

PARAMETROS SEMINALES Y CAPACIDAD FERTILIZANTE DE LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

Nelia G. Moreno, Gabriela A. Bellabarba,
Ana M. Montarroso y Walter Bishop.
Laboratorio de Neuroendocrinología y Reproducción.
Facultad de Medicina. Universidad de los Andes. Apartado
42. Mérida, Venezuela.

RESUMEN

Se evaluaron los parámetros seminales clásicos (densidad, motilidad y morfología), la integridad funcional de la membrana plasmática (TIMP) y la capacidad fertilizante "in vitro" (TPOh) de espermatozoides humanos, en 80 muestras de semen provenientes de donantes sanos y pacientes de una consulta de esterilidad. Los resultados muestran que cuando la motilidad progresiva es mayor de 15 millones por ml y el porcentaje de cabezas anormales es inferior al 40%, los valores del TIMP y el TPOh son superiores al 50%. Cuando los valores del TIMP son inferiores al 50% la capacidad fertilizante, medida por el TPOh, es muy baja (< 10%). Esta relación entre los resultados del TIMP y los del TPOh nos permite proponer la incorporación del TIMP como una prueba funcional adicional al espermograma de rutina para evaluar la capacidad fertilizante de una muestra de semen, cuando no existe la posibilidad de realizar el TPOh.

SEMINAL PARAMETERS AND FERTILIZING ABILITY OF HUMAN SPERMATOZOA

ABSTRACT

Classical seminal parameters (density, motility and morphology), functional integrity of plasmatic membrane (TIMP) and "in vitro" fertilizing ability (TPOh) of 80 samples of human sperm from healthy donors and infertile patients were examined. When progressive motility is greater than 15 millions per ml and abnormal head rate is below 40 per cent. TIMP and TPOh values are greater than 50 per cent. When TIMP values are inferior to 50 per cent, fertilizing ability (measured as TPOh) is low (< 10%). This relation between TIMP and TPOh results allows us to propose TIMP as an additional functional test in routine spermogram when TPOh evaluation is not available.

INTRODUCCION

La capacidad fertilizante de los espermatozoides humanos es un parámetro relacionado con la fertilidad masculina que puede evaluarse indirectamente mediante el espermograma de

rutina^{5,12} y directamente "in vitro" utilizando el test penetración del óvulo desnudo de hamster (TPOh)¹⁷. Este ensayo tiene alta correlación con el porcentaje de óvulos humanos fertilizados "in vitro"^{13,19} y permite identificar una posible causa de infertilidad en aquellos casos en que los parámetros convencionales del semen indican una completa normalidad^{1,4,10,16}.

La capacidad fertilizante es un fenómeno en el cual hay una participación activa de la membrana plasmática de los espermatozoides. Recientemente, Jeyendran y col.¹¹ han desarrollado una técnica sencilla que evalúa la integridad funcional de esta membrana; se trata del test de hinchamiento espermático en solución hiposmolar (TIMP), el cual según estos mismos autores, da resultados altamente correlacionados con el porcentaje de penetración de óvulos de hamster (TPOh). Otros investigadores⁹, sin embargo, aseveran que no existe relación entre ambas pruebas ya que cada una de ellas evalúa aspectos o cualidades diferentes del espermatozoide. Igualmente contradictorias son las correlaciones entre densidad, motilidad y morfología espermáticas y los resultados de las pruebas antes mencionadas^{9,11,14,22}. El objetivo de este trabajo fue determinar la relación entre los parámetros clásicos del semen y los tests funcionales TIMP y TPOh.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 80 muestras de semen provenientes de donantes voluntarios y pacientes de la consulta de esterilidad del Centro de Endocrinología y Reproducción (Mérida). Las muestras se obtuvieron por masturbación, con una abstinencia sexual de 48 horas y se realizó el análisis del semen de acuerdo a la metodología sugerida por la O.M.S.²⁰

Para la realización del TIMP se mezclaron 100 µl de semen completo con 1 ml de la solución hiposmolar (mezcla de partes iguales de una solución de fructuoso 150 mOsm y de citrato de sodio 150 mOsm) y se incubó a 37 °C por media hora. La positividad del test se estableció según la metodología original¹¹.

El TPOh se realizó de acuerdo con lo descrito por Yanagimachi y col.²¹. Los espermatozoides se lavaron y capacitaron utilizando la técnica de migración espermática ascendente o "swim up" al medio B.W.W. (Biggers, Whitten and Whittingham)³ con seroalbúmina bovina (SAB) al 3% durante 3 horas. Los óvulos se obtuvieron por superovulación en hamsters (*Mesocricetus auratus*) maduras, tratadas intraperitonealmente con 30 UI de PMS (Pregnant Mare's Serum) y 56 horas más tarde, 30 UI de hCG (human Chorionic Gonadotropin). Quince horas después los óvulos se aspiraron de la ampolla tubárica y se desnudaron mediante tratamiento enzimático (hialuronidasa testicular bovina al 1% por 15 minutos y tripsina pancreática bovina al 1% por 1 minuto). Luego de lavados sucesivos, unos 20-25 óvulos suspendidos en 250 µl de B.W.W. con SAB al 3%, se incubaron por 3-4 horas con 250 µl de la suspensión de espermatozoides lavados y capacitados (5×10^6 aproximadamente). Luego los óvulos se observaron en un microscopio de contraste de fase y se consideró como fertilizado todo aquel que presentara al menos una cabeza espermática descondensada en el ooplasma (Figura.1). Los pasos seguidos en la presente metodología se resumen en la Fig. 2.

Recibido: 13/10/87.

Aceptado: 9/8/88.

1. Relación entre parámetros clásicos del semen y los tests funcionales (TIMP) y TPOh).

Los contajes espermáticos mayores de 40×10^6 se relacionaron con valores promedio del TIMP y del TPOh del 60% (Tabla I). Cuando la motilidad progresiva expresada en millones por ml de semen fue mayor de 15, los resultados promedio del TIMP y TPOh fueron también superiores al 60% (Tabla I).

Moreno N. G. et al
En las muestras con morfología normal superior al 40% (Tabla I). La anomalía morfológica de los espermatozoides más frecuente fue la de cabeza. Cuando el porcentaje de cabezas anormales fue superior al 40%, los valores promedio de TIMP y del TPOh fueron bajos (47% y 26%, respectivamente) (Tabla I).

TABLA I. RELACIONES ENTRE LOS PARAMETROS SEMINALES CLASICOS, EL TIMP Y EL TPOh.

Parámetro Seminal	valores límites	TIMP (%) x±ES	P	TPOH (%) x±ES	P
Densidad espermática ($\times 10^6$ /ml)	< 40	51±3	<0,0025	34±12	< 0,025
	> 40	61±2		59± 4	
Motilidad progresiva ($\times 10^6$ /ml)	> 15	48±3	<0,0005	18±11	< 0,0005
	> 15	63±2		60± 4	
Morfología normal (%)	< 40	50±3	0,0005	37±11	< 0,025
	> 40	61±2		60± 4	
Cabezas anormales (%)	< 40	60±2	0,0005	59± 4	< 0,01
	> 40	47±4		26±16	



Fig. I Ovulo de hamster con varias cabezas espermáticas descondensadas (flechas) en su citoplasma. Preparación en fresco. 8.000 x (400 x 20).

2. Relación entre los resultados del TIMP y los del TPOh puede apreciarse en la Fig. 3. En las muestras del semen en las que menos del 50% de los espermatozoides respondieron al TIMP, el porcentaje de penetración fue significativamente menor ($p < 0,0005$) que el observado en las muestras en las que más del 50% de sus espermatozoides dieron positivo el TIMP.

DISCUSION

Los parámetros convencionales del semen (densidad, motilidad y morfología espermáticas) han sido relacionados con algunos tests funcionales, lo cual ha generado opiniones diversas y contradictorias. La densidad espermática según Chang y col⁹, no guarda relación con el funcionamiento de la membrana plasmática. Asimismo, ciertos investigadores que han estudiado los contajes espermáticos y el TPOh aseveran que no existe correlación entre ellos^{10,14,16,22}. Sin embargo, otros han demostrado que la relación existe no solo con el porcentaje de óvulos de hamsters penetrados¹⁸ sino también con la fertilidad clínica (número de nacimientos)⁶.

Nuestros resultados indican que cuando la densidad espermática es superior a 40 millones por ml, hay integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide y la capacidad fertilizante es buena (TIMP y TPOh > 60%).

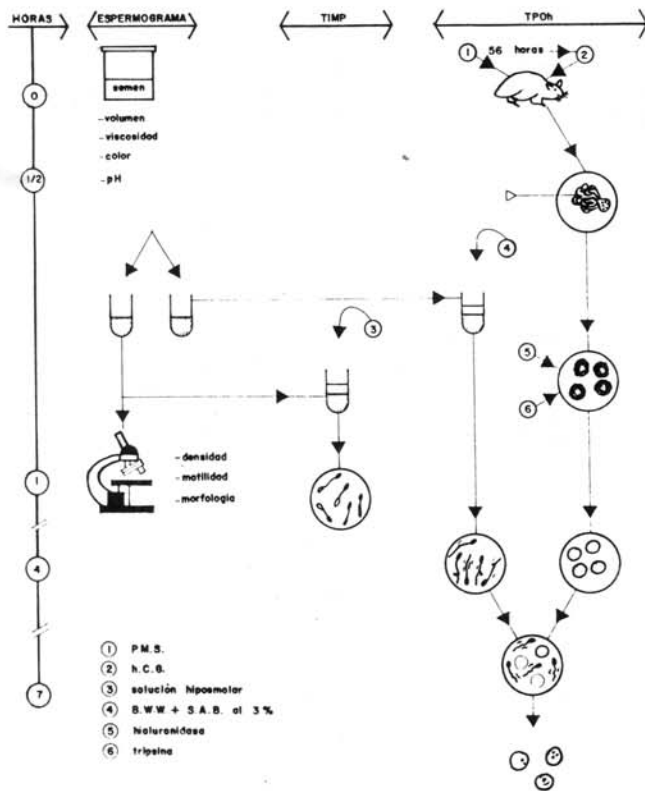
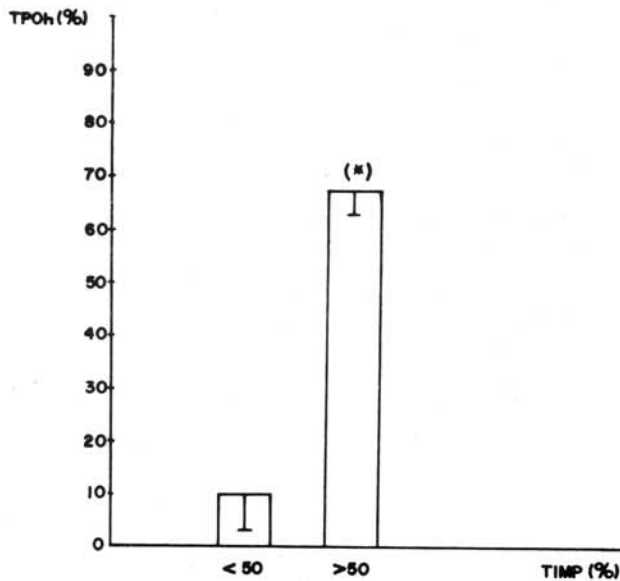


Fig. 2 Pasos metodológicos para la realización del espermograma, el TIMP y el TPOh.



(*) P < 0,0005

Fig. 3 Relaciones entre el TIMP y el TPOh.

La motilidad espermática (expresada en porcentaje, millones por ml o millones por eyaculado) ha sido correlacionada con las mencionadas pruebas funcionales (TIMP y TPOh)^{8,9,10,16,22}. Aunque los resultados son controversiales, algunos autores además de encontrar altas correlaciones entre estas variables, han determinado que 12 millones de espermatozoides móviles por ml permite la identificación correcta de donantes fértiles como tales². Nosotros pudimos establecer que un valor similar (15 millones) fue el límite por debajo del cual las respuestas al TIMP y al TPOh fueron bajas.

Otro parámetro a considerar es la morfología de los espermatozoides, la cual proporciona información importante acerca de su función, pues las formas normales poseen características estructurales consideradas como uno de los factores básicos en la determinación del potencial fertilizante masculino¹⁵. Numerosos autores coinciden en que existe una correlación significativa entre este parámetro y el porcentaje de penetración del óvulo de hamster^{17,18}. También se ha comunicado que un 40% de espermatozoides morfológicamente normales permite la identificación correcta de individuos fértiles con un 100% de especificidad. Esta cifra (40%) coincide con nuestros resultados en los cuales señalamos que aquellas muestras con más del 40% de formas normales dieron un porcentaje de penetración alto.

Al considerar la anomalía morfológica más frecuente, la de la cabeza espermática, observamos que ésta se relaciona con un bajo porcentaje de respuesta a los tests funcionales. Este dato concuerda, en parte, con los hallazgos de quienes han establecido que un aumento en el número de espermatozoides anormales se correlaciona significativamente con una disminución de la fertilidad. Nosotros encontramos que un 40% de cabezas espermáticas defectuosas es una cifra límite por encima de la cual las respuestas al TIMP y al TPOh son bajas; este valor coincide con el propuesto por Bostofte y col⁷, como valor límite de este parámetro, para el pronóstico de la fertilidad masculina. Las alteraciones morfológicas de los espermatozoides, sobre todo aquellas de la cabeza, podrían ser consideradas como causa suficiente para justificar la disminución de la capacidad fertilizante, pues es quizás la porción del espermatozoide más comprometida en los eventos de fusión de membranas de los gametos que precede a la penetración propiamente dicha.

En lo referente a la relación entre la capacidad fertilizante "in vitro" (TPOh) y el test del hinchamiento espermático (TIMP), nuestros resultados sugieren una asociación muy importante entre ambas pruebas y en este sentido coincidimos con Jeyendran y col¹¹. Estos investigadores muestran que cuando el porcentaje de respuesta al TIMP es inferior al 55%, el TPOh también es menor al 55%. Sobre este particular nosotros observamos que valores del TIMP menores de 50% se relacionan con bajos porcentajes de fertilización "in vitro" (10%); Este valor del TPOh ha sido considerado por numerosos autores como incompatible con la fertilidad masculina¹⁶.

Finalmente resulta necesario comentar que las muestras de semen con buen conteo de espermatozoides móviles progresivo, en general, tienen un alto porcentaje de formas normales; en este particular coincidimos con Makler¹², quien demostró que el mayor porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales se encuentra en la fracción de los móviles. En nuestro trabajo estas dos características (motilidad y morfología normal) se relacionan con una mayor respuesta al TIMP y es-

tas tres, a su vez, con una capacidad fertilizante elevada. La interpretación de tales relaciones nos lleva a concluir que el TIMP podría ser incorporado al espermograma de rutina como un parámetro adicional cuyo resultado, conjuntamente interpretado con la motilidad progresiva en millones por ml y el porcentaje de cabezas anormales, permitiría estimar la capacidad fertilizante cuando no sea posible la realización del TPOh.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue realizado con el financiamiento del Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (C.D.C.H.T.), Proyecto M-252.

REFERENCIAS

- Aitken, R., Best, F., Richardson, D., Djahanbakhch, O., Mortimer, D., Templeton, A. and Lees, M. An analysis of sperm function in cases of unexplained infertility: conventional criteria, movement characteristics and fertilizing capacity. *Fertil. Steril.* 38: 212-221, 1982.
- Albertsen, P., Chang, T., Vindivich, D., Robinson, J. and Smyth, J. A critical method of evaluating tests for male infertility. *J. Urol.* 130: 467-475, 1983.
- Biggers, J., Whitten, W. and Whittingham, D. The culture of mouse embryos in vitro. In: *Methods in mammalian Embriology*. Edited by J. Daniels. San Francisco, Freeman and Co. pp. 86-116, 1971.
- Binor, Z., Sokoloski, J. and Wolf, D. Penetration of the zona-free hamster egg by human sperm. *Fertil. Steril.* 33: 321-327, 1980.
- Blasco, L. Clinical tests of sperm fertilizing ability. *Fertil. Steril.* 41: 177-192, 1984.
- Bostofte, E., Serup, J. and Rebbe, H. Relation between sperm count and semen volume, and pregnancies obtained during a twenty-year follow-up period. *Int. J. Androl.* 5: 267-275, 1982.
- Bostofte, E., Serup, J. and Rebbe, H. Relation between morphologically abnormal spermatozoa and pregnancies obtained during a twenty-year follow-up period. *Int. J. Androl.* 5: 379-386, 1982.
- Cohen, J., Mooyaart, M., Vreeburg, J. and Zeilmaker, G. Fertilization of hamster ova by human spermatozoa in relation to other semen parameters. *Int. J. Androl.* 5: 21-224, 1982.
- Chan, S., Fox, E., Chan, M., Tsoi, W., Wang, Ch., Tang, L., Tan, G. and Ho, P. The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routine semen analysis, and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay. *Fertil. Steril.* 44: 668-672, 1985.
- Hall, J. Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova. *Fertil. Steril.* 35: 457-463, 1981.
- Jeyendran, R., Van der ven, H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. and Zaneveld, L. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other sperm characteristics. *J. Reprod. Fert.* 70: 219-228, 1984.
- Makler, A. Distribution of normal and abnormal forms among motile, non-motile, live and dead human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 3: 620-628, 1980.
- Margalioth, E., Laufer, N., Navot, D., Voss, R. and Schenker, J. Reduced fertilization ability of zona-free hamster ova by spermatozoa from male partners of normal infertile couples. *Arch. Androl.* 10: 67-71, 1983.
- Martin, R. and Taylor, P. Reliability and accuracy of the zona-free hamster ova assay in the assesment of male fertility. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 89: 951-956, 1982.
- Overstreet, J. Semen analysis. p.p. 907-9. In: Swerdloff, R. S. Infertility in the male. *Ann. Intern. Med.* 103: 906-916, 1985.
- Rogers, B., Van Campen, H., Ueno, M., Lambert, H., Bronson, R. and Hale, R. Analisis of human speratozoal fertilizing ability using zona-free ova. *Fertil. Steril.* 32:664-670, 1979.
- Rogers, B. The sperm penetration assay: its usefulness reevaluated. *Fertil. Steril.* 43: 821-840, 1985.
- Stenchever, M., Muller, C., Huson, J., Shy, K. and Soules, M. Relationship of hamster ovum sperm penetration assay to seminal fluid analysis in the evaluation of infertile couples. *Arch. Androl.* 14: 65-72, 1985.
- Wolf, D., Sokoloski, J. and Quigley, M. Correlation of human in vitro fertilization with the hamster egg bioassay. *Fertil. Steril.* 40: 53-59, 1983.
- World Health Organization. *Laboratory manual for the examination of human semen and semen cervical mucus interaction*. Press Concern Singapore, 1980.
- Yanaginmachi, R., Yanagimachi, H. and Rogers, B. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 15: 471-476, 1976.
- Zausner-Guelman, B., Blasco, L. and Wolf, D. Zona-free hamster eggs and human sperm penetration capacity: a comparative study of proven fertile donors and infertility patients. *Fertil. Steril.* 36: 771-777, 1981.