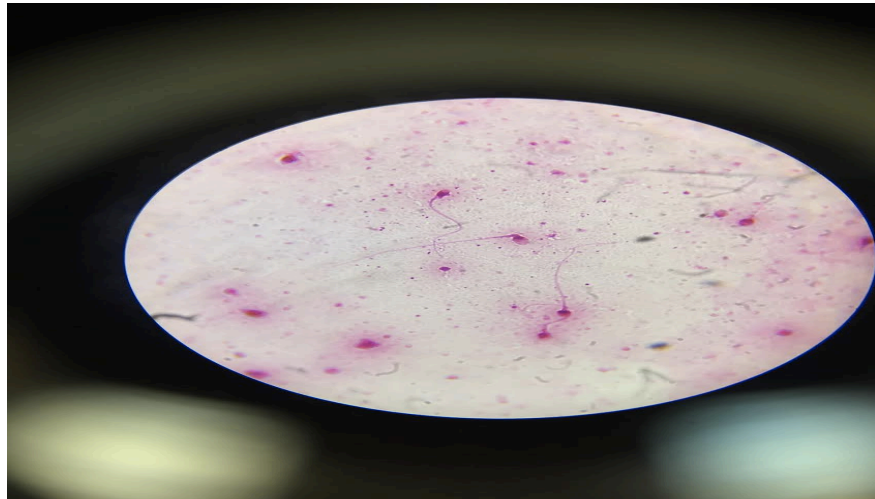


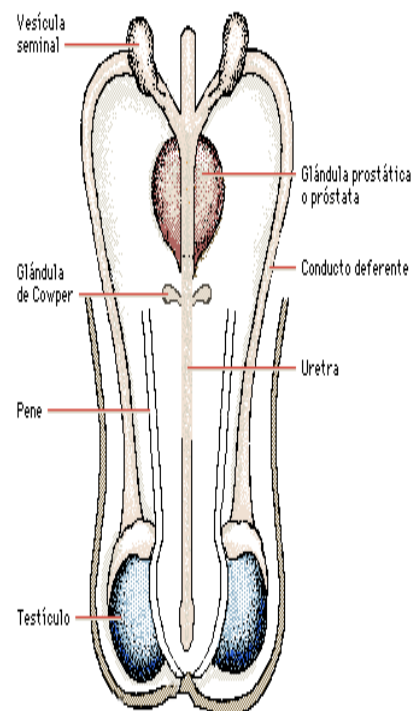
ESTUDIO BIOQUÍMICO. SEMINOGRAMA

UD-8B



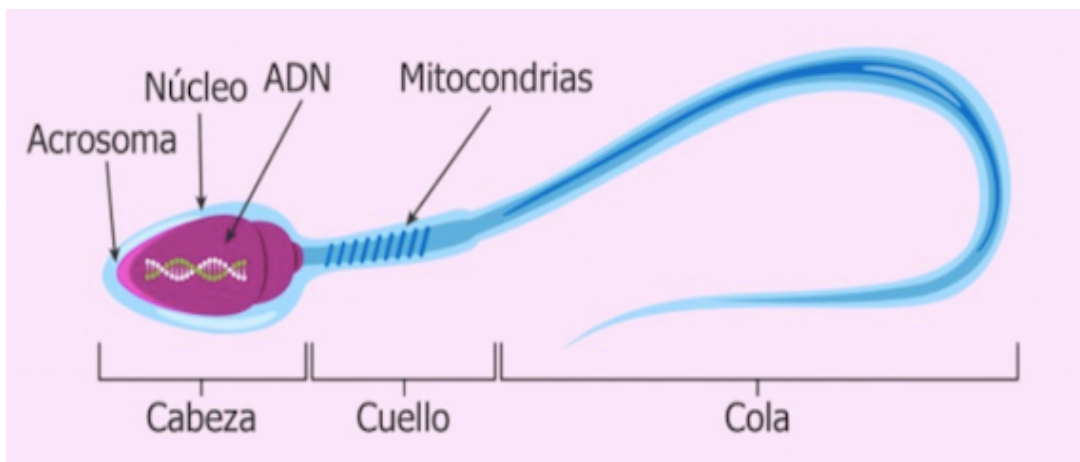
INTRODUCCIÓN

- **SEMEN O ESPERMA:** líquido blanquecino, muy viscoso, emitido en el momento de la eyaculación, compuesto de los espermatozoides en suspensión en el líquido seminal.
- En la formación del líquido seminal intervienen las distintas glándulas seminales:
 - Las vesículas seminales (60%):
 - Su secreción aporta ácido ascórbico, fructosa y factores procoagulantes
 - Función: relacionada con la movilidad, viscosidad, alcalinidad.
 - Próstata (30%):
 - Su secreción aporta zinc, citrato, fosfatasa ácida.
 - Componentes que interviene en la función del espermatozoide.
 - Epidídimo y glándulas de Cowper (10%) :
 - Epidídimo secreta espermatozoides y carnitina (aumenta la supervivencia de los espermatozoides)
 - Glándulas de Cowper un líquido que neutraliza la acidez de la uretra.



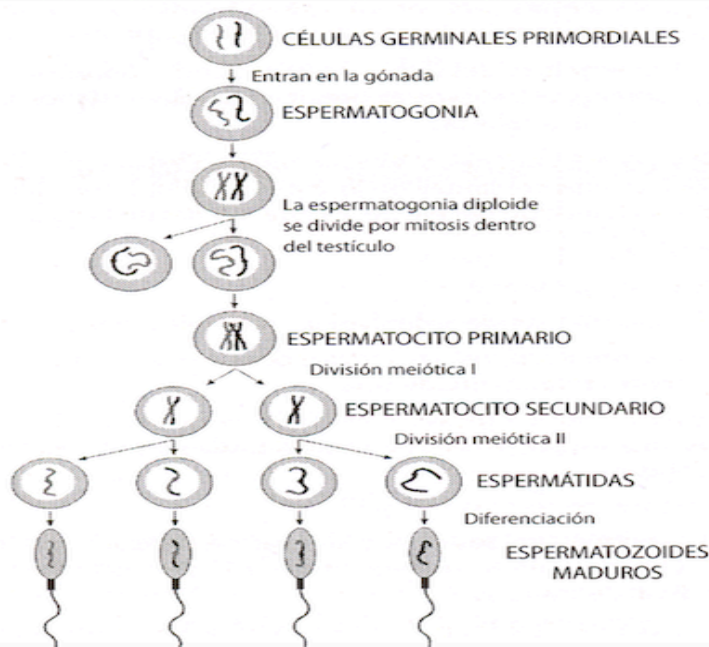
ESPERMATOZOIDES

- Células masculinas para la reproducción, se diferencian tres partes cabeza, cuello, cola.
 - Cabeza: contiene el núcleo de la célula y el DNA donde se encuentran los genes paternos. En la parte superior presenta una prominencia llamada "acrosoma"
 - Cuello: Contiene la mayor parte del citoplasma y está recorrido por un filamento axial, que corresponde al flagelo.
 - Cola: Formada por el filamento axial rodeado por citoplasma y que se usa para la propulsión.



ESPERMATOGÉNESIS

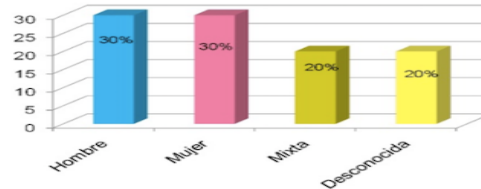
- Es el proceso de formación de espermatozoides.
- Se distinguen 3 fases mitosis, meiosis y diferenciación celular.
- Viene a durar unos 65-70 días.



ESTUDIO DEL SEMEN

- **ESPERMIOGRAMA O SEMINOGRAMA** informa sobre las características de los espermatozoides, es fundamental dentro del estudio de fertilidad de una pareja y de las técnicas de reproducción asistida.
- Las estadísticas señalan:

CAUSAS DE INFERTILIDAD



EVALUACIÓN VARÓN:

- **1.- Historia clínica**
 - Enfermedades crónicas.
 - Enfermedades respiratorias. (Síndrome del cilio inmóvil → deficiencia congénita produce hipomovilidad de los espermatozoides y limitación de la actividad ciliar de las vías respiratorias)
 - Tratamientos quirúrgicos previos.
 - Infecciones del tracto genital.
 - Medicamentos empleados.
 - Abuso de drogas o alcohol.
 - Manejo laboral de sustancias tóxicas.
 - Detalles del desarrollo puberal.
 - Historia sexual detallada que incluya la capacidad potencial, libido, eyaculación y frecuencia de relaciones sexuales.
- **2.- Exploración física**
 - valorar con detalle si existen características propias de hipogonadismo. (menos masa corporal, falta de agravamiento de la voz, poco vello corporal, crecimiento mamario, brazos y piernas largas vs tronco)
 - Examen del escroto por palpación y valoración del tamaño, agenesia vascular (ausencia de vasos testiculares) y presencia o no de varicocele (dilatación de las venas testiculares) o hidrocele (acúmulo de líquido).
- **3.- Estudios de laboratorio**

1. SEMINOGRAMA

- Debido a la variabilidad que puede existir día a día, se deben obtener tres muestras en un intervalo de 2 semanas.
- **Toma de muestra:**
 - - Masturbación
 - - Periodo de abstinencia sexual de 3 días y nunca más de 5.
 - - La muestra deberá ser llevada al laboratorio antes de 1 hora y deberá permanecer a temperatura ambiente hasta su licuación.
 - - La Tª del transporte debe ser lo mas próxima a 37°C.
 - - La persona debe evacuar la vejiga antes de la eyaculación. Y debe recogerlo con las mayores condiciones de higiene.
 - - La muestra debe ser recogida en recipientes estériles (plástico o de polietileno, 100 ml.) teniendo que pasarse tras su licuación a uno de vidrio más pequeño que facilite su trabajo en laboratorio y porque además el polietileno disminuye la motilidad de los espermatozoides.

1. SEMINOGRAMA

- El estudio básico consiste en un examen MACROSCÓPICO y MICROSCÓPICO.
- **EXAMEN MACROSCÓPICO:**
- **1. Volumen:**
 - OMS considera como valor de referencia $>1,5$ ml , no considera un límite superior ya que puede intervenir muchos factores como el volumen de secreción de las diferentes glándulas.
 - Un volumen $< 1,5$ ml (OLIGOSEMIA) indica obstrucción de los conductos seminales, pérdida de alguna fracción de la muestra...
- **2. Tiempo de licuación:**
 - El líquido seminal es un fluido de aspecto denso, más o menos viscoso que **coagula** tras su emisión y en circunstancias normales, debe licuarse a los 15-60 minutos de su emisión a temperatura ambiente. Este cambio de estado se llama licuefacción.
 - Hiperviscosidad seminal (asociada a infecciones o defectos en las glándulas secretoras) → produce la no licuefacción.

1. SEMINOGRAMA

- El estudio básico consiste en un examen MACROSCÓPICO y MICROSCÓPICO.
- **EXAMEN MACROSCÓPICO:**
- **3. Color:**
 - El color normal es gris opalescente o ligeramente amarillo.
 - Tonalidades amarillentas → pioespermia (=elevada [leucocitos]→ infección)
prolongada abstinencia sexual (elevada [flavoproteínas oxidadas])
El color rosado o rojizo → sangre reciente (traumatismo)
Marrón → sangrado antiguo o de los conductos genitales.
- **4. pH:**
 - Normalmente tiene un pH alcalino $>7,2$, aunque se consideran variaciones fisiológicas (7 y 8,1). Se mide con papel indicador
 - El pH obtenido es el resultado de la mezcla de las diferentes secreciones, principalmente entre el pH alcalino de las vesículas seminales y el ácido de la próstata.
 - Un pH inferior junto con oligo o azoospermia + volumen bajo:
 - obstrucción de las vesículas seminales, conductos deferentes.
 - Agenesia(desarrollo de ectuoso)
 - La determinación debe realizarse rápidamente, ya que se va produciendo la alcalinización de la muestra con el tiempo, debido:
 - 1- la actuación de la anhidrasa carbónica de los espermatozoides que cataliza la conversión de $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow$ bicarbonato.
 - 2- hidrólisis proteica con liberación de amoníaco.

1. SEMINOGRAMA

- **EXAMEN MACROSCÓPICO:**

- **5. Viscosidad:** Una vez que la muestra está licuada.

- Si se determina con viscosímetro, los valores normales oscilan entre 5 y 8, con un valor fisiológico medio de 6,5.
- Filancia: propiedad de formar filamentos.
 - El líquido seminal ya licuado forma un filamento de hasta **1cm** de longitud al introducir en su seno una varilla fina o un asa de platino y retirarlas suavemente. Si el filamento formado es mayor, se trata de un semen no licuado y de viscosidad aumentada.
 - Observar el deslizamiento del semen desde la punta de una pipeta Pasteur, de forma que si su viscosidad es normal, caerá gota a gota.
- La **disminución de la viscosidad** → ausencia de la coagulación espontánea del líquido seminal. Se produce en casos de muestras con acusada disminución del número de espermatozoides o con ausencia de los mismos.
- **Incrementos importantes de la viscosidad** → anulación total de la progresión espermática en el moco cervical. Disfunción prostática.

- **EXAMEN MICROSCÓPICO: microscopio idóneo = microscopio de contraste de fases con pletina termostaticada a 37°C**

Estudio de las características de los espermatozoides. MUESTRA: licuada, homogenizada. (sin coágulos ni grumos)

- **1- Examen microscópico DIRECTO**

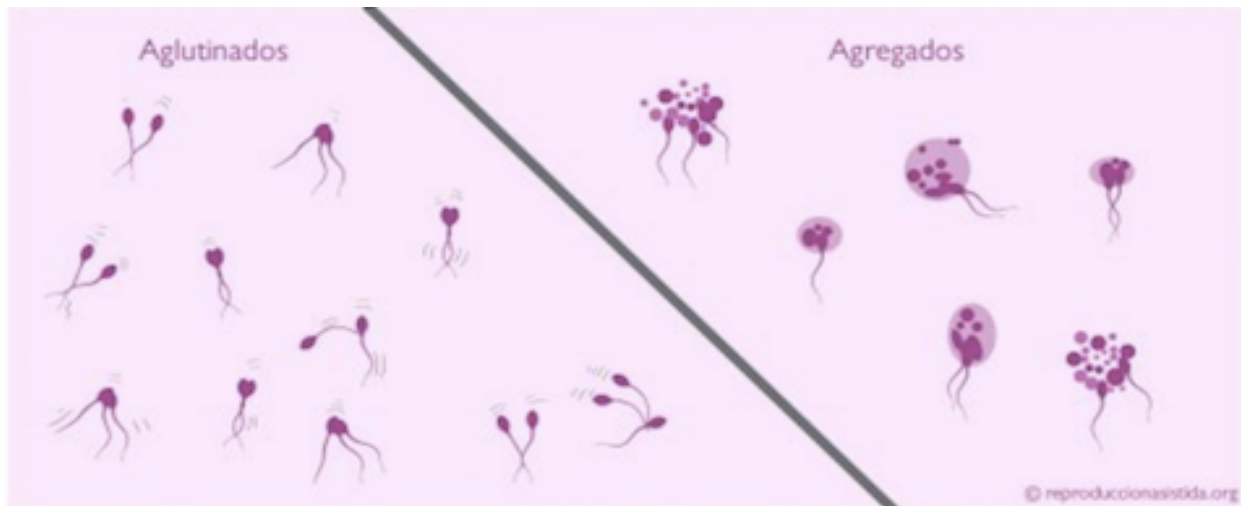
- Observación directa, en fresco, de una gota de líquido seminal homogeneizado y licuado entre porta y cubreobjetos.
- Se observa:
 - presencia o ausencia de espermatozoides y células espermáticas
 - su concentración aproximada
 - movilidad
 - formas anormales
 - aglutinación
 - cristales, leucocitos, hematíes, etc.

1. SEMINOGRAMA

- **EXAMEN MICROSCÓPICO:**

- **AGLUTINACIÓN:**

- Se produce al unirse espermatozoides móviles a otros espermatozoides móviles.
- Su presencia sugiere existencia de anticuerpos antiespermatozoides.
- Indicamos el tipo de aglutinación:
 - A= cabeza con cabeza
 - B= cola-cola
 - C= solo mediante las puntas de las colas
 - D= mixto(cabeza-cabeza, cola-cola)
 - E= maraña de aglutinación
- Y el grado de aglutinación:
 - 1= <10% de los espermatozoides; 2= 10-50%; 3= >50%; 4= Todos
- Principales causas
 - Presencia de anticuerpos en el eyaculado
 - Infecciones
 - Estados febriles
 - Elevado número de espermatozoides

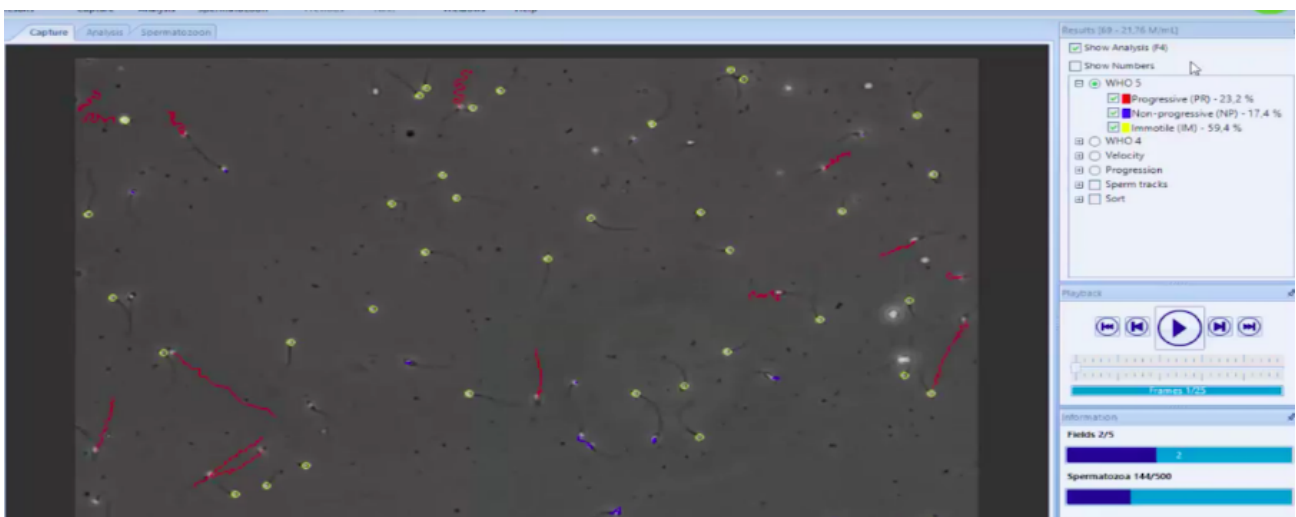


Cuando el especialista observa un grupo de espermatozoides adheridos, pone especial atención en comprobar si los espermatozoides presentan movimiento.

Si los espermatozoides adheridos se mueven, hablamos de aglutinación espermática. Si por el contrario los espermatozoides unidos entre sí están inmóviles se trata de agregación espermática.

1. SEMINOGRAMA

- **2. Estudio de la MOTILIDAD:**
- Es necesario que tengan una motilidad activa para que penetren en el moco cervical y migren hacia el óvulo.
- Depende de:
 - factores extrínsecos (composición del medio en el que se encuentra el espermatozoide)
 - intrínsecos (estructura y función del flagelo).
- Puede medirse mediante **analizadores de imágenes:**



O de forma manual → Técnica:

- Se coloca una gota de muestra sobre porta y cubre (precalentado a 37°C), se deja reposar 1 minuto, y se procede a evaluar la movilidad de 200 espermatozoides por preparación. (duplicados)

1. SEMINOGRAMA

- **EXAMEN MICROSCÓPICO:**

- **2. Estudio de la MOTILIDAD:**

- **Informe:**

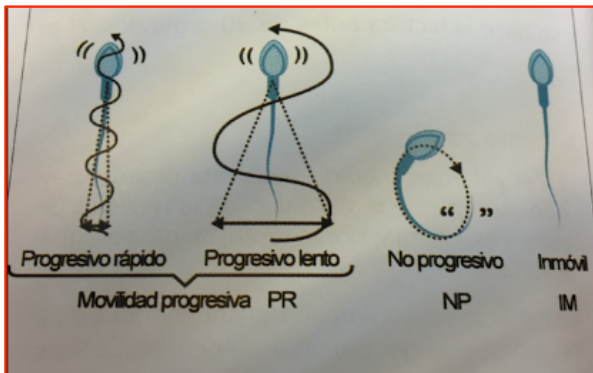
Se registra la motilidad clasificando los espermatozoides:

Progresivo rápido	Categoría A	Grado 3 (+++)	Hipercinético
Progresivo lento	Categoría B	Grado 2 (++)	Semiactivo
No progresivo	Categoría C	Grado 1(+)	Hipocinético
Inmóvil	Categoría D	Grado 0	Inactivo

Según la OMS se agrupan los dos primeros en movilidad progresiva, ya que resulta difícil distinguirlo de forma adecuada.

De forma que la clasificación quedaría:

Interpretación clínica según la OMS



NORMAL	>40% de formas móviles (progresivo + no progresivo) y un 32% con movilidad progresiva
ASTENOSPERMIA	< 40% de formas móviles y/o <32% con movilidad progresiva
NECROSPERMIA	Todas las formas carecen de movilidad o están muertos

Causas de astenospermia: alcohol, tabaco, marihuana,, edad, (>45 años), exposición agentes tóxicos, mala alimentación, varicocele, exposición al calor.

1. SEMINOGRAMA

- **EXAMEN MICROSCÓPICO:**

- **3. Estudio de la VITALIDAD:**

El porcentaje de espermatozoides viables siempre debe ser igual o superior al de espermatozoides móviles.

- **TÉCNICAS:**

- 1.- COLORANTES SUPRAVITALES
- 2.- TEST HIPOSMÓTICO

- **1.-Técnica: EOSINA/NIGROSINA**

Los espermatozoides muertos sufren una modificación de la permeabilidad de su membrana a la eosina y, en presencia de este colorante, la cabeza se colorea en rosa mientras que las cabezas de las formas vivas quedan incoloras.

Se utilizan dos colorantes, uno tiñe a los espermatozoides y el otro sirve de contraste tiñendo el fondo.

- Eosina al 0,5% en suero fisiológico.
- Nigrosina al 1% en suero fisiológico (también puede suprimirse).

De dos formas diferentes, coloración en fresco o en frotis teñido.

- **A) Montaje húmedo para lectura rápida en fresco.**

- - Se mezcla en un portaobjetos una gota de líquido seminal y una gota de la solución de eosina durante 20 segundos.
- - Se añade una gota de solución de nigrosina y se homogeneiza.
- - Se coloca un cubreobjetos y se observa rápidamente para evitar la desecación con objetivo de 40x.

- **B) Frotis para observar con el objetivo de inmersión.**

- - Se mezcla en un extremo del portaobjetos una gota de líquido seminal y una gota de eosina durante 20 segundos.
- - Se añade una gota de solución de nigrosina y se homogeneiza.
- - Se extiende la muestra con ayuda de un extensor haciendo un frotis fino.
- - Se deja secar y se observa con objetivo de inmersión.
- Se observarán varios campos contando espermatozoides teñidos y sin teñir, → porcentajes correspondientes.

1. SEMINOGRAMA

• **EXAMEN MICROSCÓPICO:**

• **3. Estudio de la VITALIDAD:**

• ♦ **2.-Técnica: TEST HIPOOSMÓTICO.**

• **Se introduce a los espermatozoides en un medio de menor []**

• Se observan dos tipos de espermatozoides:

- Unos con la cabeza hinchada y el flagelo enrollado. → + al test → VIVOS (membrana es funcional y semipermeable)
- Otros sin hinchar → - al test → MUERTOS
- Un espermatozoide no teñido (VIVO) puede ser + o – al test hipoosmótico(la membrana puede ser funcional o no)
- Un espermatozoide teñido (MUERTO) SIEMPRE será – al test hipoosmótico

• **Informe**

• Los resultados se expresan como porcentaje de espermatozoides teñidos y además se indica el **ÍNDICE DE VITALIDAD** que es la inversa del número de espermatozoides teñidos.

• ♦ **Interpretación clínica**

- Se considera normal una coloración con eosina de menos del 40%. Es decir, un índice de vitalidad del 58% como límite inferior.
- La vitalidad también sirve para poner de manifiesto errores preanalíticos. Si el 100% de los espermatozoides son inmóviles hay que valorar:
 - Problemas en la obtención (Detergentes, espermicidas)
 - Transporte inadecuado (Tª, tiempo)
 - Síndrome de Kartagener (trastorno congénito que afecta a la estructura de los flagelos, 100% espermatozoides inmóviles, pero los resultados de la vitalidad son aceptables)

1. SEMINOGRAMA

• **EXAMEN MICROSCÓPICO:**

• **4. Recuento**

• El cálculo del número de espermatozoides en la muestra seminal puede realizarse de forma automática o manualmente. El método manual es similar al recuento de células sanguíneas y consiste en que después de la licuefacción del semen, los espermatozoides pueden contarse en un hemocitómetro (OMS: NEUBAUER IMPROVED) tras dilución inicial de la muestra o sin dilución en cámara de Makler.

• Como líquido de dilución suele emplearse la solución diluyente de **Macomber y Saunders** de formol-bicarbonato. La composición es la siguiente:

- Bicarbonato sódico 5 g.,
- Formol al 40% 1mL.
- Agua destilada c.s.p. 100 mL.

• **Recuento en cámara (hemocitómetro)**

• - Homogeneización de la muestra

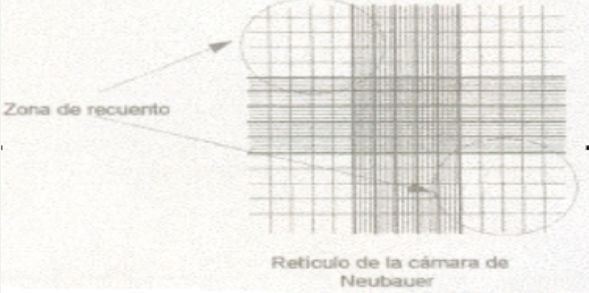
• - Dilución de la muestra. Si en la observación microscópica precedente se ha apreciado un gran número de espermatozoides o por el contrario éstos son escasos, conviene utilizar diferentes diluciones de la muestra.

Estimación del número de espermatozoides	Dilución adecuada
Menos de 5 millones/mL	1/2
5-20 millones/mL	1/5
20-40 millones/mL	1/10
40-100 millones/mL	1/20
Más de 100 millones/mL	1/40

1. SEMINOGRAMA

• **EXAMEN MICROSCÓPICO:**

• **4. Recuento manual**

<p>◆ Llenado de la cámara de recuento (Neubauer).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se desechan las 3 o 4 primeras gotas. - Se llena la cámara y se deja reposar aproximadamente 2 minutos para que sedimenten los espermatozoides. - Observación microscópica: con el objetivo 10x se comprueba que la distribución es homogénea y no hay espermatozoides aglutinados. - Se cuentan en 2 mm² (dos cuadrados grandes de las esquinas de 1 mm. x 1 mm.). 	 <p>Zona de recuento</p> <p>Reticulo de la cámara de Neubauer</p>
<p>◆ Cálculo:</p> <p>Se expresa como número de espermatozoides/ml, por lo que se tendrán que realizar correcciones:</p> <p>Número de espermatozoides contados = N.C.</p> <p>✓ Volumen de cada cuadrado contado = 1 mm x 1 mm x 0,1 mm = 0,1 mm³</p> <ul style="list-style-type: none"> • Como se han contado los espermatozoides de 2 cuadrados, el volumen total contado (V.C.) será: • V.C. = 0,1 mm³ x 2 = 0,2 mm³ ✓ Si se han encontrado N.C. espermatozoides en un volumen de 0,2 mm³, en 1 mm³ habrá: • Número de espermatozoides/mm³ = N.C. x 1/0,2 = N.C. x 5 ✓ Como se ha diluido la muestra, el resultado obtenido anteriormente debe multiplicarse por el inverso de la dilución (x20) y para obtener la cifra en ml, se multiplica por 1.000. 	<p>Número de espermatozoides/ml = N.C. x 5 x 20 x 1.000 = N.C x 100.000</p>

1. SEMINOGRAMA

• **EXAMEN MICROSCÓPICO:**

Interpretación clínica	Recuento
NORMOZOOSPERMIA	(OMS) → 2010: >15 millones/ml
OLIGOZOOSPERMIA	OMS → 2010: <15 millones/ml
AZOOSPERMIA	Ausencia de espermatozoides maduros Presencia de células de espermiogénesis
ASPERMIA	Ausencia de espermatozoides Ausencia de células de espermiogénesis

5. Fórmula espermática:

El conocimiento de las características morfológicas de los espermatozoides.

Se valora mediante recuentos diferenciales de los tipos de espermatozoides morfológicamente normales y anormales con extensiones teñidas.

◆ **Técnica**

- Extensión de la muestra:
 - Sobre un portaobjetos de forma similar a la de un frotis sanguíneo.
 - Si el recuento de espermatozoides es bajo, se hará una extensión más gruesa que asegure suficientes formas para el recuento.
- Fijación:
 - Se cubre la extensión con alcohol metílico durante 5 minutos, renovando el alcohol, si fuera necesario y se deja secar al aire o en estufa a 37 °C.
- Tinción:
 - Hematoxilina eosina, Papanicolau, May Grünwald-Giemsa.

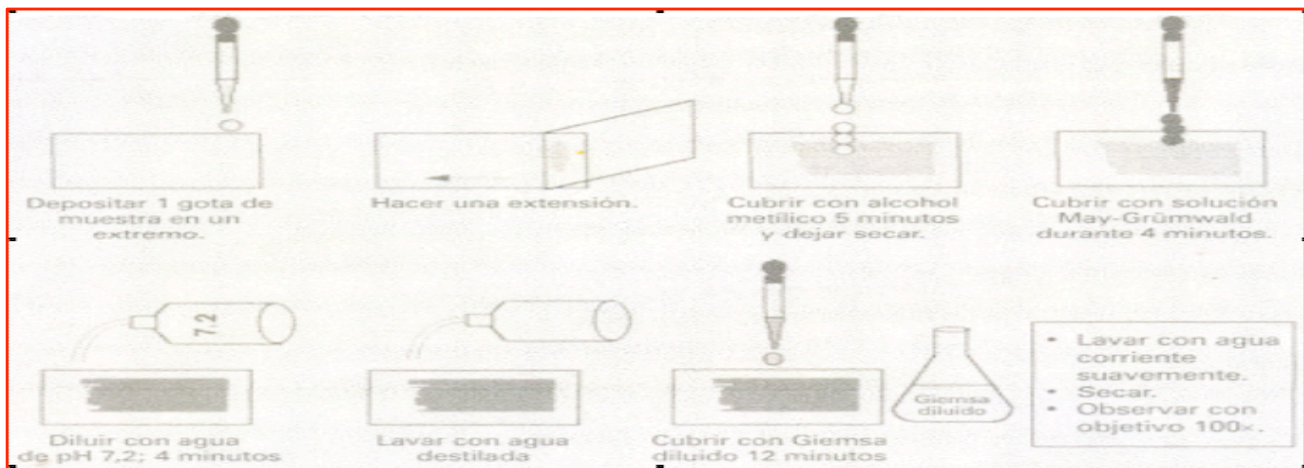
1. SEMINOGRAMA

• EXAMEN MICROSCÓPICO:

5. Fórmula espermática:

• - Tinción de May Grünwald-Giemsa. (PREVIA EXTENSIÓN Y FIJACIÓN)

- 1.- Cubrir la preparación con solución May Grünwald-Giemsa durante 4 minutos.
- 2.- Diluir con la misma cantidad de gotas con tampón de pH 7,2, durante 4 minutos.
- 3.- Decantar y lavar con agua destilada suavemente.
- 4.- Cubrir con Giemsa diluido (3 gotas colorante/ml tampón pH 7,2) durante 12 minutos.
- 5.- Lavar con agua de grifo
- 6.- Dejar secar al aire
- 7.- Se debe estudiar con el objetivo de inmersión al menos 200 espermatozoides.



1. SEMINOGRAMA

• EXAMEN MICROSCÓPICO:

5. Fórmula espermática:

• - Tinción de Fucsina fenicada. (PREVIA EXTENSIÓN Y FIJACIÓN con metanol 5min)

- 1.- Cubrir la extensión con fucsina y luego con agua destilada.
- 2.- dejar durante 5 minutos.
- 3.- Lavar con agua de grifo.
- 4.- Dejar secar al aire.
- 5.- Se debe estudiar con el objetivo de inmersión al menos 200 espermatozoides.

1. SEMINOGRAMA

• EXAMEN MICROSCÓPICO:

5. Fórmula espermática:

NORMAL		
ANOMALÍAS DE LA CABEZA	<ul style="list-style-type: none"> - Cabezas duplicadas - Cabezas gigantes - Cabezas pequeñas - Cabezas inmaduras - Cabezas redondas - Cabezas alargadas - Cabezas amorfas - Cabezas encogidas 	
ANOMALÍAS DEL CUELLO	<ul style="list-style-type: none"> - Engrosado - Alargado - Inmaduro - Ausente 	
ANOMALÍAS DE LA COLA	<ul style="list-style-type: none"> - Bífida - Mal implantada - Enrollada - Ausente 	

El **límite inferior** para considerar una muestra normal en cuanto a morfología es que más de un 4% de los espermatozoides observados se incluyan en la categoría "normal"

Si el índice de anormales es mayor del 96% = TERATOZOOSPERMIA.

Existe criterio + estricto → Criterios morfológicos de Kruger → > 86% anormales = TERATOZOOSPERMIA
Los flagelos y cabezas sueltas no se cuentan, excepto si son muy abundantes.

Globozoospermia: espermatozoides sin acrosoma, no pueden fertilizar ovocitos in vivo, si in vitro.

OTROS ESTUDIOS:

• ANTICUERPOS ANTIESPERMATOZOIDES

- Ac generados frente a antígenos específicos del espermatozoide.
- La presencia de estos Ac dificulta la penetración de los espermatozoides en el moco cervical y por tanto la fertilización in vivo.

• Tipo: IgG, IgA

• Se fijan:

- cabeza, cuello (Interés clínico) → test acrilamida(info sobre localización)
- flagelo (movilidad)

• Detección:

- MAR test :
- Bolitas de latex unidas a anticuerpos específicos (Y)
de los anticuerpos antiespermatozoides (Y).

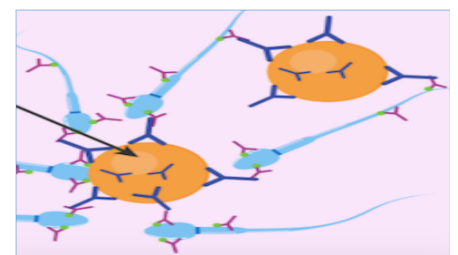
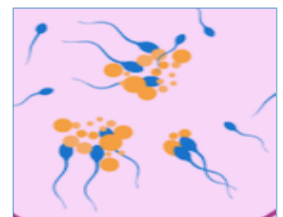
Si hay anticuerpos antiesperma → + (aglutinación)

Si no hay anticuerpos antiesperma → - (no aglutina)

Tto: inmunosupresión con corticoesteroides

• Resultados:

- reacción +: > 50% espermatozoides móviles tienen esferas de anticuerpos adheridas → Indica la presencia de Ac antiespermatozoides.



OTROS ESTUDIOS:

• CÉLULAS NO ESPERMÁTICAS

- Células epiteliales (sin interés)
- Leucocitos: si > 1 millón /ml PIOSPERMIA (infección)
- Espermátides y espermátocitos: alteraciones en la espermatogénesis.

• BIOQUÍMICA SEMINAL

- Estudio de la concentración de diferentes moléculas en el plasma seminal.

• Objetivo: funcionamiento de las glándulas.

- Citrato*, zinc, fosfatasa ácida → PROSTATA
- Carnitina, glucosidasa neutra (isoenzima)* → EPIDÍDIMO
- Fructosa* → VESÍCULAS SEMINALES

(Se suele elegir un solo marcador)

Obtención del plasma seminal:

1. Centrifugar una alícuota a 1000 r.p.m/10min
2. Decantar el sobrenadante
3. Conservar a -20°C

BIOQUÍMICA SEMINAL

• DETERMINACIÓN DE CITRATO

- Necesario una desproteinización
- Técnica espectrofotométrica de punto final a 340nm.

• DETERMINACIÓN DE CARNITINA

- Necesario una desproteinización del plasma.
- Técnica espectrofotométrica de punto final.

• DETERMINACIÓN DE GLUCOSIDASA NEUTRA

- Se determina la isoenzima α -1,4 glucosidasa.
- Uso de un inhibidor de otras hidrolasas: SDS
- Disminuida en pacientes con oclusión de los conductos, vasectomía.

• DETERMINACIÓN DE FRUCTOSA

- Necesario una desproteinización y la eliminación de la glucosa presente en el plasma seminal.

VALORES DE REFERENCIA

Tabla 3. Evolución de los valores de referencia en las distintas ediciones de los manuales de la OMS

Edición	2. ^a	3. ^a	4. ^a	5. ^a
Año	1987	1992	1999	2010
Volumen (ml)	2	2	2	1,5
Concentración espermática (x 10 ⁶ /ml)	20	20	20	15
Espermatozoides/eyaculado (x 10 ⁶)	40	40	40	39
Movilidad progresiva (%)	50	50	50	32
Vitalidad (%)	50	75	75	58
Morfología normal (%)	50	30	(15)	4
pH	7,2-7,8	7,2-8,0	≥ 7,2	≥ 7,2
Leucocitos (x 10 ⁶ /ml)	< 1	< 1	< 1	< 1
Anticuerpos (MAR, %)	< 10	< 10	< 50	< 50
Anticuerpos (IBT, %)	< 10	< 20	< 50	< 50
Zinc en plasma seminal (μmol/eyaculado)	≥ 2,4	≥ 2,4	≥ 2,4	> 2,4
Fructuosa (μmol/eyaculado)	≥ 13	≥ 13	≥ 13	≥ 13
Glucosidasa neutra (mU/eyaculado)	—	≥ 20	≥ 20	≥ 20