evaluación seminal.

Para eyaculados normales, cuando el tracto genital masculino no se encuentra obstruido y el período de abstinencia es corto, **el número total de espermatozoides** en el eyaculado se correlaciona con el volumen testicular y así constituye una medida de la capacidad testicular de producción espermática y la permeabilidad del tracto genital.

La **concentración espermática** está influida por el volumen de las secreciones de vesículas seminales y próstata, y por lo tanto no constituye una medida específica de función testicular.

TENER EN CUENTA QUE "NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZOIDES" Y "CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA", NO SON SINÓNIMOS.

La concentración de espermatozoides se determina contando la muestra diluida (1:20) con un líquido diluyente de Macomber y Saunder. Esto se logra mezclando 20 ul de semen homogenizado con 0,38 ml del líquido diluyente. Luego de 5 min se utiliza la Cámara de Neubauer para llevar a cabo el recuento, en microscopio óptico con una magnificación de 400X. El mismo se efectúa en el Retículo de Thoma (el mismo que se usa para el recuento de plaquetas). Se deben contar los cuatro cuadrados de los vértices y uno central (cinco en total). Al número de espermatozoides contados, se los multiplica por 1.000.000 para expresarlos en "millones/ml"

$$\text{Cálculo: Millones/ml} = \frac{N \times \text{dil} \times 25 \times 10.000}{5} = N \times 1.000.000$$

N: número de espermatozoides contados en la cámara

Dil: dilución (20 en este caso)

25: número de cuadros total en el retículo de Thoma

10.000: factor que expresa el recuento en "ml"

5: nº de cuadros contados

Por ejemplo si se contaron 27 células en los 5 cuadrantes terciarios la **concentración** será **27x10⁶ SPTZ/ ml**. Si el total eyaculado fue de 4.1 ml entonces el **recuento total de espermatozoides** será:

$$27.000.000 \times 4.1 = \mathbf{110.700.000 SPTZ/eyaculado.}$$

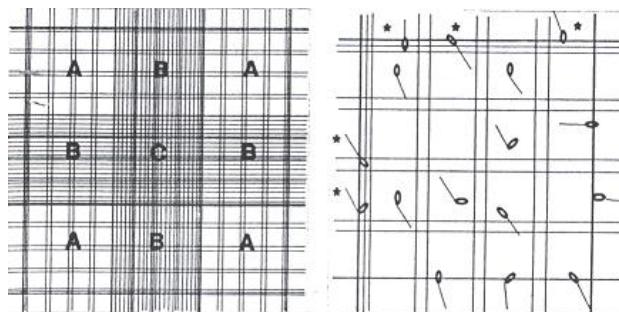
Composición de la Solución de Macomber-Sounders:

- Formol (Inmoviliza a las gametas).
- Bicarbonato de sodio (aporta un medio estable para las gametas y demás células)
- Agua destilada.

Otra manera de inmovilizar los espermatozoides es por medio de calor, para lo cual se coloca en un tubo de Kahn 500 ul de semen, luego se lleva a baño térmico

de 60 -70 °C durante 2-3 minutos. (inmoviliza los SPTZ). Realizar una dilución 1:20 en Solución Fisiológica (0.38 ml S.F + 20µl de semen).

Cargar la cámara de Neubauer dejándola reposar durante 2 minutos en cámara húmeda.



Concentración Espermática: Límite inferior de referencia (OMS 2010)

15×10^6 espermatozoides/ml.

3.d.6 Observación Morfológica

Se define a la morfología espermática como el estudio de la forma y el tamaño de los espermatozoides.

El semen humano presenta un marcado pleomorfismo en su morfología, y esto se observa en el mismo individuo y entre individuos.

Procedimiento:

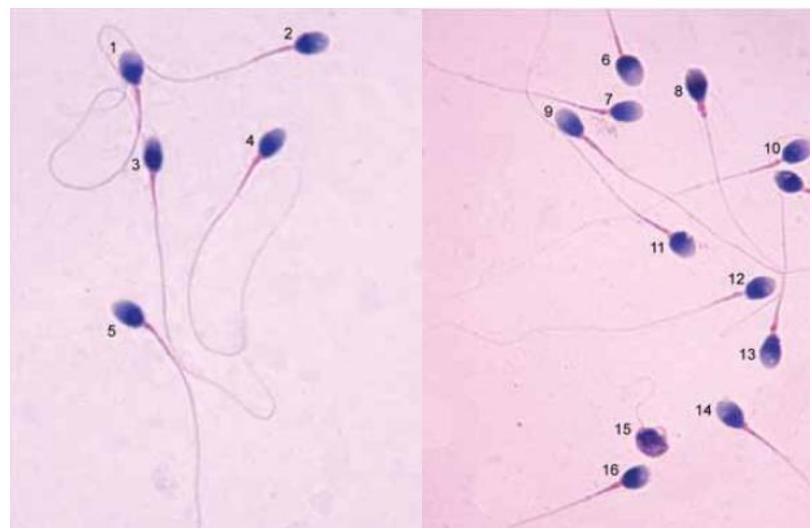
- Realizar 2 o más extendidos de semen puro. Dejar secar al aire.
- Llevar a cabo la tinción prolongada con Giemsa: Fijar con alcohol metílico durante 4 min, colorear con Giemsa diluido (1/10) durante 30 min.
- Examinar el extendido con aumento de 100X y aceite de inmersión.
- Analizar al menos 200 espermatozoides, para realizar el cálculo del porcentaje de formas normales.

Criterios de espermatozoide normal

- La **cabeza** debe ser lisa, oval y de contornos regulares; se debe distinguir claramente la región acrosómica que debe cubrir el 40-70% de la cabeza. El acrosoma no debe contener grandes vacuolas y no más de

dos vacuolas pequeñas. La región post-acrosómica no debe presentar vacuolas.

- II. La **pieza intermedia** debe ser delgada, regular y aproximadamente de la misma longitud que la cabeza. Debe estar alineada con el eje superior de la cabeza. El exceso de citoplasma residual (gota citoplasmática) debe considerarse anormal.
- III. La **cola** debe ser de calibre regular, más delgada que la pieza intermedia, y una longitud de aproximadamente 10 veces la cabeza. No debe poseer ángulos, lo que indica quiebre flagelar.



Valores de referencia (OMS 2010): el límite inferior de referencia es 4% de formas morfológicamente normales.

Dibujar algunos espermatozoides observados.

3.e. Conclusiones:

Teniendo en cuenta contenidos teóricos, (Clases Teóricas – Bibliografía Recomendada – Material provisto para el laboratorio) relacione los procesos fisiológicos involucrados con lo realizado durante el Trabajo Práctico.

4. GUIA DE ESTUDIO

1. ¿Cuáles son las funciones de la Testosterona en la ontogenia del individuo?
2. ¿Cómo se regula la síntesis y secreción de Testosterona?
3. ¿Cuál es la función de las células de Leidig?
4. ¿Cuál es la función de las Células de Sertoli?
5. Esquematice un espermatozoide normal indicando cada una de sus partes.

4. BIBLIOGRAFIA

- ✓ Organización Mundial de la Salud. "Manual de laboratorio para la examinación y procesamiento del semen humano". 5ta edición. 2010.
- ✓ Cingolani, H. E.; Houssay, A. B. y Col: ***Fisiología Humana de Houssay***. 7^a Edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires. 2006.
- ✓ Dvorkin, M. A.; Cardinali, D. P.; Iermoli, R. H.: ***Best & Taylor. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica***. 14^a Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2010.
- ✓ Guyton, A. C.: ***Tratado de Fisiología Médica***. 11^a Edición. Editorial Elsevier. Madrid. 2006.
- ✓ Silverthorn, D. U.: ***Fisiología Humana. Un Enfoque Integrado***; 5^a Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2014.
- ✓ Henry, J.B.: ***El Laboratorio en el diagnóstico clínico: homenaje a Todd-Stanford & Davidsohn***. Tomos I y II. Editorial Marbán. 2005.