

Evaluación del recolector de orina en la toma de muestra de líquido seminal y tinción diferencial de fluorescencia en espermatozoides

 Evelin Margarita Flores Fernández,¹  Jhoanna Mariet Bastardo Rosales,¹
 Luzmila Sofía Albarado Ysasis,¹  Plubio Aníbal Lobo Lobo.²

RESUMEN

Objetivo: Verificar que los recolectores de orina no son tóxicos para los espermatozoides.

Métodos: Se evaluó la toxicidad de recipientes de material de vidrio (control) y plástico (recolector de orina) con muestras de semen de buena concentración y movilidad de espermatozoides, mediante el estudio de la movilidad espermática a intervalos de 1 hora, a temperatura ambiente, durante 4 horas, siguiendo lineamientos de la quinta edición del Manual de la Organización Mundial de la Salud para el procesamiento de muestras de semen. Se comparó la movilidad progresiva entre ambos tipos de recipientes (vidrio y plástico) y se evaluaron las características morfológicas de los espermatozoides con la tinción diferencial de fluorescencia modificada.

Resultados: No se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,334$) entre los grupos. Los espermatozoides que emitieron una fluorescencia verde, se categorizaron como normales y presentaron una fuerte correlación ($r = 1,000$; $p = 0,000$); mientras que, las tinciones amarilla ($r = -0,838$, $p = 0,009$) y anaranjada ($r = 0,940$, $p = 0,000$), estuvieron altamente correlacionadas con anomalías de los espermatozoides, destacándose que la fluorescencia anaranjada, tuvo una alta correlación ($r = 0,940$, $p = 0,000$) con anomalías de la cabeza.

Conclusión: El recolector de plástico no tiene efectos tóxicos sobre los espermatozoides, satisface las necesidades de recogida de la muestra de semen. Con la tinción diferencial de fluorescencia modificada, la tinción verde se asocia a espermatozoides morfológicamente normales y las amarilla y anaranjada se asocian a anomalías de la cabeza, pieza intermedia y pieza principal de los espermatozoides.

Palabras clave: Espermatozoides, Toxicidad, Movilidad, Recolector, Semen, Fluorescencia, tinción, Morfológicas, Anomalías, Cromatina.

Evaluation of the urine collector in the collection of the seminal fluid sample and differential fluorescent staining method in sperm.

SUMMARY

Objective: To verify that urine collectors are not toxic to sperm.

Methods: The toxicity of glass (control) and plastic (urine collector) containers with semen samples of good concentration and sperm motility was evaluated by studying sperm motility at intervals of 1 hour, at room temperature, for 4 hours, following guidelines of the fifth edition of the World Health Organization Manual for the processing of semen samples. The progressive motility between both types of containers (glass and plastic) was compared and the morphotintorial characteristics of the spermatozoa were evaluated with the modified fluorescence differential stain.

Results: No statistically significant differences ($p = 0.334$) were found between the groups. Spermatozoa that emitted a green fluorescence were categorized as normal and presented a strong correlation ($r = 1.000$; $p = 0.000$); Whereas, yellow ($r = -0.838$, $p = 0.009$) and orange ($r = 0.940$, $p = 0.000$) stains were highly correlated with sperm abnormalities, highlighting that orange fluorescence had a high correlation ($r = 0.940$, $p = 0.000$) with head abnormalities.

Conclusion: The plastic collector has no toxic effects on sperm, it satisfies the needs of collection of the semen sample. With modified fluorescence differential staining, green staining is associated with morphologically normal spermatozoa and yellow and orange stains are associated with abnormalities of the head, middle piece, and main piece of sperm.

Keywords: Spermatozoa, Toxicity, Motility, Collector, Semen, Fluorescence, Staining, Morphostaining, Abnormalities, Chromatin.

INTRODUCCIÓN

Se estima que entre el 8 % al 12 % de las parejas a nivel mundial son infértiles (1), la infertilidad es una enfermedad del aparato reproductor y se define como

¹Licenciada en Bioanálisis. ²Dr. en Ginecología y Obstetricia. Laboratorio de Histología, Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumana, Venezuela. Financiado por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente bajo el código de proyecto N° CI-02-040100-1947-15. Correo de correspondencia: emflorfer@gmail.com

Forma de citar este artículo: Flores Fernández EM, Bastardo Rosales JM, Albarado Ysasis LS, Lobo Lobo PA. Evaluación del recolector de orina en la toma de muestra de líquido seminal y tinción diferencial de fluorescencia en espermatozoides. Rev Obstet Ginecol Venez. 83(3):270-280. DOI: 10.51288/00830306

la imposibilidad de establecer un embarazo después de 12 meses de relaciones sexuales regulares sin protección (2). Se ha señalado que en el 50 % de las parejas involuntariamente sin hijos los parámetros anormales del semen apuntan a un factor asociado con la infertilidad masculina (3).

El gran avance en las técnicas de reproducción asistida ha permitido establecer el análisis del semen como una herramienta importante para evaluar a la pareja masculina. El análisis del semen permite valorar la función reproductiva del hombre, diagnóstico y planificación del tratamiento para parejas infértiles, monitoreo de la eficacia de la anticoncepción masculina, estudios de la población a gran escala y actividades de investigación, como los efectos de virus, ambientales y otras sustancias tóxicas en la función reproductora masculina. Los parámetros tradicionales del semen en al menos un solo eyaculado se consideran necesarios para la investigación adecuada y vía de tratamiento para parejas con infertilidad masculina (4), por lo que es esencial la buena ejecución de todos los parámetros del análisis del semen.

La fase preanalítica del análisis del semen tiene gran importancia, de ella depende que se obtengan resultados fiables, de modo que, todos los aspectos de la recolección de semen y análisis deben evaluarse usando procedimientos debidamente estandarizados (5).

El análisis de rutina circunscribe una evaluación macroscópica inicial del semen que incluye tiempo de licuefacción, viscosidad, pH, color, olor y volumen del semen; así como una evaluación microscópica inicial donde se determinan la concentración, movilidad, vitalidad y morfología de los espermatozoides. Ensayos de investigación, no considerados métodos de rutina, que evalúan la normalidad de la cromatina de los espermatozoides y ácido desoxirribonucleico (ADN), actualmente, han tomado relevancia en el análisis del semen y son incluidos en el manual del

análisis del semen humano con fines de diagnóstico o investigación (5).

Es el manual de la quinta edición para el análisis del semen humano (6), donde se establece por primera vez la valoración de toxicidad de los recipientes de plásticos para la toma de muestra del semen para fines de diagnóstico y de investigación; recomienda el uso de recipientes de vidrio o plástico y en los recipientes de material de plástico debe verificarse la ausencia de efectos tóxicos para los espermatozoides, para evitar la alteración de la morfología y la muerte de los mismos. Así pues, motivado a garantizar la confiabilidad de los resultados en el diagnóstico de la infertilidad de pareja, así como la inexistencia de publicaciones en Venezuela que reporten la evaluación del efecto tóxico de los recipientes de material de plástico para los espermatozoides, como también, la importancia del aporte de nuevos métodos que valoren la calidad espermática, se hace necesario, evaluar el efecto tóxico del recolector de orina en la toma de muestra de líquido seminal y la tinción de fluorescencia en espermatozoides como método de estudio de la morfología de los espermatozoides.

MÉTODOS

Se realizó un muestreo no probabilístico causal en un grupo de 8 estudiantes universitarios, que asistieron voluntariamente al laboratorio de Histología del Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, estado Sucre, Venezuela, en el período noviembre 2019-abril 2020.

Esta investigación, se llevó a cabo bajo las normas de bioética establecidas, por la Organización Mundial de la Salud (OMS), para trabajos de investigación en humanos y la declaración de Helsinki (7). A los individuos seleccionados, se les informó sobre los alcances y objetivos de la presente investigación. Así como, las ventajas y desventajas de su inclusión

EVALUACIÓN DEL RECOLECTOR DE ORINA EN LA TOMA DE MUESTRA DE LÍQUIDO SEMINAL Y TINCIÓN DIFERENCIAL DE FLUORESCENCIA EN ESPERMATOZOIDES

en las mismas, esto con el propósito de obtener su consentimiento por escrito.

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

A los participantes se les instruyó sobre los pasos a seguir para la correcta toma de muestra, siguiendo los criterios del manual de la OMS para la recolección de muestras de semen (6). Se les proporcionó un recipiente de vidrio, que correspondió a un *beaker* de 50 mL (PYREX, Alemania) para recoger la muestra, el cual sirvió como control; este recipiente, previo a la toma de muestra, se lavó con una solución jabonosa neutra (Labomed, Venezuela), agua destilada y se esterilizó en autoclave. Una vez recogida la muestra, se repartió en partes iguales en los dos recipientes, una mitad representó el control: material de vidrio y la otra mitad, el evaluado: recipiente de plástico o recolector de orina (*Dexx Medical Industrie*, Venezuela).

Para la determinación de la calidad espermática, se realizó la evaluación macroscópica y microscópica inicial valorando el tiempo de licuefacción, volumen, viscosidad, pH, movilidad, vitalidad, concentración, número total y morfología de los espermatozoides siguiendo los criterios establecidos por el manual para el procesamiento de muestras de semen de la OMS (6).

Para la evaluación de la toxicidad de los recolectores para las muestras de semen, en la valoración del recipiente de material de plástico, se evaluó la movilidad espermática a intervalos de 1 hora a temperatura ambiente, durante 4 horas, solo se incluyeron los datos de muestras, con buena concentración y movilidad de espermatozoides. El criterio de no tóxico se basó en la inexistencia de diferencias significativas ($p > 0,05$),

entre el control (material de vidrio), y el evaluado (material de plástico), considerando los recipientes de ensayo apropiados para la recogida de muestra de semen (6).

Tinción diferencial de fluorescencia modificada

Se realizaron por duplicado extendidos con 10 μ L de semen en portaobjetos limpios. Las láminas se dejaron secar al aire por 4 horas. Los frotis se fijaron con etanol al 95,0 % por 15 min (6) y se aplicó la tinción diferencial de fluorescencia modificada (8).

Preparación de colorantes y decolorante

Se preparó el colorante naranja de acridina (Sigma-Aldrich, USA) al 0,7 % (p/v) en *buffer* acetato pH 4,0. El *buffer* acetato pH 4,0 se preparó mezclando 82 mL de ácido acético 0,2 mol.L-1 con 18 mL de acetato de sodio 0,2 mol.L-1. El decolorante alcohol etílico-acetona se preparó en una proporción 1:1. La solución de fluoresceína de sodio se ajustó a un pH de 6,5 y se preparó al 0,002 % en alcohol etílico. Un volumen de 100 mL de solución contenía 2 mg de fluoresceína de sodio (Sigma-Aldrich, USA), 1,5 mL de ácido acético 0,4 mol.L-1, 0,5 mL de *buffer* acetato pH 4,6 y 98 mL de alcohol etílico. El *buffer* acetato contenía 52 mL de ácido acético 0,2 mol.L-1 y 48 mL de acetato de sodio 0,2 mol.L-1.

Procedimiento de coloración e identificación microscópica

Los extendidos de semen se cubrieron con la solución naranja de acridina durante 2 min, luego, se lavaron con agua de chorro y se procedieron a decolorar con alcohol etílico/acetona, exactamente, por 10 s, inclinando la lámina en un ángulo de 45°, se enjuagaron nuevamente; se aplicó la solución de fluoresceína de sodio por 2 min y se eliminó el colorante con agua (8).

Las láminas, una vez secas, se observaron con magnificación de 1000x, empleando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX 60, con filtro de excitación azul de banda amplia de 450-480 nm, espejo dicromático de 500 nm y filtro de barrera de 515 nm.

Se contaron 200 células por duplicado con objetivo de inmersión categorizando la morfología de los espermatozoides como normales y anormales, tomando en cuenta la forma de cabeza, pieza intermedia, pieza principal y exceso de citoplasma residual (6), la fluorescencia a presentarse por la tinción diferencial de fluorescencia es verde, anaranjada y amarilla (8). Las fotomicrografías fueron tomadas con una cámara digital marca *Motic* modelo *Moticam Cooled 3000*.

Análisis estadístico

Se realizó una prueba para muestras pareadas, *t* de *Student*, la cual determinó si existía o no diferencias significativas del parámetro movilidad, entre el control, recipiente de vidrio y el evaluado, recolector de orina; y se correlacionaron las tinciones verde, amarillo y anaranjado fluorescente del método diferencial de fluorescencia modificado con normalidad y anomalías morfológicas de los espermatozoides,

aplicando un análisis de múltiples variables (9). El programa estadístico aplicado fue *Statgraphics Centurion* versión 5.

RESULTADOS

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

Los parámetros macroscópicos y microscópicos de la evaluación inicial del análisis de semen, en el grupo de estudiantes de la Universidad de Oriente presentaron valores dentro de los límites de referencia establecidos por la OMS. Asimismo, la población en estudio cumplió con los estándares establecidos para ser considerada una población, aparentemente, fértil; obteniéndose valores para concentración, movilidad y morfología espermática de 162 millones de espermatozoides por ml de semen; 62,0 % y 26,0 %, respectivamente (tabla 1).

De las ocho muestras de semen, solo seis (6/8) se incluyeron para valorar la toxicidad de los recipientes

Tabla 1. Evaluación macroscópica y microscópica inicial del semen

Evaluación macro y microscópica	Media \pm DS	LIR _{OMS,2010}
Tiempo de licuefacción (min)	20 \pm 3	≤ 20
Volumen (ml)	3,7 \pm 1,7	$\geq 1,5$
pH	8,1 \pm 0,6	$\geq 7,2$
Número total (millones de espermatozoides por eyaculado)	549 \pm 162	≥ 39
Concentración (millones de espermatozoides por ml de semen)	162 \pm 60	≥ 15
Movilidad total PR+NP (%)	62 \pm 17	≥ 40
Movilidad progresiva (%)	49 \pm 16	≥ 32
Vitalidad (% vivo)	68 \pm 14	± 58
Morfología normal (%) ^{Papanicolaou}	26 \pm 18	≥ 4
Morfología normal (%) ^{Fluorescencia}	9 \pm 4	

LIR: Límite inferior de referencia, OMS 2010; PR: progresivo; NP: no progresivo DS: desviación estándar

*EVALUACIÓN DEL RECOLECTOR DE ORINA EN LA TOMA DE MUESTRA DE LÍQUIDO SEMINAL
Y TINCIÓN DIFERENCIAL DE FLUORESCENCIA EN ESPERMATOZOIDES*

Tabla 2. Comparación del porcentaje de movilidad progresiva de espermatozoides entre recipientes de material de vidrio y plástico para la recolección de muestra de semen

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

$p = 0,334$

de orina por presentar una buena concentración y movilidad de espermatozoides, se obtuvo que no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,334$) en la movilidad progresiva entre ambos tipos de recolectores (tabla 2), considerándose al recolector de orina apto para la toma de muestras de semen, al no ser tóxico para los espermatozoides, por lo tanto, satisface las necesidades de recogida de muestra de semen.

De acuerdo al análisis de correlación de múltiples variables, hubo una fuerte correlación ($r = 1,000$; $p = 0,000$) entre los espermatozoides categorizados como normales con espermatozoides verdes fluorescentes; mientras que la tinción anaranjada, estuvo altamente correlacionada a espermatozoides anormales, específicamente, a la anormalidad de la cabeza ($r = 0,940$; $p = 0,000$), asimismo, espermatozoides con cabeza normal pero teñidos anaranjados fluorescentes, presentaron una alta correlación con anormalidad de la pieza intermedia ($r = 0,902$, $p = 0,002$) y pieza principal ($r = 0,837$, $p = 0,010$). La alta correlación de la tinción amarilla, fue inversa a la normalidad del espermatozoide ($r = -0,838$; $p = 0,009$), interpretándose que la fluorescencia amarilla, igualmente, se asocia a morfología anormal del espermatozoide, especialmente, de la cabeza (tabla 3).

Tabla 3. Correlación entre las características morfológicas y tintoriales por la tinción diferencial de fluorescencia modificada de la cabeza, pieza intermedia y pieza principal de espermatozoides del semen

Espermatozoide	Morfología	Tinción	Categoría		
			Normal	Anormal	
Normal	Cabeza	Verde	$r = 1,000$ $p = 0,000$	$r = 0,572$ $p = 0,139$	
		Verde	$r = 0,454$ $p = 0,258$	$r = 0,3649$ $p = 0,3741$	
	Cabeza	Amarilla	$r = -0,838$ $p = 0,009$	$r = -0,309$ $p = 0,457$	
		Naranja	$r = 0,526$ $p = 0,180$	$r = 0,940$ $p = 0,000$	
		Anormal	PI	$r = 0,337$ $p = 0,414$	$r = -0,052$ $p = 0,903$
			PP	$r = 0,902$ $p = 0,002$	$r = 0,483$ $p = 0,225$
Anormal	PI	Amarilla	$r = 0,675$ $p = 0,066$	$r = 0,481$ $p = 0,675$	
		Naranja	$r = 0,837$ $p = 0,010$	$r = 0,645$ $p = 0,645$	
	PP	Amarilla	$r = 0,675$ $p = 0,066$	$r = 0,481$ $p = 0,675$	
		Naranja	$r = 0,837$ $p = 0,010$	$r = 0,645$ $p = 0,084$	

r: valor de correlación, p: valor probabilístico, PI: pieza intermedia, PP: pieza principal

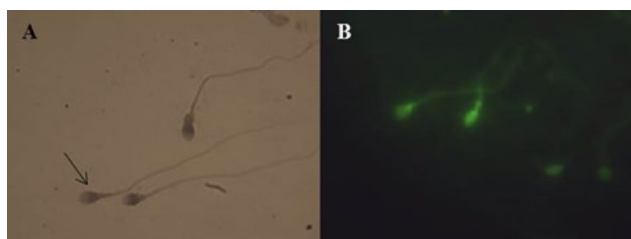


Figura 1. Fotomicrografías de espermatozoides con morfología normal. 1000x. A) Espermatozoide con morfología normal (flecha) por tinción de Papanicolaou. B) Espermatozoides normales teñidos verdes fluorescentes por la tinción diferencial de fluorescencia modificada.

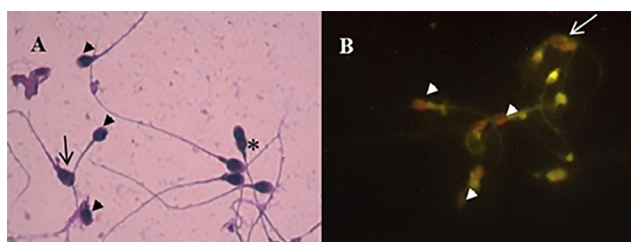


Figura 2. Fotomicrografías de espermatozoides con morfología anormal, espermatozoides cabezas grande (flechas) y pequeña (cabezas de flecha), exceso de citoplasma residual (asterisco). 1000x. A) Tinción de Papanicolaou. B) Los espermatozoides con alteraciones de la cabeza se observan con cabezas teñidas de anaranjado o amarillo fluorescente con la tinción diferencial de fluorescencia modificada.

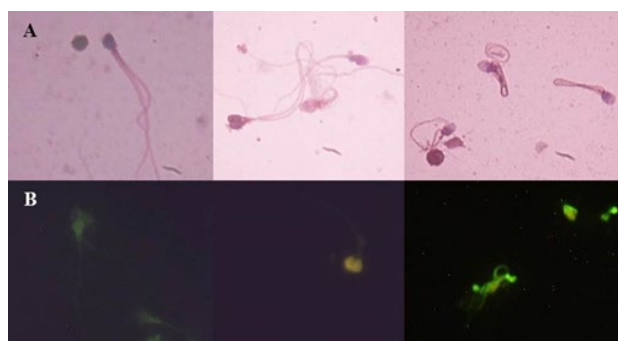


Figura 3. Fotomicrografías de espermatozoides con morfología anormal en la cola. 1000x. A) Tinción de Papanicolaou. B) Con la tinción diferencial de fluorescencia modificada, se observan espermatozoides con anomalías de cola, con tonalidad principalmente, anaranjado fluorescente.

Al comparar la morfología del espermatozoide, por las dos técnicas de tinción, Papanicolaou y fluorescencia modificada, se observaron espermatozoides con morfología normal; por ambas técnicas, se visualizaron las partes del espermatozoide, constituido por la cabeza (formada por el núcleo y acrosoma), pieza intermedia y pieza principal. Asimismo, por la técnica de fluorescencia modificada, se logró apreciar una fluorescencia de color verde y morfología normal, indicando buena integridad del ADN y categorización de la normalidad de la célula espermática (figura 1).

La aplicación de la técnica de tinción diferencial de fluorescencia modificada, ha permitido visualizar mayor número de espermatozoides con alteraciones morfológicas (tabla 1), se apreciaron, principalmente, espermatozoides cabeza pequeña, cabeza grande, cabeza redonda, cabeza atilada, doble cabeza, doble cola y cola enrollada, exceso de citoplasma residual, evidenciándose una fluorescencia amarilla o anaranjada para espermatozoides anormales (figuras 2, 3), infiriendo que tal tinción provee información sobre la calidad del ADN nuclear.

DISCUSIÓN

En la determinación de los parámetros seminales, existe un grado de error analítico donde el análisis del semen, pierde por completo su utilidad clínica si no se realiza bajo estrictas normas de control. En respuesta a este problema, la OMS buscó estandarizar y sistematizar los parámetros para el análisis seminal. La principal diferencia del manual de la OMS en su quinta edición, respecto a los anteriores y otros de su tipo es que, por primera vez, los valores que se proponen han sido obtenidos de varones cuya pareja ha logrado el embarazo durante los últimos 12 meses, por lo que son considerados fértiles. Sin embargo, la OMS recalca que estos valores son solo una guía y que cada laboratorio, dependiendo de su realidad geográfica, debe hacer esfuerzos para obtener sus propios valores (10).

EVALUACIÓN DEL RECOLECTOR DE ORINA EN LA TOMA DE MUESTRA DE LÍQUIDO SEMINAL Y TINCIÓN DIFERENCIAL DE FLUORESCENCIA EN ESPERMATOZOIDES

Uno de los mayores desafíos de este nuevo manual fue la aceptación por parte de los andrólogos e investigadores en salud reproductiva. Los cambios en los referenciales de concentración y movilidad espermática fueron los más aceptados (81 % y 96 %, respectivamente). Del mismo modo, la nueva clasificación en la movilidad del espermatozoide es mucho más cuantitativa al ser analizado solo en tres grupos: progresivos, no progresivos y espermatozoides inmóviles (11). No obstante, en la nueva actualización (5), vuelven a valorar la movilidad en cuatro categorías: movilidad progresiva rápida o tipo A, movilidad progresiva lenta o tipo B, movilidad no progresiva o tipo C e inmóviles o tipo D, por lo que, los análisis deben ajustarse a los nuevos criterios.

Investigaciones recientes que valoran las alteraciones en el semen, se acoplan a los lineamientos del manual para el estudio del semen (12, 13). No obstante, al evaluar diferentes bibliografías, no se encontraron trabajos de investigación que hayan establecido o estudiado la toxicidad del recolector de material de plástico u orina, como recolector de muestras de semen.

La toma de muestra de semen, de acuerdo al protocolo de trabajo pautado por la OMS en su quinta edición, señala que deben usarse recolectores de vidrio o plástico y a estos últimos se les debe realizar la prueba de toxicidad (6). En la nueva actualización del manual para el procesamiento de muestras de semen (5) se señala que el recolector de muestra de semen debe ser entregado por el laboratorio, el material debe ser de plástico no tóxico para los espermatozoides y aquellos cuya toxicidad no sea conocida deben valorarse con un control cuya toxicidad haya sido valorada. En Venezuela, los laboratorios clínicos en su rutina del análisis del semen emplean comúnmente el recolector de orina en la toma de muestra del líquido seminal, por lo que, el presente estudio representa un apoyo para valorar dichos recipientes, ante la ausencia en el país de recolectores apropiados para la toma de estas muestras.

El análisis de la morfología de los espermatozoides está relacionado con una serie de dificultades asociadas a la falta de objetividad, la variación en la interpretación o mal desempeño en evaluaciones externas de control de calidad. Por lo tanto, se deben aplicar criterios de clasificación para la morfología normal del espermatozoide, tomando en consideración como límite de referencia ≥ 4 % de formas normales presentes en la muestra. El espermatozoide consiste de cabeza, cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal; como el cuello y pieza terminal son difíciles de observar al microscopio de luz, se considera para el estudio microscópico del espermatozoide que la célula está constituida por cabeza y cola (pieza intermedia y pieza principal). Para que un espermatozoide se considere normal, tanto la cabeza como la cola deben ser morfológicamente normales (6).

La aplicación de la tinción de fluorescencia modificada, se ha empleado en el estudio del ciclo celular bacteriano, donde las fluorescencias verde, amarilla y anaranjada emitidas, están asociadas a síntesis de ADN y ácido ribonucleico (ARN) (8).

Sobre la base del mecanismo de tinción de la técnica diferencial de fluorescencia modificada, Flores y cols. (14) propusieron tres coloraciones observadas; verde, amarilla y anaranjada fluorescente; explican que la coloración anaranjada fluorescente, probablemente, se deba a una síntesis activa de ARN, mientras la coloración amarilla puede estar relacionada con una síntesis no tan activa de ARN. Por otro lado, Albarado y Flores (15), sugirieron que el color verde fluorescente se deba a una síntesis activa de ADN.

El principio de coloración del naranja de acridina señala que es un colorante catiónico y metacromático, que colorea ortocromáticamente al ADN y le imparte color verde. Al ARN lo tiñe metacromáticamente de rojo. La coloración del ARN, probablemente, siga el principio general del mecanismo de metacromasia, fenómeno en

el cual la célula adquiere un color distinto a la tinción empleada debido a una interacción entre las moléculas del colorante con las proteínas y aminoácidos presentes en la célula; cuando el naranja de acridina interactúa con una cadena simple en espiral aleatoria, como lo es el ARN, se une a casi todos los nucleótidos por su grupo fosfato de carga negativa, permitiendo el acercamiento entre las moléculas del colorante, de modo que estas interactúan y forman un polímero, produciendo una fluorescencia metacromática roja (16).

Según Rost (16), la coloración del ADN, sin embargo, es más complicada; está bien establecido que hay dos procesos por los cuales el naranja de acridina se une al ADN: un proceso de unión fuerte, en el cual predomina un alto radio molar de fosfato del ADN al colorante y un proceso de unión débil con menor radio molar; cuando los cationes del naranja de acridina se unen en la doble cadena de ADN, se intercala cada tercer par de bases púricas o pirimídicas y forman un complejo estable gracias a uniones iónicas y uniones dipolo-dipolo. En estas condiciones, la distancia entre las moléculas es lo suficientemente grande para prevenir la interacción colorante-colorante, de forma que la fluorescencia que se obtiene es la de un monómero de naranja de acridina, con emisión de color verde. No obstante, se ha explicado que el ADN induce metacromasia sobre el naranja de acridina, cuando el polímero de ADN de doble cadena cambia a cadena simple (17).

El naranja de acridina es un colorante usado para la detección de ácidos nucleicos, análisis de mitocondrias y lisosomas por citometría de flujo y estudios de apoptosis (18).

En espermatozoides, la tinción con naranja de acridina es utilizada para determinar el daño de la cromatina nuclear (19 - 24). Se ha demostrado que los daños morfológicos de la cabeza del espermatozoide están relacionados con la fragmentación de ADN, teniendo ello importancia dado a que se ha asociado con oligoastenozoospermia, donde los daños morfológicos

más frecuentes en los espermatozoides son a nivel de la cabeza (37,89 %), seguido de la pieza principal (4,11 %) y pieza intermedia (2,11 %) (25).

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

Una de las manifestaciones de la fragmentación de ADN en espermatozoides eyaculados incluye lesiones de la cadena simple o doble del ADN, debido al incompleto empaquetamiento nuclear. Como consecuencia, esta alteración puede generar mayor susceptibilidad del ADN espermático a sufrir daño, bajo este principio los métodos que usan naranja de acridina como lo son el ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA) y el ensayo de naranja de acridina (AO) inducen la desnaturalización del ADN, bien sea a pH ácido o alcalino, detectando la lesión del ADN, y lo cuantifican mediante el cambio metacromático de color verde (ADN nativo) al rojo (ADN desnaturalizado) (21, 24).

Un estudio donde se evaluó la asociación de la tinción diferencial de fluorescencia modificada con síntesis de ADN y ARN en bacterias del género *Acinetobacter* (26), aunque no hubo asociación estadísticamente significativa entre el color anaranjado y síntesis de ADN, encontró que postratamiento con ADNasa, en el 23 % de los tiempos del ciclo celular bacteriano, no se observaron células anaranjadas fluorescente y sugirieron que, probablemente, se debía a la presencia de ADN de cadena sencilla. Bajo esta observación, en la presente investigación, se infiere, que los espermatozoides anaranjados, puedan contener ADN fragmentado.

La morfología espermática, considerada por algunos clínicos como el índice predictor de la fertilidad

EVALUACIÓN DEL RECOLECTOR DE ORINA EN LA TOMA DE MUESTRA DE LÍQUIDO SEMINAL Y TINCIÓN DIFERENCIAL DE FLUORESCENCIA EN ESPERMATOZOIDES

masculina, también se relaciona con la integridad del ADN espermático. Las rupturas de las cadenas de ADN son correlacionadas con numerosas formas anormales de la cabeza y cola de los espermatozoides, y se informa una diferencia significativa entre la cantidad de anomalías morfológicas y las muestras de espermatozoides con alto y bajo grado de fragmentación, donde el porcentaje de cabezas amorfas y en general las anomalías de cabeza, son significativamente mayores, en las muestras con elevado grado de fragmentación de ADN (27).

En la presente investigación, hubo alta correlación entre la tinción diferencial de fluorescencia modificada y la morfología normal y anormal del espermatozoide. Esta relación quizás explique que algunas de las anomalías morfológicas del espermatozoide puedan deberse a una alteración en el ADN. Es interesante mencionar, que los estudios actuales sobre la infertilidad masculina se abocan a investigar las causas de origen epigenéticos, como metilación del ADN, remodelación de la cromatina y modificación de las histonas; en ellos han encontrado que estos cambios genéticos se asocian a daño de la cromatina, viéndose que este daño tiene impacto negativo sobre los resultados de técnicas de reproducción asistida (TRA), pueden transmitirse de una generación a la siguiente a través estas técnicas y causar un mayor riesgo de defectos de nacimiento, infertilidad y anomalías congénitas en los niños. Recomiendan que las modificaciones epigenéticas deban ser consideradas como uno de los principales factores de la etiología de la infertilidad masculina inexplicable, las cuales representan un porcentaje significativo (30 %) en las parejas infértiles (28, 29). Así pues, es importante mencionar que dentro de las nuevas pautas en la sexta edición del manual de la OMS para el examen y procesamiento del semen humano se incluyen métodos de examen ampliados para proporcionar diagnósticos clave en la investigación de la función del sistema reproductivo masculino. Estos van más allá del análisis básico del semen y pueden ser útiles para

guiar más específicamente la caracterización clínica de hombres fértiles o infértiles; entre estos exámenes está el estudio de fragmentación del ADN espermático (SDF) recomendando los ensayos Túnel y Cometa (5, 30).

Los factores que intervienen en el control del transporte y la fertilización de los espermatozoides incluyen el entorno del tracto reproductor femenino, las interacciones célula-célula, la expresión génica y los rasgos fenotípicos de los espermatozoides. Se conocen algunos de los determinantes importantes de la fertilización, es decir, la movilidad y el estado del ADN, pero muchos rasgos de los espermatozoides aún son indescifrables. Con respecto a la cromatina espermática, se ha demostrado que los espermatozoides con cromatina estable tienen una capacidad superior de llegar al sitio de fertilización y unirse a la zona pelúcida. En sí, lo que hace que los espermatozoides tengan éxito en llegar al sitio de fertilización y fertilizar el óvulo depende de una buena movilidad, morfología adecuada y estado normal del ADN (31).

Está claro que la selección de espermatozoides dentro del tracto genital femenino depende de diferentes factores y que la morfología del esperma es uno de ellos. De modo que, la tinción diferencial de fluorescencia, aunque no se propusieron valores de cortes, podría ser una herramienta útil en la evaluación del semen que, además de dar información más precisa sobre la morfología espermática, ofrece información sobre la integridad de la cromatina nuclear, pudiendo ser útil en el diagnóstico de infertilidad y la toma apropiada de decisiones por el médico, basados en la morfología y la integridad del ADN nuclear.

En conclusión, la población estudiada correspondió a una población joven en edades reproductivas, presentando una buena calidad espermática. El recolector de plástico, no tiene efectos tóxicos sobre los espermatozoides, por lo tanto, satisface las necesidades de recogida de la muestra de semen. Las variaciones

en las coloraciones, por medio de la tinción diferencial de fluorescencia modificada con naranja de acridina, están asociadas a la morfología del espermatozoide. Se confirma que la tinción verde fluorescente se asocia a espermatozoides morfológicamente normales y la tinción amarilla y anaranjada fluorescente se asocia a anomalías de la cabeza, pieza intermedia y pieza principal de los espermatozoides. Se recomienda continuar con estudios que valoren la tinción diferencial de fluorescencia modificada en la detección de la calidad cromosómica de los espermatozoides y diagnóstico de infertilidad, con el fin de aportar el uso de nuevos métodos de laboratorio que mejoren el diagnóstico de la infertilidad, al explicar las causas de las mismas.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Militza Guzmán, PhD, directora del Postgrado de Biología Aplicada de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, por haber autorizado el uso de los espacios del Laboratorio de Bacteriología Molecular para el desarrollo de la presente investigación. Así como a todos los estudiantes que participaron voluntariamente, ya que sin ellos no hubiera sido posible la elaboración de esta investigación y al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, por el apoyo financiero al proyecto de investigación con código CI-02-040100-15.

Conflictos de interés.

Los autores no reportan ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. Agarwat A, Baskaran S, Parekh N, Lam Cho Ch, Henkel R, Vij S, *et al.* Male infertility. *Lancet.* 2021;397(10271):319-333. DOI: 10.1016/S01406736(20)32667-2.
2. Szamatowicz M, Szamatowicz J. Proven and unproven methods for diagnosis and treatment of infertility. *Adv Med Sci.* 2020;65(1):93-96. DOI: 10.1016/j.advms.2019.12.008.
3. Punab M, Poolamets O, Paju P, Vihljajev V, Pomm K, Ladva R, *et al.* Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Hum Reprod.* 2017;32(1):18-31. DOI: 10.1093/humrep/dew284.
4. Wang Ch, Mbizvo M, Festin MP, Björndahl L, Toskin I, Editorial Board members of the WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Evolution of the WHO “semen” processing manual from the first (1980) to the sixth edition (2021). *Fertil Steril.* 2022;117(2):237-245. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2021.11.037.
5. World Health Organization [Internet]. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition. Ginebra: World Health Organization Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO; 2021 [consultado 28 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/item/9789240030787>.
6. World Health Organization [Internet]. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. Ginebra: World Health Organization; 2010 [consultado 28 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44261>.
7. Organización Panamericana de la Salud [Internet]. Pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud con seres humanos. PAHO; 2017 [consultado 28 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/34457>.
8. Flores Fernández EM, Caraballo Suniaga SC, Albarado Ysasis LS. Características tintoriales de *Neisseria gonorrhoeae* por la tinción diferencial de fluorescencia modificada. *Saber* [Internet]. 2014 [consultado 28 de marzo de 2023]; 26(3):281-288. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-01622014000300007&lng=es.
9. Remington RD, Schork MA. Estadística biométrica y sanitaria. España: Ediciones del Castillo, S.A. 1974.
10. Sarabia L, Munuce MJ. Nuevos valores para el espermiograma OMS 2010. *Rev Med Chile.* 2011; 139(4):548-549. DOI:10.4067/S0034-98872011000400020.
11. Cardona Maya W. Manual de procesamiento de semen humano de la Organización Mundial de la Salud-2010. *Actas Urol Esp.* 2010; 34(7):577-578. DOI: 10.1016/j.acuro.2010.05.002.
12. Burga Dávila L. Evaluación de la calidad seminal en pacientes con problemas de fertilidad del centro de reproducción humana de Lima (NACER) [tesis en Internet]. Lima: Universidad Ricardo Palma; 2016 [consultado 28 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://repositorio.urp.edu.pe/handle/20.500.14138/900>
13. Salvatierra Maza PL, Sandoval Vegas MH. Alteraciones más frecuentes de los parámetros seminales en muestras de pacientes; Laboratorio Biogénesis, Lima 2016 [tesis en

EVALUACIÓN DEL RECOLECTOR DE ORINA EN LA TOMA DE MUESTRA DE LÍQUIDO SEMINAL
Y TINCIÓN DIFERENCIAL DE FLUORESCENCIA EN ESPERMATOZOIDES

- Internet]. Lima: Universidad privada Norbert Wiener; 2018 [consultado 28 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/3148610>
14. Flores EM, Albarado LS, Thomas DE, Lobo A. Comparación de la tinción fluorescencia modificada y Gram, en muestras urogenitales y perianales de pacientes asistidos en el área de infecciones de transmisión sexual del ambulatorio Arquímedes Fuentes, Cumaná, estado Sucre. *Salus* [Internet]. 2008 [consultado 28 de marzo de 2023]; 12(2):29-35. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=375938987007>
 15. Albarado YL, Flores FE. Evaluación de la coloración diferencial de fluorescencia modificada en *Pseudomonas* spp. aisladas de suelo. *Kasmera* [Internet]. 2008 [consultado 03 de abril de 2023]; 36(1):17-27. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222008000100003&lng=es.
 16. Rost F. *Fluorescence microscopy*. Volumen II. Gran Bretaña: Cambridge University Press. 1995. DOI:10.1002/SCA.4950180810
 17. Pal MK, Ghosh AK. Stoichiometry of metachromatic dye binding by deoxyribonucleic acid. *Histochemie*. 1973; 36(1):29-33. DOI: 10.1007/BF00310118.
 18. Sigma-Aldrich [Internet]. Acridine orange hemi(zinc chloride) salt. USA: Sigma. Saint Louis; 2004-2005. [consultado 13 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/VE/es/product/sigma/a6014>.
 19. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril*. 1984; 42(1):87-91. DOI: 10.1016/s0015-0282(16)47963-x.
 20. López RE, Stone B, Navarro MC, Marrs RP. Impacto del ácido ascórbico y su correlación con la reacción acrosomal, movilidad espermática, acridina naranja y prueba de penetrancia en huevo de hámster. *An Med Asoc Med Hosp ABC* [Internet]. 2001 [consultado 04 de abril de 2023]; 46(2):76-82. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=3534>.
 21. Bouvet BR, Paparella CV, Feldman RN, Almará AM, Gatti VN, Solis EA. Capacidad fecundante espermática luego de la recuperación de espermatozoides mediante la técnica de swim-up. *Arch Esp Urol* [Internet]. 2005 [consultado 04 de abril de 2023]; 58(10):1049-1054. Disponible en: <https://docplayer.es/66296085-Capacidad-fecundante-espermatologica-luego-de-la-recuperacion-de-espermatozoides-mediante-la-tecnica-de-swim-up.html>.
 22. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge ChJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl*. 2006; 27: 53-59. DOI: 10.2164/jandrol.05068.
 23. Cruz I, Colmenares M, Berrueta Carrillo L, Gómez Pérez R, Montes H, Berrueta L, *et al*. Evaluación de la calidad del espermatozoide humano: comparación entre la integridad del ADN espermático y variables del semen. *Invest clín* [Internet]. 2010 [consultado 04 de abril de 2023]; 51(1):87-99. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332010000100009&lng=es.
 24. Portella Ruiz JR, Gonzales GF. Fragmentación del ADN espermático: origen, evaluación y repercusión en la fertilidad masculina. *Ginecol Obstet Mex* [Internet]. 2016 [consultado 05 de abril de 2023]; 84(7):462-473. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/ginobsmex/gom-2016/gom167i.pdf>.
 25. Flores E, Lobo A, Chelhod M, Rojas L, Salazar R, Alvarado L. Motilidad y morfología espermática, en estudiantes de la Universidad de Oriente. *Rev Obstet Ginecol Venez* [Internet]. 2012 [consultado 05 de abril de 2023]; 72(1): 52-57. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0048-77322012000100008&lng=es.
 26. Velásquez Rodríguez MJ. Asociación entre la reactividad tintorial por la coloración de Gram y tinción diferencial de fluorescencia modificada con la síntesis de ácidos nucleicos en *Acinetobacter baumannii*. [Trabajo de grado]. Cumaná: Universidad de Oriente; 2015.
 27. Rodríguez Pendás BV. Fragmentación del ADN espermático e infertilidad masculina. *Rev Cuba Endocrinol* [Internet]. 2017 [consultado 05 de abril de 2023]; 28(3):1-17. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-29532017000300009&lng=es.
 28. Giaccone F, Cannarella R, Mongioì LM, Alamo A, Condorelli RA, Calogero AE, *et al*. Epigenetics of Male Fertility: Effects on assisted reproductive techniques. *World J Mens Health*. 2019; 37(2):148-156. DOI: 10.5534/wjmh.180071.
 29. Tahmasbpour Marzouni E, Ilkhani H, Beigi Harchegani A, Shafaghatian H, Layali I, Shahriary A. Epigenetic modifications, a new approach to male infertility etiology: A review. *Int J Fertil Steril*. 2022; 16(1):1-9. DOI: 10.22074/IJFS.2021.138499.1032.
 30. Baldi E, Gallagher MT, Krasnyak S, Kirkman Brown J; Editorial Board Members of the WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Extended semen examinations in the sixth edition of the WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen: contributing to the understanding of the function of the male reproductive system. *Fertil Steril*. 2022; 117(2):252-257. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2021.11.034.
 31. García Vázquez FA, Gadea J, Matás C, Holt WV. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian J Androl*. 2016; 18(6):844-850. DOI: 10.4103/1008-682X.186880.

Recibido: 27 de abril de 2023
Aprobado: 12 de julio de 2023