



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

CALIDAD ESPERMÁTICA, COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PLASMA SEMINAL
Y MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE EN UN GRUPO DE ESTUDIANTES
DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE, NÚCLEO DE SUCRE
(Modalidad: Investigación)

MARIELA CHELHOD BEILOUNI

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

CUMANÁ, 2009

CALIDAD ESPERMÁTICA, COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PLASMA SEMINAL
Y MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE EN UN GRUPO DE ESTUDIANTES
DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE, NÚCLEO DE SUCRE

APROBADO POR:

Prof. Aníbal lobo
Asesor

Profa. Evelin Flores
Co-Asesor

INDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	12
Población	12
Criterios de exclusión	12
Lavado del material	12
Obtención de muestras seminales	13
Obtención de muestras sanguíneas	13
Determinación de la calidad espermática	14
A. Examen macroscópico del semen	14
Licuefacción.....	14
Viscosidad.....	14
Aspecto	14
Volumen.....	15
pH.....	15
B. Examen microscópico del semen	15
Directo	15
Movilidad espermática.....	15
Vitalidad espermática	16
Concentración espermática	17
Morfología espermática	17
Determinación de las concentraciones de calcio ionizado y magnesio en suero sanguíneo y plasma seminal.	18
Estudio por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	21

Análisis estadístico	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	46
RECOMENDACIONES.....	47
BIBLIOGRAFÍA	48
APÉNDICES Y ANEXOS	54
HOJAS DE METADATOS.....	58

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme la vida.

A mis padres, Marlene de Chelhod y Mauricio Chelhod, me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor sin nunca pedir algo a cambio.

A mis hermanos, Georges y Elías Antonio, porque la disciplina, constancia y perseverancia son las claves del éxito en la vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, quien me dio la fortaleza necesaria para salir siempre adelante pese a las dificultades, por colocarme en el mejor camino, iluminando cada paso de mi vida, y por darme la salud y la esperanza para terminar este trabajo, logrando una de mis grandes metas.

A mis padres, Marlene de Chelhod y Mauricio Chelhod, por su cariño, comprensión y apoyo incondicional, y sobre todo por guiarme por el camino de la educación, en la construcción de mi propio futuro.

A mis hermanos, Georges y Elías Antonio, por el apoyo que me brindan, sé que cuento con ellos siempre.

A mis compañeras de trabajo, Georgina Basmadji, Angge Estrada, Andreína Martínez y Marian Martínez, quienes compartimos días intensos de trabajo en el laboratorio llenos de muchas experiencias y a la vez estrechamos un gran vínculo de amistad.

Al Prof. Aníbal Lobo, principal responsable de esta tesis, por haberme permitido aprender tantas cosas, por su ejemplo de profesionalidad, por haber confiado en mi y ser un estímulo para seguir creciendo intelectualmente.

A la Profa. Evelin Flores, por su asesoramiento científico y fundamental contribución en la realización del estudio experimental.

A la Profa. Luisa Rojas, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad.

Al Licdo. Wilfred Rincones por su valiosa colaboración y disponibilidad.

Al T.S.U. Antonio Gómez, por su invaluable asesoramiento en la realización de microscopía electrónica, fundamental en la concreción de este trabajo.

Al T.S.U José Luís Prin, por su valiosa colaboración y disponibilidad.

A la Profa. Luz Marina Rojas, por su disposición y ayuda desinteresada.

Al T.S.U Liomer Bermúdez, por su disponibilidad y colaboración desinteresada.

Al IIBCA-UDO, por permitirme utilizar sus instalaciones, materiales y equipos.

A todos los estudiantes que colaboraron desinteresadamente en este proyecto de investigación, sin ellos no se hubiesen alcanzado los objetivos planteados.

¡Gracias!

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución por edad de estudiantes de la UDO-Sucre que asistieron al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.	22
Tabla 2. Valor promedio de las características macroscópicas del líquido seminal de estudiantes de la UDO-Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.	23
Tabla 3. Valor promedio de las características microscópicas del líquido seminal de estudiantes de la UDO-Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.	24
Tabla 4. Clasificación de la calidad espermática en relación con las alteraciones detectadas en el espermatograma de estudiantes de la UDO-Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología, Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.	25
Tabla 5. Comparación estadística de las medias para las concentraciones de calcio ionizado (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal de estudiantes de la UDO-Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología, Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.	26
Tabla 6. Comparación estadística de las medias para las concentraciones de magnesio (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal en estudiantes de la UDO-Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología, Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.	27
Tabla 7. Asociación de los niveles de calcio ionizado (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal en individuos normozoospermicos, oligozoospermicos, astenozoospermicos y oligoastenozoospermicos que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis, UDO-Sucre. Enero-julio 2008.	29
Tabla 8. Asociación de los niveles de magnesio (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma	

seminal en individuos normozoospermicos, oligozoospermicos, astenozoospermicos y oligoastenozoospermicos que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis, UDO-Sucre. Enero-julio 2008.	30
Tabla 9. Alteraciones morfológicas del espermatozoide encontradas en muestras de semen de estudiantes de la UDO-Sucre, que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología, Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.	32
Tabla 10. Asociación entre las anormalidades morfológicas del espermatozoide con los niveles de calcio ionizado y magnesio en suero sanguíneo y plasma seminal (valores p).	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentración de calcio ionizado (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal de estudiantes de la UDO-Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.	26
Figura 2. Concentración de magnesio (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal de estudiantes de la UDO-Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.	27
Figura 3. Promedio de morfología espermática de estudiantes de la UDO-Sucre, que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.	31
Figura 4. Promedio de las alteraciones morfológicas del espermatozoide en estudiantes de la UDO-Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.	31
Figura 5. Espermatozoide atilado observado por microscopía óptica con objetivo de 100X (coloración de Giemsa).	33
Figura 6. Espermatozoide con cabeza grande observado por microscopía óptica con objetivo de 100X (coloración de Giemsa).	33
Figura 7. Espermatozoide con cabeza redonda observado por microscopía óptica con objetivo de 100X (coloración de Giemsa).	34
Figura 8. Espermatozoide con gota citoplasmática observado por microscopía óptica con objetivo de 100X (coloración de Giemsa).	34
Figura 9. Espermatozoide con cola enrollada observado por microscopía óptica con objetivo de 100X (coloración de Giemsa).	35
Figura 10. Espermatozoide con doble cola observado por microscopía óptica con objetivo de 100X (coloración de Giemsa).	35
Figura 11. Espermatozoide morfológicamente normal observado por microscopía electrónica de barrido.	37

Figura 12. Espermatozoide con cabeza grande observado por microscopía electrónica de barrido.....	38
Figura 13. Espermatozoide con cabeza alargada observado por microscopía electrónica de barrido.....	38
Figura 14. Espermatozoide con cabeza amorfa observado por microscopía electrónica de barrido.....	39
Figura 15. Espermatozoide con presencia de gota citoplasmática observada por microscopía electrónica de barrido.....	40
Figura 16. Espermatozoide con pieza intermedia engrosada observada por microscopía electrónica de barrido.....	40
Figura 17. Espermatozoide con implantación axial de la pieza intermedia observado por microscopía electrónica de barrido.....	41
Figura 18. Espermatozoide con enrollamiento total del flagelo observado por microscopía electrónica de barrido.....	42
Figura 19. Espermatozoide con enrollamiento a nivel del extremo distal del flagelo observado por microscopía electrónica de barrido.....	42
Figura 20. Espermatozoide con el flagelo enrollado sobre sí mismo observado por microscopía electrónica de barrido.....	43
Figura 21. Espermatozoide con cabeza alargada, restos de gota citoplasmática y flagelo enrollado sobre sí mismo observado por microscopía electrónica de barrido.....	43
Figura 22. Espermatozoide cabeza alargada y restos de gota citoplasmática observado por microscopía electrónica de barrido.....	44
Figura 23. Espermatozoide con la pieza intermedia engrosada y alargada observado por microscopía electrónica de barrido.....	44
Figura 24. Espermatozoide doble cabeza y pieza intermedia engrosada observado por microscopía electrónica de barrido.....	45
Figura 25. Espermatozoide con cabeza redonda y pieza intermedia engrosada y alargada observado por microscopía electrónica de barrido.....	45

RESUMEN

Se evaluó la calidad espermática, composición química del plasma seminal y morfología del espermatozoide, en un grupo de 100 estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, en el periodo comprendido entre los meses de enero a julio de 2008. A cada participante se le tomó muestra de sangre, por punción venosa, y se recolectó muestra de líquido seminal, las cuales fueron procesadas según los criterios y parámetros establecidos por la OMS. Las concentraciones de calcio y magnesio fueron medidas mediante el método de espectrometría de emisión óptica en plasma inductivamente acoplado. La concentración promedio de calcio ionizado y magnesio en suero sanguíneo fueron de 3,27 mg/dl y 0,73 mg/dl, respectivamente, y en plasma seminal fue de 5,13 mg/dl para el calcio y 1,98 mg/dl para el magnesio. La calidad espermática se encontró alterada en un 44% de los estudiantes, siendo clasificados como astenozoospermicos (24%), oligozoospermicos (11%) y oligoastenozoospermicos (9%). No se halló asociación estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre los niveles de calcio y magnesio y las anomalías morfológicas del espermatozoide, respectivamente. El estudio por microscopía electrónica de barrido permitió la observación morfológica de los espermatozoides a un mayor nivel de magnificación y poder de resolución que la microscopía óptica, pudiéndose incluir la microscopía electrónica como un estudio opcional, confirmatorio, para aquellos pacientes en los cuales se sospecha, como causa de infertilidad masculina, un elevado porcentaje de espermatozoides alterados morfológicamente (teratozoospermia).

INTRODUCCIÓN

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

En los testículos, los espermatozoides son inmóviles o móviles *in situ* y no fecundantes. Estos espermatozoides ya maduros, son evacuados hacia el epidídimo por los conductos espermáticos intratesticulares (túbulos rectos, *rete testis*), donde se produce, al mismo tiempo, reabsorción y secreción epididimaria. Sólo aquí, los espermatozoides adquieren su movilidad progresiva y su aptitud para la fecundación (Valverde, 2002; Poirot y Cherruau, 2005).

En el momento de la eyaculación, el líquido del epidídimo que contiene los espermatozoides, es expulsado por el conducto deferente que acaba en la ampolla deferente, después pasa por los conductos eyaculadores hasta la uretra prostática. A esta altura se añade la secreción prostática. Luego, en un segundo tiempo, al contraerse las vesículas seminales, se descarga la secreción en los conductos eyaculadores. En total, el volumen de esperma representa el 5% de la secreción epididimaria, el 30% de la secreción prostática y el 65% pertenece a la secreción de las vesículas seminales. Si se fracciona la recogida del esperma, la primera fracción contendrá las secreciones epididimarias, testiculares y prostáticas, ricas en espermatozoides; y la segunda fracción contendrá la secreción de las vesículas seminales (Poirot y Cherruau, 2005).

Las vesículas seminales juegan un rol importante en la fertilidad, pues varios de sus productos de secreción estimulan de manera directa la movilidad de los

espermatozoides (Okamura *et al.*, 1985). Además, participan en la textura del plasma seminal dándole cierto grado de viscosidad y mantienen el pH del semen de 7.2 a 8.0. Esta secreción rica en fructosa, es el azúcar principal del semen que proporciona los hidratos de carbono utilizados como fuente de energía de los espermatozoides móviles. Además, contienen una variedad de compuestos químicos, potasio, bicarbonato, fosfatos, magnesio, prolactina, insulina, ácido ascórbico y prostaglandinas son algunas de estas sustancias, aunque el papel fisiológico de muchos de estos compuestos es aún desconocido (Vásquez y Vásquez, 2007).

La próstata carece de azúcares y contiene muchas enzimas proteolíticas: plasminógeno, fosfatasas ácidas, β -glucuronidasa, lisosima, amilasa, γ -glutamyltransferasa, proteinasa, seminina y otras; también contiene ácido cítrico, calcio, zinc y espermina. Sus secreciones son necesarias para el proceso de licuefacción o mucólisis, facilitando la licuefacción del líquido seminal coagulado por acción de las secreciones de las vesículas seminales (Botero *et al.*, 2004; 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 de un espermatograma, el cual refleja la función espermatogénica y esteroideogénica de los testículos y el estado funcional de las glándulas secundarias. El análisis seminal constituye la primera etapa biopatológica en la exploración de la fertilidad masculina, que permite orientar hacia una participación masculina en la hipofertilidad de pareja o bien para confirmarla (Quintero, 2003; Teppa y Palacios, 2004).

En 1929, Macomber y Sanders, basados en un estudio de 294 hombres, señalaron que la concentración espermática sería de 100 millones de espermatozoides/ml. Además, informaron que los hombres con una concentración inferior a 60 millones de espermatozoides/ml raramente podrían ser fértiles. Posteriormente, en 1943, Weisman informó que la concentración de espermatozoides varía de 80 a 120 millones/ml de

eyaculado.

En 1951, Mcleod y Gold, propusieron que el valor de 20 millones de espermatozoides por ml de eyaculado separa a varones fértiles de infértiles. A pesar de establecerse esa cifra como límite entre parámetro de normalidad y bajo número de espermatozoides, se reconoce que valores por debajo de 20 millones pueden generar, en algunos casos, sin dificultad un embarazo, lo cual va a depender de la movilidad de los espermatozoides.

La calidad espermática del semen humano, en los últimos 50 años se debate en la actualidad. Un estudio publicado en 1992, por un grupo de científicos daneses, demostró que la cantidad de espermatozoides presentes en el semen de hombres de 21 países, había disminuido en un 50% entre 1940 y 1990. El número de espermatozoides por mililitro había bajado de 113 a 66 millones, obteniéndose una disminución de alrededor del 1% por año (Brake y Krause, 1992; Carlsen *et al.*, 1992; Vine *et al.*, 1994).

En un estudio llevado a cabo en el año 2000, se indicó que en una muestra de semen perteneciente a 100 hombres con edades comprendidas entre 18 y 20 años, el 40% tenía un nivel de espermatozoides por debajo de 20 millones por mililitro, nivel asociado con infertilidad masculina (Andersen *et al.*, 2000). Esta incidencia se ha calificado como un problema de salud pública a nivel mundial, pues los problemas de infertilidad masculina han aumentado con el paso del tiempo. De allí la preocupación de la comunidad científica por realizar estudios que puedan identificar las posibles causas de este fenómeno, en función de encontrar los mecanismos que permitan revertir el problema de infertilidad (Meza, 2004).

Se conoce como infertilidad masculina cuando el hombre ha tenido relaciones sexuales con regularidad durante un año, sin usar ningún método anticonceptivo, y sin embargo, no ha sido capaz de embarazar a la mujer, término muy distinto al de esterilidad, el cual se define como la incapacidad en lograr un embarazo y la causa no

puede corregirse (Padrón *et al.*, 1998; Barja y Berrios, 2003; Hernández *et al.*, 2005).

La frecuencia de parejas infértiles a nivel mundial se sitúa entre el 10 y 15%. Actuales estudios epidemiológicos determinan que el varón es responsable de infertilidad de forma exclusiva o compartida en más del 50%. Asimismo, destacan un deterioro de la calidad del semen humano con el paso del tiempo, probablemente por factores ambientales que actuarían desde el desarrollo fetal del individuo (Barja y Berrios, 2003; Brugo *et al.*, 2003), además de enfermedades infecciosas (parotiditis post-puberal, enfermedades de transmisión sexual), patologías urológicas (prostatitis, litiasis), disfunciones sexuales (eréctiles, eyaculatorias), afecciones congénitas (criptorquídea), trastornos inmunológicos, lesiones neurológicas, factores tóxicos y de alimentación, entre otras, los cuales en definitiva afectan la fertilidad de los hombres en edades fértiles (Teppa y Palacios, 2004).

Los indicadores o marcadores utilizados para evaluar la calidad del semen en el espermiograma clásico, estándar o tradicional son fundamentalmente los siguientes: conteo de espermatozoides por mililitro (concentración), conteo total de espermatozoides, movilidad, viabilidad y morfología normal de los espermatozoides (Álvarez *et al.*, 2003); también deben evaluarse otras características físicas del semen como tiempo de licuefacción, apariencia, volumen, viscosidad, pH, así como conteo de células, en especial leucocitos (Padrón *et al.*, 1998).

La muestra de semen debe obtenerse mediante masturbación o como alternativa mediante el uso de un condón especial de polietileno, sin espermaticidas. Se recomienda un período de inactividad sexual de 3 a 5 días. Eyaculaciones frecuentes disminuyen la concentración espermática y eyaculaciones poco frecuentes (mayores a 7 días) aumentan el número de espermatozoides con movilidad pobre, debido al envejecimiento de los mismos. Si se tiene en cuenta que la producción de espermatozoides toma aproximadamente 60 días, y que cualquier infección, fiebre y otros factores pueden influir negativamente en la calidad del semen, no puede hacerse un diagnóstico

definitivo con un solo espermograma, por lo que se recomienda repetirlo 1 ó 2 veces más con un intervalo de 4 semanas (Botero *et al.*, 2004; Poirot y Cherruau, 2005).

La valoración macroscópica del semen ofrece una primera evaluación de la función secretoria de las glándulas anexas, como lo son la próstata, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales (Bernard, 1988; Strasinger, 1991). El eyaculado es opalescente (blanco-grisáceo o blanco-amarillento) y tiende a ser más amarillento con mayor abstinencia (Botero *et al.*, 2004). El semen se coagula inmediatamente después de su expulsión, y se licúa de 20 a 30 minutos. La coagulación ocurre debido a un proceso enzimático producido en las vesículas seminales, en el cual participa el plasminógeno, su conversión en plasmina y su interacción con el fibrinógeno. La enzima responsable de la licuefacción proviene de la próstata, y se denomina seminina. La falta de coagulación asociada a azoospermia (ausencia de espermatozoides en el eyaculado) indica agenesia de las vesículas seminales u oclusión de los conductos eyaculadores, mientras que la falta de licuefacción, además de indicar deficiente funcionamiento prostático, puede disminuir la movilidad por atrapamiento de los espermatozoides (Padrón *et al.*, 1992; Vásquez, 2003; Botero *et al.*, 2004).

Normalmente, el volumen del eyaculado varía entre 2 a 4 ml, su aumento se relaciona con procesos inflamatorios o infecciosos y su disminución a procesos obstructivos, acompañados con alteraciones del pH. En condiciones normales, el pH del semen está comprendido en un rango muy estrecho (7,2 - 8,0), pocos son los trastornos capaces de alterarlo. Un pH disminuido ($\text{pH} < 7,2$) 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, sin embargo, hay que descartar que esté diluido con orina; mientras que un pH elevado ($\text{pH} > 8,0$) puede relacionarse con trastornos a nivel de próstata, infecciones seminales, movilidad disminuida y suelen acompañarse de alteraciones en el volumen. En este caso, se añaden estudios especiales que no se realizan en el primer estudio, tales como cuantificación de leucocitos, cultivo de secreción prostática, medición de fructosa, fosfatasa ácida, zinc y ácido cítrico

(Padrón *et al.*, 1998; WHO, 1999; Botero *et al.*, 2004; Poirot y Cherruau, 2005).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que existe infertilidad masculina cuando hay alteración del espermatograma 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).

Según criterios de la OMS, la concentración de espermatozoides debe ser mayor a 20 millones por ml de eyaculado, definidos por individuos normozoospermicos, mientras que niveles por debajo indican la presencia de oligozoospermia (Kruger *et al.*, 1987; Padrón *et al.*, 1998; WHO, 1999; Poirot y Cherruau, 2005).

Los espermatozoides en la mayoría de los mamíferos, presentan una morfología homogénea que se correlaciona con su capacidad fecundante. Por el contrario, en la especie humana se observa un fenómeno de anisozoospermia, lo que significa que hay una gran heterogeneidad morfológica de los gametos masculinos que dificulta, en ocasiones, poder establecer esta correlación (Gómez *et al.*, 2005). El estudio de la caracterización de las diferentes formas espermáticas y su relación con la fertilidad son actualmente, uno de los puntos clave en el análisis del semen (Álvarez, 2003).

El espermatozoide tiene una estructura flagelar que le permite su desplazamiento en el líquido seminal, en la cavidad vaginal, útero y trompas uterinas (Vásquez, 2003), por lo tanto la movilidad representa uno de los parámetros más importantes de la analítica seminal y para su correcta evaluación, el espermiograma debe haber sido hecho en las primeras dos horas de haberse producido el eyaculado (Quintero, 2003). Se considera normal, cuando el 25% de los espermatozoides o más presentan una movilidad progresiva rápida (movilidad tipo “a”). La disminución de la movilidad espermática se denomina astenoospermia, puede ser un hallazgo aislado en el espermatograma o acompañarse de alteraciones en la concentración y morfología normal de los espermatozoides (que es lo más común), en este último caso indica un daño global de la

espermátogénesis (Gunalp *et al.*, 2001). La disminución de la movilidad espermática tiene múltiples causas que no son posibles diagnosticar por el simple análisis seminal y en la mayoría de los casos tampoco es posible establecer un pronóstico por este examen. Una excepción a lo dicho anteriormente es el hallazgo de una movilidad menor del 5% o incluso nula por completo, asociada a concentración, morfología y viabilidad espermática normal o muy cercanas a lo normal, en este caso es muy probable se trate de un síndrome de cilias inmóviles, trastorno de causa genética que es irreversible y que por tanto hasta el presente los pacientes son definitivamente estériles; el diagnóstico de certeza se realiza por medio de la microscopía electrónica (Padrón *et al.*, 1998).

La utilización de técnicas microscópicas para valorar y clasificar los eyaculados destinados a realizar dosis seminales, son fundamentales para alcanzar buenos resultados de fertilidad. El estudio mediante microscopía electrónica de barrido pone de manifiesto las alteraciones morfológicas de los espermatozoides, considerándose una herramienta precisa para analizar la naturaleza de estos defectos y su posible repercusión sobre la fisiología del espermatozoide humano (Gómez *et al.*, 2005). De esta manera, el estudio por microscopía electrónica de los espermatozoides permite confirmar las anomalías constitucionales de los espermatozoides, como es el caso de las disquinesias flagelares (trastornos en la movilidad), las anomalías del axonema (ausencia de brazos de dineína, ausencia de los túbulos centrales, anomalías de la vaina fibrosa) o la ausencia de la capa posacrosómica (Poirot y Cherruau, 2005).

La evaluación morfológica, constituye uno de los tres parámetros más importantes a ser evaluados en un análisis de semen, junto con la movilidad y la concentración espermática, siendo esencial para el mejoramiento de la fertilidad (Seibel y Zilberstein, 1995 y Boada *et al.*, 1999). En la especie humana, existe una gran heterogeneidad morfológica de los espermatozoides lo que dificulta, en ocasiones, poder establecer una correlación con la capacidad fecundante. Las anomalías morfológicas del espermatozoide podrían deberse a situaciones tales como: traumatismos e infecciones a nivel gonadal, disfunción en los túbulos seminíferos, alteraciones metabólicas y

endocrinas que alteren directamente a la espermatogénesis, espermiogénesis y a la función del epidídimo, y con alteraciones en la maduración de los espermatozoides. Por ello, una correcta evaluación del porcentaje de células espermáticas morfológicamente normales y anormales puede ser una información clave en el estudio básico del semen (Gómez *et al.*, 2005; Jurado *et al.*, 2008).

El estudio morfológico de los espermatozoides, se realiza de manera rutinaria por microscopía óptica dividiendo el espermatozoide en cabeza, pieza intermedia y cola, pasando desapercibidos los defectos más finos (Zamboni, 1987 y Boada *et al.*, 1999). Sin embargo, el uso de la microscopía electrónica de barrido dentro de la evaluación de infertilidad masculina, ha contribuido en responder incógnitas referidas a sus posibles causas, dado que provee información detallada acerca de la morfología e integridad de la célula espermática, que no es posible obtener por medio de otras metodologías. Esta información posibilita estimar la fertilidad del semen analizado con mayor exactitud que otras pruebas de análisis de semen *in vitro* (Quintero, 2003; Jurado *et al.*, 2008).

El microscopio electrónico de barrido permite examinar el espermatozoide completo a un nivel de magnificación elevado y con mayor poder de resolución que el microscopio óptico (Boada *et al.*, 1999; Jurado *et al.*, 2008). Además, el secado por punto crítico empleado en este tipo de microscopía evita las deformaciones de las células espermáticas apreciándose mejor las estructuras superficiales (Jurado *et al.*, 2008). A pesar del gran aporte de la microscopía electrónica de barrido en los estudios de infertilidad, no son incluidos dentro de los exámenes clínicos de rutina por su elevado costo y engorroso procesamiento (Quintero, 2003; Gómez *et al.*, 2005; Jurado *et al.*, 2008).

Gracias al estudio del eyaculado en los últimos años se ha podido avanzar considerablemente en el conocimiento del proceso de fertilización. Los espermatozoides del eyaculado, deben ser capaces de desplazarse a través de la vagina, útero y trompas, requiriendo un aporte de energía y debiendo eliminar una serie de barreras naturales,

proceso en que el plasma seminal juega un papel importante (Álvarez, 2003).

El plasma seminal es un medio rico y complejo, que sirve a la vez de vehículo y de medio nutritivo y protector de los espermatozoides. Los constituyentes que lo forman son principalmente los iones sodio (Na^+), potasio (K^+), cloro (Cl^-), calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}) y zinc (Zn^{2+}) (Poirot y Cherruau, 2005). Básicamente, la valoración bioquímica del semen refleja los productos de la secreción de las glándulas accesorias. Estas sustancias son muy útiles para diagnosticar la presencia o ausencia de infección o disfunción de una glándula en particular, evaluando así el funcionamiento de las glándulas accesorias en el aparato genital masculino (Teppa y Palacios, 2004).

El espermatozoide constituye una célula formada por dos zonas con distintas funciones: la cabeza y la cola. La cola se divide a su vez en cuatro segmentos que, por orden cráneo-caudal, se denominan cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal. La cabeza contiene el núcleo y posee una estructura altamente especializada llamada acrosoma, la cual presenta enzimas hidrolíticas que sirven para el proceso de penetración de la corona radiada y la zona pelúcida. Por su parte, la cola se considera como un flagelo cuyo axonema central sale de un corpúsculo basal situado inmediatamente detrás del núcleo, contiene dos microtubúlos centrales rodeados por nueve pares de túbulos periféricos formados por las proteínas tubulina y actina, y es responsable del movimiento de la cola. La energía que activa al axonema, ubicada en la pieza intermedia, proviene del ATP proporcionado por la vaina mitocondrial donde la concentración de algunos iones es esencial (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) (Quintero, 2003).

Los espermatozoides deben completar un proceso de capacitación para poder fecundar al óvulo. Entre estos cambios, la capacitación del espermatozoide maduro incluye modificaciones metabólicas y alteraciones en la permeabilidad de su membrana plasmática a diversos iones. Los flujos iónicos de Ca^{2+} y K^+ en particular, resultan ser claves en el intercambio molecular que se establece entre el espermatozoide, su medio

ambiente y el óvulo (Olivera *et al.*, 2006). Estudios recientes indican que, el flujo de iones K^+ juega un papel muy importante en el desarrollo de la capacidad espermática, además, de que los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular son críticos, no sólo para la capacitación espermática y la reacción acrosomal, sino que también juegan un papel determinante en la movilidad espermática (Vega *et al.*, 2002). Estos canales no son más que proteínas con un poro que permite que determinadas sustancias (Ca^{2+} , Na^+ , K^+) pasen a través de la membrana de las células. De este modo, se generan señales eléctricas que controlan la contracción muscular, la secreción de hormonas, las sensaciones o en este caso, el movimiento de espermatozoides (Ren *et al.*, 2001).

Estudios realizados han comprobado que el movimiento acelerado de los gametos masculinos cuando se aproximan al óvulo se debe a una proteína, responsable de las corrientes de calcio que movilizan al espermatozoide. La hiperactivación es uno de los factores claves en la fertilidad masculina, pues esta hiperactividad necesita un aumento de calcio en la cola del espermatozoide. La proteína responsable se denomina Catsper y se encuentra sólo en la cola de los espermatozoides maduros. La sustancia regula la cantidad de calcio que penetra en el flagelo y a su vez, este calcio activa las proteínas motrices de la cola iniciando el movimiento descontrolado de los espermatozoides (Ren *et al.*, 2001).

La exploración completa y escrupulosa de la hipofertilidad masculina es esencial. El espermiograma es un examen básico y la bioquímica del plasma seminal lo complementa, permitiendo explicar ciertas anomalías, en particular las azoospermias obstructivas. El diagnóstico exacto de la causa de infertilidad resulta de un proceso pluridisciplinar, pudiendo recurrir a numerosos exámenes complementarios más o menos complejos. Es muy importante, ya que condiciona la elección de un tratamiento o de una técnica de procreación médicamente asistida (Poirot y Cherruau, 2005).

Cabe destacar que, existe un grupo elevado de hombres que acuden a consulta por infertilidad con un espermiograma estándar normal (49,2% en el estudio multicéntrico

de la OMS), a estos se les clasifican en la categoría diagnóstica de causa no demostrable. Esto indica que, en ocasiones son necesarios otros elementos que permitan definir mejor la capacidad de fertilización de los espermatozoides (Padrón *et al.*, 1998). Así que, tomando conciencia de la importancia del factor masculino en la fertilidad de pareja y la necesidad de buscar sus causas, se hace interesante desarrollar este trabajo que aparte de evaluar la calidad espermática, profundiza en las posibles causas, poco estudiadas, como alteraciones iónicas y morfológicas del espermatozoide.

METODOLOGÍA

Población

La población en estudio estuvo conformada por 100 individuos del sexo masculino, con edades comprendidas entre 17 y 46 años, que asistieron al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, entre los meses enero a julio del año 2008, con indicación de estudio del líquido seminal.

A la población estudiada, se le realizó una encuesta sobre sus datos personales y datos clínicos (apéndice 1). De igual forma, se siguieron las normas de ética establecidas por la OMS para trabajos de investigación en humanos, según la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, para lo cual a cada individuo seleccionado se le informó sobre los alcances y objetivos de esta investigación, así como las ventajas y desventajas de su participación, esto con el propósito de obtener su consentimiento por escrito (OPS, 2000; De Abajo, 2001).

Criterios de exclusión

Fueron excluidos aquellos estudiantes que recibieron tratamiento médico que pudiera afectar de alguna manera la función reproductora (quimioterapia, radioterapia), varicocele, individuos vasectomizados u otras patologías similares.

Lavado del material

Los recolectores de orina utilizados para la obtención de las muestras de semen y todos los materiales para el procesamiento de las muestras y preparaciones de los

patrones, fueron previamente tratados para evitar cualquier tipo de interferencias en las determinaciones de los diferentes parámetros estudiados. El tratamiento aplicado fue el siguiente:

El material utilizado (recolectores de orina, puntas plásticas de pipeta, tubos de vidrio, tubos de polietileno, tapones de goma, cilindro graduado, varilla de vidrio, entre otros) se colocó en remojo durante 12 horas en una solución de ácido nítrico (HNO_3) diluido al 10%, con la finalidad de eliminar cualquier contaminación del material que pueda interferir en las determinaciones de los iones calcio y magnesio. Posteriormente, todo el material se enjuagó con agua desionizada de alta pureza Milli-Q (18 MW/cm de resistividad) y se secó perfectamente dejándolo escurrir. Luego, fue guardado en bolsas plásticas selladas, para evitar cualquier contaminación por polvo hasta el momento de su uso (Grosso, 2001).

Obtención de muestras seminales

Se analizaron muestras de líquido seminal provenientes de los individuos seleccionados, para lo cual cada uno mantuvo una abstinencia sexual de 3 a 5 días antes del estudio; las muestras fueron obtenidas por masturbación y recogidas en recipientes plásticos, previamente tratados con ácido nítrico diluido al 10%, debidamente rotulados con el número de muestra, tiempo de abstinencia, fecha y hora de recolección. Luego, las muestras de semen fueron analizadas inmediatamente después del tiempo de licuefacción (Kruger *et al.*, 1987; WHO, 1999).

Obtención de muestras sanguíneas

A cada uno de los individuos participantes se le tomaron 10 ml de sangre por punción venosa, para lo cual se utilizaron jeringas descartables de 10 ml con aguja de 21 x 1 ½". Posteriormente, se agregó la sangre en un tubo de ensayo sin anticoagulante, previamente identificado, que se dejó reposar aproximadamente unos 20 minutos hasta

que se formara el coágulo de fibrina; y con la ayuda de una centrífuga, se separó la muestra de sangre a unos 3 500 rpm durante 10 minutos. Obteniéndose, de esta manera, los sueros, los cuales se identificaron y se conservaron a -4°C hasta su análisis. (Morisawa *et al.*, 1983).

Determinación de la calidad espermática

Siguiendo los criterios y parámetros establecidos por la OMS (Remohi *et al.*, 2000), cada una de las muestras de semen recolectadas, fueron sometidas a las siguientes pruebas espermáticas:

A. Examen macroscópico del semen

Licuefacción

El tiempo de licuefacción en el semen normal debe completarse a los 30 minutos. Por lo que, una vez recolectadas las muestras de semen, se esperó un lapso de tiempo de aproximadamente 20 a 30 minutos a temperatura ambiente, para que ocurriera la licuefacción y así proceder a su evaluación.

Viscosidad

Para evaluar la viscosidad se introdujo una varilla de vidrio en la muestra y se observó la longitud del filamento que se forma al retirarlo, el cual no debe ser mayor a 2 cm de longitud. La viscosidad del semen se reportó según el filamento que formaba la muestra, ya sea ausente, normal o aumentada.

Aspecto

El aspecto del eyaculado se valoró según su color, opacidad/transparencia y

presencia de cuerpos mucosos o gelatinosos. El color del semen normalmente varía de blanco amarillento a blanco grisáceo, mientras que su aspecto es opalescente y homogéneo.

Volumen

El volumen normal de eyaculado varía de 2 a 4 ml y fue medido con un cilindro graduado.

pH

El pH de las muestras de semen varía normalmente entre un rango de 7,2 - 8,0 y este se midió depositando una gota de esperma sobre una tira de papel de pH y al cabo de 30 segundos el color de la zona impregnada fue comparado con una escala colorimétrica para leer el pH.

B. Examen microscópico del semen

Directo

Se colocaron 10 μ l de la muestra de semen bien mezclada y licuada en un portaobjetos limpio y calentado a 37°C (para mantener la movilidad espermática), se cubrió con un cubreobjetos de 22 x 22 mm². Posteriormente, la preparación fue examinada con un objetivo de 40X, en la cual se observó la presencia de bacterias, eritrocitos, células redondas, células epiteliales y aglutinación espermática.

Movilidad espermática

Se colocaron 10 μ l de semen licuado entre un portaobjeto y cubreobjeto secos y desengrasados. El análisis de movilidad de los espermatozoides de la muestra de semen

se realizó contando solamente los espermatozoides libres y nunca los que estuvieran agregados entre sí o a otras células. Se llevó a cabo el recuento de los espermatozoides móviles e inmóviles en varios campos seleccionados al azar y con un objetivo de 40X fueron contados no menos de 100 espermatozoides. Primero, se registraron los espermatozoides móviles progresivos del campo o de un área determinada y luego se contaron los móviles no progresivos e inmóviles del mismo campo.

En función de la movilidad que presentaron los espermatozoides, estos fueron agrupados en las siguientes categorías:

- a: Móviles progresivos rápidos.
- b: Móviles progresivos lentos.
- c: Móviles no progresivos.
- d: Inmóviles.

El resultado de la movilidad fue presentado como los porcentajes de espermatozoides a, b, c y d.

Vitalidad espermática

Se utilizó la tinción vital con eosina, cuya técnica se basa en el principio de que las células muertas que presentan alteraciones de la membrana plasmática, absorben determinadas tinciones, como en este caso, la de eosina. Para ello, se preparó una solución de eosina al 0,5% (5 g/l) en una solución acuosa al 0,9% (9 g/l) de cloruro sódico y se procedió a mezclar en proporción 1:1 del semen fresco con la solución de eosina en un tubo. Después de 1 ó 2 minutos, se tomaron 10 µl de la mezcla y se añadieron en un portaobjeto cubriéndolo con un cubreobjeto para luego observar la preparación a 40X, con luz brillante. Finalmente, se contaron los espermatozoides no teñidos (vivos) y los teñidos (muertos), y se expresaron en porcentaje.

Concentración espermática

Se diluyó la muestra de semen en una proporción 1:19 con un diluyente preparado de la siguiente manera: 1 000 ml de agua destilada se le agregó 50 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), 10 ml de solución de formaldehído (CH_2O) de 36-40% y 0,25 g de azul de tripano. La muestra diluida se mezcló enérgicamente y se añadieron 10 μl en una cámara de Neubauer; una vez sedimentadas las células, se realizó el recuento de espermatozoides presentes en los 5 cuadrados medianos del cuadrado central de ambos retículos.

La cámara de Neubauer utilizada para el conteo de los espermatozoides, posee un cuadrado central conformado por 25 cuadrados grandes, cada uno de los cuales contiene 16 cuadros más pequeños. Para las muestras que contenían menos de 10 espermatozoides por cuadrado se contaron todos los cuadrados, es decir, 25 cuadrados; para las que contenían de 10 a 40 espermatozoides por cuadrado se contaron 10 cuadrados y aquellos con más de 40 células por cuadrado fue suficiente contar 5 cuadrados (OMS, 1987). Sólo se contaron espermatozoides del lado superior o izquierdo del cuadrado en estudio, cuando uno de estos se ubicó en la línea que divide a dos cuadrados adyacentes, esto con la finalidad de evitar el conteo repetitivo de células. La concentración de espermatozoides en la muestra de semen original en millones/ml, se obtuvo dividiendo la cantidad de espermatozoides contados por los factores de corrección que se indican en el anexo 1 y luego se multiplicó por el factor 10^6 .

Morfología espermática

El estudio de la morfología espermática se realizó a partir de extendidos de la muestra de semen aplicando la coloración de Giemsa. Para ello, se utilizaron 10 μl de semen sobre un portaobjetos limpio y desengrasado para la extensión y se dejó secar al aire. El estudio de la preparación se llevó a cabo con un microscopio de campo claro,

con un objetivo de 100X en aceite de inmersión, contándose un mínimo de 100 espermatozoides; desechándose aquellos espermatozoides mal teñidos, colas sueltas y espermatozoides cabezas de alfiler. Un espermatozoide anormal puede presentar defectos de la cabeza (grande, pequeña, redonda, piriforme, atilada, amorfa, vacuolada, doble), de la pieza media (ausente, pequeña, anormalmente fina, conteniendo residuos citoplasmáticos) o de la cola (doble, enrollada, con residuos citoplasmáticos, horquillada). Una vez contados y clasificados los espermatozoides dependiendo de su morfología, ya sean como normales y anormales, estos fueron expresados en porcentajes.

Determinación de las concentraciones de calcio ionizado y magnesio en suero sanguíneo y plasma seminal.

La determinación de las concentraciones de calcio y magnesio en suero sanguíneo y plasma seminal, se realizaron por Espectrometría de Emisión Óptica en Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-OES), Perkin–Elmer modelo 5 100. La espectroscopia de emisión óptica es una técnica reconocida para el análisis cuantitativo de un gran número de elementos químicos. El desarrollo relativamente reciente del plasma inductivamente acoplado (ICP), ha reactivado su aplicación como una potente técnica a niveles de concentración en el orden de partes por millón (ppm), con buena exactitud y precisión (Zhang *et al.*, 1997).

El ICP-OES se basa en la nebulización, desolvatación, vaporización, atomización, ionización y excitación de los diferentes elementos químicos de una muestra en el interior de un plasma. La muestra es usualmente transportada al instrumento como un chorro de muestra líquida. Dentro del instrumento el líquido es convertido en un aerosol mediante un proceso conocido como nebulización. Posteriormente, la muestra es arrastrada hacia el plasma para ejercer su primera función, la de remover el solvente o desolvatar el aerosol, dejando usualmente las muestras como partículas microscópicas de sal. Los siguientes pasos involucran la descomposición de las partículas de sal para

formar un gas de las moléculas individuales (vaporización) las cuales son disociadas en átomos (atomización). Una vez que el aerosol de la muestra ha sido desolvatado, vaporizado y atomizado, el plasma tiene dos funciones restantes, la ionización y excitación. Mientras que los mecanismos exactos para la excitación e ionización no han sido totalmente comprendidos, se cree que estos dos últimos procesos en el ICP ocurren como resultado de las colisiones de los átomos de analito con electrones energéticos (Boss y Fredeen, 1997).

Por definición, un plasma es una mezcla gaseosa conductora de la electricidad que contiene partículas cargadas y neutras de un gas ionizado: argón, el cual es ionizado por efecto de la inducción de un campo magnético generado por una corriente de alta frecuencia. El argón, es dirigido a través de una antorcha consistente de tres tubos concéntricos hechos de cuarzo. Un espiral de cobre, denominado espiral de carga, rodea el borde superior de la antorcha y esta conectado a un generador de radiofrecuencia (RF). Cuando se aplica el poder de RF (típicamente 700-1500 Watts) al espiral de carga, una corriente alterna se mueve de adelante hacia atrás a través del espiral, u oscila, a una velocidad correspondiente a la frecuencia del generador. Esta oscilación de RF de la corriente en el espiral ocasiona que se instalen campo de RF, eléctrico y magnético, en el tope de la antorcha. Con el argón circulando a través de la antorcha, se activa una chispa al gas ocasionando que algunos electrones sean desprendidos de sus átomos de argón, los cuales son atrapados en el campo magnético y acelerados por éste. Estos electrones de alta energía a su vez chocan con otros átomos de argón, despojando aún más electrones. Esta ionización por colisión del gas argón continúa en una reacción en cadena, descomponiendo el gas para formar un plasma consistente de átomos de argón, formando lo que se conoce como ICP. (Skoog y Leary, 1994; Boss y Fredeen, 1997; Grosso, 2001).

Una de las funciones del gas es mantener frías las paredes de cuarzo de la antorcha y, por lo tanto, este flujo de gas fue llamado flujo de enfriamiento, flujo de plasma o flujo de gas “exterior”. El flujo de gas intermedio o auxiliar, es usualmente introducido

para reducir la formación de carbón en la punta del tubo de inyección cuando se analizan muestras orgánicas. Sin embargo, también puede mejorar el desempeño con las muestras acuosas. El flujo de la muestra, flujo del gas interno o flujo de nebulizador, transporta la muestra hacia el plasma (Boss y Fredeen, 1997).

La detección de calcio y magnesio mediante el ICP-OES, se realizó ajustando las condiciones óptimas del plasma requerido por la muestra (flujos de gas: del plasma (15 l/min), auxiliar (0,4 l/min) y nebulizador (0,80 l/min), poder de RF (1400 Watts), bomba peristáltica o velocidad de aspiración (1,50 ml/min), utilizando un inyector de 1,2 mm de diámetro.

El análisis de las muestras se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Nixon *et al.* (1999). Las determinaciones se realizaron por duplicado con previa calibración del equipo; se diluyeron 1:5 las muestras de suero sanguíneo y semen con una solución diluyente que contiene 1% V/V de ácido nítrico; 1% V/V de etanol, 0,5% V/V de Triton X-100 en un volumen final de 1 000 ml de agua desionizada de alta pureza Milli-Q (18 MW/cm de resistividad) para eliminar el efecto matriz, lograr el perfeccionamiento de la ionización de los elementos, reducir el fondo isobárico y hacer que la muestra sea más fácil de nebulizar. La longitud de onda para la cuantificación de calcio y magnesio fueron: 317,9 nm y 285,2 nm, respectivamente. Se realizaron curvas de calibración con patrones acuosos de 0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,5 - 1,0 - 2,0 y 5,0 mg/l; preparados a partir de una solución certificada (Accustandard, USA) de 100 mg/l de calcio (apéndice 2) y 100 mg/l de magnesio (apéndice 3). Los resultados reportados por el ICP-OES son expresados en mg/l, los cuales fueron convertidos a mg/dl.

Se tomaron como valores de referencia en suero sanguíneo, para calcio ionizado: 4,5 a 5,6 mg/dl y magnesio: 1,3 a 2,1 mg/dl (Pagana y Pagana, 2001). No se encontraron valores de referencia de los niveles de calcio y magnesio en plasma seminal.

Estudio por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Luego de completado el tiempo de licuefacción, las muestras fueron diluidas en una proporción 1:1 con buffer fosfato salino (PBS) 0,1 mol/l; pH 7,4 seguido de tres lavados con PBS, centrifugadas por 2 minutos a 5 000 rpm. Una vez descartado el plasma seminal en el último lavado, los espermatozoides fueron fijados con glutaraldehído al 2,5% en PBS (0,1 mol/l; pH 7,4) por 90 minutos a 4°C. Luego, se hicieron tres lavados en el mismo buffer por 5 minutos cada uno. Se post-fijaron en tetra-óxido de osmio (OsO₄) al 1% por 90 minutos a 4°C y se lavaron tres veces. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas en una serie creciente de concentraciones de etanol (50, 70, 80, 90, 95, 100%) por 10 minutos cada uno y se colocaron en un portamuestra metálico especial para MEB y secadas por el método de punto crítico (HITACHI, HCP-2), cubiertas con cromo (Cr) en un evaporador iónico HITACHI HUS-5GB y finalmente, observadas y fotografiadas a través de un MEB HITACHI S-800 (Jurado *et al.*, 2008).

Análisis estadístico

Se emplearon como métodos estadísticos de asociación el análisis de regresión lineal simple y múltiples variables, para establecer asociación entre la calidad espermática y concentraciones iónicas en los individuos con alteraciones en el espermatograma; y el análisis de muestras pareadas para comparar los valores medios de las concentraciones de calcio y magnesio en suero sanguíneo y plasma seminal, respectivamente (Sokal y Rohlf, 1979).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se resume la distribución por edad de los estudiantes de la UDO-Sucre, que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis entre los meses enero-julio de 2008, donde se destaca que el mayor grupo de jóvenes se encuentra en el rango de 17-28 años, correspondiendo al 87% del total de la población estudiada.

Tabla 1. Distribución por edad de estudiantes de la UDO-Sucre que asistieron al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.

Grupo Etario	% estudiantes
17 – 22	49
23 – 28	38
29 – 34	8
35 – 40	3
41 – 46	2
Total	100

El promedio del tiempo de abstinencia sexual de los estudiantes que participaron en la presente investigación, fue de $3,97 \pm 0,76$ días; siendo recomendado por la OMS un lapso de 3 a 5 días. Eyaculaciones frecuentes ocasionan una disminución en el volumen del líquido eyaculado y de la concentración espermática. Por el contrario, eyaculaciones poco frecuentes (mayores a 7 días) dan lugar a un volumen y una concentración de espermatozoides mayor, con una disminución de la movilidad y un aumento de las formas anormales (WHO, 1999; Botero *et al.*, 2004; Poirot y Cherruau, 2005).

La tabla 2 muestra el valor promedio de las características macroscópicas del líquido seminal de estudiantes de la UDO-Sucre, que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis; de enero a julio de 2008. La

media y la desviación estándar para las variables: tiempo de licuefacción ($29,56 \pm 9,77$) y volumen ($3,37 \pm 1,15$) se encontraron dentro de los valores de referencia, según valores establecidos por la OMS (WHO, 1999). El pH seminal va de neutro a ligeramente alcalino, entre 7,2 y 8,0; y depende de las secreciones de las glándulas accesorias, siendo la próstata acidificante y alcalinizantes las vesículas seminales (Okamura *et al.*, 1985; Remohi *et al.*, 2000; Vásquez, 2003; Botero *et al.*, 2004; Vásquez y Vásquez, 2007). El resultado obtenido en la presente investigación para el pH seminal ($8,97 \pm 0,17$), demuestra estar ligeramente por encima del valor referencial, por lo que Padrón *et al.* (1998) sugieren que un pH elevado (>8) puede considerarse signo de infección seminal si se asocia a otros síntomas y signos de sospecha. Sin embargo, al realizar el examen microscópico de la muestra de semen mediante el directo, no se observó la presencia de bacterias. Por ello, los resultados arrojados en esta investigación sugieren que, las glándulas que intervienen en definir el pH seminal pudieran estar alteradas, ejerciendo mayor actividad las vesículas seminales sobre la próstata. Por otro lado, Botero *et al.* (2004) indican que el semen libera CO_2 y en consecuencia se incrementan los valores de pH cuando la medición se hace tardíamente, constituyendo una causa de error. No obstante, es importante resaltar que estos detalles fueron rigurosamente cuidados a la hora del procesamiento de las muestras de líquido seminal, por lo que se descarta una posible fuente de error.

Tabla 2. Valor promedio de las características macroscópicas del líquido seminal de estudiantes de la UDO-Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.

Características macroscópicas	N	\bar{X}	S	VR
Tiempo de licuefacción (min)	100	29,56	9,77	20-30
Volumen (ml)	100	3,37	1,15	2,0-4,0
pH	100	8,97	0,17	7,2-8,0

\bar{X} : media; S: desviación estándar; $V_{\text{mín.}}$: valor mínimo; $V_{\text{máx.}}$: valor máximo; VR: valor de referencia.

La tabla 3 muestra el valor promedio de las características microscópicas del líquido seminal de estudiantes de la UDO-Sucre, que asistieron voluntariamente al

laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis; de enero a julio de 2008. La concentración promedio de espermatozoides por ml de eyaculado fue de 60 844 000±52 090 600, con una media en la movilidad tipo “a” de 33,87±16,97% y una morfología espermática normal de 68,42±13,98%, cuyos valores se encuentran dentro del intervalo de referencia establecidos por la OMS (WHO, 1999).

Tabla 3. Valor promedio de las características microscópicas del líquido seminal de estudiantes de la UDO-Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.

Características microscópicas	N	¡Error! Marcador		
		no definido. \bar{X}	S	VR
Concentración (esp/ml)	100	60 844 000	52 090 600	$\geq 20 000 000$
Movilidad tipo “a” (%)	100	33,87	16,97	≥ 25
Morfología normal (%)	100	68,42	13,98	≥ 15

\bar{X} : media; S: desviación estándar; Vmín.: valor mínimo; Vmáx: valor máximo; VR: valor de referencia.

En la tabla 4 se refleja la clasificación de la calidad espermática en relación con las alteraciones detectadas en el espermatograma de estudiantes de la UDO-Sucre, que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología, Departamento de Bioanálisis; de enero a julio de 2008. La calidad espermática resultó estar afectada en un 44% de la población estudiada, clasificándose en individuos que presentaron astenozoospermia (espermatozoides con movilidad tipo “a” < 25%), oligozoospermia (concentración de espermatozoides < 20 000 000 esp/ml), y oligoastenozoospermia (baja concentración y movilidad), obteniéndose como frecuencias 24%, 11% y 9%, respectivamente, lo cual indica que la astenozoospermia es una de las alteraciones más predominantes en esta población joven, seguida de la oligozoospermia, y por último, pero no menos importante, la oligoastenozoospermia, que aún representando la minoría de la población, hay que considerar este resultado, debido a que estos estudiantes tienen alteraciones en dos variables del espermatograma (concentración y movilidad), las cuales resultan ser

importantes a la hora de hablar de calidad espermática. Estos resultados coinciden con los descritos por Barja y Berrios (2003), en el que examinaron 925 espermogramas, reportando con mayor frecuencia la presencia de individuos astenozoospermicos (39,1%) seguido de los oligozoospermicos (14,0%). Aunado a esto, un estudio similar realizado por Mendeluk y Chiavetta (2005), en el que se incluyeron 100 muestras de hombres aparentemente sanos, obtienen un 49% de astenozoospermia y un 17% de oligozoospermia; asimismo, Salabarría *et al.* (2006); reportaron como alteración, más frecuente, la astenozoospermia con un 63,4% y en segundo lugar la oligozoospermia con 21,5%. Esto quiere decir que, la movilidad es una de las principales variables del espermograma alteradas con mayor frecuencia. No obstante, en nuestra región no existen estudios similares realizados en una población joven estudiantil, que permitan comparar los resultados arrojados en la presente investigación.

Tabla 4. Clasificación de la calidad espermática en relación con las alteraciones detectadas en el espermograma de estudiantes de la UDO-Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología, Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.

Alteraciones	Porcentaje (%)
Astenozoospermia	24
Oligozoospermia	11
Oligoastenozoospermia	9
Total	44

La tabla 5 muestra la comparación estadística de las medias para las concentraciones de calcio (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal de estudiantes pertenecientes a la UDO-Sucre, que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología, Departamento de Bioanálisis; de enero a julio de 2008. La concentración media de calcio (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal del grupo estudiado fue de $3,27 \pm 1,31$ y $5,13 \pm 2,01$; respectivamente, resultados que difieren de los descritos por Morisawa *et al.* (1983); Parker y McDaniel (2006); tales autores destacan que los niveles de calcio en suero sanguíneo son más altos que en el plasma seminal. Se encontró una

diferencia estadísticamente muy significativa entre los niveles de calcio ($p < 0,001$) en suero sanguíneo y plasma seminal, que aplicando un análisis de regresión lineal simple (figura 1), se observó una moderada relación positiva ($r = 0,66$) influyendo de forma directa la concentración de calcio (mg/dl) en suero sanguíneo sobre el plasma seminal, es decir, a medida que aumenta los niveles de calcio en suero sanguíneo aumenta en el semen.

Tabla 5. Comparación estadística de las medias para las concentraciones de calcio ionizado (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal de estudiantes de la UDO-Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología, Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.

	N	\bar{X}	S	Vmín.	Vmáx.	Valor p
Suero sanguíneo	100	3,27	1,31	1,00	6,80	0,0000***
Plasma seminal	100	5,13	2,01	2,20	12,60	

\bar{X} : media; S: desviación estándar; Vmín.: valor mínimo; Vmáx: valor máximo; ***: altamente muy significativo ($p < 0,001$)

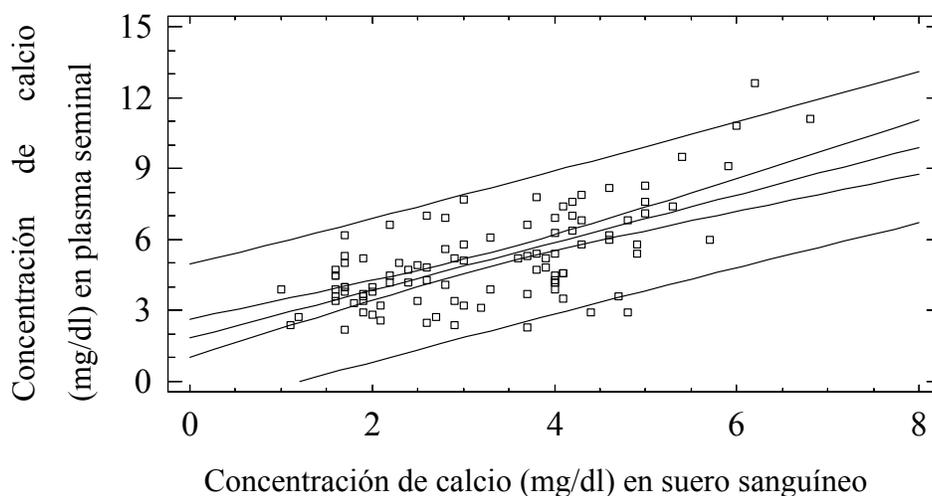


Figura 1. Concentración de calcio ionizado (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal de estudiantes de la UDO-Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.

La tabla 6 muestra la comparación estadística de las medias para las

concentraciones de magnesio (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal de estudiantes pertenecientes a la UDO-Sucre, que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis; de enero a julio de 2008. La concentración de magnesio (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal del grupo estudiado fue de $0,73 \pm 0,21$ y $1,98 \pm 0,95$; respectivamente, tales resultados coinciden con los descritos por Omu *et al.* (2001), dichos autores destacan que los niveles de magnesio son más altos en el semen que en suero sanguíneo. Se encontró una diferencia estadísticamente muy significativa entre los niveles de magnesio ($p < 0,001$), que aplicando un análisis de regresión lineal simple (figura 2), se observó una relación relativa directa ($r = 0,39$), aumentando la concentración de magnesio en el plasma seminal a medida que aumenta en la sangre.

Tabla 6. Comparación estadística de las medias para las concentraciones de magnesio (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal en estudiantes de la UDO-Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología, Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.

	N	\bar{X}	S	Vmín.	Vmáx.	Valor p
Suero sanguíneo	100	0,73	0,21	0,30	1,30	0,0004***
Plasma seminal	100	1,98	0,95	0,90	9,30	

\bar{X} : media; S: desviación estándar; Vmín.: valor mínimo; Vmáx: valor máximo; ***: altamente muy significativo ($p < 0,001$)

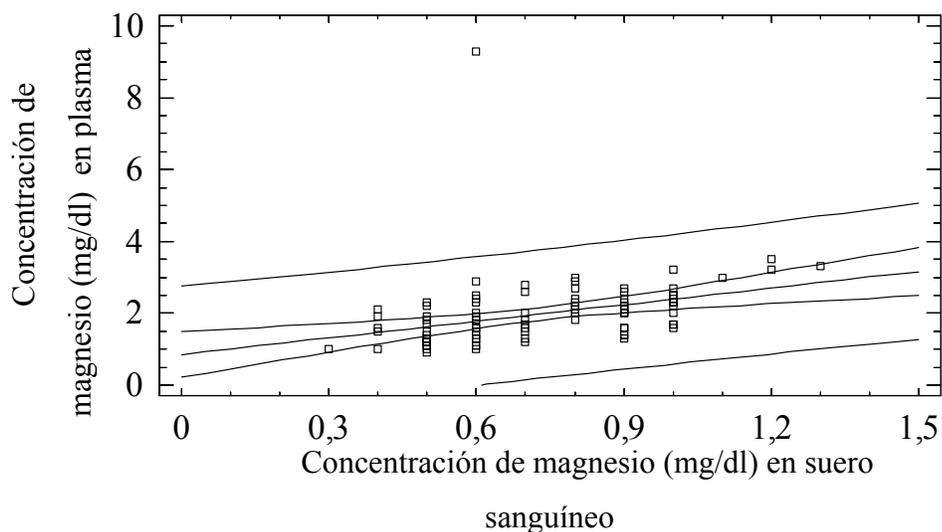


Figura 2. Concentración de magnesio (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal de estudiantes de la UDO-Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.

En las tablas 7 y 8 se resumen la asociación de los niveles de calcio ionizado y magnesio (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal en individuos normozoospermicos, oligozoospermicos, astenozoospermicos y oligoastenozoospermicos que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis, UDO-Sucre; de enero a julio de 2008. Al aplicar el análisis de regresión lineal simple, no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre las concentraciones de calcio ionizado y magnesio (mg/dl) sérico y seminal. Resultados similares son los descritos por Umeyama *et al.* (1986); Abou-Shakra *et al.* (1989); Magnus *et al.* (1990); Wong *et al.* (2001); los cuales no encontraron correlación estadísticamente significativa entre las concentraciones de calcio y magnesio, tanto en suero sanguíneo como en plasma seminal. Si bien el calcio y magnesio desempeñan un papel fundamental en la espermatogénesis, la determinación de estos iones en sangre y semen no discriminan sobre la calidad espermática en este grupo de hombres (Wong *et al.*, 2001). Con respecto a la movilidad tipo “a” y su asociación con los niveles de calcio, los resultados de Arver y Sjöberg (1982); Arver y Sjöberg (1983) resaltan que a niveles bajos de concentraciones de calcio en plasma seminal, los espermatozoides tienen una mejor movilidad rápida y progresiva (tipo “a”) que cuando el nivel de calcio es mayor. Por otra parte, las investigaciones de Prien *et al.* (1990) y Kilic *et al.* (1996) difieren con las observaciones obtenidas, destacando una relación directa y señalando que al aumentar la concentración de calcio mejora la movilidad espermática tipo “a”.

Tabla 7. Asociación de los niveles de calcio ionizado (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal en individuos normozoospermicos, oligozoospermicos, astenoospermicos y oligoastenoospermicos que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis, UDO-Sucre. Enero-julio 2008.

	N	Valores p		Valores r	
		Suero sanguíneo	Plasma seminal	Suero sanguíneo	Plasma seminal
Normozoospermicos	56				
Concentración		0,1391ns	0,7062ns	-0,20	-0,05
Movilidad tipo “a”		0,3523ns	0,6813ns	-0,13	-0,06
Oligozoospermicos	11				
Concentración		0,7851ns	0,6263ns	-0,09	0,16
Astenoospermicos	24				
Movilidad tipo “a”		0,3722ns	0,2800ns	-0,19	-0,23
Oligoastenoospermicos	9				
Concentración		0,6264ns	0,7397ns	0,20	0,14
Movilidad tipo “a”		0,3382ns	0,2885ns	-0,39	-0,43
Total	100				

Análisis de regresión lineal simple. ns: estadísticamente no significativo ($p > 0,05$); r: coeficiente de correlación.

El magnesio está implicado en muchos procesos biológicos aunque su rol en el semen aún no está aclarado (Omu *et al.*, 2001, Botero *et al.*, 2004) y se encuentra en la próstata en muy altas concentraciones siendo liberado en el fluido seminal (Edorh *et al.*, 2003). Umeyama *et al.* (1986); Abou-Shakra *et al.* (1989); Omu *et al.* (2001); concuerdan en que no se encontró correlación estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre la concentración de magnesio (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal en este grupo de individuos; sin embargo, Omu *et al.* (2001) resaltan una asociación en aquellos individuos con eyaculación precoz, por lo que, probablemente, el magnesio en el plasma seminal pudiese estar implicado con el transporte del semen. Por otro lado, Edorh *et al.* (2003) coinciden con los resultados del presente estudio, al no haber encontrado

correlación en individuos normozoospermicos, oligozoospermicos, astenozoospermicos y oligoastenozoospermicos; no obstante, en su población de estudio añadieron hombres con prostatitis crónica, en los cuales el magnesio presente en el semen se redujo significativamente en comparación con los otros grupos, proponiendo así el magnesio como un marcador de la prostatitis.

Tabla 8. Asociación de los niveles de magnesio (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal en individuos normozoospermicos, oligozoospermicos, astenozoospermicos y oligoastenozoospermicos que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis, UDO-Sucre. Enero-julio 2008.

	N	Valores p		Valores r	
		Suero sanguíneo	Plasma seminal	Suero sanguíneo	Plasma seminal
Normozoospermicos	56				
Concentración		0,1110ns	0,9256ns	-0,22	-0,01
Movilidad tipo “a”		0,3063ns	0,5188ns	-0,14	0,09
Oligozoospermicos	11				
Concentración		0,9429ns	0,9108ns	-0,02	0,04
Astenozoospermicos	24				
Movilidad tipo “a”		0,5428ns	0,3979ns	-0,13	-0,18
Oligoastenozoospermicos	9				
Concentración		0,3182ns	0,9169ns	0,41	0,04
Movilidad tipo “a”		0,9506ns	0,3058ns	0,03	-0,42
Total	100				

Análisis de regresión lineal simple. ns: estadísticamente no significativo ($p>0,05$); r: coeficiente de correlación.

El 100% de la población estudiada obtuvo una morfología espermática dentro de los valores de referencia según la OMS (WHO, 1999), con un promedio del 68,42% de espermatozoides morfológicamente normales y 31,58% anormales (figura 3). Aunque este porcentaje de morfología anormal resulta no significativo, es importante destacar

que, las alteraciones morfológicas más frecuentes se presentaron a nivel de la cabeza del espermatozoide con un promedio de 25,49% del total, seguido del flagelo con un 3,73% y por último, la pieza intermedia con un 2,36% (figura 4).

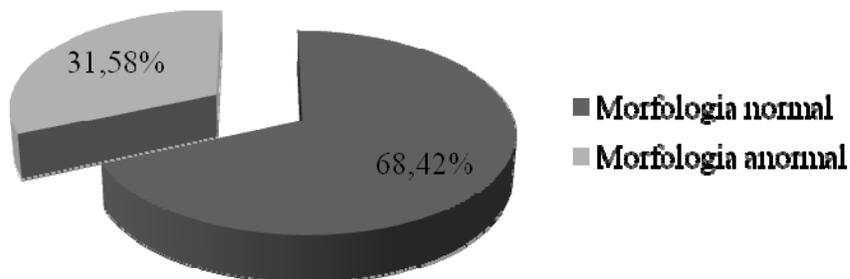


Figura 3. Promedio de morfología espermática de estudiantes de la UDO-Sucre, que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.

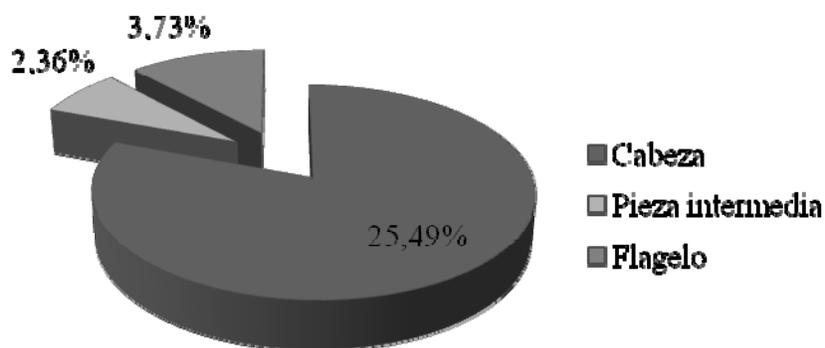


Figura 4. Promedio de las alteraciones morfológicas del espermatozoide en estudiantes de la UDO-Sucre que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología del Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.

En la tabla 9, se resume las diferentes alteraciones morfológicas del espermatozoide encontradas en muestras de semen de estudiantes de la UDO-Sucre, que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología, Departamento de Bioanálisis; de enero a julio de 2008. A nivel de la cabeza predominaron los espermatozoides atilados (figura 5), con 8,48%, cabeza grande (figura 6), con 7,45% y cabeza redonda (figura 7), con 5,48%; a nivel de la pieza intermedia, la presencia de gota citoplasmática (figura 8) prevaleció con un 2,36% y a la altura del flagelo, se encontró un 2,00% de espermatozoides con cola enrollada (figura 9) y 0,85% doble cola (figura 10).

Tabla 9. Alteraciones morfológicas del espermatozoide encontradas en muestras de semen de estudiantes de la UDO-Sucre, que asistieron voluntariamente al laboratorio de histología, Departamento de Bioanálisis. Enero-julio 2008.

Alteraciones morfológicas	Porcentaje (%)
Cabeza	
Grande	7,45
Pequeña	1,19
Piriforme	0,15
Redonda	5,48
Atilados	8,48
Amorfa	1,56
Vacuolada	0,46
Doble cabeza	0,47
Acrosoma reducido	0,25
Pieza intermedia	
Gota citoplasmática	2,36
Cola	
Enrollada	2,00
Horquillada	0,70
Doble cola	0,85
Inserción cola asimétrica	0,18
Total	31,58

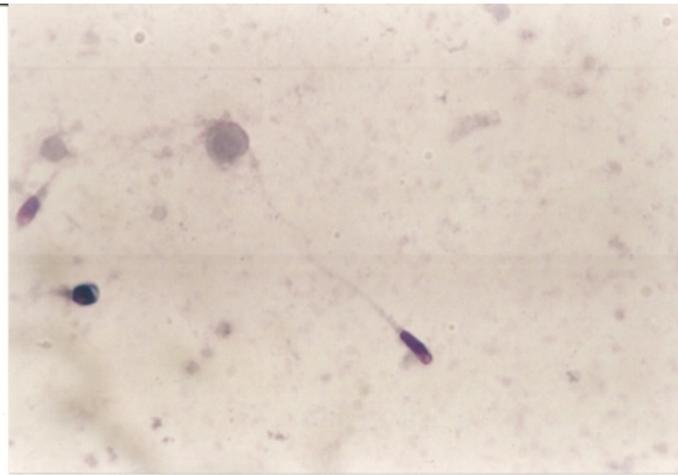


Figura 5. Espermatozoide atilado observado por microscopía óptica con objetivo de 100X (coloración de Giemsa).

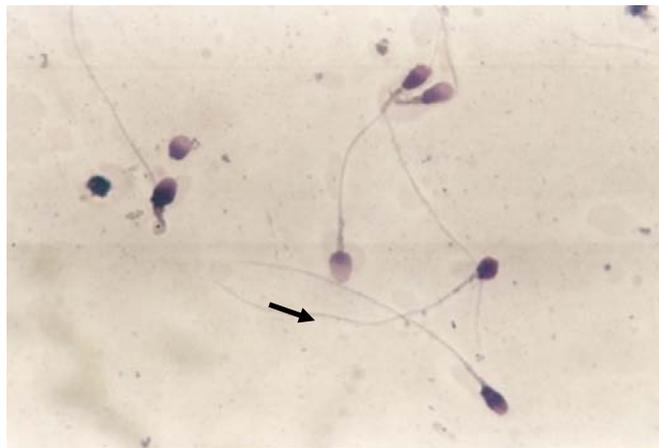


Figura 6. Espermatozoide con cabeza grande observado por microscopía óptica con objetivo de 100X (coloración de Giemsa).

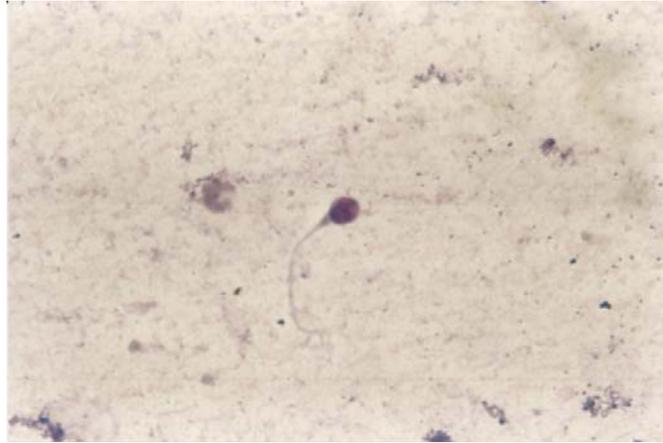


Figura 7. Espermatozoide con cabeza redonda observado por microscopía óptica con objetivo de 100X (coloración de Giemsa).

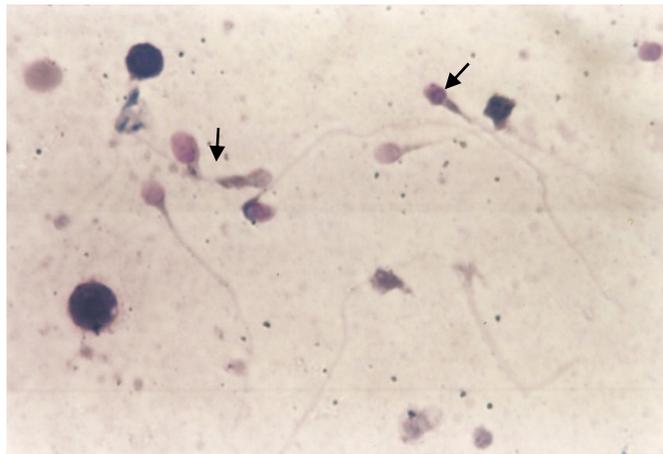


Figura 8. Espermatozoide con gota citoplasmática observado por microscopía óptica con objetivo de 100X (coloración de Giemsa).

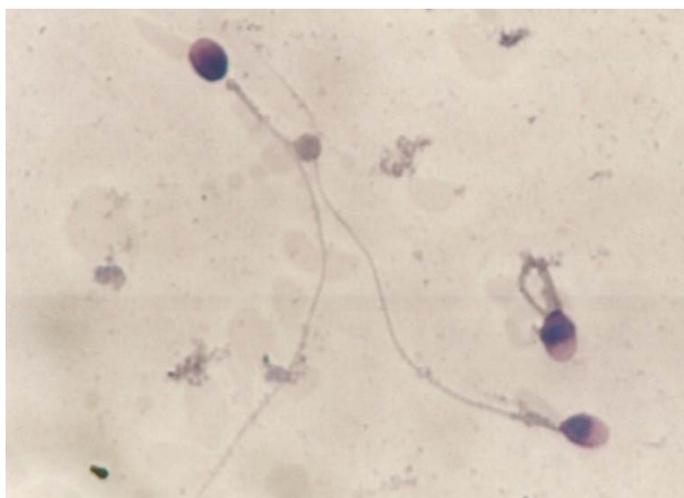


Figura 9. Espermatozoide con cola enrollada observado por microscopía óptica con objetivo de 100X (coloración de Giemsa).

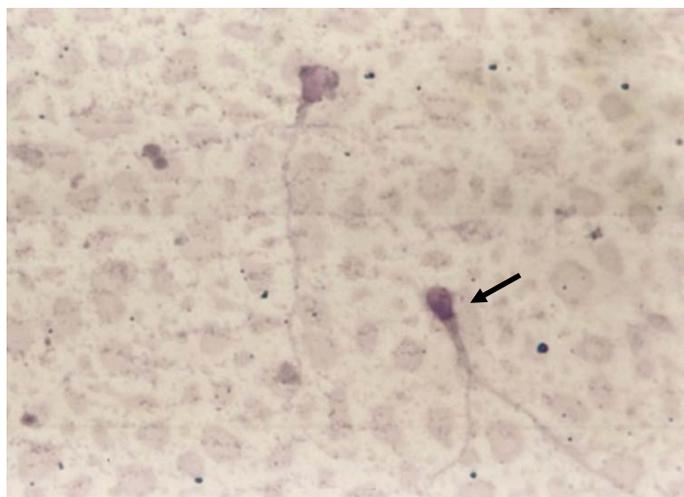


Figura 10. Espermatozoide con doble cola observado por microscopía óptica con objetivo de 100X (coloración de Giemsa).

En la tabla 10, se resume la asociación entre las anomalías morfológicas del espermatozoide con los niveles de calcio y magnesio en suero sanguíneo y plasma seminal, cuyos resultados coinciden con los descritos por Colleen *et al.* (1975) y Wong *et al.* (2001); los cuales no encuentran correlación estadísticamente significativa, con la presencia de las distintas alteraciones morfológicas del espermatozoide y las concentraciones de calcio y magnesio.

Tabla 10. Asociación entre las anomalías morfológicas del espermatozoide con los niveles de calcio ionizado y magnesio en suero sanguíneo y plasma seminal (valores p).

Morfología espermática	Calcio	Calcio	Magnesio	Magnesio
	en suero sanguíneo	en plasma seminal	en suero sanguíneo	en plasma seminal
Cabeza grande	0,3455ns	0,1861ns	0,4692ns	0,7125ns
Cabeza pequeña	0,1208ns	0,1389ns	0,3668ns	0,8776ns
Cabeza redonda	0,5979ns	0,9964ns	0,8830ns	0,3352ns
Cabeza piriforme	0,2003ns	0,1242ns	0,5578ns	0,2398ns
Atilados	0,9518ns	0,8304ns	0,9614ns	0,6108ns
Cabeza amorfa	0,0536ns	0,6961ns	0,9297ns	0,5948ns
Cabeza vacuolada	0,5737ns	0,9830ns	0,3511ns	0,6497ns
Doble cabeza	0,7265ns	0,4136ns	0,9075ns	0,9662ns
Acrosoma reducido	0,7457ns	0,6120ns	0,8019ns	0,8744ns
Gota citoplasmática	0,2266ns	0,3451ns	0,0796ns	0,7318ns
Cola enrollada	0,2419ns	0,2077ns	0,6774ns	0,9011ns
Cola horquillada	0,4559ns	0,1563ns	0,0621ns	0,5701ns
Doble cola	0,9317ns	0,8553ns	0,4816ns	0,7419ns
Inserción cola asimétrica	0,8734ns	0,4737ns	0,1085ns	0,9794ns

Análisis de múltiples variables: ns: estadísticamente no significativo ($p > 0,05$)

Aplicando el estudio morfológico del espermatozoide por microscopía electrónica de barrido, en la figura 11 se observa un espermatozoide morfológicamente normal, en el cual se visualizan las partes del espermatozoide: la cabeza constituida por el núcleo y acrosoma; pieza intermedia (PI), que es el segmento de la cola en donde se localizan las mitocondrias y finalmente la pieza principal (PP) que se va estrechando gradualmente a medida que se aproxima a la pieza terminal (PT).

En cuanto a las alteraciones morfológicas del espermatozoide a nivel de la cabeza, se observaron espermatozoides con cabeza grande (figura 12), que según Bonet y Briz (1991); Briz *et al.* (1996), coinciden que el origen de estas malformaciones es de tipo

primario, es decir de origen testicular, sin embargo no están bien aclaradas sus causas. En la figura 13 se observa un espermatozoide con cabeza alargada (atilado), el cual posee la forma de un elipse en la que existe un marcado predominio del eje longitudinal sobre el eje transversal. Por otra parte, la figura 14 muestra un espermatozoide con cabeza amorfa.

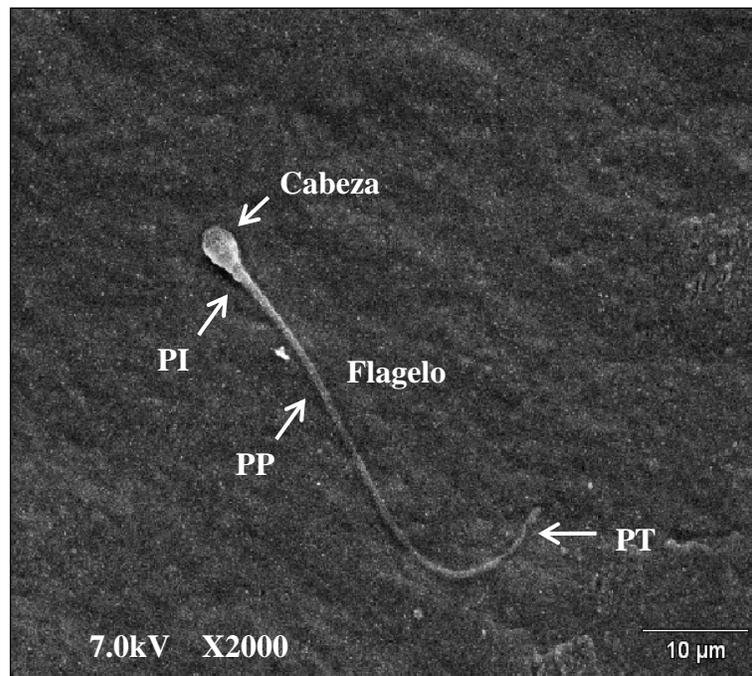


Figura 11. Espermatozoide morfológicamente normal observado por microscopía electrónica de barrido.



Figura 12. Espermatozoide con cabeza grande observado por microscopía electrónica de barrido.

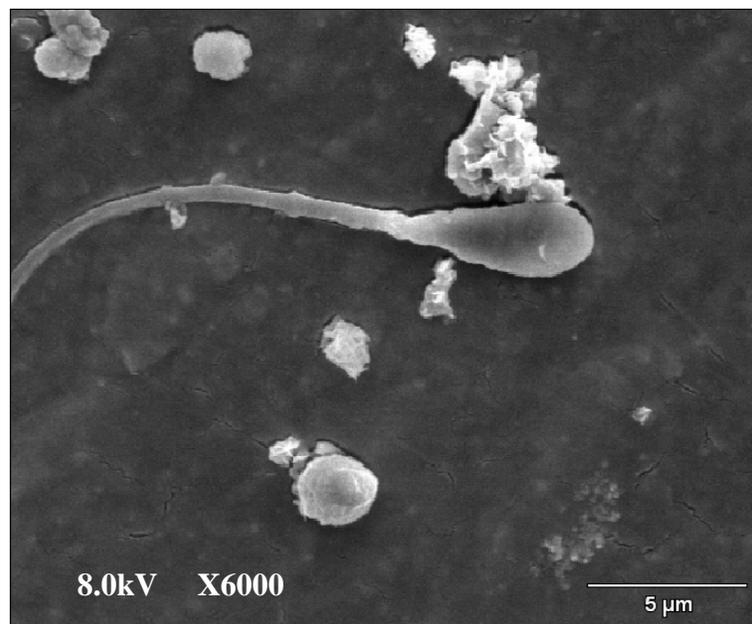


Figura 13. Espermatozoide con cabeza alargada observado por microscopía electrónica de barrido.



Figura 14. Espermatozoide con cabeza amorfa observado por microscopía electrónica de barrido.

A nivel de la pieza intermedia, se observaron espermatozoides con presencia de gota citoplasmática (figura 15) y piezas intermedias engrosadas (figura 16), que según Gadea *et al.* (2001) se corresponden con 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. Además, se encontraron espermatozoides con implantación anómala del flagelo (figura 17), en el que se observa una estrangulación a nivel de la pieza intermedia que se une a la fosa de implantación, formando un ángulo de 45-90° con respecto al eje longitudinal de la cabeza (Gómez *et al.*, 2005).



Figura 15. Espermatozoide con presencia de gota citoplasmática observada por microscopía electrónica de barrido.

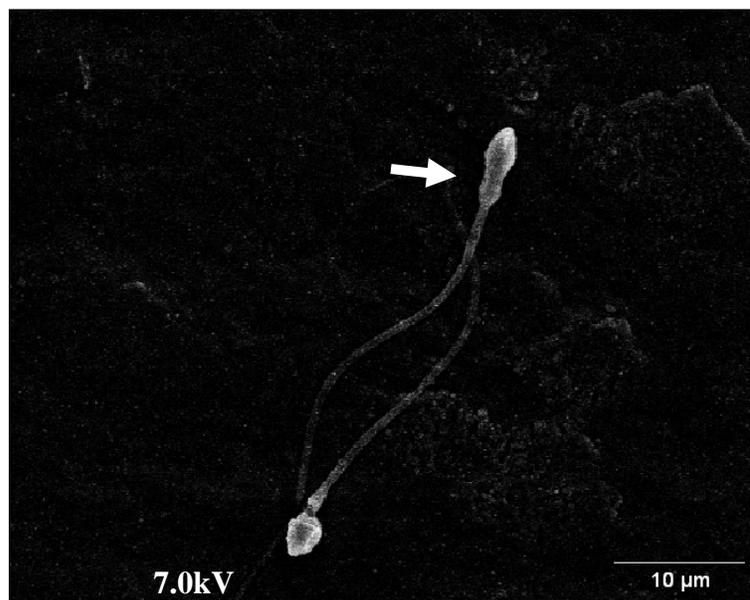


Figura 16. Espermatozoide con pieza intermedia engrosada observada por microscopía electrónica de barrido.



Figura 17. Espermatozoide con implantación axial de la pieza intermedia observado por microscopía electrónica de barrido.

En la figura 18, existe un enrollamiento total del flagelo del espermatozoide; mientras que, en la figura 19 se observa un espermatozoide con enrollamiento parcial de la cola, afectando el extremo final. Asimismo, están los espermatozoides con el flagelo enrollado sobre sí mismo (figura 20). Estas alteraciones tienen su origen en el tránsito por el epidídimo y la frecuencia de aparición suelen ser reducida (Holt, 1982).

Cabe destacar que, la aplicación de la microscopía electrónica de barrido ha permitido la observación múltiples alteraciones morfológicas en un mismo espermatozoide, hecho que no sucedió con el uso de la microscopía óptica. Esto debido a que, la microscopía electrónica de barrido provee una información detallada acerca de la morfología e integridad del espermatozoide, siendo examinado a un nivel de magnificación elevado y con mayor poder de resolución que mediante el uso de la microscopía óptica.

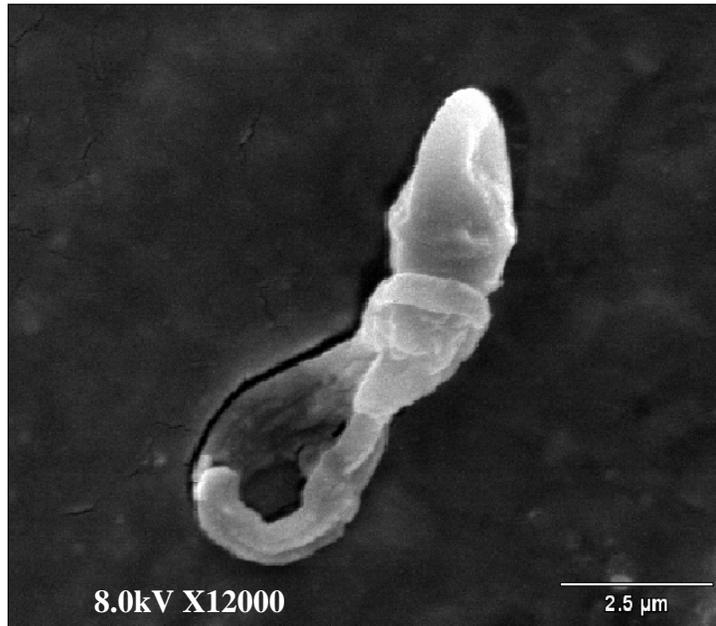


Figura 18. Espermatozoide con enrollamiento total del flagelo observado por microscopía electrónica de barrido.

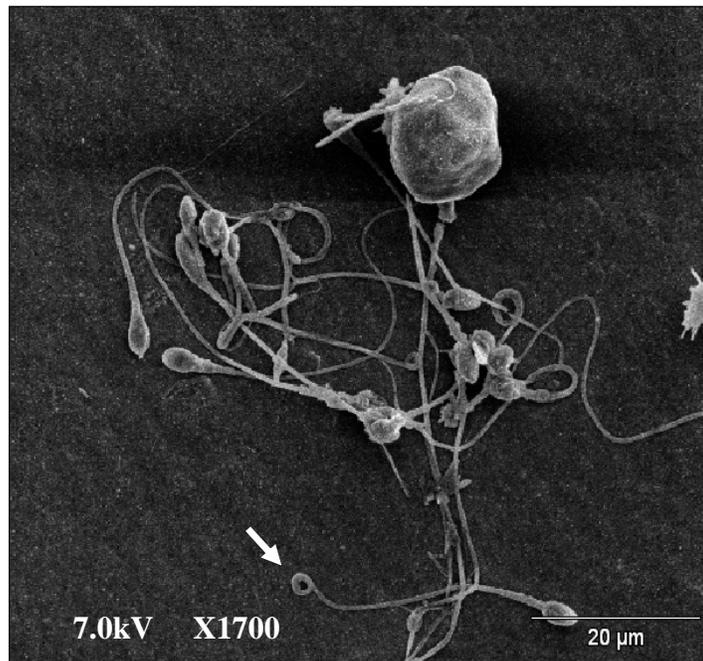


Figura 19. Espermatozoide con enrollamiento a nivel del extremo distal del flagelo observado por microscopía electrónica de barrido.



Figura 20. Espermatozoide con el flagelo enrollado sobre sí mismo observado por microscopía electrónica de barrido.

En la figura 21 se observa un espermatozoide con tres alteraciones morfológicas simultáneas, cabeza alargada, restos de gota citoplasmática a nivel de la pieza intermedia y flagelo enrollado sobre sí mismo. Por otro lado, la figura 22 muestra un espermatozoide con la cabeza alargada y presencia de restos de gota citoplasmática.

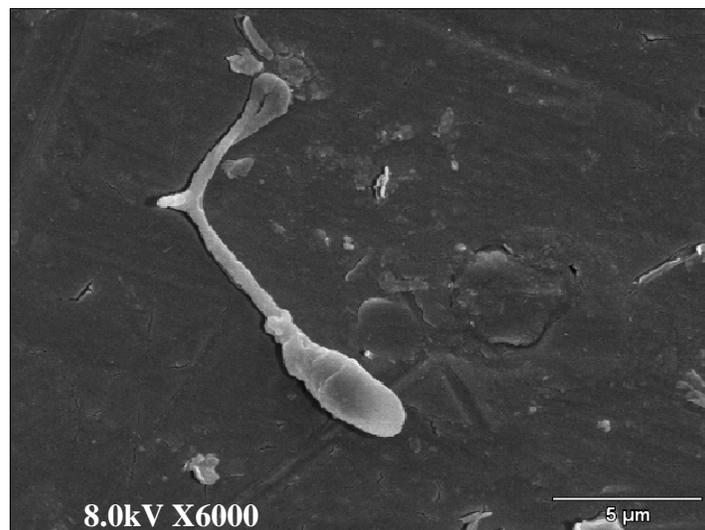


Figura 21. Espermatozoide con cabeza alargada, restos de gota citoplasmática y flagelo enrollado sobre sí mismo observado por microscopía electrónica de barrido.



Figura 22. Espermatozoide cabeza alargada y restos de gota citoplasmática observado por microscopía electrónica de barrido.

En la figura 23 se aprecia un espermatozoide con la pieza intermedia engrosada y alargada; y en la figura 24 se observa un espermatozoide con doble cabeza y un flagelo, en el que se distingue la pieza intermedia engrosada. Además, en la figura 25 se señala un espermatozoide con cabeza redonda y pieza intermedia engrosada y alargada.



Figura 23. Espermatozoide con la pieza intermedia engrosada y alargada observado por microscopía electrónica de barrido.



Figura 24. Espermatozoide doble cabeza y pieza intermedia engrosada observado por microscopía electrónica de barrido.



Figura 25. Espermatozoide con cabeza redonda y pieza intermedia engrosada y alargada observado por microscopía electrónica de barrido.

CONCLUSIONES

Un alto porcentaje de los estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, presentaron alteraciones en el espermatograma definidos por astenozoospermia, oligozoospermia y oligoastenozoospermia, indicando una baja calidad espermática en este grupo de jóvenes.

No se encontró correlación entre las concentraciones de calcio ionizado y magnesio (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal, en los individuos normozoospermicos, oligozoospermicos, astenozoospermicos y oligoastenozoospermicos.

No hubo correlación entre las anormalidades morfológicas del espermatozoide y los niveles de calcio ionizado y magnesio (mg/dl) en suero sanguíneo y plasma seminal.

El estudio por MEB permitió la observación morfológica de los espermatozoides a un nivel de magnificación elevado y con mayor poder de resolución que la microscopía óptica, pudiéndose incluir como un estudio opcional, confirmatorio, para aquellos pacientes los cuales se sospecha como causa de infertilidad masculina un alto porcentaje de espermatozoides anormales (teratozoospermia).

El hecho de encontrar alteraciones en el análisis seminal no significa haber encontrado la causa de infertilidad. Pueden ser necesarios otros estudios complementarios que ayuden a un enfoque diagnóstico correcto en cada caso (bacteriológico, inmunológico, del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, histopatológico y citogenético).

RECOMENDACIONES

Proseguir con la realización de trabajos que permitan establecer valores de referencia para los electrolitos calcio y magnesio en plasma seminal.

Incluir la determinación de los niveles de cloro, sodio y potasio tanto en suero sanguíneo como en plasma seminal.

Realizar Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), para el estudio ultraestructural del espermatozoide, con el fin de determinar una posible alteración en algún segmento de éste.

BIBLIOGRAFÍA

Abou-Shakra, F.; Ward, N. y Everard, D. 1989. The role of trace elements in male infertility. *Fertil. Steril.*, 52 (2): 307-310.

Alavi, S.; Rodina, M.; Policar, T.; Kozak, P.; Psenicka, M. y Linhart, O. 2007. Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. *Theriogenology*, 68 (2): 276-283.

Álvarez, C. 2003. Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del Sperm Class Analyzer. Tesis doctoral. Departamento de Biología Funcional y Antropología Física, Universidad De Valencia, España.

Álvarez, C.; Castilla, J.; Martínez, L.; Ramírez, J.; Vergara, F. y Gaforio, J. 2003. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum. Reprod.*, 18 (10): 2082-2088.

Andersen, A.; Jensen, T.; Carlsen, E.; Jorgensen, N.; Andersson A.; Krarup, T.; N Keiding, N. y Skakkebaek, N. 2000. High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Hum. Reprod.*, 15 (2): 366-372.

Anderson, S. y Cockaine, S. 1995. *Química clínica*. Interamericana McGraw-Hill. México, D.F.

Arver, S. y Sjöberg, H. 1982. Calcium fractions in seminal plasma and functional properties of human spermatozoa. *Acta Physiol. Scand.*, 116 (2): 159-165.

Arver, S. y Sjöberg, H. 1983. Ionized calcium in human seminal plasma. *Scand. J. Clín. Lab. Invest. Suppl.*, 165: 123-126.

Barja, L. y Berrios, L. 2003. Alteraciones de espermograma 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.

Bernard, J. 1988. *Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio*. Tomo I. Octava edición. Editorial Salvat. Barcelona. España.

Boada, A.; De Stefano, H.; González, B.; Soto, H.; Godoy, S. y Bretaña, A. 1999.

Microscopía electrónica de barrido de las alteraciones presentes en los espermatozoides de toros mestizos siboney. *FCV-LUZ*, 9 (3): 235-242.

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

Boss, C. y Fredeen, K. 1997. *Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*. Segunda edición. The Perkin-Elmer Corporation. USA.

Botero, J.; Jubiz, A. y Henao, G. 2004. *Obstetricia y ginecología*. Séptima edición. Corporación para Investigaciones Biológicas.

Brake, A. y Krause, W. 1992. Decreasing quality of semen. *BMJ*, 305:1498-1949.

Brugo, S.; Chilik, C. y Kopelman, S. 2003. Definición y causas de infertilidad. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.*, 54: 227-248.

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

Carlsen, E.; Giwercman, A.; Keiding, N. y Skakkebaek, N. 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*, 305: 609-612.

Colleen, S.; Mardh, P. y Schytz, A. 1975. Magnesium and zinc in seminal fluid of healthy males and patients with non-acute prostatitis with and without gonorrhoea. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 9 (3): 192-197.

De Abajo, F. 2001. La declaración de Helsinki VI. *Rev. Esp. Salud Pública.*, 75: 407-420

Edorh, A.; Tachev, K.; Hadou, T.; Gbeassor, M.; Sanni, A.; Creppy, E.; Le Faou, A. y Rihn, B. 2003. Magnesium content in seminal fluid as an indicator of chronic prostatitis. *Cell. Mol. Biol.*, 49: 419-423.

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.

Gómez, M.; Girela, J.; Fernández, P. y Romeo, 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.

Grosso, G. 2001. Correlación entre las concentraciones de Mg, Cr, Cu, Zn y Se con la

actividad de la enzima glutatona peroxidasa, en jóvenes diabéticos. Trabajo de Pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Gunalp, S.; Onculoglu, C.; Gurgan, T.; Kruger, T. y Lombard, C. 2001. A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds. *Hum. Reprod.*, 16 (1): 110-114.

Hernández, I.; 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 northern Mexico. *Reprod. Toxicol.*, 20 (2): 221-228.

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

Jurado, S.; Sarmiento, P. y Stornelli, A. 2008. La microscopía electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino. *Analecta Veterinaria*, 28 (1): 7-14.

Kilic, S.; Sarica, K.; Yaman, O.; Soygür, T.; Göğüs, O. y Yaman, L. 1996. Effect of total and ionized calcium levels of seminal fluid on sperm motility. *Urol. Int.*, 56 (4): 215-218.

Kruger, T.; Acosta, A.; Simmons, K.; Swanson, R.; Matta, J. y Veeck, L. 1987. New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human *in vitro* fertilization. *Urology*, 30: 248-252.

Macomber, D y Sanders, M. 1929. The spermatozoa count: Its value in the diagnosis, prognosis, and treatment of sterility. *N. Engl. J. Med.*, 200 (19): 981-984.

McLeod, J. y Gold, R. 1951. The male factor in fertility and infertility. II. Spermatozoon counts in 1000 men of known fertility and in 1000 cases of infertile marriage. *J. Urol.* 66 (3): 436-449.

Magnus, O.; Abyholm, T.; Kofstad, J. y Purvis, K. 1990. Ionized calcium in human male and female reproductive fluids: relationships to sperm motility. *Hum. Reprod.*, 5 (1): 94-98.

Mendeluk, G. y Chiavetta, L. 2005. Estudio básico de semen en el Hospital J. M. Ramos Mejía. Reporte de cien casos. *Rev. Hosp. J. M. Ramos Mejía*, 10 (2): 1-3.

Meza, R. 2004. Valoración de fructosa en líquido seminal de individuos oligozoospermicos y normozoospermicos. Trabajo de Pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Morisawa, M.; Susuki, K. y Morisawa, S. 1983. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. *J. Exp. Biol.* 107, 105-113.

Nixon, D.; Moyer, T. y Burrit, M. 1999. The determination of selenium in serum and urine by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim. Acta*, 54: 931-942.

Okamura, N.; Tarima, Y.; Soejima, A.; Masuma, H. y Sugita, Y. 1985. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.*, 260: 9699-9705.

Olivera, M.; Ruiz, T.; Tarazona, A. y Giraldo, C. 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 19 (4): 426-436.

Omu, A.; Al-Bader, A.; Dashti, H. y Oriowo, M. 2001. Magnesium in human semen: posible role in premature ejaculation. *Arch. Androl.*, 46 (1): 59-66.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 1987. *Manual de laboratorio de la Organización Mundial de la Salud para el semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2000. *Bioética*. Principios éticos para los investigadores en seres humanos. Publicación científica. OPS-OMS.

Padrón, R.; Fernández, G. y Gallardo, M. 1998. Interpretación del análisis seminal. *Rev. Cubana Endocrinol.*, 9 (1): 81-90.

Padrón, R.; Pérez, M.; Mas, J. y Curbelo, K. 1992. Relación entre volumen eyaculado aumentado, sepsis seminal e infertilidad masculina. *Rev. Latinoam. Esteril. Fertil.*, 6: 92-95.

Pagana, K. y Pagana, T. 2001. *Guía de pruebas diagnósticas y de laboratorio*. Ediciones Elsevier. Quinta edición. España.

Parker, H. y McDaniel, C. 2006. The immediate impact of semen diluent and rate of dilution on the sperm quality index, ATP utilization, gas exchange, and ionic balance of broiler breeder sperm. *Poult. Sci.*, 85: 106-116

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

Prien, S.; Lox, C.; Messer, R. y De Leon, F. 1990. Seminal concentrations of total and ionized calcium from men with normal and decreased motility. *Fertil. Steril.*, 54 (1): 171-172.

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.

Remohi, J.; Romero, J.; Pellicer, A.; Simón, C. y Navarro, J. 2000. *Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana*. Interamericana McGraw Hill, España.

Ren, D.; Navarro, B.; Pérez, G.; Jackson, A.; Hsu, S.; Shi, Q.; Tilly, J. y Clapham, D. 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male infertility. *Nature*, 413: 603-609.

Salabarría, M.; Aganza, O.; Guzmán, A.; Ortiz, A. y De la torre, A. 2006. La infección y su interacción en la reproducción. *Rev. Int. Androl.*, 4 (3): 98-135.

Seibel, M. y Zilberstein, M. 1995. The diagnosis of male infertility by semen quality. *Hum. Reprod.*, 63 (6): 1293-1300.

Skoog, D. y Leary, J. 1994. *Análisis instrumental*. 4ª Edición. McGraw-Hill Interamericana, México.

Sokal, R. y Rohlf, J. 1979. *Biometría, principios y métodos estadísticos de la investigación biológica*. Editorial H. Blume. España.

Strasinger, S. 1991. *Líquidos corporales y análisis de orina*. El Manual Moderno S. A. de C.V., México.

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

Umeyama, T.; Ishikawa, H.; Yoshii, S. y Koiso, K. 1986. A comparative study of seminal trace elements in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.*, 46 (3): 494-499.

Valverde, J. 2002. Factores predictores de embarazo en inseminación intrauterina. Tesis doctoral. Departamento de Obstetricia y Ginecología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Vásquez, J. 2003. Características del espermograma y determinación de los niveles séricos de gonadotrofinas al inicio de la espermatogénesis humana en una población de adolescentes de la ciudad de Barranquilla, Colombia 1999-2000. Tesis doctoral. Departamento de Biología Celular y Fisiología. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.

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

Vega, A.; Treviño, C. y Félix, R. 2002. Canales iónicos y su papel funcional en el espermatozoide. *Avance y perspectiva*, 21: 89-95.

Vine, M.; Margolin, B.; Morrison, H. y Hulka, B. 1994. Cigarette smoking and sperm density: a meta-analysis. *Fertil. Steril.*, 61: 35-43.

Weisman, A. 1943. Spermatozoal counts in fertile males. *Urol. Cutan. Rev.*, 47: 166-168.

Wong, W.; Flik, G.; Groenen, P.; Swinkels, D.; Thomas, C.; Copius-Peereboom, J.; Merkus, H. y Steegers-Theunissen, R. 2001. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod. Toxicol.*, 15 (2): 131-136.

World Health Organization. 1999. *Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*. Fourth edition. Cambridge University Press, Cambridge.

Zamboni, L. 1987. The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertil. Steril.*, 48:711-734.

Zhang, Z.; Shimba, S.; Ochi, N.; Eguchi, T.; Moon, C. y Lkedo, M. 1997. Determination of lead and cadmium in food and blood by inductively coupled plasma spectrometry: A comparison with graphite furnace atomic spectrometry. **Sci. Total Environ.**, 205: 179-187.

APÉNDICES Y ANEXOS

APÉNDICE 1

Fecha: _____

Muestra N° _____

1) Datos personales

- 1.a) Nombres y Apellidos: _____
1.b) Edad: _____ 1.c) Días de abstinencia: _____ 1.d) Hora de recolección: _____
1.e) Ocupación: _____
1.f) Dirección permanente: _____
1.g) Dirección actual: _____

2) Datos Clínicos:

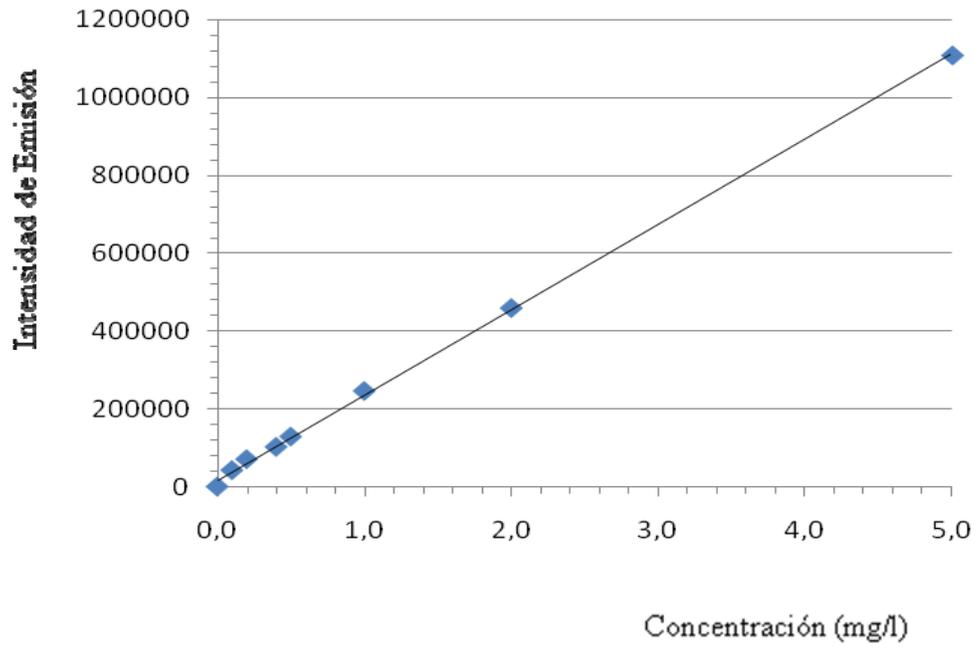
- 2.a) ¿Presenta antecedentes familiares de infertilidad? Sí _____ No _____
2.b) ¿Ha presentado enfermedades de transmisión sexual? Sí _____ No _____
De ser “Sí” su respuesta, señale cuál de ellas:
Sífilis _____ Gonorrea _____ Candidiasis _____ Clamidia _____
Chancro _____ Otra(s): _____
- 2.c) ¿Presenta varicocele? Sí _____ No _____
- 2.d) ¿Ha sido operado? Sí _____ No _____
De ser “Sí” su respuesta, señale cuál de ellas e indique fecha (al menos el año):
Varicocele _____ Vasectomía _____ Otra(s): _____
- 2.e) ¿Presenta algún trastorno endocrino? Sí _____ No _____
De ser “Sí” su respuesta, señale cuál de ellas:
Hipopituitarismo _____ Hipertiroidismo _____ Hipotiroidismo _____
Diabetes _____ Otra(s): _____
- 2.f) ¿Actualmente está bajo tratamiento médico? Sí _____ No _____
De ser “Sí”, especifique: _____
- 2.g) ¿Usted fuma? Sí _____ No _____
- 2.h) ¿Consume bebidas alcohólicas? Sí _____ No _____
- 2.i) ¿Condiciones de estrés? Poco _____ Frecuente _____ Siempre _____

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

Firma del paciente

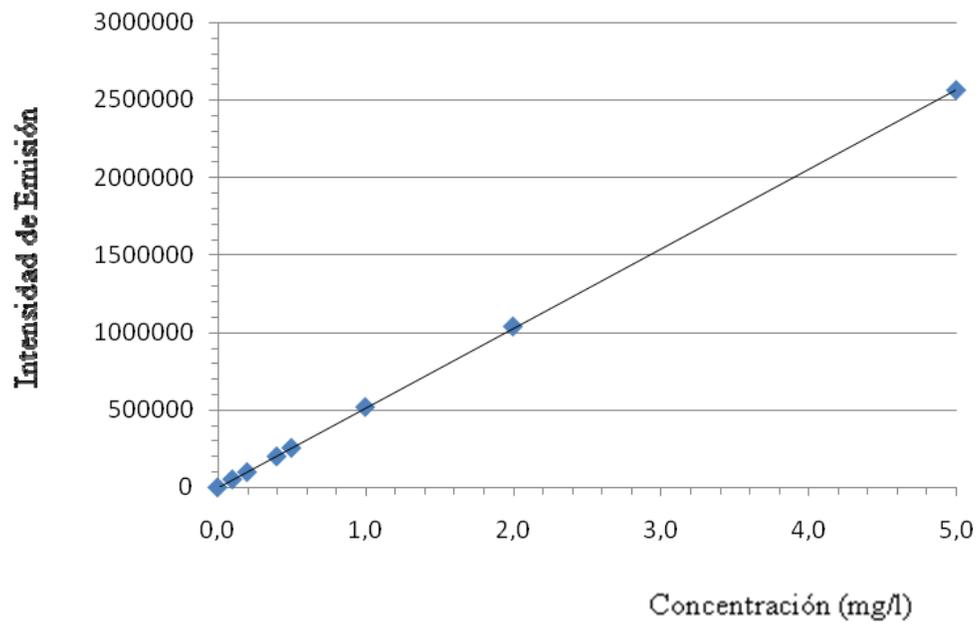
APÉNDICE 2

Curva de calibración de calcio.



APÉNDICE 3

Curva de calibración de magnesio.



ANEXO 1

Factores de corrección para hemocitometría.

Dilución (μ l) Semen+diluyente	Número de cuadrados grandes contados		
		25	10
1+9	10	4	2
1+19	5	2	1
1+49	2	0,8	0,4

HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	Calidad espermática, composición química del plasma seminal y morfología del espermatozoide en un grupo de estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Chelhod B. MARIELA	CVLAC	17 762 914
	e-mail	mariela_chelhod@hotmail.com
	e-mail	mariela.chelhod@gmail.com
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Espermatograma, líquido seminal, infertilidad masculina, microscopía electrónica de barrido, calcio en plasma seminal y suero sanguíneo, magnesio en plasma seminal y suero sanguíneo.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

Se evaluó la calidad espermática, composición química del plasma seminal y morfología del espermatozoide, en un grupo de 100 estudiantes de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, en el periodo comprendido entre los meses de enero a julio de 2008. A cada participante se le tomó muestra de sangre, por punción venosa, y se recolectó muestra de líquido seminal, las cuales fueron procesadas según los criterios y parámetros establecidos por la OMS. Las concentraciones de calcio y magnesio fueron medidas mediante el método de espectrometría de emisión óptica en plasma inductivamente acoplado. La concentración promedio de calcio ionizado y magnesio en suero sanguíneo fueron de 8,17 mg/dl y 0,73 mg/dl, respectivamente, y en plasma seminal fue de 12,84 mg/dl para el calcio y 1,98 mg/dl para el magnesio. La calidad espermática se encontró alterada en un 44% de los estudiantes, siendo clasificados como astenozoospermicos (24%), oligozoospermicos (11%) y oligoastenozoospermicos (9%). No se halló asociación estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre los niveles de calcio y magnesio y las anomalías morfológicas del espermatozoide, respectivamente. El estudio por microscopía electrónica de barrido permitió la observación morfológica de los espermatozoides a un mayor nivel de magnificación y poder de resolución que la microscopía óptica, pudiéndose incluir la microscopía electrónica como un estudio opcional, confirmatorio, para aquellos pacientes en los cuales se sospecha, como causa de infertilidad masculina, un elevado porcentaje de espermatozoides alterados morfológicamente (teratozoospermia).

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Aníbal Lobo	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	2 627 040
	e-mail	palobol@cantv.net
	e-mail	
Evelin Flores	ROL	CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	11 825 759
	e-mail	eveflores@cantv.net
	e-mail	
Gilda Millán	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	4 692 369
	e-mail	gildamg@gmail.com
	e-mail	
Patricia Cruces	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	12 664 848
	e-mail	pycruces@hotmail.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2009	06	2009
------	----	------

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS_MCBc	Aplication/Word

Alcance:

Espacial : _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciatura en Bioanálisi

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

Área de Estudio: Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

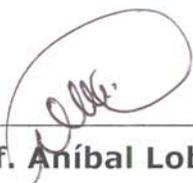
Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

Los autores garantizamos en forma permanente a la Universidad de Oriente el derecho de difundir por cualquier medio el resumen de este trabajo de investigación. Los autores nos reservamos los derechos de propiedad intelectual así como todos los derechos que pudieran derivarse de patentes industriales y comerciales.



Mariela Chelhod Beilouni



Prof. Aníbal Lobo



Profa. Evelin Flores



Profa. Gilda Millán



Lcda. Patricia Cruces

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:

