

# Espermograma.

## Según los criterios de OMS

*Prof. MSc. Luis Sarabia Villar. e mail: lsarabia@med.uchile.cl*

*Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo.*

*Facultad de Medicina. Universidad de Chile.*

Para curso y Diplomado en su modalidad semipresencial y online certificado por la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, favor escribir al correo del autor (LSARABIA@MED.UCHILE.CL).

*Documento en preparación.*

*Introducción*

El presente texto busca simplificar y ayudar a la comunidad hispano parlante a implementar las recomendaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su reciente manual WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen (fifth edition) hasta la publicación en español del manual. En este caso indicaremos las recomendaciones de la OMS y comentaremos estas indicaciones con la experiencia del autor.

En la década del 50 aparecen las importantes contribuciones de MacLeod donde comparaba los resultados obtenidos del análisis seminal de personas fértiles con los obtenidos de pacientes con problemas para concebir un hijo. Se comprobó una fuerte correlación entre la movilidad y fertilidad potencial y que la probabilidad de la concepción dependía del porcentaje de células activas y de la calidad de la movilidad, MacLeod (1951) encontró que por encima de 20 millones por mL. no había aumento de la fertilidad potencial. De sus trabajos surgen las condiciones mínimas que debe reunir un espermatozoide para ser considerado con capacidad fecundante. Sin embargo, en base a estos valores límites, debe tenerse en cuenta que si algún resultado es inferior al valor mínimo correspondiente, debe compensarse con un aumento correlativo de otro y que siempre se habla en términos de probabilidad para que un par conciba un hijo, sin embargo estos valores han cambiado a lo largo del tiempo en vista de la nueva evidencia, estos valores han cambiado a lo largo del tiempo, lo que se aprecia al comparar los manuales de la OMS en sus versiones, primera edición (1982), segunda edición (1987), tercera edición (1992), cuarta edición (1999) y por último la quinta edición WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen” (2010), al cual simplemente nos referiremos como el manual OMS 2010.

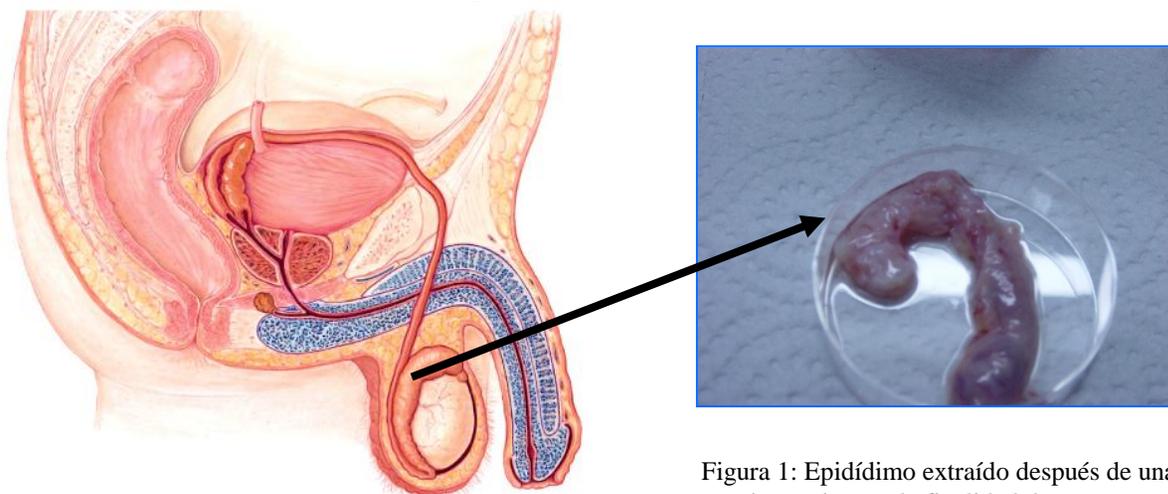


Figura 1: Epidídimo extraído después de una orquiectomía, con la finalidad de recuperar espermatozoides. (Foto L. Sarabia)

El semen normal es una mezcla de espermatozoides suspendidos en las secreciones que provienen del testículo y epidídimo (fotografía), las que se combinan al momento de la eyaculación con las secreciones de la próstata, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales. Por lo tanto, el análisis del semen provee información sobre la producción de espermatozoides en los túbulos seminíferos y condición fisiológica de estos tejidos.

## **RECOLECCION DE LA MUESTRA Y ENTREGA.**

Las indicaciones se deben entregar al paciente en forma escrita y oral, de una forma clara, en lo referente a la recolección y transporte del semen. El manejo de la muestra debe ser muy cuidadoso en el laboratorio, ya que toda muestra biológica puede ser potencialmente peligrosa por la presencia de virus y bacterias patógenas.

- a) La muestra debe ser recolectada por masturbación. El eyaculado se recoge en un frasco limpio, estéril, de boca ancha, cerca del laboratorio para así, limitar el tiempo de exposición del semen a las fluctuaciones de la temperatura y mantener el control entre colección de la muestra y su análisis. Debe mantener la temperatura entre los 20 y 37° C a temperaturas inferiores a 5° C los espermatozoides experimentan el “Schock térmico” que se caracteriza por la disminución de la movilidad de manera irreversible. Sin embargo, excepcionalmente una muestra puede ser colectada en casa después de una demostrada inhabilidad del paciente de producir una muestra por masturbación cerca del laboratorio. La movilidad espermática declina con el tiempo y las variaciones de temperatura. En estos casos hay que ser muy claros y dar las instrucciones por escrito y oralmente al paciente.

### **Instrucciones para el paciente (Se entregan por escrito)**

- 1.- La muestra debe estar completa. (Esto es esencial para un correcto análisis),** oralmente se le puede explicar al paciente que la primera porción de l líquido seminal contiene la mayor cantidad de espermatozoides.
- 2.-Deberá rotular el frasco con el nombre del paciente y hora de emisión del eyaculado.**
- 3.-Deberá entregar la muestra al laboratorio máximo dentro de una hora de emitida.**
- 4.-Durante el transporte al laboratorio, la muestra debe ser mantenida entre 20 °C y 37 °C**

El laboratorio por su parte indicará la hora de recepción y análisis de la muestra junto a la especificación que la muestra fue obtenida fuera del laboratorio.

- b) Cuando la muestra no se puede recolectar por masturbación se debe utilizar un condón especial para recolección de semen. Ningún otro tipo de condón es recomendable. El coitus interruptus no es un medio adecuado para recolectar la muestra.
- c) El paciente debe tener un mínimo de 2 días de abstinencia sexual, pero no más allá de los 7 días de abstinencia (ojala con una abstinencia constante en cada muestra del mismo paciente). Se debe procurar que el tiempo de abstinencia sea registrado en días para estandarizar los protocolos de trabajo. La abstinencia debe ser valorada de acuerdo a la frecuencia de las relaciones sexuales en la pareja. Con un menor período de abstinencia a la

media sexual, se puede producir una disminución en la densidad espermática o del volumen seminal. Con una abstinencia mayor a los 7 días, se puede ver incrementado el número de espermatozoides inmóviles y morfológicamente alterados.

Episodios febriles, intervenciones quirúrgicas o tratamientos farmacológicos recientes deberían aplazar el espermiograma hasta después de 70 días después (ciclo espermatogénico).

d) Dos muestras como mínimo son necesarias para la evaluación inicial, si los resultados entre ambas muestras son marcadamente diferentes, muestras adicionales deben ser evaluadas.

e) El intervalo entre cada toma de muestra no debe ser menor a 7 días ni mayor a 3 semanas.

f) La recolección de la muestra debe ser completa. Es importante señalar que la primera porción del eyaculado emitido es la que contiene la mayor concentración de espermatozoides (75 % aproximadamente), y por esta razón es importante que no se pierda, de lo contrario se pide una nueva muestra para realizar el análisis con el mismo rango de abstinencia antes señalada, las últimas porciones eyaculadas se caracterizan porque predominan los espermatozoides inmóviles y de mala morfología, en donde la segunda fracción es predominantemente de origen prostático y la tercera (última) fracción es predominantemente de origen de las glándulas seminales.

g) El frasco de recolección debe ser adecuadamente rotulado con los datos del paciente, con la fecha y la hora de recolección de la muestra y en presencia del paciente para evitar posteriores errores de rotulación.

### **Recolección de la muestra para reproducción asistida o microbiología.**

La finalidad es disminuir al máximo la posibilidad de contaminación principalmente de bacterias comensales que están en la piel y que podrían contaminar la muestra. Por lo tanto, todo el material a utilizar debe ser estéril.

En estos casos el paciente debería

**1.- Orinar**

**2.- Lavar sus manos y el pene con jabón.**

**3.-Secar sus manos y pene con toallas desechables.**

**4.-Eyacular dentro del frasco.**

### **Recolección de la muestra mediante condón.**

Una muestra puede ser colectada en condón durante una relación sexual solo bajo circunstancias excepcionales, tal como demostrada incapacidad de producir una muestra por masturbación. Condiciones a tomar en cuenta.

1.- Solo condones no tóxicos diseñados especialmente para no dañar a los espermatozoides se podrán entregar al paciente por el laboratorio.

2.- Se deberá entregar al paciente las instrucciones precisas para usar el condón, cerrarlo y transportarlo hasta el laboratorio.

3.- Durante el transporte hasta el laboratorio, la muestra deberá mantenerse entre 20 °C y 37 °C.

4.- El examen deberá consignar que la obtención de la muestra fue por condón y fuera del laboratorio.

Nota: No se deberán usar condones de látex comunes ya contiene agentes que interfieren con la movilidad espermática.

El coito interruptus no es indicado para la recolección de semen ya que la primera porción del eyaculado, contiene la mayor concentración espermática, y esta puede perderse. Además, se puede producir la contaminación de la muestra y una baja del pH debido a la acidez de los fluidos vaginales que podrían además afectar a la movilidad espermática.

Nota: Hay que tomar en cuenta que si el hombre no puede obtener una muestra seminal por masturbación, se recomienda la obtención con condón apropiado y entregado por el laboratorio o en último caso por el test post coital que entregara la información de sus espermatozoides, teniendo en consideración el efecto de los fluidos vaginales sobre los espermatozoides

### **Los pasos básicos en el análisis del semen son los siguientes:**

- 1.- A los 0-5 minutos después de emitida la muestra, se registran los datos del paciente y se coloca en una incubadora a 37° C. hasta que licuó.
- 2.- A los 20-25 minutos, se evalúa la licuefacción, la apariencia visual y el olor.
- 3.- A los 30-60 minutos, se evalúa la viscosidad, la movilidad espermática, la agregación/aglutinación espermática, otros tipos celulares y el debris. Se realizan los test para anticuerpos, se evalúa la vitalidad espermática. Se hacen las diluciones para determinar la concentración espermática, se separan 100 µL de semen para evaluar células inflamatorias, se tiñen las láminas para evaluar la morfología espermática, se recupera y centrifuga el semen para el análisis bioquímico posterior si corresponde.
- 4.- Mas tarde, se hace el recuento de espermatozoides en una cámara Neubauer. Si hay un número > a  $1 \times 10^6$  células redondas/mL en el semen, se hace una evaluación de células inflamatorias, se tiñen los frotis para evaluación de la morfología espermática y de células redondas.
- 5.- En el mismo día o después si la muestra es congelada, se realiza el análisis bioquímico de las secreciones de la próstata (zinc), vesícula seminal (fructuosa) y epidídimo ( $\alpha$ -glucosidasa).

## MANIPULACIÓN INICIAL DE LA MUESTRA.

Las muestras de semen pueden tener agentes infecciosos peligrosos (VIH, hepatitis, herpes, gonorrea, sífilis, etc.). La utilización de vestimenta adecuada, guantes, así como evitar cualquier contacto directo con la muestra por parte del personal debe ser de estricto cumplimiento.

### EXAMEN MACROSCOPICO

El análisis debe ser hecho mediante inspección simple inmediatamente después de la liquefacción, preferiblemente antes de los 30 minutos, pero no más allá de una hora, para prevenir la deshidratación o cambios en la temperatura que afectan la calidad del líquido seminal.

**Rango de Valores Normales Según O.M.S, 2010 “WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen”** Entre paréntesis se indica el rango de valores “límites inferiores”.

**LICUEFACCIÓN:** (Tiempo normal entre 15-60 minutos a 37 °C).

Inmediatamente después de la eyaculación la muestra es típicamente una masa semisólida y coagulada. Dentro de unos pocos minutos, a temperatura ambiente, la muestra de semen comienza a licuarse, Hacia los 15 minutos la muestra debería estar licuada. Hay que tener presente que la presencia de moco puede interferir en el análisis y rara vez la muestra no licua antes de una hora, si esto no ocurriese dentro de la hora se debe registrar como licuefacción incompleta a la hora.

Una vez licuada la muestra, se debe mezclar suavemente el semen con un movimiento rotatorio para reducir el error en la determinación de la concentración espermática.

El semen normal puede contener cuerpos gelatinosos de origen prostáticos normales que no se licuan pero que no parecen tener importancia clínica. Sin embargo, los hilos de moco pueden interferir con la movilidad y recuento espermático.

**Licuefacción retardada:** Ocasionalmente algunas muestras no licuan a la hora y en estos casos, un tratamiento adicional debe ser realizada, mezclando mecánicamente o por digestión enzimática, en estos casos, sin embargo en base a nuestra experiencia no hemos conocido un laboratorio en Latinoamérica que utilice la digestión enzimática y en la última encuesta del Programa para la estandarización del análisis seminal que involucro a 30 expertos latinoamericanos realizadas en Santiago de Chile el 2010, todos indicaron usar en sus laboratorios solo la licuefacción obtenida con jeringa y aguja (licuefacción mecánica), haciendo pasar la muestra a través de una guja



Figura 2: Líquido seminal con viscosidad aumentada.

18G o 19G de 6 a 10 veces. Sin embargo, sabemos que al libera a los espermatozoides del impedimento mecánico que influye sobre la movilidad de los espermatozoides, la movilidad espermática si es que aumenta no representará necesariamente lo que ocurre in vivo.

**CONSISTENCIA:** La viscosidad, está en relación a cómo fluye la muestra desde una pipeta. La muestra debe caer en forma de pequeñas gotas. Si se forma un hilo al caer la muestra desde la pipeta, se dice que hay una viscosidad anormal (filancia). Cuando el hilo que se forma es  $>$  de 2 cm., se dice que hay una viscosidad elevada. La viscosidad elevada se reconoce rápidamente ya que al intentar pipetear la muestra, esta se adhiere fuertemente a la punta de pipeta. Los métodos para bajar la viscosidad son los mismos que para lograr la licuefacción de la muestra.

**APARIENCIA, COLOR, OLOR:** Deben ser evaluados a temperatura ambiente, dentro de la primera hora después de emitida la muestra. Una muestra normal tiene una apariencia homogénea, un color blanco opalescente a gris amarillento y un olor característico. (Se informa como normal). **Un aspecto** translucido se relaciona con una baja concentración espermática y con ausencia de células de la espermatogénesis, leucocitos hematíes o gérmenes y un aspecto heterogéneo se observa cuando queda material sin licuar. **Un Color** Amarillo intenso en los casos que hay leucocitos (piospermia), herrumbre indica presencia de sangre hemolizada (vesiculitis o prostatitis), rojo indica presencia de sangre (hemospermia por traumatismo o neoplasia de las vías seminales). Casi siempre se debe a una afección banal denominada hemospermia crónica y un color verdoso se correlaciona con infección de pseudomonas algunas vitaminas y fármacos pueden alterar el color del líquido seminal. **Olor:** Un olor fecal indica la presencia de *E. coli*.

**VOLUMEN:** ( $\geq 1.5$  mL): El volumen del eyaculado es principalmente aportado por las vesículas seminales y glándula prostática, con un pequeño aporte de las glándulas bulbouretrales y el epidídimo. El volumen del líquido seminal es esencial para obtener el número total de espermatozoides y células no espermáticas en el eyaculado. OMS recomienda el cálculo por simple pesada del frasco sin muestra y luego con muestra tomando en cuenta que la densidad del líquido seminal es aproximadamente de 1 g/mL (Auger et al., 1995) y pesando cada frasco por separado ya que estos por fabricación pueden tener diferentes pesos. Cuando el volumen es muy pequeño se informa sin medirlo, como menor de 0.5 mL. Es frecuente el hallazgo de volúmenes aumentados. Alternativamente OMS recomienda que se puede medir directamente el volumen de la muestra si esta la coloca directamente el paciente en un frasco graduado tipo probeta de 0.1 mL de precisión, con boca ancha, pero en lo personal no hemos visto laboratorios latinoamericanos que

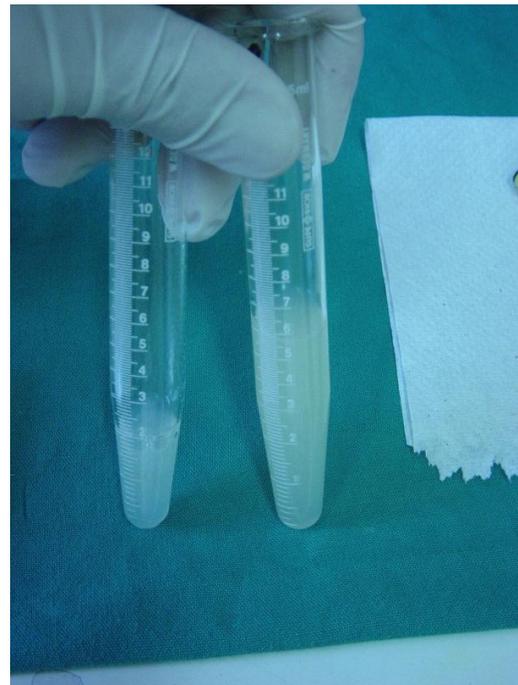


Figura 3: Líquido seminal con apariencia normal.

utilicen este medio. No se recomienda la medición de la muestra pasándola desde el frasco original a una jeringa o probeta ya que se sabe que se pierde entre 0,3 y 0,9 mL de líquido seminal (Cooper et al., 2007).

En nuestro laboratorio hemos encontrado pacientes con volúmenes entre 9 y 13 mL. y dos casos de pacientes con 18 y 19 mL de eyaculado que podrían deberse a procesos inflamatorios de alguna glándula accesoria. Al contrario, bajos niveles de líquido seminal son característicos en obstrucciones del conducto eyaculador, ausencia bilateral del conducto deferente o pobre desarrollo de las vesículas seminales. (Weiske et al., 2000), eyaculación retrograda o ausencia funcional de los conductos eyaculadores. Este último síndrome fue descrito en 1972 y lo presentan hasta el 15 % de los pacientes azoospermicos, los signos que sugieren este síndrome además del volumen disminuido ( $< 1$  mL) son: azoospermia, pH disminuido ( $< 7.0$ ) fructosa disminuida (Marcador de funcionalidad de las vesículas seminales), fosfatasa ácida o ácido cítrico aumentados (marcadores de funcionalidad prostática). Otros trastornos que pueden dar origen a un volumen disminuido son el síndrome de Klinefelter y el hipogonadismo hipogonadotrófico, por la baja estimulación de las glándulas sexuales.

**pH:**  $\geq 7.2$  El pH del semen refleja el balance entre diferentes valores de pH de diferentes secreciones de las glándulas accesorias, principalmente alcalino de las vesículas seminales y ácido de la próstata. El pH puede ser más alcalino y no necesariamente significa anormalidad. A medida que transcurre el tiempo la muestra se va alcalinizando por pérdida de anhídrido carbónico. Se mide en tanto licua la muestra preferiblemente dentro de los primeros 30 minutos post eyaculación y en algunos casos se puede medir a lo más una hora post eyaculación. La exactitud y calidad del papel se puede verificar con sustancias de pH conocido. Para muestras viscosas, el pH puede ser medido usando un pHmetro diseñado para medir soluciones viscosas. (Haugen and Grotmol, 1998).

Si el pH es menor de 7.0 con un bajo volumen y bajo recuento espermático, puede deberse a una obstrucción del conducto eyaculador o ausencia bilateral del conducto deferente (Daudin et al., 2000).

El pH del semen varía normalmente en un rango muy estrecho (7,2 - 8,0), pocos son los trastornos capaces de alterarlo. Es importante asegurarse que el laboratorio esté usando el papel de pH adecuado pues de otra manera las lecturas pueden ser falsas; el mejor es el papel con rango 6,4 - 8,0, que es el que más se ajusta al pH del semen, pero en su defecto puede usarse el de rango 6,1 - 10,0. Nosotros hemos visto estudios de otros laboratorios donde se ha informado valores de hasta 11,0, lo que desde el punto de vista biológico es totalmente imposible.

Se ha sugerido que un pH elevado ( $> 8$ ) puede considerarse un signo de infección seminal si se asocia a otros síntomas y signos de sospecha, mientras que un pH disminuido ( $< 7,2$ ) se observa cuando existe un déficit de la función de las vesículas seminales, en especial en pacientes con el síndrome de ausencia funcional de los conductos eyaculadores.



Figura 4: Medición de pH con tiras Merck.

## PREPARACION DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS DEL SEMEN

### EXAMEN DENTRO DE LA HORA.

La muestra debe ser colocada inmediatamente a una temperatura de 37° C hasta la licuefacción. Un volumen de 10 µl. de semen es adecuado para ser colocado en una lámina portaobjeto y cubierto con una lámina cubreobjeto de 22 mm x 22 mm de esta manera el cubreobjeto queda perfectamente adherido al porta y se forma una profundidad de liquido de 20 um suficientes para asegurar el movimiento rotacional de los espermatozoides durante su avance ya que una profundidad menor interfiere con el avance espermático y una profundidad mayor nos obligaría a obtener diferentes planos focales para observar adecuadamente a todos los espermatozoides del campo. Otras alternativas incluyen cubre objetos de 18 mm x 18 mm en este caso se agregan 6.5 µl de líquido seminal para asegurar una profundidad de 20 um. Se determina una aproximación sobre la concentración de espermatozoides, la calidad de movimiento, la presencia de células redondas, aglutinación y el debris (que corresponde generalmente a desechos de fragmento celulares). Esto nos dará una idea de cómo proceder con respecto a las diluciones para los análisis, que incluye recuento en cámara, viabilidad espermática, con qué volumen hacer el frotis etc. Si la temperatura ambiente es inferior a 22° C debe colocarse previamente los portaobjetos y cubreobjeto a 37 °C durante 15 minutos.

Si la muestra no esta bien mezclada nos resultarán valores totalmente diferentes entre nuestros duplicados de movilidad, vitalidad, concentración y morfología espermática. Para lograr una buena homogeneización de la muestra se mezcla la muestra en el mismo recipiente original con movimientos rotacionales suaves y con pipetas desechables, nunca se debe utilizar vortex a altas velocidades debido al daño que genera el movimiento brusco sobre los espermatozoides.

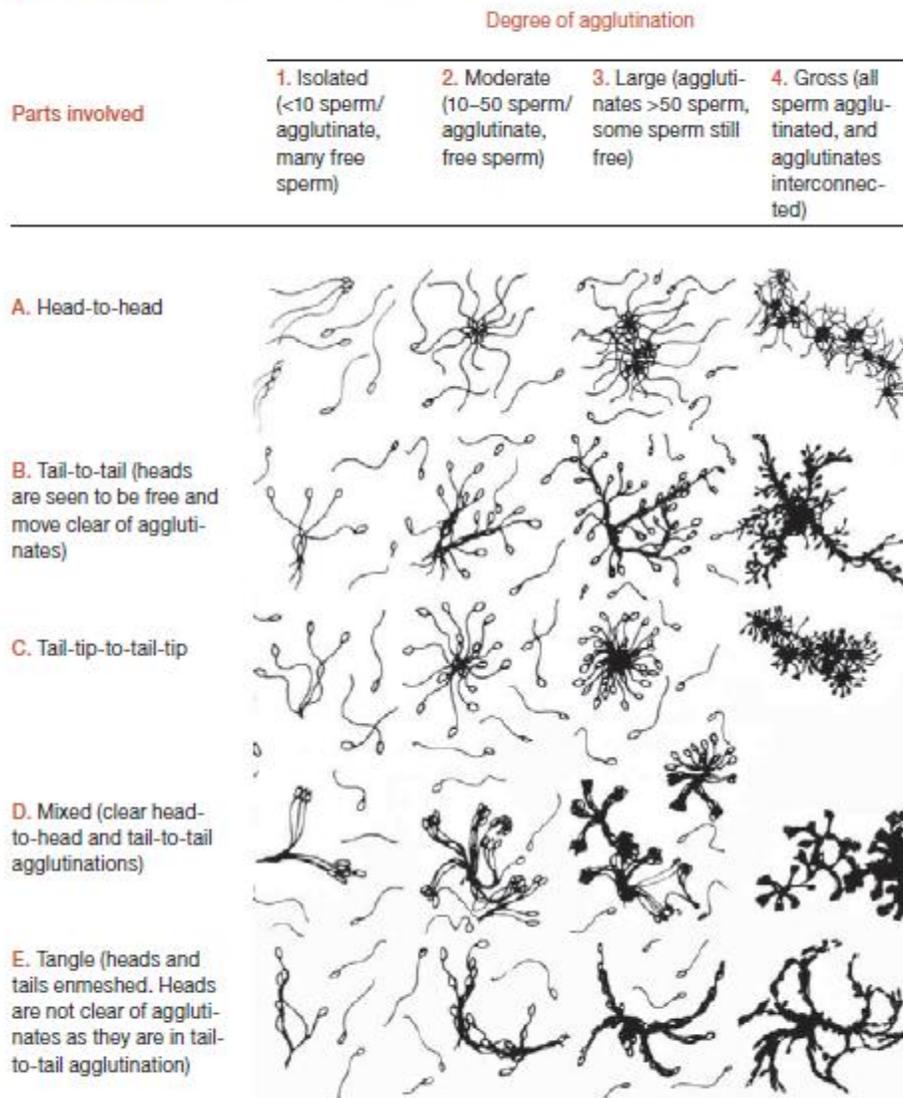
Si en el primer análisis no se observan espermatozoides ni células de la espermatogénesis, se procede a centrifugar el semen y con el sedimento se hacen preparados para teñir e identificar la presencia de espermatozoides o células de la espermatogénesis. Idealmente se centrifuga a 3.000 g durante 15 minutos y si aún así no se encuentran estas células se informa de la siguiente manera:

**En el sedimento de la muestra centrifugada a 3000g durante 15 minutos, no se observaron espermatozoides o células de la espermatogénesis.**

**AGREGACION.**

La adherencia entre espermatozoides inmóviles o espermatozoides móviles con hilos de mucus, células no espermáticas o debris se considera agregación no específica y debe ser registrada como tal.

**AGLUTINACION ESPERMATICA.** La aglutinación se refiere específicamente a espermatozoides móviles y pegados entre ellos, esta aglutinación puede ser de tipo A: (cabeza-cabeza), B: (cola-cola), C: (solo la punta de la cola), D: Se aglutina las cabezas con las cabezas y a la vez las colas con las colas) y E: Se produce una maraña de aglutinación. Al mismo tiempo se registra el grado de aglutinación como Grado 1: Menos del 10 % de los espermatozoides esta aglutinado, Grado 2: entre el 10 y 50 % de los espermatozoides esta aglutinado, Grado 3: Más del 50 % de los espermatozoides esta aglutinado pero algunos permanecen libres, Grado 4: Todos los espermatozoides están aglutinados e interconectados. Espermatozoides móviles y pegados a células, debris o a espermatozoides inmóviles (agregación) no deben ser informados como aglutinación. La presencia de aglutinación no es suficiente para deducir infertilidad por causa inmunológica, pero es sugestiva de la presencia de anticuerpos anti espermáticos que deberán investigarse.



C Figura 5: Grados y tipos de aglutinación espermática. Página 20 “WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen.

**CELULAS REDONDAS:** ( $\leq 5 \times 10^6$  células/mL)

**CELULAS GERMINALES INMADURAS:** 1-3% con respecto a 100 espermatozoides.

**LEUCOCITOS:**  $\leq 1 \times 10^6$  leucocitos/mL

El eyaculado además de poseer espermatozoides, posee otros elementos y células que pueden tener importancia clínica. Esto incluye células epiteliales del tracto genitourinario, leucocitos y células inmaduras de la espermatogénesis. Estas células llamadas en general “células redondas”. Pueden ser identificadas en el frotis de la muestra y también con ayuda de la determinación de la enzima peroxidasa presente en los neutrófilos o indirectamente cuantificadas, determinando la tasa entre espermatozoides y las células redondas que encontremos en el frotis correlacionando esta tasa con la concentración espermática.

Detallaremos más adelante.

**ANÁLISIS DE LA MOVILIDAD: (> 32 %).** La movilidad debe ser determinada tan pronto como sea posible después de licuada la muestra y preferiblemente dentro de los primeros 30 minutos de emitida, pero en ningún caso después de una hora de la eyaculación, para evitar el deterioro por efecto del cambio de pH, deshidratación o cambios de la temperatura.

Se pueden trabajar con un volumen de 10  $\mu$ L para cubre objetos de 22x22 mm., Se debe evitar que haya demasiado volumen entre las láminas para que el desplazamiento de los espermatozoides sea homogéneo y en lo posible en una monocapa según lo recomendado al inicio en examen dentro de la hora. La temperatura de evaluación puede ser de 37 °C pero al elegir esta temperatura se deberá pre atemperar los portas y cubre objetos y trabajar en microscopio acondicionado con platina termo regulada, pero se puede trabajar a temperatura ambiente, entre 20 y 24 °C. Es importante estandarizar las condiciones de temperatura para el trabajo, mezclar bien la muestra, se deben contar no menos de 200 espermatozoides y por duplicado en otra alícuota de la muestra y solo incluir en este parámetro a espermatozoides intactos.

Los tipos de movilidad a evaluar son los siguientes:

**Movilidad Progresiva (MP):** Los espermatozoides se mueven activamente, ya sea de manera lineal o en un gran círculo, independiente de la velocidad.

**Movilidad No Progresiva: (MNP)** Incluye todos los patrones de movilidad pero con ausencia de progresión como el avance en pequeños círculos.

**Inmóviles (IM):** Sin movimiento.

En los manuales anteriores se indicaba una separación entre espermatozoides rápidos tipo A  $> 25 \mu\text{m/s}$  y los progresivos lentos o tipo B con una velocidad inferior a esta, sin embargo, es muy difícil eliminar el grado de subjetividad y diferenciar las velocidades.

En muy pocas oportunidades hemos observado hipercinesis, que se caracteriza por movimientos sumamente enérgicos y desordenados de los espermatozoides. Valores inferiores al 34 % pueden deberse a pérdida de fracciones seminales, cambios bruscos de temperatura, pH sobre o bajo 7.2-8.0, Leucocitosis por aumento de la concentración de especies reactivas del oxígeno, anticuerpos antiespermáticos, recipientes contaminados aunque esto último cada vez es más improbable ya que se recomienda que el frasco estéril sea entregado por el laboratorio y que sea en base a polipropileno neutro. Movilidad entre 0

y 5 % probablemente se deban al síndrome de cilias inmóviles lo que se correlaciona con síntomas respiratorios en el paciente al ser los cilios esenciales para la depuración del lumen respiratorio.

### **Recomendaciones:**

- Observar ordenadamente diferentes campos evitando evaluar el mismo campo dos veces y evitar buscar un campo en base al número de espermatozoides móviles, la elección del primer campo debe ser al azar).
- Comenzar instantáneamente una vez determinado el campo a evaluar, no esperar que el espermatozoide comienza a moverse para comenzar.
- Determinar la movilidad espermática dentro de un área definida. Esto es más fácilmente realizable utilizando un retículo instalable en el ocular
- Revisar y contar rápidamente para evitar la sobre estimación del número o espermatozoides móviles y el conteo de espermatozoides que recién entran al campo de la grilla.
- Inicialmente se recomienda que se evalúen primero los espermatozoides PR, luego los NP y finalmente los IM, sin embargo con experiencia el observador podrá evaluar los tres parámetros simultáneamente.
- Contar los espermatozoides y registrar el número con ayuda de un multicontador.
- Evaluar a lo menos 200 espermatozoides en total en al menos cinco campos en cada replica, con el objetivo de lograr el menor error de muestra.
- Calcular el porcentaje promedio de las tres categorías de movilidad (PR, NP, IM)

**VITALIDAD:**  $\geq 58\%$  de espermatozoides vivos para las técnicas descritas a continuación. Esta prueba debe ser utilizada si el porcentaje de espermatozoides inmóviles excede el 60 % aunque la mayoría de los laboratorios la realizan de rutina debido a su facilidad y rapidez en entregar el resultado.

**ANÁLISIS DE LA VITALIDAD:** La vitalidad espermática se evalúa dentro de los primeros 30 minutos inmediatamente después de licuada la muestra, pero en algunos casos se puede evaluar hasta dentro de una hora cuando la muestra no a licuado completamente, nunca después de la hora para evitar encontrar un elevado número de espermatozoides muertos por efectos de deshidratación o cambios de pH o temperatura que puedan afectar a la muestra. i) Técnica eosina pura: La proporción de espermatozoides vivos puede ser determinada utilizando técnicas de tinción las que se basan en el principio de que las células muertas con una membrana plasmática dañada toman ciertos colorantes. Para esta evaluación se utiliza una solución de eosina (C.I. 45380) al 0.5% en Buffer fosfato Salino (PBS pH 7.1) o NaCl 0,9 %. Se mezcla una alícuota de eosina (5  $\mu$ L) con una muestra de semen (5  $\mu$ L), se cubre con un cubreobjeto de 22 x 22 mm., se deja reposar 30 segundos y se evalúa inmediatamente al microscopio. Se deben contar 200 espermatozoides diferenciando los espermatozoides vivos (no teñidos) de los espermatozoides muertos (teñidos).

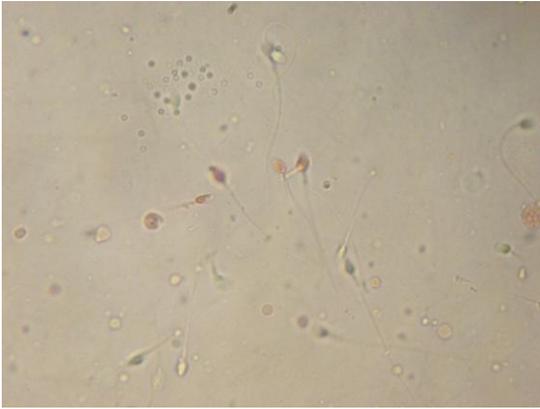


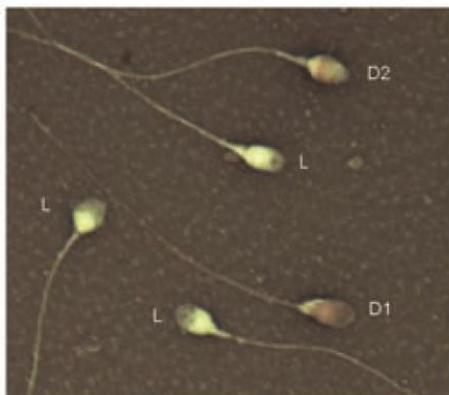
Figura 6: Vitalidad espermática: Los espermatozoides muertos se tiñen de rojo con eosina 0.5 %

ii) Una segunda forma de realizar el examen de vitalidad corresponde a la técnica con la tinción de Eosina-Nigrosina (E-N) cuya ventaja con respecto al test de Eosina es que nos permite almacenar las muestras para re-evaluación y propósitos de control de calidad o re chequeos por otros investigadores en casos de evaluación científica, con esta tinción los espermatozoides muertos se tiñen de Rojo o rosado oscuro y los vivos se tiñen de rosado claro o no se tiñen.

Para esta técnica se agrega 10 g de negrosina a la eosina 0,5 % en PBS o NaCl 0,9 % se hierve, luego se enfría y filtra y guarda en frascote vidrio oscuro.

El procedimiento consiste en remover 50 µL de semen y mezclar con igual cantidad de E-N, esperar 30 segundos mezclar y realizar un frotis (todo se realiza en duplicado real) se deja secar al aire y se cubre de manera permanente con medio de montaje para examinar a x 1000

Spermatozoa with red (D1) or dark pink heads (D2) are considered dead (membrane-damaged), whereas spermatozoa with white heads (L) or light pink heads are considered alive (membrane-intact).

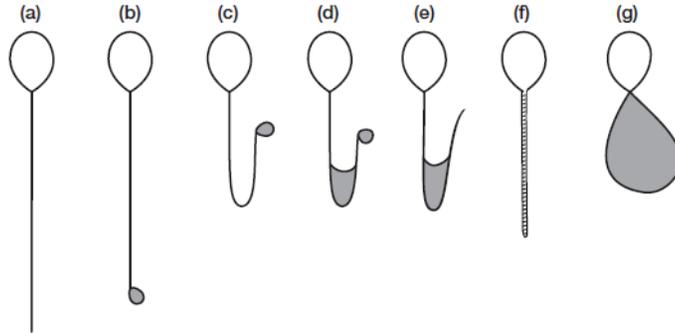


Micrograph courtesy of TG Cooper.

Figura 7: Espermatozoides teñidos con Eosina-Nigrosina observados a x1000 con microscopia de luz

iii) Por último, una tercera manera de realizar el test de vitalidad consiste en el conocido test Hipoosmótico en donde espermatozoides con membranas intactas se hinchan y su forma flagelar cambia dentro de 30 minutos de exposición al medio hipoosmótico.

(a) no change. (b)–(g) various types of tail changes. Swelling in tail is indicated by the grey area.



Reproduced from Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. (1984) *Journal of Reproduction and Fertility*, 70: 219–228. © Society for Reproduction and Fertility (1984). Reproduced by permission.

Figura 8: Representación esquemática de los cambios morfológicos en espermatozoides humanos sujetos a estrés hipoosmótico.

Brevemente, se disuelve 0.735 g de citrato de sodio dihidrato y 1.351 g de D-fructosa en 100 mL de agua, se congelan alicuotas de 1 mL a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para realizar el test, se descongela 1 mL de medio hipo osmótico y se estabiliza por 5 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  luego se agregan 100  $\mu\text{L}$  de semen bien mezclado y se incuba 5 minutos para fines terapéuticos (ICSI) o 37 minutos para fines diagnósticos. Posteriormente se transfieren 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla a un portaobjeto y se cubre para la observación de 200 espermatozoides por duplicado con un aumento de 40 x se calcula el promedio y se informa según corresponde (ver tabla 4).

La disminución de la movilidad espermática con un porcentaje normal de espermatozoides vivos, sugiere la presencia de anomalías en la ultraestructura del flagelo del espermatozoide como el síndrome de cilios inmóviles cuya causa es a nivel genético y su diagnóstico definitivo se realiza mediante microscopía electrónica, de diagnosticarse esta patología es de muy mal pronóstico quedando como única opción la inyección intracitoplasmática del ovocito con un espermatozoide de la pareja.

## RECUESTO DE ESPERMATOZOIDES

**Limite inferior normal**  $\geq 15 \times 10^6$  espermatozoides/mL. o  $39 \times 10^6$  espermatozoides por eyaculado o más (OMS, 2010).

**Principio:** El número total de espermatozoides por eyaculado y la concentración espermática se encuentran directamente relacionadas con el tiempo en que tarda la pareja en conseguir la preñez (Slama et al., 2002) y con la tasa de preñez (Zinaman et al., 2000) y como predictor de la concepción (Larsen et al., 2000). El número total de espermatozoides por eyaculado se correlaciona en condiciones normales con el volumen testicular con tiempos de abstinencia normales.



Figura 9: Frasco con solución de formalina para recuento.

La primera observación nos orientará para determinar la dilución de trabajo (ver “Observación dentro de la hora”) teniendo en cuenta que siempre la muestra debe estar perfectamente y recién homogeneizada para comenzar las diluciones.

La concentración espermática solo incluye a espermatozoides completos con cabeza y cola y si existen anormalmente muchos cabezas o colas sueltas, estas se cuantificarán por separado o se puede cuantificar en el frotis y consignar como una observación, aunque estos casos no son frecuentes.

Se cuantifica utilizando un hemocitómetro de Neubauer, (última recomendación de OMS 2010) o en cámara Makler que no requiere dilución.

**Procedimiento:** Las diluciones para la cámara de Neubauer pueden ser 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 (lo importante para evitar errores es tomar al menos 50  $\mu$ L. de muestra para las diferentes diluciones, fig b). El diluyente es preparado adicionando a 1 Litro de agua destilada, 50 g de bicarbonato de sodio, 10 mL 35% (v/v) de formalina y 0.25 g de azul tripán o 5 mL de una solución saturada de violeta de genciana. (Se almacena a 4 °C. Si se forman cristales se filtra con papel de 0.45  $\mu$ m antes de usar).

Se deben transferir entre 10 a 15  $\mu$ L. de la dilución hacia la cámara de recuento de Neubauer, pero lo más importante es que la cámara quede completamente llena pero no en exceso para evitar que la lámina que la cubre se mueva por acción de la dilución transferida. La muestra se debe dejar sedimentar (2 a 3 minutos), y debe ser conservada en una cámara húmeda y evaluadas dentro de 10 a 15 minutos para prevenir la evaporación, hasta el momento de realizar el recuento. El recuento debe ser de cabezas de espermatozoides y no de colas para evitar el doble recuento.

## Tabla de dilución:

Spermatozoa per ×400 field	Spermatozoa per ×200 field	Dilution required	Semen (μl)	Fixative (μl)	Chamber	Area to be assessed
>101	>404	1:20 (1+19)	50	950	Improved Neubauer	Grids 5, 4, 6
16–100	64–400	1:5 (1+4)	50	200	Improved Neubauer	Grids 5, 4, 6
2–15	8–60	1:2 (1+1)	50	50	Improved Neubauer	Grids 5, 4, 6
<2	<8	1:2 (1+1)	50	50	Improved Neubauer or large-volume	All 9 grids Entire slide

Figura 9 b: Esta tabla recomienda los volúmenes de muestra y fijador necesarios para la dilución dependiendo la concentración nativa de espermatozoides y la cantidad de grillas a evaluar que por lo general serán tres grillas y en duplicado real. (Pág. 39, OMS 2010).

## Cálculos y resultados.

### **Tipos de cámara de conteo recomendados por OMS 2010.**

**El hemocitómetro de Neubauer:** Cada hemocitómetro posee dos cámaras de conteo por separado, con un área de 3 mm x 3 mm. (9 cuadrantes de 1 mm<sup>2</sup> conteniendo 100 nL de volumen cada uno) y ambas cámaras se cubren con un cubre cámara n° 4 que es de 0.44 mm. de grosor, este cubre cámara queda levantado 100 μm por medio de pilares de vidrio pertenecientes a la misma cámara de Neubauer (fig. 10). El cuadrante 5 de la figura 11 tiene 25 cuadrículas menores que se denomina en conjunto retículo de Thomas, cada una de estas 25 cuadrículas menores a su vez tiene 16 cuadrículas más pequeñas (fig. 11 derecha).

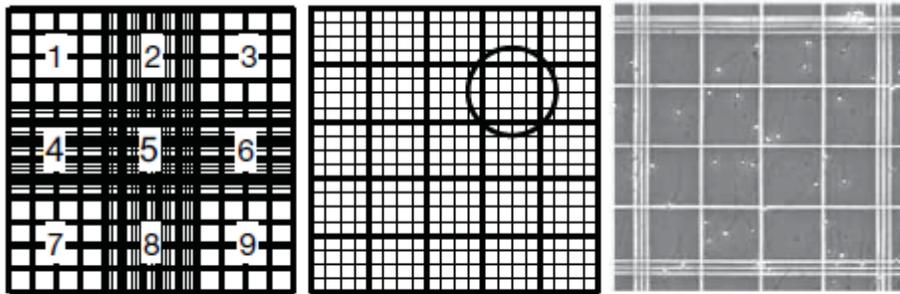
**Metodología para el recuento:** Si un espermatozoide se ubica sobre la línea que divide dos cuadrículas adyacentes, debe ser contado solamente si está en la línea inferior o hacia la línea del lado izquierdo de la cuadrícula a ser evaluada, si las retículas tienen líneas triples la misma regla se conserva pero para la línea central (fig 11).

Con la finalidad de simplificar los cálculos de los resultados, explicaremos una metodología que difiere de la metodología recomendada por OMS, sin embargo, entrega el mismo grado de confiabilidad. A fin de determinar la concentración de los espermatozoides en la muestra original de semen en millones/mL, el número promedio de espermatozoides (2 recuentos) es multiplicado por el factor de conversión apropiado. Para mayor claridad de lo expuesto tenemos el siguiente ejemplo. Si la dilución es 1/5 (200 uL de semen y 800 uL de solución de solución), y se han contado las 25 cuadrículas (retículo de Tomas completo), entonces se multiplica el número de espermatozoides en las 25 cuadrículas, por 5 (dilución) y por 10.000 (x 50.000). Segundo ejemplo, si la dilución es 1/5, y se han contado solo 5 cuadrículas, entonces se multiplica el número de espermatozoides registrados en las 5 cuadrículas por 5 (representa los 25 cuadrantes), por 5 (dilución) y por 10.000 (10.000 corresponde al factor de conversión propio de la cámara por sus dimensiones obtenidos al dividir el equivalente a 1 mL (1.000.000 nL) por el volumen promedio contado en un

cuadrante de los 9 enumerados en la figura 11, de esta manera tenemos 1.000.000 nL/100 nL = 10.000). Hay que tener presente que el mínimo recomendado de espermatozoides a contar son 200 por lo que si la muestra no tiene suficientes espermatozoides para llegar a 200 en el retículo de Tomas se deberá continuar con los cuadrantes vecinos numerados en la figura 11 de tal manera de obtener un error de muestra calculado en solo un 5 % (tabla 5). Y una diferencia aceptable de 39 espermatozoides como máximo entre ambos recuentos (tabla 6). Si la diferencia fuese mayor se repite el procedimiento desde la mezcla del líquido seminal en adelante. (Replicas nuevas y duplicados reales).



Figura 10: Cámara de Neubauer Izquierda: Vista desde arriba, Derecha vista de perfil mostrando la separación entre la cámara y el cubrecámara.



*Micrograph courtesy of C Brazil.*

Figura 11 Ampliaciones sucesivas de la cámara de Neubauer, el recuadro 5 (retículo de Tomas) se ve amplificado en el esquema central ( $1 \text{ mm}^2$ ) que a su vez indica un círculo que se amplifica nuevamente a la derecha para realizar el recuento ( $0,2 \text{ mm}^2$ ). Página 34 “WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen.

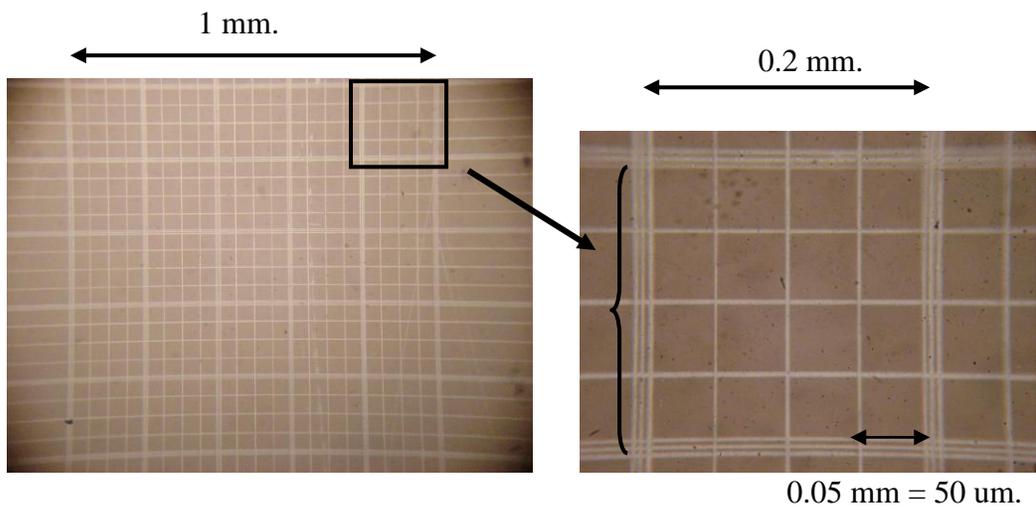


Figura 12: Fotografías equivalentes a los esquemas central y derecha de la figura 11.

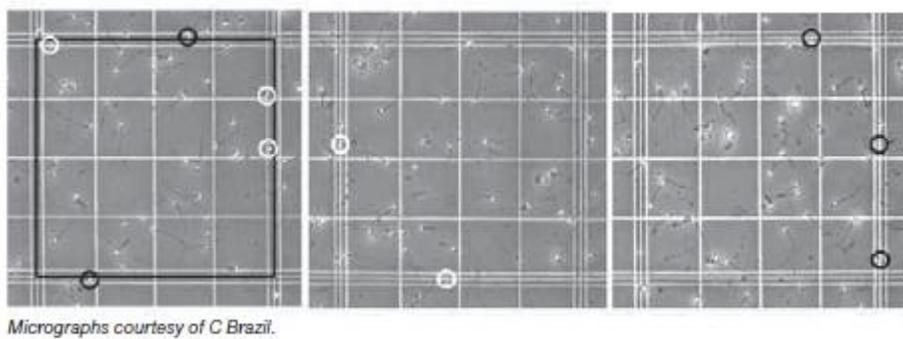


Figura 13: Los círculos blancos indican espermatozoides que se cuentan en el campo indicado y los círculos negros indican espermatozoides que no se cuentan: Esta técnica evita contar al espermatozoide 2 veces. Página 34 “WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen.

En los casos en que no se alcancen a contar los 200 espermatozoides en el retículo de Tomas (cuadrícula 5, figura 11) se continuara el recuento en las otras cuadrículas de la cámara de Neubauer, desde la 1 a la 9.

### Recuento en cámara Makler

La cámara Makler no es recomendada por OMS en el último manual del 2010, sin embargo, presenta la ventaja de trabajar con muestra sin diluir lo que evita este factor de error y además se puede determinar los distintos grados de movilidad a la vez, lo que ahorra tiempo al personal del laboratorio.

Para determinar la concentración, se cuenta las 100 cuadrículas y se multiplica el resultado por 100.000, para expresar la concentración espermática en millones/mL.

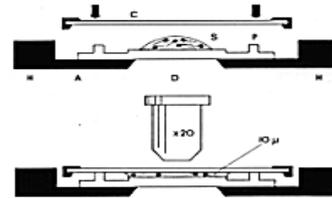


Figura 14: Cámara de Makler Izquierda: Vista desde arriba, Derecha vista de perfil mostrando la separación entre la cámara y el cubrecámara.

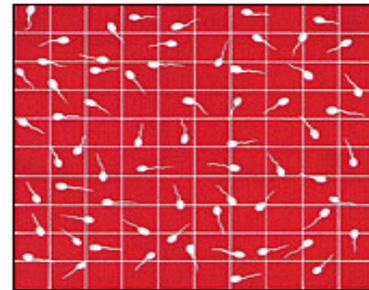
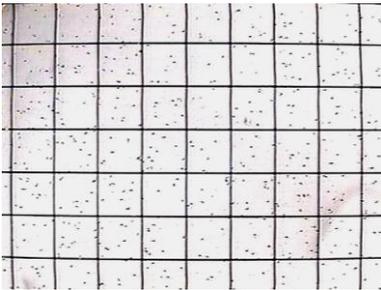


Figura 15: Izquierda: Vista a bajo aumento de la grilla casi completa de la cámara de Makler: posee 100 cuadrantes en total. Derecha: Esquema de la grilla en cámara de Makler.

Hay que tener en cuenta que la centrifugación en muestras con criptoospermia (concentración espermática menor de  $1 \times 10^6/\text{mL}$ ), disminuirá la movilidad espermática en los pocos espermatozoides que se pudieran encontrar y en algunos caso la movilidad se puede perder en su totalidad.

Si el numero de espermatozoides es  $< 4$  por campo con aumento de  $\times 400$  esto representara aproximadamente a  $1 \times 10^6/\text{mL}$  de espermatozoides y para la mayoría de los propósitos clínicos se informara una concentración espermática  $< 2 \times 10^6/\text{mL}$  ya sea se encuentren o no espermatozoides móviles.

Al finalizar el trabajo de recuento se dejara la cámara en solución desinfectante preferiblemente durante toda la noche para eliminar posibles agentes infecciosos del semen.

**OLIGOZOOSPERMIA:** Se define con el recuento de espermatozoides inferior a  $15 \times 10^6$  /mL esta puede ser, ligera (entre  $10 - <15 \times 10^6$  /mL), oligozoospermia moderada (entre  $5 - 10 \times 10^6$  /mL) y oligozoospermia severa cuando la concentración espermática es inferior a  $5 - 10 \times 10^6$  /mL). Algunas causas son; Obstrucción epididimaria, eyaculación retrograda, diabetes mellitus, factores congénitos, estrés y periodos febriles intensos, hipogonadismo hipogonadotrofico.

**CRIPTOZOOSPERMIA:** Se define como una concentración de espermatozoides inferior a  $1 \times 10^6$  /mL.

**AZOOSPERMIA:** Se define como la ausencia de espermatozoides en el líquido seminal y puede indicar un daño severo del epitelio germinal con aplasia germinal o síndrome de Sertoli solo (azoospermia secretora) y la detención de la maduración espermática (arresto de la espermatogénesis). La zoospermia también puede deberse a una obstrucción de las vías seminales (azoospermia obstructiva). En estos casos se deberá centrifugar toda la muestra a 3000 g durante 15 minutos y revisar en 2 portaobjetos todo el pellet para informar, revisado preferiblemente con aumento de  $\times 20$  para abarcar toda el área del cubreobjeto de  $22 \times 22$  mm. Si se encuentra al menos 1 espermatozoide se informa como criptozoospermia, de lo contrario solo se sugiere la azoospermia ya que existe la posibilidad que en el resto de la muestra si se encuentren espermatozoides ya que e ha demostrado que no todos los espermatozoides bajan al pellet a ese tiempo y velocidad. (Corea et al., 2005) Debemos tener presente que casi en todos los casos, esta centrifugación afectará negativamente la movilidad de los escasos espermatozoides que pudiera tener la muestra.

Conclusión: A pesar que estos protocolos se sigan con exactitud, tenemos que considerar varios factores relacionados con posibles errores, entre ellos tenemos solo como algunos ejemplo más frecuentes, el uso de pipetas de aire en vez de pipetas de presión positiva, errores en la mezcla y dilución de las muestras, pipetas descalibradas, cámaras y contadores defectuosos entre otros factores por lo que siempre se recomendará el uso de control de calidad tanto interno como externo para asegurar la confiabilidad de nuestros resultados.

#### **RECUESTO DE OTRAS CELULAS DIFERENTES A LOS ESPERMATOZOIDEOS:**

El semen eyaculado contiene otras células además de los espermatozoides, entre ellas se incluyen células epiteliales de la uretra, leucocitos, células germinales.

La concentración de estas células se puede estimar de la siguiente manera. Se cuentan las células en los cuadrados que están ubicados en las esquinas del retículo de Thomas (Cuadrantes 1,3,7 y 9). Cada cuadrado tiene un volumen de  $0.1\text{mL}^3$  pero representan un valor de 1 mL. El conteo que resulta en los 4 cuadrados se divide entre 4 y se multiplica por el factor de dilución para obtener el número de células por mL de muestra. Lo mínimo que hay que contar son 200 células redondas, si este valor no se alcanza se cuentan el resto de los cuadrantes y el resultado se divide por el número de cuadrantes contados OMS además recomienda que este análisis se haga por duplicado real en la cámara contra lateral.

Otra manera de estimar el número de células redondas especificando el detalle de estas es directamente en el mismo frotis utilizado para determinar la morfología espermática, lo cual obviamente requerirá un análisis de un experto en citología para poder discriminar entre células de origen sanguíneo y de origen espermático, de esta manera si **N** es el número de un tipo celular dado por 100 espermatozoides y **S** es la concentración de espermatozoides en millones/mL, entonces la concentración **C** de un tipo celular dado en millones/mL. puede ser calculada con la siguiente fórmula:

$$C=(N \times S)/200$$

Así, si el número de células germinales inmaduras o leucocitos contados es 5 por 200 espermatozoides y el recuento de espermatozoides es  $120 \times 10^6/\text{mL}$  la concentración de dichas células es  $5 \times 120 \times 10^6 / 200 = 3$  millones /mL.

Con el mismo ejemplo pero ahora determinado el número de neutrófilos, si encontramos 2 neutrófilos por cada 200 espermatozoides tendremos que:

$$C = 2 \times 120 \times 10^6 / 200 = 1,2 \text{ millones/mL}$$

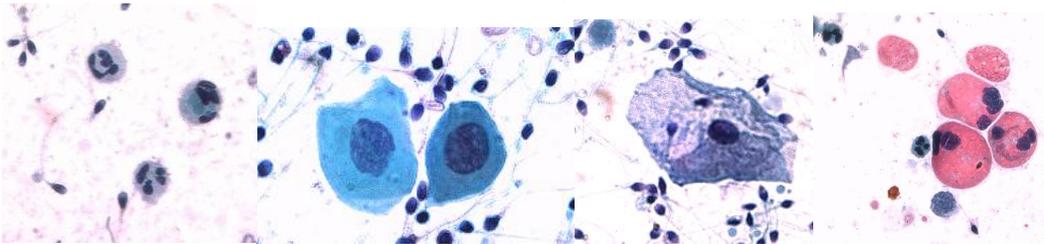


Figura 16: De izquierda a derecha, 1.- Neutrófilos, 2.- epitelio descamativo, 3.-epitelio descamativo plano, 4.- Espermátidas.

### Determinación química de Leucocitos.

Los leucocitos pueden dañar la movilidad y el DNA espermático a través de un ataque oxidativo, sin embargo, este daño dependerá de varios factores entre ellos, el lugar de infiltración leucocitaria, naturaleza de los leucocitos encontrados (Macrófagos, Neutrófilos y excepcionalmente Linfocitos) y el estado de activación leucocitaria. Aunque la leucocitoespermia no nos asegura el diagnóstico de infección, si se considera un signo de sospecha si se asocia a otros signos seminales y clínicos que confirman dicho diagnóstico. Algunos síntomas clínicos podrían ser: dolor al eyacular, antecedentes de infecciones de transmisión sexual o genitourinarias, exámenes anormales de alguna glándula del sistema reproductor y alteraciones físico químicas del plasma seminal lo que confirma el diagnóstico es el examen bacteriológico positivo. Hay que tomar en cuenta que un segundo grupo de análisis de espermiograma solo podrá realizarse solo después de transcurridos al menos 90 días después de la última dosis de antibióticos ya que estos afecta a la concentración espermática.

Dentro de la población de leucocitos, predominan los Neutrófilos. Sin embargo, estas células podrían ser confundidas por un evaluador inexperto con espermáticas multinucleadas. Algunas características morfológicas que los diferencia a ambos, por ejemplo, son: los puentes de cromatina que solo están presentes en el Neutrofilo, los linfocitos tiene un núcleo en promedio de  $7 \mu\text{m}$  a diferencia de un macrófago que posee un tamaño nuclear promedio de  $15 \mu\text{m}$

En nuestro laboratorio determinamos leucocitos peroxidasa positivos en base a una solución de agua oxigenada 10-30% (100  $\mu$ L) mezclada con una solución de ortotoluidina 0.15% (900  $\mu$ L), en una relación 1:10. De esta mezcla, se toman 900  $\mu$ L a los que se agregan 100  $\mu$ L de muestra de semen (relación 1:10). La solución final se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente. Los leucocitos peroxidasa positivos dan una coloración marrón, y se registran como positivos para la reacción. Este recuento es útil para diferenciar los leucocitos peroxidasa positiva (Neutrófilos) de otros tipos de células redondas y se cuentan en cámara de Neubauer o Makler, sin embargo, esta técnica no detecta a Macrófagos o Neutrófilos que ya hayan excitado sus gránulos. Un método similar pero más complejo se detalla en el Manual OMS 2010 aunque varias otras técnicas para identificar la población leucocitaria en semen, como son en base a inmunocitoquímica, también pueden ser utilizadas aunque estas son mas costosas y demandan un tiempo de procesamiento y análisis mayor por lo que tendrá que evaluare el real aporte que puede entregar esta técnica al diagnostico en cada caso en particular.

La agencia internacional de investigación del cáncer (IARC, 1982) ha declarado que la ortho-toluidina presenta riesgo carcinogénico para humanos.

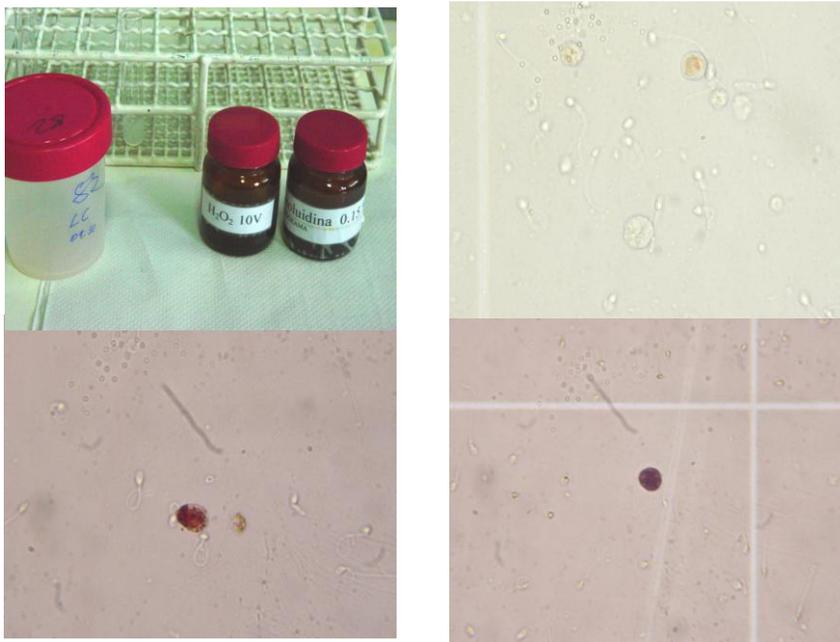


Figura 17: Células Peroxidasa positivas: Se marcan de café claro hasta marrón intenso.

**Determinación de células inmaduras:**

Las células germinales o células inmaduras incluyen espermátidas y espermatoцитos pero rara vez incluyen a espermatogonias debido a que estas están unidas mediante hemidesmosomas a la lamina basal lo que previene su liberación al lumen y la que se libera tras una mitosis generalmente alcanza a transformarse en un elemento celular más diferenciado, estas células generalmente son detectadas en los preparados (frotis) pero son difícilmente diferenciadas de células inflamatorias cuando estas células se encuentran en degeneración.

**MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA:**  $\geq 4\%$  de formas normales. Este valor está sujeto a estudios multicéntricos que realiza la OMS. Sin embargo, se sugiere que cada laboratorio estandarice sus propios valores de referencia lo que en mi experiencia es poco factible y no hemos conocido un laboratorio con estudios serios que produzcan sus propios valores y publicados.

Algunas muestras de líquido seminal contienen espermatozoides con diferentes malformaciones: Defectos de la espermatogenesis y algunas patologías espermáticas son comúnmente asociadas con un incrementado porcentaje de espermatozoides con formas anormales. Los espermatozoides anormales generalmente poseen un bajo potencial fértil, dependiendo de los tipos de anomalías, estos también pueden poseer anomalías en su DNA. Defectos morfológicos han sido asociados con un incrementado fragmentación del DNA (Gandini et al., 2000) una incrementada incidencia de aberraciones estructurales de cromosomas (Lee et al., 1996) cromatina inmadura (Dadoune et al., 1988) y aneuploidia (Martin et al., 2003). En los casos de teratozoospermia (Valores inferiores al 4 % de espermatozoides normales) pueden observarse en un gran número de trastornos como son el varicocele, la sepsis seminal, el estrés, la exposición a agentes nocivos ya sean químicos o físicos. Algunos casos de muy mal pronóstico son las morfologías de espermatozoides con forma de pera, redondos (globozoospermia) o los espermatozoides con cabeza de alfiler en que estas malformaciones son de causa genética y esta presente en más del 95 % de los espermatozoides.

**Concepto de espermatozoide normal:** La recuperación de espermatozoides obtenidos del tracto reproductor femenino específicamente en el moco endocervical postcoital y también en la zona pelúcida, han ayudado a definir la apariencia del espermatozoide potencialmente fértil (morfológicamente normal). Usando esta guía el rango de espermatozoides normales en fértiles e infértiles varía entre 0-30 % y muy pocas muestras superan el 25 % de espermatozoides móviles. Este bajo valor inevitablemente producirá bajos puntos de cortes que en estudios in vitro, inseminación intrauterina y fertilidad in vivo varía entre 3-5 % de formas normales.

## EVALUACION DE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA



Figura 18: Materiales para morfología espermática.

Dos o más extendidos deben ser preparados de la muestra de semen hay que tomar en cuenta que puede fallar el protocolo de tinción o algún extendido puede romperse. Las láminas deben ser limpiadas adecuadamente con papel libre de pelusas, antes de que una pequeña gota de semen bien mezclada (5-10  $\mu\text{L}$ ) sea colocada sobre su superficie, hay que considerar que la viscosidad del semen puede estar aumentada dificultando así el extendido de la muestra sobre la lámina.

El extendido debe ser bien delgado para que se seque rápidamente y debe realizarse inmediatamente al colocar la gota sobre el portaobjetos, no debe emplearse calor para el secado ya que produce el enroscamiento de las colas y alteraciones de cabeza. Además, el semen tiene mucus que al exponerse al calor enturbia toda la muestra haciendo difícil observar los espermatozoides, por ende se deja secar al aire se marca el frotis con un lápiz común de carbón (HB o N° 2) que es resistente a los solventes y colorantes y se sigue el siguiente protocolo. En los casos en que la concentración espermática es menos a  $2 \times 10^6$  /mL la muestra se puede centrifugar a no más de 600g por 10 minutos y el pellet se puede resuspender en los restos de sobrenadante que queden en el tubo, en nuestra experiencia la centrifugación de la muestra con PBS deja los espermatozoide más limpios y nos facilita la observación para determinar la morfología, el mismo procedimiento es utilizable cuando la muestras son viscosas o presentan problemas de licuefacción. Sin embargo hay que tomar en cuenta que en algunos casos la centrifugación puede alterar la morfología espermática por lo que es recomendable registrar este procedimiento en el informe.

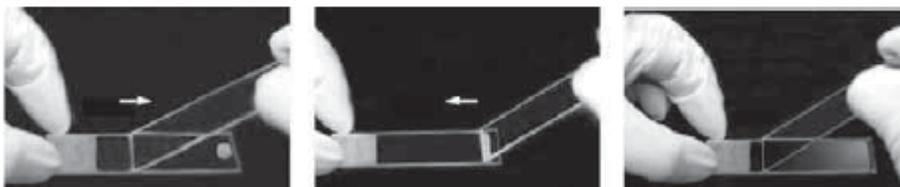


Figura 19: Preparación de un frotis seminal: Se coloca una gota de líquido seminal en un extremo del portaobjetos (fotografía de la izquierda), tocar la gota con el extremo de otro portaobjetos con un ángulo que dependerá de la concentración espermática (generalmente de 45°), fotografía central y finalmente realizar un movimiento homogéneo de 1 segundo para extender la muestra a lo largo del portaobjetos (fotografía de la izquierda).

**Métodos de Tinción:** Una vez que la muestra este seca, se debe fijar y teñir con Papanicolaou, tinción de Shorr, Diff-Quik.

### CLASIFICACION DE LA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.

La morfología espermática esta asociada con un número de dificultades técnicas de las cuales las más importantes son el grado de subjetividad, la variación en la interpretación y en algunos casos inexistente realización de control de calidad externo. Para valorar la morfología hay que conocer muy bien las partes de un espermatozoide normal con sus respectivas dimensiones, al respecto básicamente el espermatozoide cuenta con una cabeza, pieza media, pieza principal y pieza final. Por lo tanto nosotros podemos distinguir una cabeza que incluye al cuello, y la cola con sus piezas media y principal, la pieza final es muy difícil distinguirla. Para que un espermatozoide sea considerado como normal, ambos cabeza y cola deben ser normales. Todos los espermatozoides al límite de la normalidad deben considerarse anormales.

#### Detalles morfológicos:

**La cabeza:** El espermatozoide humano posee una cabeza oval de  $5\mu\text{m}$  de largo,  $3\mu\text{m}$  de ancho y  $1,5\mu\text{m}$  de espesor, ocupada en su gran mayoría por el núcleo, que contiene el ácido desoxirribonucleico, o ADN, donde reside la información genética paterna. El acrosoma está bien desarrollado y se distribuye en forma de capucha sobre el núcleo; en su interior se encuentran las enzimas encargadas de la degradación de la zona pelúcida que rodea al ovocito. La cabeza debe ser lisa, de un contorno regular y de forma oval, el acrosoma debe abarcar entre el 40 y 70 % del área de la cabeza (Menkveld et al., 2001). La región del acrosoma no debe poseer más de 2 pequeñas vacuola que no deben ocupar más del 20 % del área de la cabeza espermática. La región post acrosomal no debe poseer ninguna vacuola.

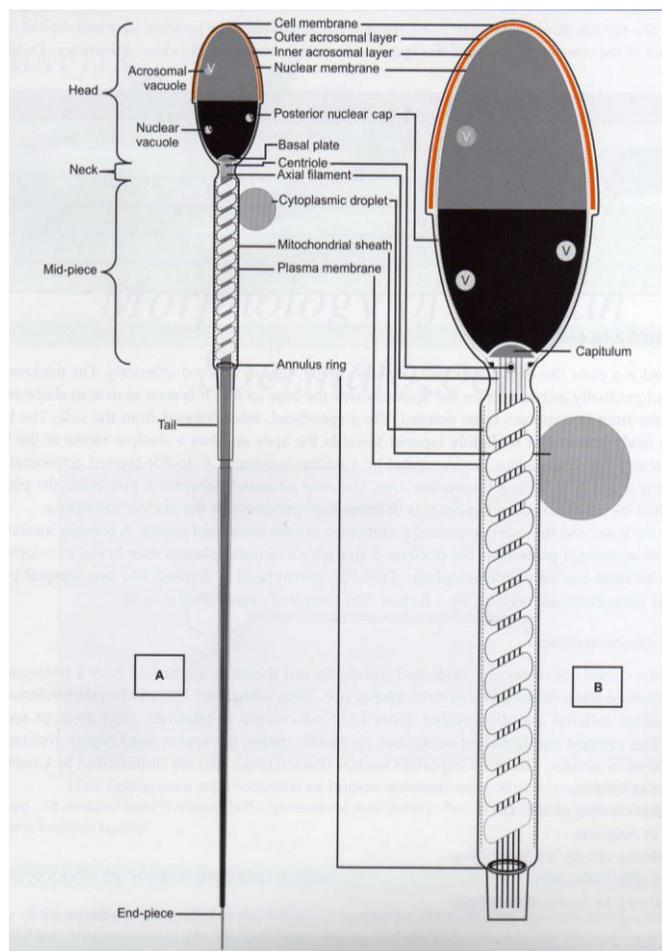


Figura 20: Esquema de un espermatozoide normal y sus partes.

**La cola** mide 55  $\mu\text{m}$  y abarca tres partes, la pieza media, pieza principal y pieza Terminal.

**La pieza media** debe ser robusta, regular y tener alrededor de la misma longitud de la cabeza, unos 5  $\mu\text{m}$  de longitud, el eje mayor de la pieza media debe estar alineado con el eje mayor de la cabeza, posee una vaina mitocondrial dispuesta helicoidalmente y por lo tanto la hace la parte más gruesa del flagelo (aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ ), El citoplasma residual solo es considerado anormal cuando está en exceso (excede un tercio del tamaño de la cabeza). **Pieza principal** debe tener un calibre uniforme a lo largo de su longitud, ser más delgada que la pieza media y tener aproximadamente 45  $\mu\text{m}$  de longitud (alrededor de 10 veces el tamaño de la longitud de la cabeza) puede estar enrollado sobre sí mismo siempre y cuando no existan ángulos agudos indicando ruptura flagelar. **La pieza terminal** mide unos 2 a 5  $\mu\text{m}$  de largo y solo 0,1  $\mu\text{m}$  de grosor.

Por lo tanto clasificaremos en el informe de la siguiente manera:

**Defecto de cabeza:** incluiremos los microcéfalos, macrocéfalos, cónicos, piriformes, redondos, amorfos, vacuolados, bicéfalos, y sus combinaciones.

**Defectos de cuello y pieza media:** Inserción asimétrica de la pieza media en la cabeza, grueso o irregular, bruscamente doblado, anormalmente delgado o alguna combinación de estas

**Defectos de la pieza principal:** Pieza corta, múltiple, rota, fuertemente angulada, irregularmente ancha, enrollada o una combinación de estas.



Figura 21: Espermatozoide normal: Tinción de May Grunwald Giemsa. X 400.

**Exceso de citoplasma residual:** Esta asociada con una espermatogénesis anormal, producido por defectos de procesos espermatogénicos y se consigna si supera un tercio del tamaño de la cabeza del espermatozoide. El exceso de citoplasma no debe ser llamado gota citoplasmática.

Ocasionalmente, muchos espermatozoides tendrán un defecto estructural específico. Por ejemplo el acrosoma puede fallar en el desarrollo “Globozoospermia” o falla en la unión de la placa basal al núcleo, en el polo opuesto al desarrollo del acrosoma en la espermiación, en este último caso la cabeza será absorbida y solo las colas serán encontradas en semen y estos son los mal llamados “cabeza de alfiler” Estos últimos no entran en el detalle de la morfología o recuento espermático y se cuenta a parte solo si son muy abundantes ya que por definición solo se consideran a espermatozoides completos.



Figura 22: Globozoospermia : Tinción de May Grunwald Giemsa. X 300.

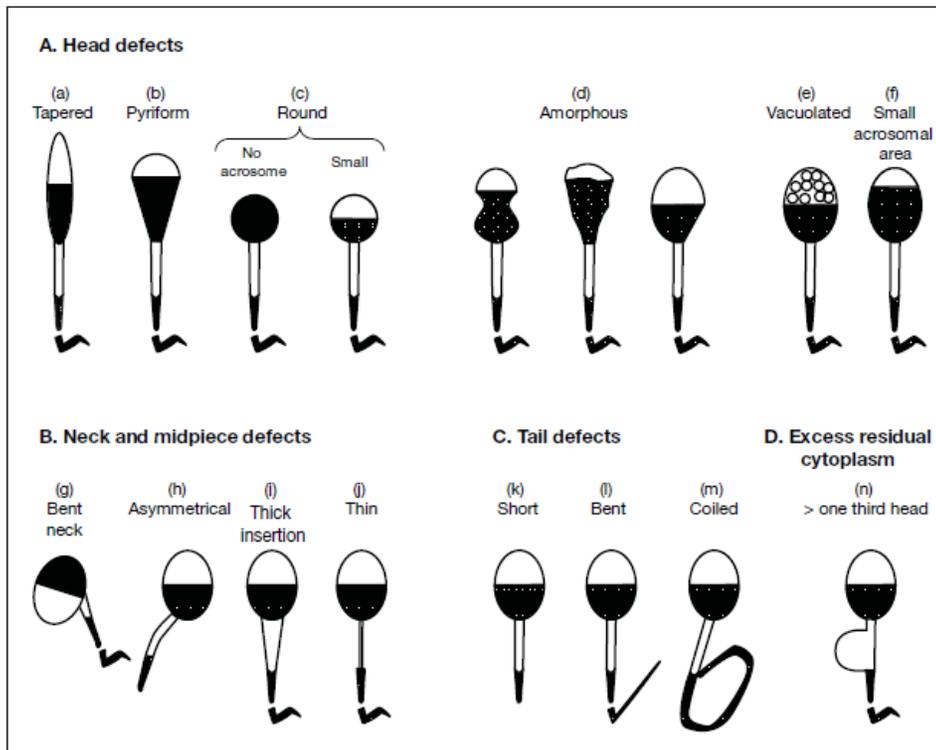


Figura 23: Dibujo de algunas formas anormales de los espermatozoides.

Página 70 “WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen.

## PROCOLOS DE TINCIÓN

**Protocolo de tinción rápida de espermatozoides:** Aunque la OMS no recomienda la tinción de Hematoxilina y Eosina, hemos decidido incorporarla ya que por nuestra experiencia, sabemos que si esta tinción se realiza correctamente, se puede aplicar en muestras que no superan al  $1 \times 10^6$ /mL de células redondas, debido a que no entrega detalles morfológicos que nos permitan diferenciar claramente entre leucocitos y células del epitelio germinativo.

**Fijación:** Etanol al 70 - 80 % por 1 minuto.

Se fija la muestra para evitar que la exposición de los espermatozoides a la humedad, cambios de temperatura y otros factores ambientales.

### **Protocolo simplificado solo para espermatozoides.**

- 1.- Sumergir 10 segundos en Hematoxilina de Harris.
- 2.- Sumergir 5 - 10 minutos en agua corriente
- 3.- Sumergir 1 minuto en agua destilada
- 4.- Sumergir 2 minutos en Eosina 0.1 % (En agua destilada)
- 5.- Enjuagar con agua destilada 1 minuto aprox.
- 6.- Secar, poner cubre objeto, solo observar al microscopio con aceite de inmersión.

Esta técnica permite re evaluar la muestra incluso años después para fines de control de calidad interno. La desventaja es que entrega un pobre detalle de las células redondas lo que hace difícil la diferenciación entre leucocitos y células del epitelio germinativo.

### **TINCION DE MAY-GRUNWALD-GIEMSA.**

La experiencia en el laboratorio nos a indicado que esta tinción es ideal ya que nos proporciona no solo lacas características morfológicas de los espermatozoides si no que además las características de las células redondas logrando diferenciar con gran claridad los leucocitos, células epiteliales y las células de la espermatogénesis. Siendo por lo mismo una tinción ampliamente usada en la mayoría de los laboratorios latinoamericanos y Europeos tanto por su rapides como por la cantidad de datos y detalles que entrega.

### **MAY-GRUNWALD : AZUR II- EOSINA**

### **GIEMSA : AZUL DE METILENO-EOSINA**

### **PROCEDIMIENTO PARA ESPERMATOZOIDE.**

- 1.- Colocar una capa fina de May Grunwald sobre un frotis durante 4 minutos
- 2.- Enjuagar con agua destilada
- 3.- Colocar una capa de Giemsa diluido 1:10 en agua destilada durante 15 minutos
- 4.- Enjuagar con agua destilada
- 5.- Secar y montar

## **PROCEDIMIENTO PARA CELULAS GERMINALES.**

Idéntica que el procedimiento para tinción espermática solo que la dilución de Giemsa es 1:20.

En nuestro laboratorio ocupamos siempre una dilución 1:15 donde el núcleo se tiñe de azul-violeta y el citoplasma adquiere diferentes tonalidades dependiendo el tipo celular observado, como esta es una tinción usada en hematología es muy adecuada para hacer detallados análisis morfológicos.

## **TINCIÓN DE PAPANICOLAOU Para espermatozoides.**

Una tinción de excelencia aunque mucho más laboriosa y ampliamente usada y recomendada por los autores del manual OMS 2010 es la tinción de Papanicolau.

Se recomienda que los preparados sean secados al aire al menos 4 horas antes de ser teñidos pero pueden ser almacenados hasta una semana antes de fijar y teñir.

- 1.- Fijación: Sumergir en alcohol 95 5 a lo menos 15 minutos.
- 2.- Sumergir secuencialmente y 30 segundos respectivamente en alcohol 80 %, 50 %.
- 3.- Agua destilada durante 30 segundos.
- 4.- Hematoxilina de Harris durante 4 minutos.
- 5.- Agua destilada durante 30 segundos.
- 6.- Alcohol acido (1 mL de ácido clorhídrico en 200 mL de etanol 70 %).
- 7.- Sumergir en agua corriente y fría durante 5 minutos.
- 8.- Sumergir secuencialmente y 30 segundos respectivamente en etanol 50 %, 70 % .
- 9.- Sumergir en etanol 95 % al menos durante 15 minutos.
- 10.-Sumergir en colorante naranja G-6 durante 1 minuto.
- 11.-Sumergir en etanol 95 % durante 30 segundos y repetir 2 veces pero en otros alcoholes de 95 % para continuar limpiando el exceso de colorante.
- 12.-Sumergir en la tinción verde EA-50 durante 1 minuto.
- 13.-Sumergir en etanol 95 % durante 30 segundos y repetir en otro etanol de 95 %.
- 14.-Sumergir en etanol 100 % durante 15 segundos y repetir en otro alcohol de 100 5 limpio.
- 15.- Se puede pasar a Xilol puro 2 o tres diferentes y finalmente montar para dejar esta preparación de manera permanente para fines de control de calidad interno.

**Se cuentan 200 espermatozoides clasificándolos como normales o anormales. Las células de la espermatogénesis halladas al contar los espermatozoides se informan aparte.**

### **Valores de referencia:**

Las mediciones en las muestras de semen necesariamente deben ser comparadas con valores de referencia que nos permitan decidir el manejo y tratamiento del paciente y puntos de cortes o valores límites

**Tabla 1: Resumen de Límites de Referencia Inferiores (LRI), con un percentil de 5 e intervalo de confianza de un 95 %.**

Parameter	Lower reference limit
Semen volume (ml)	1.5 (1.4–1.7)
Total sperm number (10 <sup>6</sup> per ejaculate)	39 (33–46)
Sperm concentration (10 <sup>6</sup> per ml)	15 (12–16)
Total motility (PR + NP, %)	40 (38–42)
Progressive motility (PR, %)	32 (31–34)
Vitality (live spermatozoa, %)	58 (55–63)
Sperm morphology (normal forms, %)	4 (3.0–4.0)
<i>Other consensus threshold values</i>	
pH	≥7.2
Peroxidase-positive leukocytes (10 <sup>6</sup> per ml)	<1.0
MAR test (motile spermatozoa with bound particles, %)	<50
Immunobead test (motile spermatozoa with bound beads, %)	<50
Seminal zinc (μmol/ejaculate)	≥2.4
Seminal fructose (μmol/ejaculate)	≥13
Seminal neutral glucosidase (mU/ejaculate)	≥20

Página 224 “WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen.

**Tabla 2: Forma para registrar el análisis del espermiograma y moco cervical, según el manual de la OMS 2010.**

Name:			
Code:			
Date (day/month/year)			
Collection (1, at laboratory; 2, at home)			
Collection time (hour : minute)			
Sample delivered (hour : minute)			
Analysis begun (hour : minute)			
<b>Patient</b>			
Abstinence time (days)			
Medication			
Difficulties in collection			
<b>Semen</b>			
Treatment (e.g. bromelain)			
Complete sample? (1, complete; 2, incomplete)			
Appearance (1, normal; 2, abnormal)			
Viscosity (1, normal; 2, abnormal)			
Liquefaction (1, normal; 2, abnormal) (minutes)			
Agglutination (1-4, A-E)			
pH [ $\geq 7.2$ ]			
Volume (ml) [ $\geq 1.5$ ]			
<b>Spermatozoa</b>			
Total number ( $10^6$ per ejaculate) [ $\geq 39$ ]			
Concentration ( $10^6$ per ml) [ $\geq 15$ ]			
Error (%) if fewer than 400 cells counted			
Vitality (% alive) [ $\geq 58$ ]			
Total motile PR+NP (%) [ $\geq 40$ ]			
Progressive PR (%) [ $\geq 32$ ]			
Non-progressive NP (%)			
Immotile IM (%)			
Normal forms (%) [ $\geq 4$ ]			
Abnormal heads (%)			
Abnormal midpieces (%)			
Abnormal principal pieces (%)			
Excess residual cytoplasm (%)			
Direct MAR-test IgG (%) (3 or 10 minute) [ $< 50$ ]			
Direct MAR-test IgA (%) (3 or 10 minute) [ $< 50$ ]			
Direct IB-test IgG (% with beads) [ $< 50$ ]			
Direct IB-test IgA (% with beads) [ $< 50$ ]			
<b>Non-sperm cells</b>			
Peroxidase-positive cells, concentration ( $10^6$ per ml) [ $< 1.0$ ]			
<b>Accessory gland function</b>			
Zinc ( $\mu\text{mol}$ per ejaculate) [ $\geq 2.4$ ]			
Fructose ( $\mu\text{mol}$ per ejaculate) [ $\geq 13$ ]			
$\alpha$ -Glucosidase (neutral) (mU/ejaculate) [ $\geq 20$ ]			
Technician:			

**Tabla 3: Nomenclatura para algunas variables seminales WHO 2010.**

<b>TERMINO</b>	<b>DEFINICION</b>
<b>Normozoospermia:</b>	Eyaculado normal definido por los valores de referencia.
<b>Oligozoospermia:</b>	Concentración espermática menor a los valores de referencia.
<b>Astenozoospermia:</b>	Movilidad menor al valor de referencia.
<b>Teratozoospermia</b>	Morfología menor al valor de referencia.
<b>Oligoastenoterato zoospermia:</b>	Significa alteraciones en tres variables. (También se usarla combinación de 2 prefijos).
<b>Azoospermia:</b>	Ausencia de espermatozoides en el Eyaculado.
<b>Aspermia</b>	Ausencia de eyaculado.
<b>Cryptozoospermia:</b>	Espermatozoides ausentes en el preparado examinado al fresco pero presentes en el pellet.
<b>Hemospermia:</b>	Hematospermia; Presencia de eritrocitos en el eyaculado.
<b>Leucospermia:</b>	Leucocitospermia, Piospermia; Presencia de leucocitos en el eyaculado por sobre el valor de referencia.
<b>Necrozoospermia:</b>	Porcentaje de espermatozoides vivos menor al valor de referencia.

**El sufijo espermia se refiere al eyaculado y zoospermia al espermatozoide.** Por lo tanto los siguientes términos NO deben ser usados: astenospermia, astenoteratospermia, criptospermia, oligoastenospermia, oligoteratospermia, oligospermia, teratospermia.

Las siguientes tablas nos resuelven el problema que tenían los laboratorios al obtener diferentes valores en las variables determinadas en duplicados reales.

**Tabla 4: Diferencias aceptables entre dos porcentajes promedios provenientes de la misma muestra, al evaluar 200 células en cada placa, total 400 células.**

**Ejemplo 1:**

Si la vitalidad en la placa 1 nos da un valor del 60 % y en la placa 2 un valor de 68 % tenemos que:

Promedio, 64 % para lo cual la máxima diferencia aceptable observada en esta tabla corresponde a 10, entonces como 68-60 es 8 la vitalidad espermática que informaremos es de 68 % de lo contrario si la diferencia fuese mayor a la diferencia aceptable, se tendrá que analizar un nuevo set de preparados.

Average (%)	Acceptable Difference*
0	1
1	2
2	3
3-4	4
5-7	5
8-11	6
12-16	7
17-23	8
24-34	9
35-65	10

Average (%)	Acceptable Difference*
66-76	9
77-83	8
84-88	7
89-92	6
93-95	5
96-97	4
98	3
99	2
100	1

*\*Based on the rounded 95% confidence interval.*

**Tabla 5: Error de muestreo en porcentaje (%) de acuerdo al número total de células contadas.**

**Ejemplo 2:** El valor mínimo a evaluar para todas las variables, será de 200 células y por duplicado, lo que nos entrega un valor total de 400 células analizadas y con esto aseguramos un error de muestra del 5 %.

Total (N)	Sampling error (%)	Total (N)	Sampling error (%)	Total (N)	Sampling error (%)
1	100	25	20	85	10.8
2	70.7	30	18.3	90	10.5
3	57.7	35	16.9	95	10.3
4	50	40	15.8	100	10
5	44.7	45	14.9	150	8.2
6	40.8	50	14.1	200	7.1
7	37.8	55	13.5	250	6.3
8	35.4	60	12.9	300	5.8
9	33.3	65	12.4	350	5.3
10	31.6	70	12	400	5
15	25.8	75	11.5	450	4.7
20	22.4	80	11.2	500	4.5

Página 37 “WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen.

**Tabla 6: Diferencia aceptable entre dos recuentos que entregan una suma**

**Ejemplo 3:** Si el recuento de células redondas en la placa 1 nos entrega un valor del 100 y en la placa 2 un valor de 120 tenemos que:

La suma es 220 para lo cual la máxima diferencia aceptable observada en esta tabla corresponde a 29, entonces como 120-100 es 20, Se acepta la suma de 220 y se proceden a hacer los cálculos para determinar la concentración de las células, determinadas según dilución.

Sum	Acceptable Difference*	Sum	Acceptable Difference*
144–156	24	329–346	36
157–169	25	347–366	37
170–182	26	367–385	38
183–196	27	386–406	39
197–211	28	407–426	40
212–226	29	427–448	41
227–242	30	449–470	42
243–258	31	471–492	43
259–274	32	493–515	44
275–292	33	516–538	45
293–309	34	539–562	46
310–328	35	563–587	47

\*Based on the rounded 95% confidence interval.

Página 42 “WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen.

**Tabla 7: Diferencia aceptable entre dos bajos recuentos que entregan una suma**

**Ejemplo 4:** Idéntico al ejemplo 3 y se incluye el calculo para bajas concentraciones.

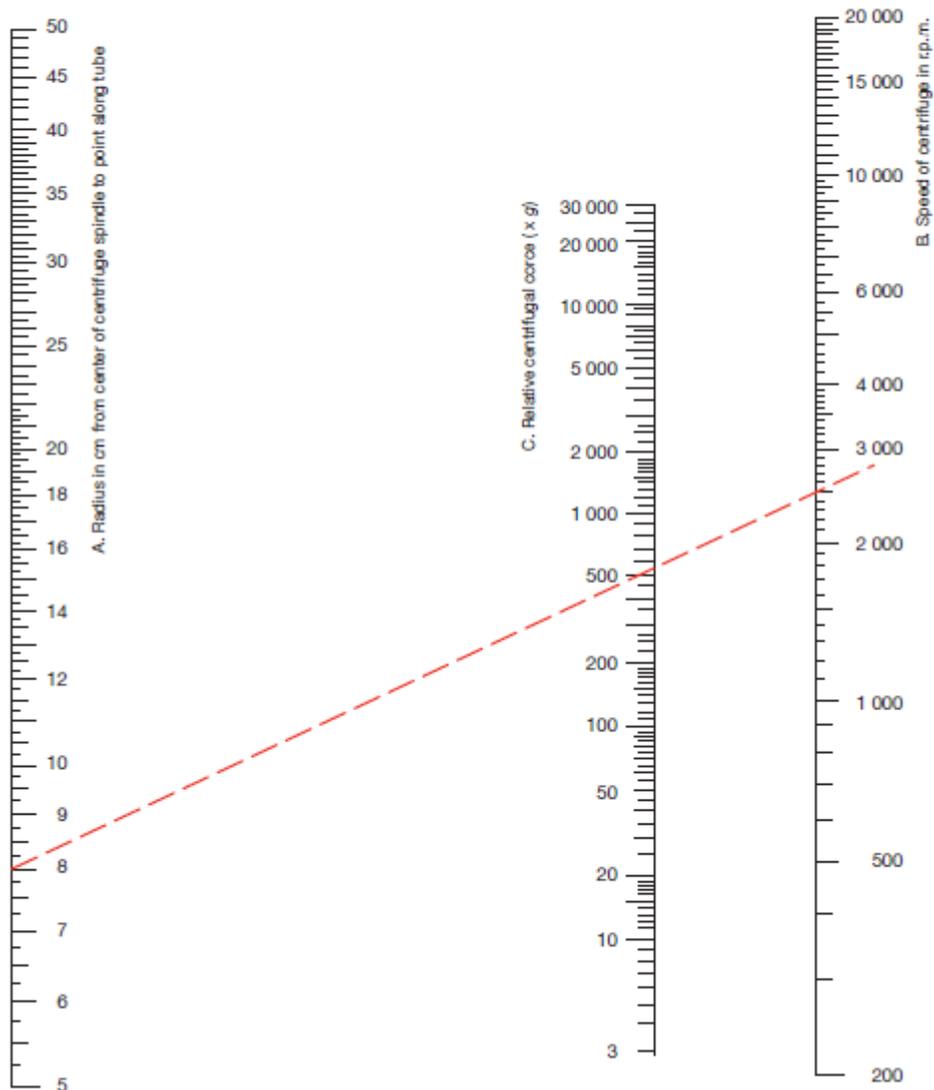
Sum	Acceptable difference*	Sum	Acceptable difference*	Sum	Acceptable difference*
35-40	12	144-156	24	329-346	38
41-47	13	157-169	25	347-366	37
48-54	14	170-182	26	367-385	38
55-62	15	183-196	27	386-406	39
63-70	16	197-211	28	407-426	40
71-79	17	212-226	29	427-448	41
80-89	18	227-242	30	449-470	42
90-98	19	243-258	31	471-492	43
99-109	20	259-274	32	493-515	44
110-120	21	275-292	33	516-538	45
121-131	22	293-309	34	539-562	46
132-143	23	310-328	35	563-587	47

*\*Based on the rounded 95% confidence interval.*

Página 50 “WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen.

**Normograma:** De especial utilidad para extrapolar la fuerza centrifuga a las revoluciones por minutos (rpm) y viceversa.

En este ejemplo una fuerza de rotación centrifuga (RCF) de 550 g para una centrifuga con un radio de rotor de 8 cm. Corresponderá a 2500 rpm.



## **Bibliografía**

WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, Fifth edition 2010. Geneva Switzerland.

Auger J. et al. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New England Journal of Medicine*, 332:281-285.

Cooper T et al. (2007). Ejaculate volume is seriously underestimated when semen is pipetted or decanted into cylinders from the collection vessel. *Journal of Andrology*, 28:1-4.

Corea M., Campagnone J., Sigman M. (2005). The diagnosis of azoospermia depends on the force of centrifugation. *Fertility and Sterility*, 83: 920-922

Weiske W et al. (2000). Clinical findings in congenital absence of the vasa deferentia. *Andrologia*, 32:13-18.

Haugen TB, Grotmol T (1998). pH of human semen. *International Journal of Andrology*, 21:105-108.

Daudin M. et al. (2000). Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertility and Sterility*, 74:1164-1174.

Dadoune J. et al. (1988). Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia*, 20:211-217.

Gandini L. et al. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 15:830-839.

Larsen L. Scheike T., Jensen T., Bonde J., Ernst E., Hjollund N., Zhou Y., Skakkebaek N., Giwercman A. (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Human Reproduction*, 15:1562-1567.

Martin R et al. (2003). A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. *Biology of Reproduction*, 69:535-539.

MacLeod, J. and Gold R. (1951). The male factor in fertility and infertility. VI. Semen quality and certain other factors in relation to ease of conception. *Fertility and sterility*, 4, 10-33.

Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen T, Jorgensen N, Horte A, Irvine S, Suominen J, Andersen A, Auger J, Vierula M, Toppari J, Andersen A, Keiding N, Skakkebaek N, Spira A, Jounannet P. (2002). Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Human Reproduction*, 17:503-515.

Zinaman M, Brown C, Seleva S, Cleqq E. (2000). Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *Journal of Andrology*, 21:145-153.