



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

BIOCOMPATIBILIDAD ENTRE RECIPIENTES DE MATERIAL DE VIDRIO Y
PLÁSTICO PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRA DE SEMEN Y
CARACTERÍSTICAS MORFOTINTORIALES POR FLUORESCENCIA, EN
UN GRUPO DE ESTUDIANTES DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE
(Modalidad: Tesis de Grado)

JHOANNA MARIET BASTARDO ROSALES

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOANÁLISIS

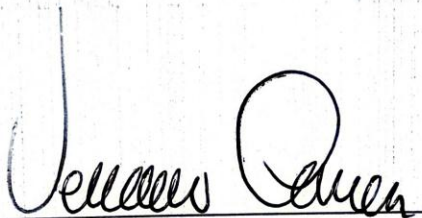
CUMANÁ, 2020

BIOCOMPATIBILIDAD ENTRE RECIPIENTES DE MATERIAL DE VIDRIO Y
PLÁSTICO PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRA DE SEMEN Y
CARACTERÍSTICAS MORFOTINTORIALES POR FLUORESCENCIA EN UN
GRUPO DE ESTUDIANTES DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE.

APROBADO POR:



Profra. Evelin Flores
Asesor



Jurado



Jurado

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| DEDICATORIA..... | I |
| AGRADECIMIENTO | II |
| LISTA DE TABLAS | III |
| LISTA DE FIGURAS | IV |
| RESUMEN | V |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| METODOLOGÍA | 7 |
| Muestra poblacional..... | 7 |
| Criterios de exclusión | 7 |
| Toma de muestra..... | 7 |
| Determinación de la calidad espermática | 8 |
| Evaluación macroscópica inicial | 8 |
| Tiempo de licuefacción..... | 8 |
| Viscosidad..... | 8 |
| Volumen..... | 9 |
| pH | 9 |
| Evaluación microscópica inicial..... | 9 |
| Movilidad..... | 9 |
| Prueba de vitalidad con eosina | 11 |
| Concentración..... | 12 |
| Número total de espermatozoides..... | 13 |
| Morfología..... | 13 |
| Evaluación de la compatibilidad de los recolectores para las muestras de semen... | 14 |
| Tinción diferencial de fluorescencia modificada | 14 |
| Análisis estadístico | 15 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 16 |
| CONCLUSIONES | 33 |
| RECOMENDACIONES | 34 |
| BIBLIOGRAFÍA | 36 |

| | |
|-------------------------|----|
| APÉNDICES | 44 |
| ANEXOS | 49 |
| HOJA DE METADATOS | 56 |

DEDICATORIA

A

Dios todopoderoso por permitirme la vida.

Mis padres, Carmen Rosales y Nelson Bastardo, por ser las personas que han confiado en mí y me han brindado su apoyo a lo largo de todo mi andar. Por todo su esfuerzo para que no perdiera el rumbo y culminar esta etapa en mi vida.

Mis hermanas Esmeralda y Fabiola Bastardo, que siempre han confiado en mí, me han animado y han estado en todo momento.

Mi amiga y compañera Hilda Blondet por su apoyo y hermandad a lo largo de nuestras carreras.

Daniel Díaz, por brindarme su cariño, paciencia y apoyo en todo momento.

AGRADECIMIENTO

A

Dios todopoderoso, por haberme dado la fortaleza necesaria durante toda mi carrera.

Especialmente a mi profesora Evelin Flores, por haberme acompañado y orientado a lo largo de esta investigación.

La Dra. Militza Guzmán, por haber autorizado el uso de los espacios del Laboratorio de Bacteriología Molecular del Postgrado de Biología Aplicada, para el desarrollo de la presente investigación.

Todos los estudiantes que participaron voluntariamente, ya que sin ellos no hubiera sido posible la elaboración de esta investigación.

Consejo de Investigación, por el apoyo financiero al proyecto de investigación con código CI-02-040100-15, que contribuyó en la realización de la presente investigación.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Evaluación macroscópica y microscópica inicial del semen, en un grupo de estudiantes de la Universidad de Oriente. Cumaná, estado Sucre y valores de referencias de la quinta edición del manual para el análisis de semen humano de la Organización Mundial de la Salud. 17

Tabla 2. Comparación del porcentaje de movilidad progresiva de espermatozoides entre recipientes de material de vidrio y plástico para la recolección de muestra de semen, en un grupo de estudiantes de la Universidad de Oriente. Cumaná, estado Sucre. 19

Tabla 3. Correlación entre las características morfológicas y tintoriales por la tinción diferencial de fluorescencia modificada de la cabeza, pieza intermedia y pieza principal de espermatozoides del semen, en un grupo de estudiantes de la Universidad de Oriente. Cumaná, estado Sucre. 20

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fotomicrografías de espermatozoides con morfología normal. 1000X
A) tinción de Papanicolaou. B) tinción diferencial de fluorescencia modificada. 25
- Figura 2. Fotomicrografías de espermatozoides con morfología anormal, espermatozoides cabeza grande (flechas). 1000X. A) tinción de Papanicolaou. B) tinción diferencial de fluorescencia modificada..... 26
- Figura 3. Fotomicrografías de espermatozoides con morfología anormal, espermatozoides cabeza pequeña (flechas). 1000X. A) tinción de Papanicolaou. B) tinción diferencial de fluorescencia modificada..... 26
- Figura 4. Fotomicrografías de espermatozoides con morfología anormal, espermatozoides con cabeza alargada (flechas). 1000X. A) tinción de Papanicolaou. B) tinción diferencial de fluorescencia modificada. 27
- Figura 5. Fotomicrografías de espermatozoides con morfología anormal, espermatozoides con exceso de citoplasma residual (flechas).1000X. A) tinción de Papanicolaou. B) tinción diferencial de fluorescencia modificada. 28
- Figura 6. Fotomicrografías de espermatozoides con morfología anormal, espermatozoides con cola enrollada (flechas). 1000X. A) tinción de Papanicolaou. B) tinción diferencial de fluorescencia modificada. 29
- Figura 7. Fotomicrografías de espermatozoides con morfología anormal. 1000X. Tinción diferencial de fluorescencia modificada. A) espermatozoides microcéfalos (flechas). B) espermatozoides con cola enrollada (flechas). C) espermatozoides con doble cabeza (flechas). D) espermatozoides con cabeza redonda (flechas). 30

RESUMEN

Se evaluó la biocompatibilidad de los recipientes de material de vidrio (control) y plástico (recolector de prueba) con muestras de semen de buena concentración y movilidad de espermatozoides, mediante el estudio de la movilidad espermática, a intervalos de 1 hora a temperatura ambiente, durante 4 horas, siguiendo los lineamientos de la quinta edición del Manual de la Organización Mundial de la Salud, para el procesamiento de muestras de semen. Con el fin de verificar que los recipientes de plástico o recolectores de orina no son tóxicos para los espermatozoides, se comparó la movilidad progresiva entre ambos tipos de material (vidrio y plástico), no hallándose diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,334$), considerando así al recipiente de plástico apto para la recolección de muestras de semen. En la determinación de los parámetros: concentración, vitalidad y morfología espermática, se obtuvieron valores dentro de los límites de referencia establecidos por la OMS en su quinta edición, cumpliendo con los estándares establecidos para ser considerada una población, aparentemente, fértil; obteniéndose, valores para concentración, vitalidad y morfología espermática de 162 millones de espermatozoides por ml de semen, 68,0% y 26,0%, respectivamente. Para analizar y asociar las características morfotintoriales de los espermatozoides, se empleó la técnica diferencial de fluorescencia modificada, la cual a través de la producción de diferentes coloraciones (verde, amarillo y anaranjado), se diferenciaron los espermatozoides morfológicamente como normales y anormales. Aquellos espermatozoides que emitieron una fluorescencia verde, se categorizaron como espermatozoides normales y presentaron una fuerte correlación ($r= 1,000$) estadísticamente significativa ($p= 0,000$). Mientras que, las tinciones amarilla ($r= -0,838$, $p= 0,009$) y anaranjada ($r= 0,940$, $p= 0,000$), estuvieron altamente correlacionadas con anomalías de los espermatozoides, destacándose que la fluorescencia anaranjada, tuvo una alta correlación, estadísticamente significativa ($r= 0,940$, $p= 0,000$) con anomalías de la cabeza, sugiriéndose una posible asociación con daños de la cromatina nuclear.

INTRODUCCIÓN

El semen es un líquido blanquecino que contiene en suspensión los espermatozoides, los cuales se producen en el testículo en dos etapas que duran, aproximadamente, 60 días. La primera etapa corresponde a la espermatogénesis, que es la formación de las espermátidas a partir de las células madres y la segunda etapa, la espermiogénesis, corresponde a la modificación morfológica de la espermátida en espermatozoide (Poirot y Cherruau, 2005).

La eyaculación es un proceso que ocurre de manera secuencial y sincronizada, la fracción prostática predomina en las primeras gotas y la secreción de las vesículas seminales en las restantes, si se fracciona la recogida del semen, la fracción inicial contendrá las secreciones testiculares, epididimarias y prostáticas, ricas en espermatozoides; la segunda fracción contendrá la secreción de las vesículas seminales. Las glándulas seminales y la próstata son dependientes en su función de los andrógenos, tanto en su diferenciación como maduración, desarrollo y mantenimiento. Ambas glándulas son órganos importantes que complementan la espermatogénesis, al aportar el vehículo de transporte, nutrición y manutención del espermatozoide que, como célula flagelar, requiere de una sustancia líquida para su desplazamiento (Vásquez y Vásquez, 2007).

Desde el punto de vista funcional, los componentes del eyaculado forman un todo, cuyo sentido biológico es hacer que el espermatozoide sea fecundante; de esta manera, la evaluación del factor masculino se realiza, inicialmente, a través del espermatograma, el cual refleja la función espermatogénica y esteroideogénica de los testículos y el estado funcional de las glándulas secundarias (Quintero, 2003). El análisis del líquido seminal constituye la primera etapa biopatológica en la exploración de la fertilidad masculina, que

permite orientar hacia una participación masculina en la infertilidad de la pareja o bien para confirmarla (Teppa y Palacios, 2004).

Desde los inicios en la investigación de la infertilidad y, por largo tiempo, los estudios estuvieron dirigidos con mayor enfoque hacia los factores involucrados en la infertilidad femenina. No obstante, los factores responsables de infertilidad en el hombre son objeto de mayor atención (Osuna, 1999).

La fertilidad es la obtención de un embarazo dentro de los 2 primeros años de relaciones sexuales, sin utilizar ningún método de planificación (Hernández *et al.*, 2005). Situación contraria a la infertilidad, la cual es definida como la incapacidad de una pareja para concebir después de un año de relaciones sexuales frecuentes, sin medidas anticonceptivas. La prevalencia de la infertilidad se ha estimado que ocurre en un 15% de las parejas en edad reproductiva y sus causas pueden presentarse de forma unitaria o multifactorial (Sánchez *et al.*, 2014).

Existe un creciente problema de salud reproductiva por la disminución considerable en la calidad y fertilidad de los espermatozoides. Aunque la causa de la infertilidad masculina se presenta, en algunos casos, debido a afecciones patológicas subyacentes, la mayoría de los casos se deben a una calidad deficiente del semen o anomalías del esperma de causas desconocidas (Famurewa y Ugwuja, 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que existe infertilidad masculina cuando hay alteración del análisis del semen, fundamentalmente, de la calidad seminal definida por la concentración de espermatozoides, la movilidad y morfología asociada a alteraciones propias del líquido seminal (Barja y Berrios, 2003).

El análisis del semen es el biomarcador más usado para predecir el potencial de fertilidad masculina; provee información sobre el estatus funcional

de los túbulos seminíferos, epidídimo y glándulas sexuales accesorias (Esteves, 2014). El análisis de rutina circunscribe una evaluación macroscópica inicial del semen que incluye tiempo de licuefacción, viscosidad, pH, color, olor y volumen del semen; así como una evaluación microscópica inicial donde se determinan la concentración, movilidad, vitalidad y morfología de los espermatozoides. Ensayos de investigación, no considerados métodos de rutina, que evalúan la normalidad de la cromatina de los espermatozoides y ADN, del mismo modo, son incluidos en el manual del análisis del semen humano (WHO, 2010).

El estudio de la integridad del ADN nuclear contenido en la cabeza de los espermatozoides, es uno de los procedimientos que ha alcanzado particular importancia en la última década. La fragmentación del ADN consiste en interrupciones en las cadenas simples o dobles del ADN que ocurre, frecuentemente, en el semen de pacientes no fértiles. Se ha comprobado que la proporción de ADN fragmentado es mayor en espermatozoides de hombres que consultan por infertilidad, comparada con sujetos de fertilidad probada. Además, en hombres con espermatograma alterado se ha encontrado mayor daño del ADN nuclear (Cruz *et al.*, 2010).

Otros estudios, han demostrado que los daños morfológicos de la cabeza del espermatozoide están estrechamente relacionados con la fragmentación de ADN (Flores *et al.*, 2012).

La morfología del espermatozoide es útil en el estudio inicial de la evaluación del hombre e identifica también un incremento en el riesgo de anomalías cromosómicas. Sin embargo, la morfología espermática anormal por sí sola no, necesariamente, refleja dichas anomalías (López *et al.*, 2001).

Las tinciones empleadas para los estudios de la integridad de ADN se basan en colorantes que se unen a las histonas (azul de anilina) o ácido nucleico (naranja de acridina, cromomicina) y se evalúan histológicamente o

mediante citometría de flujo. Otros métodos incluyen los basados en la evaluación de las roturas de cadenas de ADN, tales como la terminal de desoxinucleotidiltransferasa (TDT), mediada por el trifosfato de desoxiuridina (DUTP), el ensayo cometa o dispersión de la cromatina de los espermatozoides (SCD). Los resultados de estas pruebas se han correlacionado entre sí y también con la morfología, movilidad y vitalidad de los espermatozoides (Chohan *et al.*, 2006).

Cuando existe alteración de la cromatina espermática, la tinción naranja de acridina, produce un color anaranjado fluorescente, como consecuencia de la presencia de cadenas simples de ADN (Cruz *et al.*, 2010). Se explica que la tinción con fluorescencia verde observada con naranja de acridina es por intercalación de monómeros entre las bases paralelas con doble enlace de la hélice de ADN. La fluorescencia naranja o roja indica agujeros iónicos entre los polímeros de naranja de acridina y los enlaces sencillos del ADN (López *et al.*, 2001).

El colorante naranja de acridina es un fluorocromo que se intercala en el ADN, produciendo una fluorescencia verde e interactúa con el ARN por atracción electrostática, manifestando un color anaranjado fluorescente (Darzynkiewicz, 1990). La tinción diferencial de fluorescencia modificada, emplea bajas concentraciones de naranja de acridina (0,05%) y fluoresceína de sodio (0,002%), además, requiere de una solución decolorante de alcohol/acetona, que ayuda a remover el naranja de acridina no adherido al material genético (Flores *et al.*, 2008).

La tinción diferencial de fluorescencia modificada ha sido evaluada en bacterias, confirmándose que las variaciones de color que se producen en las bacterias corresponden a fases del ciclo celular bacteriano, en donde están asociadas a la síntesis de ADN y ARN (Flores *et al.*, 2014; Velásquez, 2015).

No obstante, este método de tinción no ha sido evaluado en células espermáticas.

Sobre la base de este mecanismo de tinción, Flores *et al.* (2008) propusieron que la coloración anaranjada fluorescente, probablemente, se deba a una síntesis activa de ARN, mientras que el color amarillo puede estar relacionado con una síntesis no tan activa de ARN. Por otro lado, Albarado y Flores (2008), en el estudio sobre la evaluación diferencial de fluorescencia modificada en *Pseudomonas* spp. aisladas del suelo, sugirieron que el color verde fluorescente se deba a una síntesis activa de ADN.

Considerando que el análisis del semen constituye la base de importantes decisiones en relación a un tratamiento apropiado para la pareja infértil (De Alvear, 1995; Acosta y Kruger, 1996) y la necesidad de la reproducibilidad de los resultados del análisis del semen, para un diagnóstico, tratamiento y asesoría a la pareja infértil, es requerido la aplicación de métodos estandarizados en la práctica del análisis del semen en los laboratorios clínicos.

Las pautas para la toma de muestra del semen para fines de diagnóstico y de investigación, según la quinta edición del manual de análisis del semen humano (WHO, 2010), recomiendan el uso de recipientes de vidrio o plástico, en los recipientes de material de plástico se debe verificar la ausencia de efectos tóxicos para los espermatozoides, para evitar la alteración de la morfología y la muerte de los espermatozoides. Así pues, motivado a garantizar la confiabilidad de los resultados en el diagnóstico de la infertilidad de pareja; así como la inexistencia de publicaciones bibliográficas en Venezuela que reporten la evaluación del efecto tóxico de los recipientes de material de plástico para los espermatozoides, así como la importancia del aporte de nuevos métodos que valoren la calidad espermática, se hace necesario, evaluar la biocompatibilidad de recipientes de plásticos, como lo son los recolectores de

orina, usados en la práctica diaria para el análisis de semen, en los laboratorios clínicos de Venezuela.

Por otro lado, aplicar, por primera vez, la tinción diferencial de fluorescencia modificada en el estudio morfológico de los espermatozoides, podría permitir la detección de la desnaturalización del ADN nuclear en espermatozoides anormales, lo cual está asociado a las anomalías de la cabeza e influye en la infertilidad del hombre.

METODOLOGÍA

Muestra poblacional

La población en estudio estuvo conformada por un grupo de 8 estudiantes, con edades comprendidas entre 18 y 45 años, que asistieron al laboratorio de Histología del Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, estado Sucre.

Esta investigación, se llevó a cabo bajo las normas de bioética establecidas, por la OMS, para trabajos de investigación en humanos y la declaración de Helsinki, documentos que han ayudado a delinear los principios de ética pertenecientes a la investigación biomédica en seres humanos (OPS, 2003). A los individuos seleccionados, se les informó sobre los alcances y objetivos de la presente investigación. Así como, las ventajas y desventajas de su inclusión en las mismas, esto con el propósito de obtener su consentimiento por escrito (apéndice 1). Además, se aplicó una encuesta a cada individuo con el fin de obtener datos de interés para el estudio (apéndice 2).

Criterios de exclusión

Fueron excluidos aquellos estudiantes con tratamiento médico que pudiera afectar la función reproductora (quimioterapia, radioterapia), así como, aquellos pacientes con antecedentes de enfermedades de transmisión sexual, vasectomizados, varicocele y fiebre, producto de algún proceso viral o bacteriano.

Toma de muestra

A los pacientes se les instruyó sobre los pasos a seguir para la correcta toma de muestra, siguiendo los criterios y pautas planteadas en el manual de la OMS (WHO, 2010) para la recolección de muestra de semen (apéndice 3). Se les proporcionó un recipiente de vidrio para recoger la muestra, el cual sirvió como control; este recipiente, previo a la toma de muestra, se lavó con una solución jabonosa neutra (Labomed, Venezuela), agua destilada y se esterilizó

en autoclave. Una vez recogida la muestra, se repartió en partes iguales en los dos recipientes, una mitad representó el control (material de vidrio) y la otra mitad, el evaluado (recipiente de plástico).

Determinación de la calidad espermática

Siguiendo los criterios y parámetros establecidos por el manual para el procesamiento de muestras de semen de la OMS (WHO, 2010), todas las muestras recolectadas fueron procesadas de la siguiente forma:

Evaluación macroscópica inicial

Se determinaron los parámetros como tiempo de licuefacción, volumen, viscosidad y pH.

Tiempo de licuefacción

El tiempo de licuefacción en el semen normal debe completarse entre los 15 a 30 min después de la eyaculación. Por lo tanto, una vez recolectadas las muestras de semen, se esperó un lapso de tiempo de aproximadamente 15 a 30 min a temperatura ambiente, para que ocurriera la licuefacción y así proceder a su evaluación y a la determinación del resto de los parámetros.

Viscosidad

Usando una pipeta de plástico desechable con diámetro, aproximadamente, de 1,5 mm, se aspiró la muestra de semen; la viscosidad se evaluó al observar la longitud del filamento formado, cuando el semen cayera por gravedad. La viscosidad se consideró normal, cuando la longitud del filamento no fue mayor a 2 cm. En muestras normales el semen sale de la pipeta en pequeñas gotas discretas, la viscosidad se reportó según el filamento que formaba la muestra, como normal o anormal.

Volumen

El volumen normal de eyaculado varía de 2 a 4 ml. El semen se recogió en un recipiente, pre pesado y limpio. Posteriormente, se pesó el recipiente con el semen en una balanza analítica. Se calculó la diferencia para obtener el valor del volumen, y, finalmente se comparó el valor obtenido con el valor del límite inferior de referencia.

El límite inferior de referencia del volumen del semen es 1,5 ml (percentil 5, intervalo de confianza del 95% (IC), 1,4-1,7).

pH

El pH de las muestras de semen varía normalmente entre un rango de 7,2 – 8,0. Primeramente, antes de extraer la alícuota de semen para la evaluación, se mezcló bien la muestra de semen en su envase original, no vigorosamente, evitando la formación de burbujas. Esto puede lograrse por aspiración de la muestra 10 veces con una pipeta de plástico desechable (estéril) con cavidad amplia (aproximadamente 1,5 mm de diámetro). No mezclar con un vórtex a alta velocidad ya que podría dañar los espermatozoides. Asimismo, una vez mezclada la muestra de semen, el pH se midió depositando una gota de esperma sobre tira de papel de pH y al cabo de 30 s el color de la zona impregnada fue comparado con una escala colorimétrica para leer el pH.

Evaluación microscópica inicial

El análisis microscópico comprende movilidad, vitalidad, concentración, número total y morfología de los espermatozoides.

Movilidad

Una vez ocurrido el proceso de licuefacción (entre los 15 a 30 min después de la eyaculación) y mezclada la muestra de semen como se explica

anteriormente, se evaluó la movilidad espermática mediante la preparación húmeda, es decir, se tomó, una alícuota de 10 μ l con pipeta de desplazamiento positivo, se colocó en un porta objeto limpio y se cubrió con un cubre objeto de 22 mm x 22 mm, evitando la formación de burbujas de aire. Se montaron dos preparaciones húmedas, mezclando bien la muestra de semen antes de tomar cada alícuota. Asimismo, antes de observar al microscopio, se esperó hasta que los espermatozoides y otros elementos dejaran de moverse por la corriente (dentro de 60 s). La preparación se examinó, con un microscopio óptico con magnificación de 400x.

Se exploró y contó con un contador de laboratorio (contador hematológico), rápidamente, el número de espermatozoides móviles (PR). Luego, los espermatozoides no progresivos (NP) y, finalmente, los inmóviles (IM). Se evaluaron al menos 200 espermatozoides en un total de al menos 5 campos en cada preparación húmeda, a fin de lograr un error de muestreo bajo aceptable.

Se calculó la media y la diferencia entre los dos porcentajes para los grados de mayor frecuencia (PR, NP o IM) en las preparaciones húmedas. Se determinó la aceptabilidad de la diferencia a partir de la tabla 1 del manual de la OMS en su quinta edición (anexo 1), si la diferencia entre los porcentajes fue aceptable, se reportó la media de los porcentajes para cada categoría de movilidad (PR, NP e IM). Cuando la diferencia fue alta, se consideró no aceptable y se repitió el procedimiento, tomando dos alícuotas de la muestra de semen y preparando dos nuevos montajes para repetir la evaluación. Para culminar, se reportó el porcentaje promedio para cada categoría de movilidad al número entero más próximo.

El límite inferior de referencia de la movilidad total (PR + NP) es de 40% (percentil 5, IC 95%: 38-42). El límite de referencia inferior de la movilidad progresiva (PR) es de 32% (percentil 5, IC 95%: 31-34).

Prueba de vitalidad con eosina

Se preparó una solución de NaCl al 0,9% (p/v), a partir de 0,9 g de NaCl en 100 ml de agua destilada y eosina Y al 0,5% (p/v), a partir de 0,5 g de eosina Y (índice de color 45380) en 100 ml de NaCl 0,9%.

Una vez preparado el reactivo, se procedió a mezclar bien la muestra de semen, posteriormente, se tomó una alícuota de 5 μ l de semen con pipeta de desplazamiento positivo y combino con 5 μ l de la solución de eosina Y sobre un portaobjetos, se mezcló con la punta de una pipeta con movimientos giratorios rápidos sobre el portaobjetos, se colocó un cubreobjetos de 22 mm x 22 mm y espere 30 s. Se mezcló, nuevamente, la muestra de semen y montó un duplicado, repitiendo los pasos anteriores.

Se examinó cada lámina, con microscopio de campo brillante, contando el número de células coloreadas (muertas) y no coloreadas (vivas) a 400x de magnificación con la ayuda de un contador hematológico. Se evaluaron 200 espermatozoides en cada réplica, a fin de lograr un error de muestreo bajo aceptable. Se calculó la media y la diferencia de los dos porcentajes de células vivas en las láminas. Se determinó la aceptabilidad de la diferencia a partir de la tabla 1 del manual de la OMS vigente (anexo 1). Si la diferencia entre los porcentajes era aceptable, se reportó la media de los porcentajes de espermatozoides vivos. Si la diferencia era alta, no se aceptaban y se realizaban dos nuevos preparados a partir de dos alícuotas frescas de la muestra de semen y posteriormente se repetiría la evaluación. Para culminar, se reportó la media del porcentaje de espermatozoides vivos, redondeado al número entero más próximo.

El límite de referencia inferior para la vitalidad (espermatozoides con membrana intacta) es de 58% (percentil 5, IC 95%: 55-63).

Concentración

Se examinó una preparación húmeda bien mezclada de semen licuado sin diluir, entre cubre objetos y porta objetos, la cual permitió determinar la dilución apropiada (anexo 2), una vez determinada la dilución a emplear, la muestra de semen se diluyó con un fijador, preparándose de la siguiente manera: se disolvieron 50 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y 10 ml de formalina al 35,0% (v/v) en 1000 ml de agua destilada. Se le añadieron 5 ml de violeta de genciana (índice de color 42555) saturado (>4 mg/ml) para resaltar las cabezas de los espermatozoides.

Una vez realizada la dilución de la muestra de semen por duplicado se cargaron dos cámaras de Neubauer con la pipeta de desplazamiento positivo, se dejaron los hemocitómetros en cámara húmeda y se evaluó la muestra dentro de 10 a 15 min. Se contaron 200 espermatozoides por réplica, a fin de lograr un error de muestreo bajo aceptable, comparándolo con los valores de la tabla 2 del manual para procesamiento de muestras de semen de la OMS vigente (anexo 3). Primero, se evaluó el cuadrado grande central (número 5) de la cámara de Neubauer, fila por fila, hasta que por lo menos 200 espermatozoides fueron observados y se haya examinado una fila completa (de las 5 del cuadrado grande). El conteo se realizó por filas completas, sin detenerse a la mitad de una fila. Si 200 espermatozoides no se observaron en las 5 filas del cuadrado grande central, se siguió contando en las filas de los dos cuadrados adyacentes (números 4 y 6). Se calculó la suma y la diferencia de los dos números. Además, se determinó la aceptabilidad de la diferencia a partir de la tabla 4 descrita en el manual de la OMS en su quinta edición (anexo 4). Finalmente, se realizaron los cálculos matemáticos para determinar la concentración (anexo 5).

El límite inferior de referencia para la concentración de espermatozoides es de 15×10^6 espermatozoides/ml (percentil 5, IC 95%: $12-16 \times 10^6$).

Número total de espermatozoides

El número de espermatozoides en el eyaculado se calculó a partir de la concentración de espermatozoides, refiriéndose al número total de espermatozoides en el eyaculado completo, se obtuvo su valor multiplicando la concentración de espermatozoides por el volumen del semen.

El límite inferior de referencia del número total de espermatozoides es de 39×10^6 espermatozoides por eyaculado (percentil 5, IC 95%: $33-46 \times 10^6$).

Morfología

Se mezcló la muestra de semen y se transfirió una alícuota de 10 μ l, a un porta objeto limpio y se elaboró un frotis, este procedimiento se repitió para el duplicado, las láminas se dejaron secar al aire por 4 h.

Los frotis se fijaron con etanol al 95,0% por 15 min y se aplicó el método de coloración de Papanicolaou (Biopur, Argentina) de la siguiente manera; primeramente, se sumergió el extendido fijado en etanol al 80%, seguidamente, en etanol al 50% y, posteriormente, en agua destilada durante 30 s. Consecutivamente, se introdujo en hematoxilina de Harris por 4 min, se lavó el exceso de colorante con agua destilada durante 30 s y se procedió a realizar de 4 a 8 inmersiones por 1 s en etanol ácido. Seguidamente, se dejó correr agua de chorro por la lámina durante 5 min. Próximamente, se sumergió la lámina en etanol al 50% y 80%, durante 30 s en cada oportunidad. Se realizó una segunda fijación con etanol al 95% y luego, se coloreó el extendido con naranja O6 por 1 min. Posteriormente, se realizaron una tercera, cuarta y quinta fijación con etanol al 95%, durante 30 s y se sumergió la lámina durante un tiempo de 1 min en verde EA-50, se realizaron una sexta y séptima fijación con etanol al 95% y, finalmente, se realizaron 2 inmersiones en etanol al 100% durante 15 s.

Culminando la coloración, se analizó la morfología espermática clasificando los espermatozoides como normal o anormal (anexo 6), a través de la observación microscópica con magnificación de 1000x con aceite de inmersión. Se contaron 200 espermatozoides por réplica, para los porcentajes de formas normales y anormales, a fin de lograr un error de muestreo bajo aceptable. Además, se determinó la aceptabilidad de las diferencias a partir de la tabla 1 descrita en el manual de la OMS en su quinta edición (anexo 1). Si la diferencia entre los porcentajes era aceptable, se reportó la media de la morfología normal. Sin embargo, si la diferencia era alta, se repetía la evaluación en las mismas láminas. Se reportó la media de los porcentajes de formas normales al número entero más cercano.

El límite de referencia inferior de formas normales es del 4% (percentil 5, IC 95% 3,0- 4,0).

Evaluación de la compatibilidad de los recolectores para las muestras de semen

En la valoración del recipiente de material de plástico, se evaluó la movilidad espermática a intervalos de 1 h a temperatura ambiente, durante 4 h, solo se incluyeron los datos de muestras, con buena concentración y movilidad de espermatozoides. El criterio de biocompatibilidad se basó en la inexistencia de diferencias significativas ($p > 0,05$), entre el control (material de vidrio), y el evaluado (material de plástico), considerando los recipientes de ensayo apropiados para la recogida de muestra de semen (WHO, 2010).

Tinción diferencial de fluorescencia modificada

Se preparó el colorante naranja de acridina al 0,7% en buffer acetato pH 4,0. Para preparar un volumen de 100 ml de solución de naranja de acridina, se agregaron 700 mg de naranja de acridina doble sal hemi (Sigma- Aldrich, USA) en 100 ml de buffer acetato pH 4,0; éste, previamente, se preparó mezclando

82 ml de ácido acético 0,2 mol.l⁻¹ con 18 ml de acetato de sodio 0,2 mol.l⁻¹. El decolorante alcohol etílico/acetona se preparó en una proporción 1:1. La solución de fluoresceína de sodio se ajustó a un pH de 6,5 y se preparó al 0,002% en alcohol etílico. Un volumen de 100 ml de solución contenía 2 mg de fluoresceína de sodio (Sigma- Aldrich, USA), 1,5 ml de ácido acético 0,4 mol.l⁻¹, 0,5 ml de buffer acetato pH 4,6 y 98 ml de alcohol etílico. El buffer acetato pH 4,6 contenía 52 ml de ácido acético 0,2 mol.l⁻¹ y 48 ml de acetato de sodio 0,2 mol.l⁻¹ (Flores *et al.*, 2014).

Se cubrió la lámina con la solución de naranja de acridina por 2 min, una vez cumplido el tiempo se lavó con agua de chorro y se procedió a decolorar con alcohol etílico-acetona, exactamente por 10 s, inclinando la lámina en un ángulo, aproximadamente, de 45 grados, nuevamente se lavó con agua de chorro; posteriormente, la lámina fue cubierta con la solución de fluoresceína de sodio por 2 min y al cabo de ese tiempo, se lavó con agua y se dejó secar a temperatura ambiente para su posterior observación microscópica (Flores *et al.*, 2014). Los colores a observar son verde, amarillo y anaranjado fluorescente (Flores *et al.*, 2008).

Análisis estadístico

Se realizó una prueba para muestras pareadas, *t de Student*, la cual determinó si existía o no diferencias significativas del parámetro movilidad, entre el control, recipiente de vidrio y el evaluado, recolector de orina; y se correlacionaron las tinciones verde, amarillo y anaranjado fluorescente del método diferencial de fluorescencia modificado con normalidad y anormalidades morfológicas de los espermatozoides, aplicando un análisis de múltiples variables (Remington y Schork, 1974). El programa estadístico aplicado fue Statgrafics Centurion versión 5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron estudiantes en edades comprendidas entre 18 y 45 años, resultando una edad media de 24,5 años con una desviación estándar de $\pm 2,07$. El mayor porcentaje de estudiantes que acudieron, voluntariamente, al laboratorio, correspondieron a una población joven en edades reproductivas.

La tabla 1, muestra las medias y desviaciones estándares para las variables macroscópicas y microscópicas de la evaluación inicial del análisis de semen, en un grupo de estudiantes de la Universidad de Oriente, en la cual, se observa que los valores obtenidos se encontraron dentro de los límites de referencia establecidos por la OMS (WHO, 2010). Asimismo, la población en estudio cumplió con los estándares establecidos para ser considerada una población, aparentemente, fértil; obteniéndose valores para concentración, movilidad y morfología espermática de 162 millones de espermatozoides por ml de semen; 62,0% y 26,0%, respectivamente. Según Cortés *et al.* (2007) y Góngora y Fontecilla (2010), la calidad seminal se asocia, generalmente, a una buena concentración y morfología espermática.

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con los trabajos realizados por Espinoza *et al.*, (2011), Senovia y Cardona, (2013) y Curi *et al.*, (2014), los cuales determinaron los parámetros seminales en hombres con fertilidad probada, obteniendo como resultado, parámetros seminales dentro de los valores de referencia publicados en el manual de procesamiento del semen humano de la OMS vigente (WHO, 2010).

Tabla 1. Evaluación macroscópica y microscópica inicial del semen, en un grupo de estudiantes de la Universidad de Oriente. Cumaná, estado Sucre y valores de referencias de la quinta edición del manual para el análisis de semen humano de la Organización Mundial de la Salud.

| Evaluación macro y microscópica | $\bar{X} \pm DS$ | VR |
|---|------------------|------|
| Tiempo de licuefacción (min) | 20±3 | ≤20 |
| Volumen (ml) | 3,7±1,7 | ≥1,5 |
| pH | 8,1±0,6 | ≥7,2 |
| Número total (millones de espermatozoides por eyaculado) | 549±162 | ≥39 |
| Concentración (millones de espermatozoides por ml de semen) | 162±60 | ≥15 |
| Movilidad total PR+NP (%) | 62±17 | ≥40 |
| Movilidad progresiva (%) | 49±16 | ≥32 |
| Vitalidad (% vivo) | 68±14 | ±58 |
| Morfología normal (%) ^{Papanicolaou} | 26±18 | ≥4 |
| Morfología normal (%) ^{Fluorescencia} | 9±4 | |

VR: valores de referencia; PR: progresivo; NP: no progresivo DS: desviación estandar

En la determinación de los parámetros seminales, existe un grado de error analítico donde el análisis del semen, pierde por completo su utilidad clínica si no se realiza bajo estrictas normas de control. En respuesta a este problema, la OMS buscó estandarizar y sistematizar los parámetros para el análisis seminal. La principal diferencia del manual de la OMS en su quinta edición (WHO, 2010), respecto a los anteriores y otros de su tipo es que, por primera vez, los valores que se proponen han sido obtenidos de varones cuya pareja ha logrado el embarazo durante los últimos 12 meses, por lo que son considerados “fértils”.

Sin embargo, la OMS recalca que estos valores son solo una guía y que cada laboratorio, dependiendo de su realidad geográfica, debe hacer esfuerzos

para obtener sus propios valores (Sarabia y Munuce, 2011). Uno de los mayores desafíos de este nuevo manual es la aceptación por parte de los andrólogos e investigadores en salud reproductiva. Los cambios en los referenciales de concentración y movilidad espermática son los más aceptados (81% y 96%, respectivamente). Del mismo modo, la nueva clasificación en la movilidad es mucho más cuantitativa al ser analizado solo en tres grupos: progresivos, no progresivos y espermatozoides inmóviles (Cardona, 2010). Sin embargo, en las bibliografías evaluadas, no se hallaron estudios sobre la calidad espermática en la población objeto de estudio, que permitan comparar los resultados hallados con el presente trabajo de investigación.

De las ocho muestras de semen solo seis (6/8) se incluyeron para valorar la biocompatibilidad de los recipientes de plástico, por presentar una buena concentración y movilidad de espermatozoides, expresándose en la tabla 2 los porcentajes de movilidad progresiva de los espermatozoides durante el tiempo de evaluación del líquido seminal, tanto para los recolectores de material de vidrio como plástico. Se obtuvo que no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,334$) en la movilidad progresiva entre ambos tipos de recolectores, considerándose al recolector de plástico apto para la toma de muestras de semen, al no ser tóxico para los espermatozoides, por lo tanto, satisface las necesidades de recogida de muestra de semen. Investigaciones recientes que valoran las alteraciones en el semen, se acoplan a los lineamientos del manual para el estudio del semen (Burga, 2016; Salvatierra y Villegas, 2017). No obstante, al evaluar diferentes bibliografías, no se encontraron trabajos de investigación que hayan establecido o estudiado la toxicidad del recolector de material de plástico, como recolector de muestras de semen.

Tabla 2. Comparación del porcentaje de movilidad progresiva de espermatozoides entre recipientes de material de vidrio y plástico para la recolección de muestra de semen, en un grupo de estudiantes de la Universidad de Oriente. Cumaná, estado Sucre.

| Tiempo (h) | Movilidad progresiva de espermatozoides (%) según tipo de recolector | |
|------------|---|------------------------|
| | Recolector de vidrio | Recolector de plástico |
| 1 | 44 | 66 |
| 2 | 56 | 62 |
| 3 | 54 | 51 |
| 4 | 10 | 29 |
| 1 | 51 | 66 |
| 2 | 52 | 67 |
| 3 | 24 | 34 |
| 4 | 5 | 8 |
| 1 | 70 | 52 |
| 2 | 51 | 52 |
| 3 | 39 | 47 |
| 4 | 26 | 16 |
| 1 | 63 | 63 |
| 2 | 30 | 26 |
| 3 | 32 | 22 |
| 4 | 30 | 26 |
| 1 | 55 | 72 |
| 2 | 48 | 81 |
| 3 | 45 | 31 |
| 4 | 49 | 34 |
| 1 | 54 | 50 |
| 2 | 60 | 61 |
| 3 | 47 | 40 |
| 4 | 22 | 23 |

$p= 0,334^{ns}$

ns: estadísticamente no significativo ($p>0,05$)

En la tabla 3, se presenta la correlación entre las características morfológicas y tintoriales por la tinción diferencial de fluorescencia modificada de la cabeza, pieza intermedia y pieza principal de espermatozoides del semen, en un grupo de estudiantes de la Universidad de Oriente. Cumaná, estado Sucre.

Tabla 3. Correlación entre las características morfológicas y tintoriales por la tinción diferencial de fluorescencia modificada de la cabeza, pieza intermedia y pieza principal de espermatozoides del semen, en un grupo de estudiantes de la Universidad de Oriente. Cumaná, estado Sucre.

| Espermatozoide | Morfología | Tinción | Categoría | |
|----------------|------------|----------|-----------|-----------|
| | | | Normal | Anormal |
| Normal | Cabeza | Verde | r= 1,000 | r= 0,572 |
| | | | p= 0,000* | p= 0,139 |
| | | Verde | r= 0,454 | r= 0,3649 |
| | | | p= 0,258 | p= 0,3741 |
| | | Amarilla | r= 0,838 | r= 0,309 |
| | | | p= 0,009* | p= 0,457 |
| | PI | Amarilla | r= 0,180 | r= 0,000* |
| | | | p= 0,337 | p= 0,052 |
| | | Naranja | r= 0,414 | r= 0,903 |
| | | | p= 0,902 | p= 0,483 |
| | | Amarilla | r= 0,002* | r= 0,225 |
| | | | p= 0,066 | p= 0,675 |
| | PP | Amarilla | r= 0,675 | r= 0,481 |
| | | | p= 0,066 | p= 0,675 |
| | | Naranja | r= 0,837 | r= 0,645 |
| | | | p= 0,010* | p= 0,084 |

r: valor de correlación, p: valor probabilístico, *: estadísticamente significativo (p<0,05), PI: pieza intermedia, PP: pieza principal

De acuerdo al análisis de correlación de múltiples variables, hubo una fuerte correlación ($r= 1,000$), estadísticamente significativa ($p= 0,000$) entre los espermatozoides categorizados como normales con espermatozoides verdes fluorescentes. Mientras que la tinción anaranjada, estuvo altamente correlacionada a espermatozoides anormales, específicamente, a la anomalía de la cabeza ($r= 0,940$, $p= 0,000$), asimismo, espermatozoides con cabeza normal pero teñidos anaranjados fluorescentes, presentaron una alta correlación con anomalía de la pieza intermedia ($r= 0,902$, $p= 0,002$) y pieza principal ($r= 0,837$, $p= 0,010$). La alta correlación de la tinción amarilla, fue inversa a la normalidad del espermatozoide ($r= -0,838$), siendo esta estadísticamente significativa ($p= 0,009$), interpretándose que la fluorescencia amarilla, igualmente, se asocia a morfología anormal del espermatozoide, especialmente, de la cabeza.

El análisis de la morfología de los espermatozoides está relacionada con una serie de dificultades asociadas a la falta de objetividad, la variación en la interpretación o mal desempeño en evaluaciones externas de control de calidad. Por lo tanto, se deben aplicar criterios de clasificación para la morfología normal del espermatozoide (anexo 7), tomando en consideración como límite de referencia $\geq 4\%$ de formas normales presentes en la muestra. El espermatozoide consiste de cabeza, cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal; como el cuello y pieza terminal son difíciles de observar al microscopio de luz, se considera para el estudio microscópico del espermatozoide que la célula está constituida por cabeza y cola (pieza intermedia y pieza principal). Para que un espermatozoide se considere normal, tanto la cabeza como la cola deben ser morfológicamente normales (WHO, 2010).

La aplicación de la tinción de fluorescencia modificada como ya se ha explicado, se ha realizado en el ciclo celular bacteriano, donde, las

fluorescencias verde, amarilla y anaranjada emitidas, están asociadas a síntesis de ADN y ARN (Flores *et al.*, 2014).

Sobre la base del mecanismo de tinción de la técnica diferencial de fluorescencia modificada, Flores *et al.* (2008) propusieron tres coloraciones observadas; verde, amarilla y anaranjada fluorescente, explican que la coloración anaranjada fluorescente, probablemente, se deba a una síntesis activa de ARN, mientras la coloración amarilla puede estar relacionada con una síntesis no tan activa de ARN. Por otro lado, Albarado y Flores (2008), sugirieron que el color verde fluorescente se deba a una síntesis activa de ADN.

El naranja de acridina es un colorante catiónico y metacromático, que colorea ortocromáticamente al ADN y le imparte color verde. Al ARN lo tiñe metacromáticamente de rojo. La coloración del ARN, probablemente, siga el principio general del mecanismo de metacromasia, fenómeno en el cual la célula adquiere un color distinto a la tinción empleada debido a una interacción entre las moléculas del colorante con las proteínas y aminoácidos presentes en la célula; cuando el naranja de acridina interactúa con una cadena simple en espiral aleatoria, como lo es el ARN, se une a casi todos los nucleótidos por su grupo fosfato de carga negativa, permitiendo el acercamiento entre las moléculas del colorante, de modo que, éstas interactúan y forman un polímero, produciendo una fluorescencia metacromática roja (Rost, 1995).

Según Rost (1995), la coloración del ADN, sin embargo, es más complicada; está bien establecido que hay dos procesos por los cuales el naranja de acridina se une al ADN: un proceso de unión fuerte, en el cual predomina un alto radio molar de fosfato del ADN al colorante y un proceso de unión débil con menor radio molar; cuando los cationes del naranja de acridina se unen en la doble cadena de ADN, se intercala cada tercer par de bases púricas o pirimídicas y forman un complejo estable gracias a uniones iónicas y

uniones dipolo-dipolo. En estas condiciones la distancia entre las moléculas es lo suficientemente grande para prevenir la interacción colorante-colorante, de forma que la fluorescencia que se obtiene es la de un monómero de naranja de acridina, con emisión de color verde.

El naranja de acridina es un colorante usado para la detección de ácidos nucleicos, análisis de mitocondrias y lisosomas por citometría de flujo y estudios de apoptosis (Sigma-Adrich, 2004-2005). La tinción con naranja de acridina en espermatozoides es utilizado para determinar el daño de la cromatina nuclear (López *et al.*, 2001; Bouvet *et al.*, 2005; Chohan *et al.*, 2006; Bouvet *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2015; Portella y Gonzáles, 2016).

Ortega *et al.*, (2010) aplican la tinción de fluorescencia con naranja de acridina, para evaluar el índice de vitalidad. Se ha demostrado en estudios recientes, que los daños morfológicos de la cabeza del espermatozoide están relacionados con la fragmentación de ADN (Flores *et al.*, 2012).

De acuerdo con los resultados obtenidos hubo una alta correlación, estadísticamente significativa ($p=0,000$) entre la fluorescencia anaranjada con anomalías de la cabeza, donde, posiblemente, haya daño de la cromatina nuclear, del mismo modo, se infiere, esta explicación para la tinción amarilla, donde el ADN, posiblemente, se encuentre desnaturalizado.

Un estudio donde se evaluó la asociación de la tinción diferencial de fluorescencia modificada con síntesis de ADN y ARN en bacterias del género *Acinetobacter* (Velásquez, 2015), aunque no hubo asociación estadísticamente significativa entre el color anaranjado y síntesis de ADN, se observó que luego de post-tratamiento con ADNasa en el 23% de los tiempos del ciclo celular bacteriano, no se observaron células anaranjadas fluorescente y sugirieron que, probablemente, se debía a la presencia de ADN de cadena sencilla. Bajo esta

observación, se intuye, que los espermatozoides anaranjados, puedan presentar ADN fragmentado.

En el presente estudio se utiliza la técnica de tinción diferencial de fluorescencia modificada, para identificar anomalías morfológicas no encontradas por la tinción de Papanicolaou. No fue objetivo del trabajo comparar ambos métodos, pues no se dispone de un valor de corte, con una proporción de espermatozoides determinada, para considerar una muestra con espermatozoides morfológicamente normales; por la técnica de tinción diferencial de fluorescencia modificada; solo se trató de corroborar, que con este método, se puede precisar un mayor número de anomalías, que por el método convencional (% formas normales: $\bar{X} \pm DS$ Papanicolaou : 26 ± 18 ; $\bar{X} \pm DS$ Fluorescencia: 9 ± 4). Además, proporciona información respecto al daño de la cromatina espermática. Aksoy *et al.* (2012) en su estudio de morfología en espermatozoides humanos, donde emplearon diferentes métodos de tinción, describen, que tanto la tinción de Papanicolaou como hematoxilina eosina (HE) son técnicas válidas para los estudios de morfología espermática.

La tinción Papanicolaou, mediante una serie de condiciones morfológicas determinan la normalidad en cada una de las principales estructuras del espermatozoide: cabeza, pieza media y la pieza principal, también, se toman en cuenta las regiones vacuolares y el área acrosomal. Por ser una técnica cualitativa, los espermatozoides quedan limitados como normales o anormales, representados porcentualmente (Evangelista, 2015). Del mismo modo, mediante el uso de la tinción diferencial de fluorescencia modificada, se obtuvieron resultados que brindaron información detallada acerca de la morfología e integridad de la célula espermática, permitió resaltar, notoriamente, el perímetro de la célula, optimizando los resultados obtenidos en los análisis morfológicos. Al comparar la morfología del espermatozoide, por las dos técnicas de tinción, papanicolaou y fluorescencia modificada, en la figura 1

se observan espermatozoides con morfología normal; por ambas técnicas, se visualizan las partes del espermatozoide, constituido por la cabeza (formada por el núcleo y acrosoma), pieza intermedia y pieza principal. Asimismo, por la técnica de fluorescencia modificada, se logra apreciar una fluorescencia de color verde y morfología normal, indicando buena integridad del ADN y categorización de la normalidad de la célula espermática.

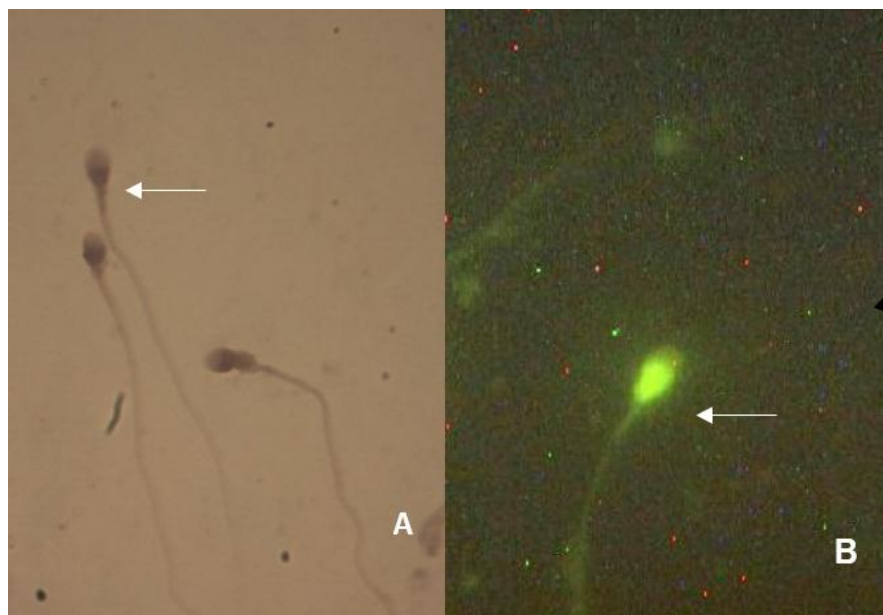


Figura 1. Fotomicrográficas de espermatozoides con morfología normal. 1000X
A) tinción de Papanicolaou. B) tinción diferencial de fluorescencia modificada.

En cuanto a las alteraciones morfológicas del espermatozoide a nivel de la cabeza, empleando las técnicas de tinción Papanicolaou y diferencial de fluorescencia modificada, se observaron espermatozoides con cabeza grande (figura 2), cabeza pequeña (figura 3), Bonet y Briz (1991); Briz *et al.* (1996), señalan que las malformaciones de este tipo a nivel de la cabeza, se originan durante el proceso de espermatogénesis en el testículo, sin embargo, no están claras sus causas.

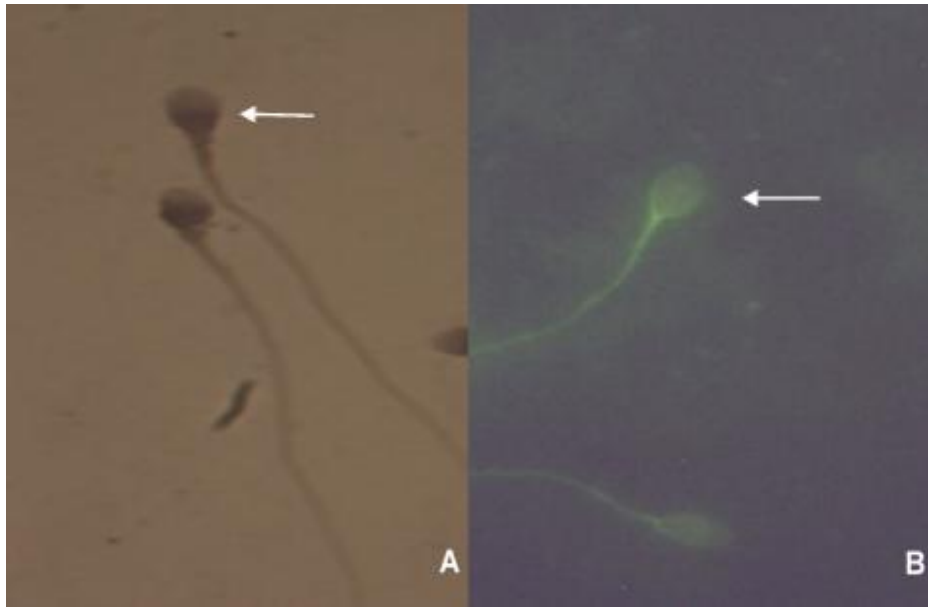


Figura 2. Fotomicrografías de espermatozoides con morfología anormal, espermatozoides cabeza grande (flechas). 1000X. A) tinción de Papanicolaou. B) tinción diferencial de fluorescencia modificada.

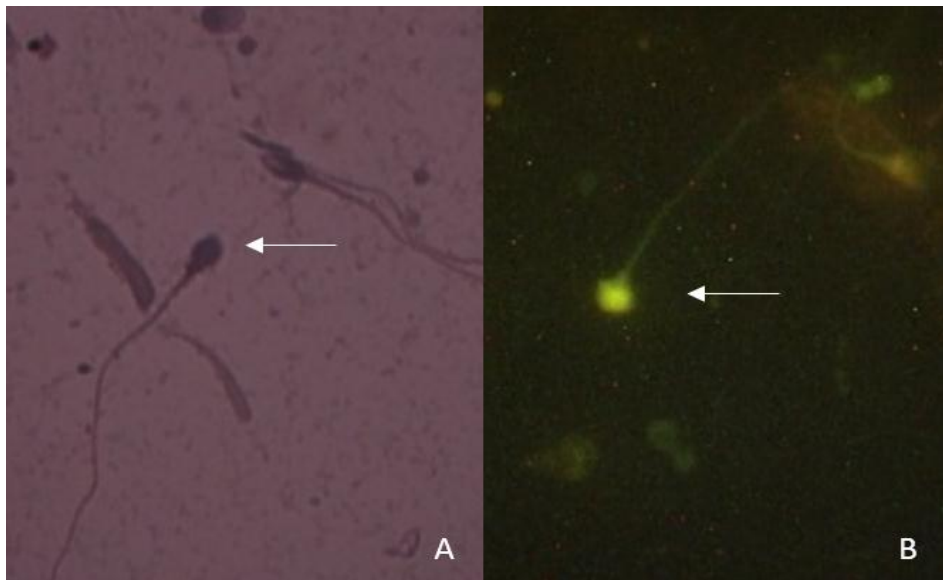


Figura 3. Fotomicrografías de espermatozoides con morfología anormal, espermatozoides cabeza pequeña (flechas). 1000X. A) tinción de Papanicolaou. B) tinción diferencial de fluorescencia modificada.

En la figura 4, se observan espermatozoides con cabeza alargadas, también conocidos como atilados, el cual posee la forma de una elipse en la que existe un marcado predominio del eje longitudinal sobre el eje transversal (WHO, 2010; Gómez *et al.*, 2005).

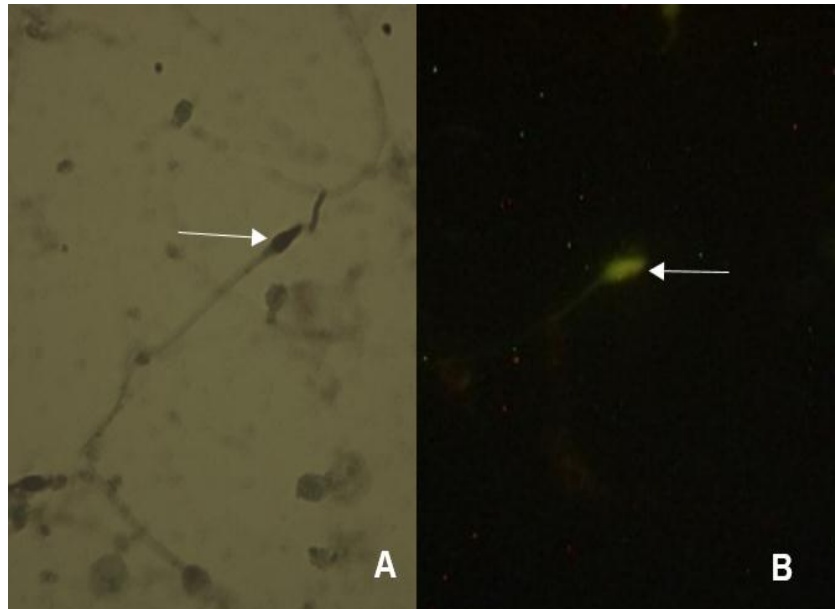


Figura 4. Fotomicrografías de espermatozoides con morfología anormal, espermatozoides con cabeza alargada (flechas). 1000X. A) tinción de Papanicolaou. B) tinción diferencial de fluorescencia modificada.

A nivel de la pieza intermedia, se hallaron espermatozoides con presencia de exceso de citoplasma residual (figura 5), que según Gadea *et al.* (1998) corresponden a gametos que no han completado el proceso de maduración espermática, en el que hay una pérdida del material citoplasmático. Por otro lado, Gómez *et al.* (2005) asegura que este es un tipo de anomalía difícil de diagnosticar debido a que se pueden confundir con piezas intermedias engrosadas.

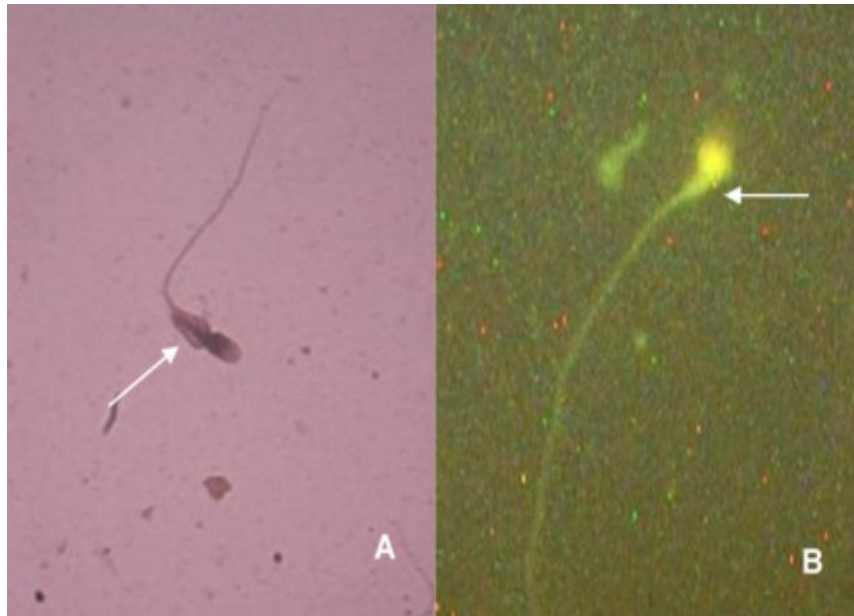


Figura 5. Fotomicrografías de espermatozoides con morfología anormal, espermatozoides con exceso de citoplasma residual (flechas).1000X. A) tinción de Papanicolaou. B) tinción diferencial de fluorescencia modificada.

En la figura 6, existe un enrollamiento total del flagelo del espermatozoide; su frecuencia de aparición suele ser reducida y tiene su origen en el tránsito por el epidídimo (Holt, 1982; Valverde y Madrigal, 2018).

Las alteraciones en el acrosoma o los defectos nucleares, causan muerte embrionaria temprana o impiden que se produzca la fertilización (Saacke, 2008), mientras que, las anomalías de la cola, alteran la movilidad espermática, impidiendo que el espermatozoide pueda alcanzar al oocito (Saacke *et al.*, 2000).

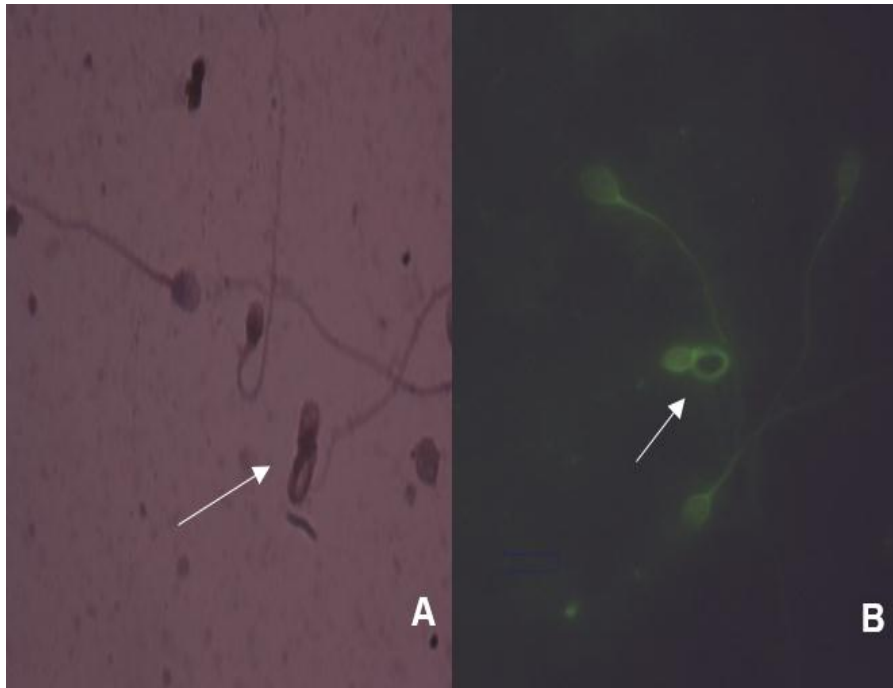


Figura 6. Fotomicrografías de espermatozoides con morfología anormal, espermatozoides con cola enrollada (flechas). 1000X. A) tinción de Papanicolaou. B) tinción diferencial de fluorescencia modificada.

La aplicación de la técnica de tinción diferencial de fluorescencia modificada, ha permitido visualizar mayor número de espermatozoides con alteraciones morfológicas, como se visualiza en la figura 7, se aprecian espermatozoides cabeza pequeña, cabeza redonda, doble cabeza y cola enrollada, evidenciándose una fluorescencia amarilla o anaranjada para espermatozoides anormales, lo cual provee información sobre la calidad del ADN nuclear; se señala, que los espermatozoides con cabezas pequeñas y redondas usualmente presentan acrosomas pequeños o ausentes, la presencia de espermatozoides con cabezas pequeñas se asocia con infertilidad. Los espermatozoides doble cabeza se presentan cuando ocurre un error en el proceso de espermatogénesis. En el caso de las alteraciones del flagelo, resulta evidente la importancia de la integridad de esta estructura para un adecuado y

efectivo movimiento de la célula que permita la fecundación (Serrano, 1983; Menkveld, 2013; Gandini *et al.*, 2015; Menkveld, *et al.*, 2015)

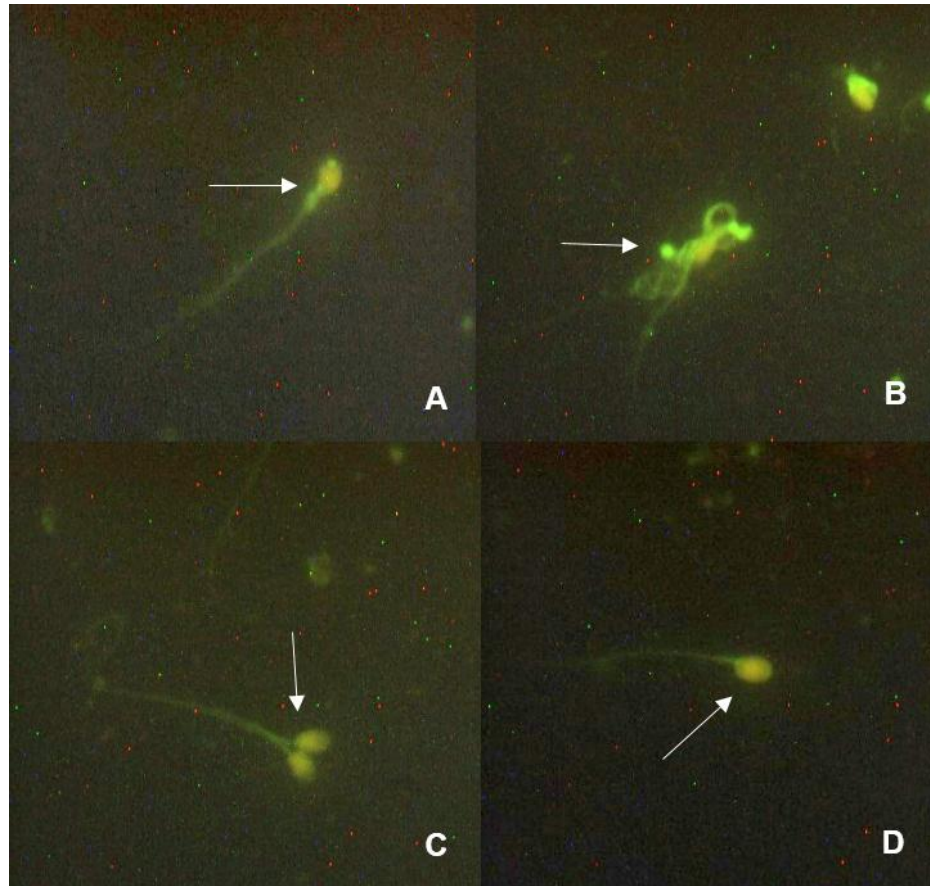


Figura 7. Fotomicrografías de espermatozoides con morfología anormal. 1000X. Tinción diferencial de fluorescencia modificada. A) espermatozoides microcéfalos (flechas). B) espermatozoides con cola enrollada (flechas). C) espermatozoides con doble cabeza (flechas). D) espermatozoides con cabeza redonda (flechas).

La morfología espermática, considerada por algunos clínicos como el índice predictor de la fertilidad masculina, también se relaciona con la integridad del ADN espermático. Las rupturas de las cadenas de ADN son correlacionadas con numerosas formas anormales de la cabeza y cola de los espermatozoides, y se informa una diferencia significativa entre la cantidad de anomalías morfológicas y las muestras de espermatozoides con alto y bajo grado de

fragmentación, donde el porcentaje de cabezas amorfas y en general las anomalías de cabeza, son significativamente mayores, en las muestras con elevado grado de fragmentación de ADN (Rodríguez, 2017).

En la presente investigación, hubo alta correlación entre la tinción diferencial de fluorescencia modificada y la morfología normal y anormal del espermatozoide. Esta relación quizás explique que algunas de las anomalías morfológicas del espermatozoide puedan deberse a una alteración en el ADN. Es interesante mencionar, que los estudios actuales sobre la infertilidad masculina se abocan a investigar las causas de origen epigenéticos, como metilación del ADN, remodelación de la cromatina y modificación de las histonas; en ellos han encontrado que estos cambios genéticos se asocian a daño de la cromatina, viéndose que este daño tiene impacto negativo sobre los resultados de técnicas de reproducción asistida (Giacone, *et al.*, 2019)

En el tracto genital femenino en el momento de la eyaculación se deposita una gran cantidad de espermatozoides, pero se sabe poco sobre las características especiales que permiten que un espermatozoide en particular alcance el oocito y lo fecunde con preferencia a los otros millones que lo rodean. Los factores que intervienen en el control del transporte y la fertilización de los espermatozoides incluyen el entorno del tracto reproductor femenino, las interacciones célula-célula, la expresión génica y los rasgos fenotípicos de los espermatozoides. Se conocen algunos de los determinantes importantes de la fertilización, es decir, la movilidad y el estado del ADN, pero muchos rasgos de los espermatozoides aún son indescifrables. Con respecto a la cromatina espermática, se ha demostrado que los espermatozoides con cromatina estable tienen una capacidad superior de llegar al sitio de fertilización y unirse a la zona pelúcida. En sí, lo que hace que los espermatozoides tengan éxito en llegar al

sitio de fertilización y fertilizar el óvulo depende de una buena movilidad, morfología adecuada y estado normal del ADN (García, *et al.*, 2016).

Está claro que la selección de espermatozoides dentro del tracto genital femenino depende de diferentes factores y que la morfología del esperma es uno de ellos. De modo que, la tinción diferencial de fluorescencia podría ser una herramienta útil en la evaluación del semen, que además de dar información más precisa sobre la morfología espermática, ofrece información sobre la integridad de la cromatina nuclear, que permitiría la selección de eyaculados basados en la integridad del ADN nuclear, pudiéndose emplear en técnicas de reproducción asistida.

CONCLUSIONES

La población estudiada, comprendió una población joven en edades reproductivas, presentando una buena calidad espermática.

El recolector de plástico, no tiene efectos tóxicos sobre los espermatozoides, por lo tanto, satisface las necesidades de recogida de la muestra de semen.

Las variaciones en las coloraciones, por medio de la tinción diferencial de fluorescencia modificada con naranja de acridina, están asociadas a la morfología del espermatozoide.

Se confirma que la tinción verde fluorescente se asocia a espermatozoides morfológicamente normales y la tinción amarilla y anaranjada fluorescente se asocian a anormalidades de la cabeza, pieza intermedia y pieza principal de los espermatozoides.

RECOMENDACIONES

Promover la participación de jóvenes en este tipo de estudios, mediante charlas o conversatorios que les informe sobre la declinación de la calidad espermática a través de los años y para concientizarlos sobre la condición de su fertilidad.

Revisar y aplicar en la práctica del laboratorio clínico e investigación el manual de la OMS en su quinta edición para emitir información actualizada en los estudios seminales.

Confirmar la biocompatibilidad de recipientes de plásticos para la recolección de muestras de semen, a fin de garantizar resultados confiables.

Evaluar la tinción diferencial de fluorescencia modificada, en la detección de la calidad cromosómica de los espermatozoides y diagnóstico de infertilidad, con el fin de aportar el uso de nuevos métodos de laboratorio que mejoren el diagnóstico de la infertilidad, al explicar las causas de las mismas.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta, A. y Kruger, T. 1996. *Human spermatoa in asisted reproduction*. Segunda Edition. The Parthenon Publishing Group. New Cork.

Aksoy, E.; Murad, T.; Duman, S. y Gokhan, C. 2012. Assessment of spermatozoa morphology under light microscopy with different histologic stains and comparison of morphometric measurements. *Int. J. Morphol.*, 30(4): 1544-1550.

Albarado, L. y Flores, E. 2008. Evaluación de la coloración diferencial de fluorescencia en *Pseudomonas* spp. Aisladas en suelo. *Kasmera*, 36(1):17-27.

Álvarez, C.; Arellano, F. y Pérz, A. 2015. Técnicas de estudio para la evaluación del daño al ADN y su aplicación en la producción animal. *SNS*, 7: 2314-2901.

Barja, L. y Berrios, L. 2003. Alteraciones del espermatograma en varones que acudieron por infertilidad de pareja a la unidad de reproducción humana del hospital Edgardo Rebagliati Martins. Trabajo de postgrado. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.

Bonet, S. y Briz, M. 1991. New data on aberrant in the ejaculat of *Sus domesticus*. *Theriogenology*, 35: 725-731.

Bouvet, B.; Paparella, C. y Feldman, R. 2007. Estrés oxidativo y su efecto sobre calidad seminal. *Rev. Haban. Cienc. Méd.*, 6: 729-519.

Bouvet, B.; Paparella, C.; Feldman, R.; Almará, A.; Gatti, V. y Solis, E. 2005. Capacidad fecundante espermática luego de la recuperación de espermatozoides mediante la técnica de swim-up. *Arch. Esp. Urol.*, 58(10): 1049-1054.

Briz, M.; Bonet, S.; Pinart, B. y Camps, R. 1996. Sperm malformations throughout the boar epididyma duct. *Anim. Reprod. Sci.*, 43: 221-239.

Burga, L. 2016. Evaluación de la calidad seminal en pacientes con problemas de fertilidad del centro de reproducción humana de Lima (NACER). Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología, Universidad Ricardo Palma, Lima.

Cardona, W. 2010. Manual de procesamiento de semen humano de la Organización Mundial de la Salud-2010. *Actas Urol. Esp.*, 34(7):577-578.

Chohan, K.; Griffin, J.; Lafromboise, M.; De Jonge, C. y Carrell, D. 2006. Comparación de los ensayos de cromatina para la evaluación de la fragmentación del ADN en espermatozoides humanos. *J. Androl.*, 27: 53-59.

Cortés, E.; Dávila, M.; López, C.; Fernández, J. y Gosálves, J. 2007. Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urol. Esp.*, 31(2):120-131.

Curi, S.; Chenlo, P.; Pugliese, M.; Ariagno, J.; Repetto, H.; Vázquez, J.; Segovia, M.; Mendeluk, G. 2014. Verificación de los valores de referencia del estudio del semen según OMS 2010 en Buenos Aires. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.*, 48(4): 429-435.

Cruz, I.; Colmenares, M.; Berrueta, L.; Carrillo, L.; Gómez, R.; Montes, H.; Salmen, S. y Osuna, J. 2010. Evaluación de la calidad del espermatozoide humano: comparación entre la integridad del ADN espermático y variables del semen. *Rev. Invest. Clin.*, 51(1): 87 - 99.

Darzynkiewicz, Z. 1990. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. *Meth. Cell Biol.*, 33: 285-298.

De Alvear, M. 1995. Manual de laboratorio de la Organización Mundial de la Salud para el examen del líquido seminal humano. Editorial Médica. Panamericana. Buenos Aires.

Espinoza, O.; Cortés, S.; Monreal, J. y Ferreccio, C. 2011. Análisis de las variables en jóvenes sanos en Arica Chile. *Rev. Méd. Chil.*, 138(12):1510-1516.

Esteves, S. 2014. Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. *Int. Braz. J. Urol.*, 40: 443-453.

Evangelista, O. 2015. Caracterización morfológica de los espermatozoides en alpacas macho (*Vicugna pacos*) de fertilidad comprobada. Tesis para optar al título profesional de Biólogo con mención en zoología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.

Famurewa, A. y Ugwuja, E. 2017. Association of blood and seminal plasma cadmium and lead levels with semen quality in non-occupationally exposed infertile men in abakaliki, south east Nigeria. *Afr. J. Reprod. Health*, 11(2): 97-103.

Flores, E.; Albarado, L. y Caraballo, S. 2014. Características tintoriales de *Neisseria gonorrhoeae* por la tinción diferencial de fluorescencia modificada. *Saber*, 26(3): 281-288.

Flores, E.; Albarado, L.; Thomas, D. y Lobo, A. 2008. Comparación de la tinción fluorescencia modificada y Gram, en muestras urogenitales y perianales de pacientes asistidos en el área de infecciones de transmisión sexual del ambulatorio Arquímedes Fuentes, Cumaná, estado Sucre. *Salus*, 12(2):29-35.

Flores, E.; Lobo, A.; Chelhod, M.; Rojas, L.; Salazar, R. y Albarado, L. 2012. Movilidad y morfología espermática, en estudiantes de la Universidad de Oriente. *Rev. Obstet. Ginecol. Venez.*, 72(1): 52-57.

Gadea, J.; Matas, C. y Lucas, X. 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration (hIVP) assay. *Anim. Reprod. Sci.*, 54: 95-108.

Gandini, L.; Lombardo, F.; Paoli, D.; Caponecchia, L.; Familiari, G. y Verlengia, C. 2015. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 15(4)

García, F.; Gadea, J.; Matás, C. y Holt, W. 2016. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian. J. Androl.*; 18(6): 844–850.

Giacone, F.; Cannarella, R.; Mongioi, L.; Alamo, A.; Condorelli, R.; Calogero, A. y La Vignera, S. 2019. Epigenetics of Male Fertility: Effects on assisted reproductive techniques. *World. J. Mens. Health*, 37(2): 148–156.

Gómez, M.; Girela, J.; Fernández, P. y Romero, A. 2005. Estudio de las alteraciones morfológicas de espermatozoides humanos con microscopia electrónica de barrido (SEM). *Rev. Iberoam. Fertil. Reprod. Hum.*, 22(1): 59-66.

Góngora, A. y Fontecilla, D. 2010. La fragmentación de ADN espermático, influencia sobre las técnicas de reproducción asistida y la calidad embrionaria. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.*, 16(2):160-164.

Hernández, L.; García, G.; López, L.; Rubio, M.; Morán, J.; Cebrián, M. y Quintanilla, B. 2005. Low lead environmental exposure alters semen quality and sperm chromatin condensation in north Mexico. *Reprod. Toxicolog.*, 20(2): 221-228.

Holt, W. 1982. Epididymal origin of coiled-tail sperm defect in a boar. *J. Reprod. Fertil.*, 64: 485-489.

López, E.; Stone, B.; Navarro, C. y Marrs, R. 2001. Impacto del ácido ascórbico y su correlación con la reacción acrosomal, movilidad espermática,

acridina naranja y prueba de penetrancia en huevo de hámster. *An. Med. Asoc. Med. Hosp. ABC*, 46(2): 76-82.

Menkveld, R. 2013. Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian. J. Androl.*, 12(1)

Menkveld, R.; Holleboom, C. y Rhemrev, J. 2015. Measurement and significance of sperm morphology. *Asian. J. Androl.*, 13(1)

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2003. *Bioética*. Pautas éticas de investigación en sujetos humanos. Publicación científica. OPS-OMS. 15-50.

Ortega, L.; Olaya, E.; López, P.; Gabriel, A.; Orozco, I.; Núñez, R. y Caballero, P. 2010. Comparación entre el test de fragmentación de ADN espermático mediante la técnica de SCD y el índice de vitalidad medida con el test de naranja de acridina. *Rev. int. Androl.*, 8: 114-121.

Osuna, J. 1999. Tratamiento médico de la infertilidad masculina. *Rev. Venez. Urol.*, 41(3-4): 67-81.

Poirot, C. y Cherruau, B. 2005. Infertilidad masculina. Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.*, 39(2): 225-241.

Portella, J. y Gonzáles, G. 2016. Fragmentación del ADN espermático: origen, evaluación y repercusión en la fertilidad masculina. *Ginecol. Obstet. Mex.*, 84(7): 462-473.

Quintero, A. 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis doctoral facultad de veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.

Remington, R. y Schork, M. 1974. *Estadística biométrica y sanitaria*. Editorial Prentice/Hali Internacional. Madrid, España.

Rodríguez, B. 2017. Fragmentación del ADN espermático e infertilidad masculina. *Rev. Cubana. Endocrinol.*, 28(3)

Rost, F. 1995. Fluorescence microscopy. Volumen II. Cambridge University Press. Gram Bretaña.

Saacke, R. 2008. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology*, 70: 473-478.

Saacke, R.; Dalton, J.; Nadir, S.; Nebel, R. y Bame, J. 2000. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim. Reprod. Sci.*, 61: 663-677.

Salvatierra, P. y Villegas, F. 2017. Alteraciones más frecuentes de los parámetros seminales en muestras de pacientes; Laboratorio Biogénesis, Lima 2016. Tesis para optar el título profesional de licenciadas en tecnología médica en laboratorio clínico y anatomía patológica. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad privada Norbert Wiener. Lima, Perú.

Sánchez, E.; Oláez, J.; Ávila, A.; López, L. y Sánchez, S. 2014. Alteraciones en el semen de pacientes con problemas de infertilidad. *iMedPub. Journals.*, 10: 3823-1215.

Sarabia, L. y Munuce, M. 2011. Nuevos valores para el espermiograma OMS 2010. *Rev. Med. Chile*, 139: 548-549.

Senovia, M. y Cardona, M. 2013. Evaluación de los parámetros seminales en 30 hombres con fertilidad probada y breve revisión de la literatura. *Rev. Cubana. Obstet. Ginecol.*, 39(4): 368-382.

Serrano, A. 1983. Conceptos sobre reproducción en bovinos. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Costa rica.

Sigma-Aldrich. 2004-2005. *Biochemicals & Reagents, for life science research*. Sigma. Saint Louis, USA; p.58-59.

Teppa, A. y Palacios, A. 2004. Evaluación actual de la infertilidad masculina. *Invest. Clin.*, 45(4): 355-370.

Valverde, A. y Madrigal, M. 2018. Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal. *Agron. Mesoam.*, 29(2): 469-484.

Vásquez, F. y Vásquez, D. 2007. Espermograma y su utilidad clínica. *Rev. Salud. Uninort.*, 23(2): 25-43.

Velásquez, M. 2015. Asociación entre la reactividad tintorial por la coloración de gram y tinción diferencial de fluorescencia modificada con la síntesis de ácidos nucleicos en *Acinetobacter baumannii*. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.

World Health Organization (WHO). 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edition. Geneva, Switzerland.

APÉNDICES

APÉNDICE 1

CONSENTIMIENTO VÁLIDO

Bajo la coordinación de la licenciada Evelin Flores, profesora de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, se está realizando el proyecto de Investigación titulado “BIOCOMPATIBILIDAD ENTRE RECIPIENTES DE MATERIAL DE VIDRIO Y PLÁSTICO PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRA DE SEMEN Y CARACTERÍSTICAS MORFOTINTORIALES POR FLUORESCENCIA, EN UN GRUPO DE ESTUDIANTES DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE”.

Yo:

C.I.: _____ Nacionalidad:

Estado civil: _____ Domiciliado en:

En uso pleno de mis facultades mentales y sin que medie coacción, ni violencia alguna, en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el estudio indicado, declaro mediante la presente:

1. Haber sido informado(a) de manera clara y sencilla por parte del grupo de Investigadores de este Proyecto, todos los aspectos relacionados con el proyecto de Investigación titulado: Biocompatibilidad entre recipientes de material de vidrio y plástico para la recolección de muestras de

semen y características morfológicas por fluorescencia en un grupo de estudiantes de la Universidad de Oriente.

2. Tener conocimiento claro de que el objetivo del trabajo antes señalado es: evaluar la biocompatibilidad entre recipientes de material de vidrio y plástico para la recolección de muestra de semen en los parámetros de rutina del análisis de semen y características morfológicas por fluorescencia en estudiantes que acuden a la universidad de oriente.
3. Conocer bien el Protocolo Experimental expuesto por el investigador, el cual establece que, mi participación en el trabajo consiste en: donar de manera voluntaria una muestra de semen.
4. Que la muestra de semen que acepto donar, será utilizada exclusivamente para evaluar la biocompatibilidad entre recipientes de material de vidrio y plástico. Además, para analizar y asociar las características morfológicas por fluorescencia en muestras de semen.
5. El equipo de personas que realiza esta investigación coordinada por la licenciada Evelin Flores, me ha garantizado confidencialidad relacionada tanto a mi identidad como a cualquier otra información relativa a mi persona a la que tenga acceso por concepto de mi participación en el proyecto antes mencionado.
6. Que bajo ningún concepto podré restringir el uso para fines académicos de los resultados obtenidos en el presente estudio.
7. Que mi participación en dicho estudio no implica riesgo e inconveniente alguno para mi salud.
8. Que cualquier pregunta que tenga en relación con este estudio me será respondida oportunamente por parte del equipo de personas antes mencionadas.
9. Que bajo ningún concepto, se me ha ofrecido ni pretendo recibir ningún beneficio de tipo económico, producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación.

APÉNDICE 2

ENCUESTA

Nº Muestra: _____

Fecha:

Datos personales:

Nombres _____ y _____ Apellidos:

Edad: _____ Estado Civil: _____ Ocupación:

_____ Días de abstinencia: _____ Hora de recolección: _____

Dirección permanente: _____ Dirección actual:

Datos clínicos:

¿Posee usted en estos momentos una pareja sexual estable? _____

¿Tiene usted hijos? Sí () No ()

En caso de ser afirmativa su respuesta, indique cuántos: _____

En caso de ser negativa su respuesta, indique si ha intentado tener hijos y no lo ha logrado: Sí () No ()

¿Presenta antecedentes familiares de infertilidad?: Sí () No ()

¿Ha padecido de alguna enfermedad de transmisión sexual? Sí () No ()
) ¿Cuál?: _____

¿Presenta varicocele? Sí () No (). En caso de ser afirmativa su respuesta, ¿Ha sido operado? Sí () No ()

¿Presenta algún trastorno endocrino? Sí () No () ¿Cuál?:

¿Se encuentra usted en tratamiento? Sí () No () de ser afirmativa su respuesta, especifique: _____

¿Consume usted cigarrillos o algún tipo de tabaco?: Sí () No ()

¿Consume usted bebidas alcohólicas? Sí () No ()

Por medio de la presente, hago constar que he dado consentimiento para que los datos aquí recopilados sean usados con fines de investigación.

Firma del paciente

APÉNDICE 3

RECOMENDACIONES Y CONDICIONES PARA UNA BUENA TOMA DE MUESTRA DE LÍQUIDO SEMINAL

1. Es recomendable la asepsia de los genitales antes de la toma de muestra.
2. Es necesario tener una abstinencia sexual entre 3-7 días para el momento de la toma de muestra.
3. Es recomendable una abstinencia alcohólica entre 5-7 días.
4. Para el momento de la toma de la muestra el paciente no debe de estar tomando antibióticos, ni haber presentado fiebre o algún proceso viral o bacteriano; pues ello interferirá de forma negativa en los resultados.
5. La muestra debe ser obtenida por masturbación directamente en el envase estéril entregado por el personal encargado de realizar el examen.
6. La muestra de semen debe ser completa y ante cualquier pérdida de alguna fracción debe informarlo.
7. La muestra debe llegar al laboratorio para su procesamiento lo antes posible, nunca después de 30-45 minutos, razón por la cual se recomienda que la toma de la muestra sea realizada en el mismo laboratorio.

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 1. Diferencias aceptables entre dos porcentajes para un promedio dado, determinado a partir del conteo de 200 espermatozoides por réplica (total 400 contados).

| Media (%) | Diferencia aceptable* | Media (%) | Diferencia aceptable* |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|
| 0 | 1 | 66-76 | 9 |
| 1 | 2 | 77-83 | 8 |
| 2 | 3 | 84-88 | 7 |
| 3-4 | 4 | 89-92 | 6 |
| 5-7 | 5 | 93-95 | 5 |
| 8-11 | 6 | 96-97 | 4 |
| 12-16 | 7 | 98 | 3 |
| 17-23 | 8 | 99 | 2 |
| 24-34 | 9 | 100 | 1 |
| 35-65 | 10 | | |

**Basado en el intervalo de confianza del 95%*

ANEXO 2

Tabla 3. Diluciones de semen requeridas de acuerdo al campo microscópico de alto poder, cámara a usar y áreas a evaluar.

| Espermatozoides por campo de 400x | Espermatozoides por campo de 200x | Dilución requerida | μl de semen | μl de fijador | Cámara | Área a evaluar |
|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------|-------------|---------------|--|--|
| >101 | >404 | 1:20 (1+19) | 50 | 950 | Neubauer mejora | cuadrados 5, 4, 6 |
| 16-100 | 64-400 | 1:5 (1+4) | 50 | 200 | Neubauer mejorada | cuadrados 5, 4, 6 |
| 2-15 | 8-60 | 1:2 (1+1) | 50 | 50 | Neubauer mejorada | cuadrados 5, 4, 6 |
| <2 | <8 | 1:2 (1+1) | 50 | 50 | Neubauer mejorada o Volumen grande | todos los 9 cuadrados lámina completa |

ANEXO 3

Tabla 2. Errores de muestreo redondeados (%) de acuerdo al número total de espermatozoides contados.

| Total (N) | Error de muestreo (%) | Total (N) | Error de muestreo (%) | Total (N) | Error de muestreo (%) |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|
| 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 |

ANEXO 4

Tabla 4. Diferencias aceptables entre dos cuentas a partir de los replicados para una suma determinada.

| Suma | Diferencia aceptable* | Suma | Diferencia aceptable* |
|---------|-----------------------|---------|-----------------------|
| 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 |

* Basado en el intervalo de confianza del 95%

ANEXO 5

.8.12. Cálculo de la concentración de espermatozoides en el semen

Se recomienda calcular e informar sobre la concentración de espermatozoides en el semen. Aunque la concentración no es una medida específica de la función testicular, está relacionada con tasas de fecundación y embarazo.

La concentración de espermatozoides en el semen es su número (N) dividido por el volumen en el que se encontraron, es decir, el volumen del número total (n) de filas examinadas en los replicados (20 nl para cada fila de los cuadrados grandes números 4, 5 y 6), multiplicado por el factor de dilución. Es decir:

$$C = (N/n) \times (1/20) \times \text{factor de dilución.}$$

Para una dilución 1+4 (1:5), usando los cuadrados 4, 5 y 6, la concentración $C = (N/n) \times (1/20) \times 5$ espermatozoides por nl = $(N/n) \times (1/4)$ espermatozoides/nl (o 10^6 por mililitro de semen).

Para una dilución 1+19 (1:20), usando los cuadrados 4, 5 y 6, la concentración $C = (N/n) \times (1/20) \times 20$ espermatozoides por nl = (N/n) espermatozoides/nl (o 10^6 por mililitro de semen).

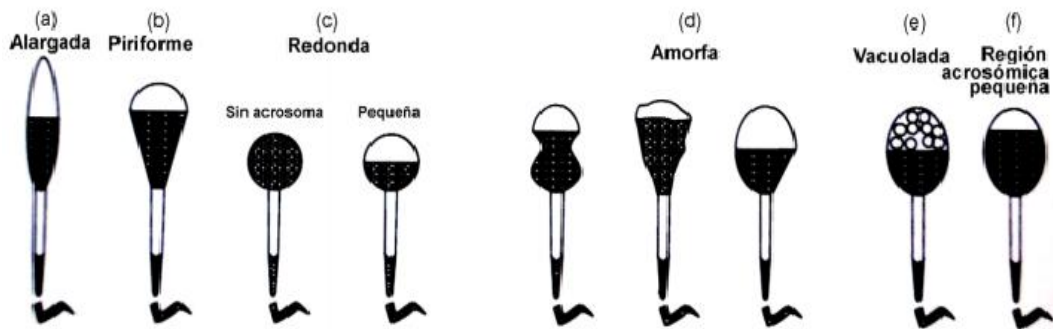
Para una dilución 1:50 (1+49), usando los cuadrados 4, 5 y 6, la concentración $C = (N/n) \times (1/20) \times 50$ espermatozoides por nl = $(N/n) \times 2,5$ espermatozoa/nl (o 10^6 por mililitro de semen).

ANEXO 6

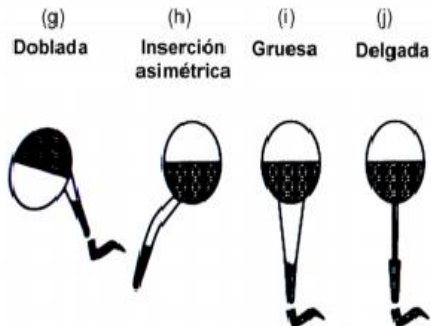
Clasificación de anomalías de cabeza, cola y cuello espermáticos

Según el manual de la OMS, las anomalías de cabeza pueden ser: alargada, piriforme, redonda (no acrosoma), vacuolada, bicéfala, macrocéfala y microcéfala. Las anomalías de cuello o pieza media pueden ser: angulada, asimétrica, engrosada y delgada. Las anomalías en el flagelo pueden ser: corto, enrollado y horquilla. Las anomalías citoplasmáticas pueden ser restos citoplasmáticos (OMS, 2010)

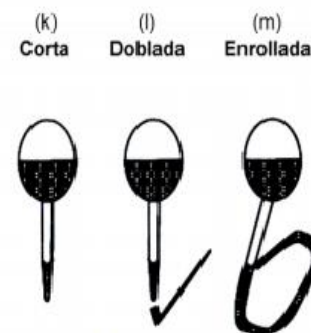
A. Defectos de cabeza



B. Defectos de cuello y pieza intermedia



C. Defectos de cola



D. Exceso de citoplasma residual



Adaptado por Kruger et al., 1993 y reproducido con permiso de MQ Médicos.

Figura 13. Dibujo esquemático de algunas formas anormales de espermatozoides humanos.

ANEXO 7

Criterios de clasificación para normalidad

- La cabeza del espermatozoide debe ser lisa, regularmente contorneada y generalmente de forma ovalada. Debe haber una región acrosómica muy bien definida que ocupe entre el 40 y 70% del área de la cabeza. La región acrosómica no debe contener vacuolas grandes y no más de dos vacuolas pequeñas, que no deberían ocupar más del 20% de la cabeza del espermatozoide. La región postacrosómica no debe contener vacuolas.

- La pieza media debe ser delgada, regular y aproximadamente de la misma longitud que la cabeza del espermatozoide. El eje longitudinal de la pieza intermedia debe estar alineado con el eje longitudinal de la cabeza del espermatozoide. El citoplasma residual se considera una anomalía sólo cuando está en exceso, es decir, cuando supera un tercio del tamaño de la cabeza del espermatozoide.

- La pieza principal debe tener un calibre uniforme a lo largo de su longitud, ser más delgada que la pieza intermedia y tener una longitud aproximadamente de 45 μm (unas 10 veces la longitud de la cabeza). Puede estar enrollada sobre sí misma, siempre que la forma no demuestre ruptura del flagelo.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos y Trabajos de Ascenso – 1/6

| | |
|---------------|--|
| Título | BIOCOMPATIBILIDAD ENTRE RECIPIENTES DE MATERIAL DE VIDRIO Y PLÁSTICO PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRA DE SEMEN Y CARACTERÍSTICAS MORFOTINTORIALES POR FLUORESCENCIA, EN UN GRUPO DE ESTUDIANTES DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE |
|---------------|--|

Autor(es):

| Apellidos y Nombres | Código CVLAC / e-mail | |
|-------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Bastardo Rosales, Jhoanna Mariet | C VLAC | 24 739 902 |
| | e- mail | Jhoannita.bastardo.r@gmail.com |

Palabras o frases claves:

SEMEN, ESPERMATOZOIDES, BIOCOMPATIBILIDAD, RECOLECTORES, FLUORESCENCIA, NARANJA DE ACRIDINA

Hoja de Metadatos y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

| Área | Subárea |
|----------|-----------------------------|
| Ciencias | Departamento de Bioanálisis |

Resumen (abstract):

Se evaluó la biocompatibilidad de los recipientes de material de vidrio (control) y plástico (recolector de prueba) con muestras de semen de buena concentración y movilidad de espermatozoides, mediante el estudio de la movilidad espermática, a intervalos de 1 hora a temperatura ambiente, durante 4 horas, siguiendo los lineamientos de la quinta edición del Manual de la Organización Mundial de la Salud, para el procesamiento de muestras de semen. Con el fin de verificar que los recipientes de plástico o recolectores de orina no son tóxicos para los espermatozoides, se comparó la movilidad progresiva entre ambos tipos de material (vidrio y plástico), no hallándose diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,334$), considerando así al recipiente de plástico apto para la recolección de muestras de semen. En la determinación de los parámetros: concentración, vitalidad y morfología espermática, se obtuvieron valores dentro de los límites de referencia establecidos por la OMS en su quinta edición, cumpliendo con los estándares establecidos para ser considerada una población, aparentemente, fértil; obteniéndose, valores para concentración, vitalidad y morfología espermática de 162 millones de espermatozoides por ml de semen, 68,0% y 26,0%, respectivamente. Para analizar y asociar las características morfotintoriales de los espermatozoides, se empleó la técnica diferencial de fluorescencia modificada, la cual a través de la producción de diferentes coloraciones (verde, amarillo y anaranjado), se diferenciaron los espermatozoides morfológicamente como normales y anormales. Aquellos espermatozoides que emitieron una fluorescencia verde, se categorizaron como espermatozoides normales y presentaron una fuerte correlación ($r= 1,000$) estadísticamente significativa ($p= 0,000$). Mientras que, las tinciones amarilla ($r= -0,838$, $p= 0,009$) y anaranjada ($r= 0,940$, $p= 0,000$), estuvieron altamente correlacionadas con anomalías de los espermatozoides, destacándose que la fluorescencia anaranjada, tuvo una alta correlación, estadísticamente significativa ($r= 0,940$, $p= 0,000$) con anomalías de la cabeza, sugiriéndose una posible asociación con daños de la cromatina nuclear.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

| Apellidos y Nombres | ROL / Código CVLAC / e-mail | |
|---------------------|-----------------------------|--|
| Flores, Evelin | ROL | C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> |
| | CVLAC | 11.825.759 |
| | e-mail | emflorfer@gmail.com |
| | e-mail | |
| Albarado, Luzmila | ROL | C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> x |
| | CVLAC | 9.278.774 |
| | e-mail | luzalv@hotmail.com |
| | e-mail | |
| Carrera, Venancio | ROL | C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> x |
| | CVLAC | 8.442.251 |
| | e-mail | venanciocarrera@hotmail.com |
| | e-mail | |

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

Colocar fecha de discusión y aprobación:

| | | |
|------|----|----|
| 2020 | 10 | 22 |
|------|----|----|

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

| Nombre de archivo | Tipo MIME |
|-----------------------------|-----------------|
| Tesis-Bastardo,Jhoanna.docx | Aplication/word |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Alcance:

Espacial: Internacional (Opcional) _____

Temporal: Temporal (Opcional) _____

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciado en Bioanálisis _____

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado _____

Área de Estudio: Bioanálisis _____

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado: Universidad de Oriente _____

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CU N° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Letido el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR *Martínez*
FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

Juan A. Bolaños Cumbel
JUAN A. BOLAÑOS CUMBEL
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/manuja

Apartado Correos 094 / Tel: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

Hoja de Metadatos y Trabajos de Ascenso – 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): "los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización".



Johanna Bastardo
Autor



Profa. Evelin Flores
Asesora