

Biología de la Reproducción

Estudio de las alteraciones morfológicas de espermatozoides humanos con microscopia electrónica de barrido (SEM)

Morphological alterations of human sperm by Scanning Electron Microscopy (SEM)

Gómez-Torres M.J^a, Girela, J.La, Fernández-Colom P.J^b, Romeu, A^b, De Juan J^a.

^aDepartamento de Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante. ^bServicio de Ginecología (Reproducción Humana). Hospital Universitario "La Fe". Valencia.

Resumen

El objetivo principal de este trabajo es describir las alteraciones morfológicas del espermatozoide humano mediante Microscopia Electrónica de Barrido. En este estudio hemos utilizado muestras de semen de pacientes que acudieron al Servicio de Reproducción Humana del Hospital Universitario "La Fe". Las muestras fueron procesadas para su estudio ultraestructural. En este trabajo hemos establecido las principales categorías de alteraciones morfológicas, divididas en tres grandes tipos: alteraciones de la cabeza, cuello y flagelo. Además dentro de estos tipos hemos observado alteración del número y de la forma. Finalmente hemos correlacionado algunas de estas alteraciones con sus posibles mecanismos etiopatogénicos.

Palabras clave: morfología/SEM/espermatozoide/teratozoospermia

Summary

The aim of this paper is to describe the altered morphology of human sperm by Scanning Electron Microscopy. In this study we have used semen samples from patients of the Human Reproduction Service at "La Fe" University Hospital. The samples were processed for ultrastructural study. In this work we have established the principal categories of alterations spermatozoa. Three principal kinds have been described: head, neck and flagellum alterations. In addition, number and shape modification were observed into of each kind. Finally a relationship between some of these alterations and its possible etiopathogenic mechanisms were established.

Key words: morphology/SEM/ spermatozoa/teratospermia

Correspondencia : Dra. María José Gómez-Torres
Departamento de Biotecnología.
Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante.
Campus de San Vicente del Raspeig.
Apartado de Correos 99.
03080 Alicante. España

INTRODUCCIÓN

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.

En el estudio de la morfología de las células espermáticas, se debe de utilizar un sistema de clasificación adecuado que permita evidenciar el máximo número de anomalías que puedan relacionarse con problemas de esterilidad de origen masculino. Estas anomalías podrían deberse a situaciones tales como: traumatismos e infecciones a nivel gonadal, disfunción en los túbulos seminíferos, alteraciones metabólicas y endocrinas que afecten directamente a la espermatogénesis, a la espermiogénesis y a la función del epidídimo y con alteraciones en la maduración de los espermatozoides (Andolz y Bielsa, 1995). Por ello, una correcta evaluación del porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y anormales puede ser una información clave en el estudio básico del semen.

Sin embargo, si los criterios de valoración de la morfología espermática no son claros y precisos la relación entre morfología y capacidad fecundante puede llegar a ser controvertida (Kruger y Coetzee, 1999).

En un espermiograma normal, el porcentaje de células sin alteraciones morfológicas debe ser (14 %; cuando este valor desciende hablamos de una teratozoospermia (WHO, 1999). Se asume que existe una correlación entre la teratozoospermia y la esterilidad. No obstante su etiopatogenia es muy poco conocida y son escasos los datos existentes en la literatura (Chemes et al., 1999; Nardo et al., 2002, Baccetti et al., 2002, Nistal, 2004). Esto, junto al poco consenso que existe a la hora de diagnosticar la morfología espermática con microscopía óptica (Eustache y Auger, 2003) ha determinado que se plantee el presente trabajo de actualización. El objetivo principal de este trabajo es describir las alteraciones morfológicas de espermatozoides humanos mediante Microscopía Electrónica de Barrido. Para ello, se han utilizado muestras de semen de pacientes que acudieron al Servicio de Reproducción Humana del Hospital Universitario "La Fe". Dichas muestras fueron procesadas para su estudio ultraestructural y el microscopio utilizado para su observación fue un Hitachi S-3000N.

LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA CON SEM

Morfología del espermatozoide normal

Las características citomorfológicas del espermatozoide maduro normal, observado con microscopía óptica (MO), se muestran en las figura 1. Esta célula tiene una cabeza o región cefálica ovoidea en visión frontal y piriforme en visión lateral, constituida por el núcleo condensado y además una cola que le permite la movilidad necesaria para atravesar las distintas cubiertas que rodean al ovocito y llegar al espacio perivitelino. La cabeza está constituida por el núcleo y el acrosoma. Este último determina en la superficie cefálica la existencia de dos regiones claramente definidas en imágenes de SEM, la región acrosomal (RA) y la región postacrosomal (RP), separadas ambas por una fina banda de transición denominada segmento ecuatorial (SE), no siempre claramente definido. En la cola del espermatozoide existen cuatro regiones que pueden ser diferenciadas por la naturaleza de las estructuras que rodean al axonema. Desde su origen, en la cabeza o base, hasta el extremo terminal, estas regiones estudiadas con SEM son la pieza de conexión (PC), la pieza intermedia (PI), la pieza principal (PP) y la pieza terminal (PT). La PC o cuello, como su propio nombre indica, es la parte que une la cabeza con el resto del flagelo. La PI es el segmento de la cola donde se localizan las mitocondrias y finalmente la PP se va estrechando gradualmente a medida que se aproxima a la PT. (Fig 1b).

Alteraciones morfológicas del espermatozoide

A nivel de la cabeza:

- (1) Alteraciones numéricas:
 - (A) Espermatozoides sin cabeza, anucleados, en cabeza de alfiler o decapitados (Fig 2): Se trata de espermatozoides acéfalos, por tanto sin su material genético. Estos espermatozoides cuando se observan "in vitro" pueden presentar movilidad progresiva.
 - (B) Espermatozoides Bicéfalos: Espermatozoides con dos cabezas y un solo flagelo, normalmente la pieza intermedia aparece engrosada como se ilustra en la Figura 3.
- (2) Alteraciones en la forma:
 - (A) Espermatozoides con cabezas alargadas o "tapering" (Fig 4): En este caso la cabeza de los espermatozoides posee la forma de una elipse en la que existe un marcado predominio del eje longi-

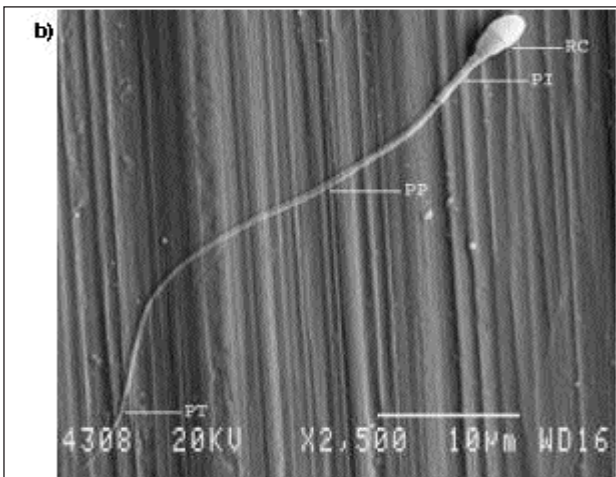
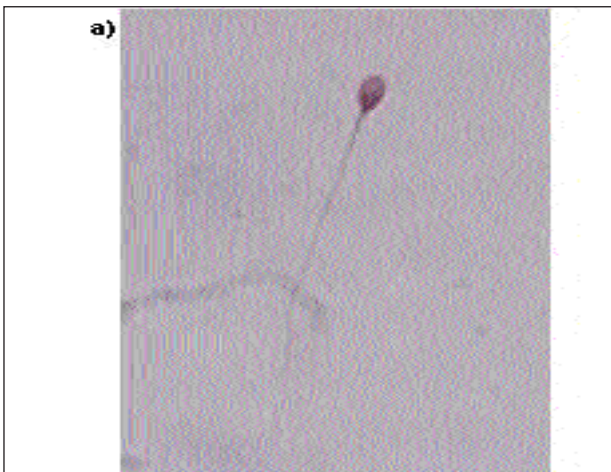


Figura 1:

- a) Espermatozoide humano morfológicamente normal visto con microscopía óptica (MO) a 1000X;
 b) Espermatozoide humano morfológicamente normal observado con SEM. (A: Anillo, PC: Pieza de Conexión, PI: Pieza Intermedia, PP: Pieza Principal, PT: Pieza Terminal, RA: Región Acrosomal, RC: Región Cefálica, RP: Región Postacrosomal, SE: Segmento Ecuatorial).

tudinal (5 a 6 µm) sobre el eje transversal (2 a 3 µm).

- (B) Espermatozoides con cabezas redondas (Fig 5): A diferencia del caso anterior, aquí ambos ejes tienden a ser similares lo que le da un aspecto esferoideo.

A nivel de la pieza de conexión:

Espermatozoides con implantación axial anómala del flagelo (Fig 6). En estos casos observamos una estrangulación a nivel de la pieza intermedia, que se

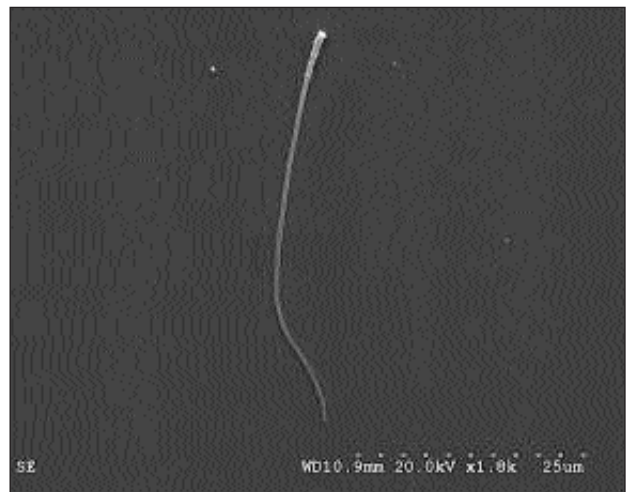


Figura 2

Espermatozoide anucleado, en el que se observa en su extremo anterior la ausencia de cabeza (flecha).



Figura 3

Espermatozoide bicéfalo.

une a la fosa de implantación formando un ángulo de 45-90° con respecto al eje longitudinal de la cabeza.

A nivel de la cola o flagelo:

- (1) Alteraciones numéricas:
 - (A) Espermatozoides sin flagelo (Fig 7): Se observan solamente cabezas de espermatozoides aisladas con ausencia total de cola.
 - (B) Espermatozoides con flagelos múltiples: Como se ilustra en la Figura 8 podemos encontrar espermatozoides con dos o más flagelos .
- (2) Alteraciones en la forma, a nivel de la pieza intermedia:



Figura 4

Espermatozoide con cabeza alargada.



Figura 6

Espermatozoide con implantación axial de la pieza intermedia.



Figura 5

Espermatozoide con cabeza redonda.

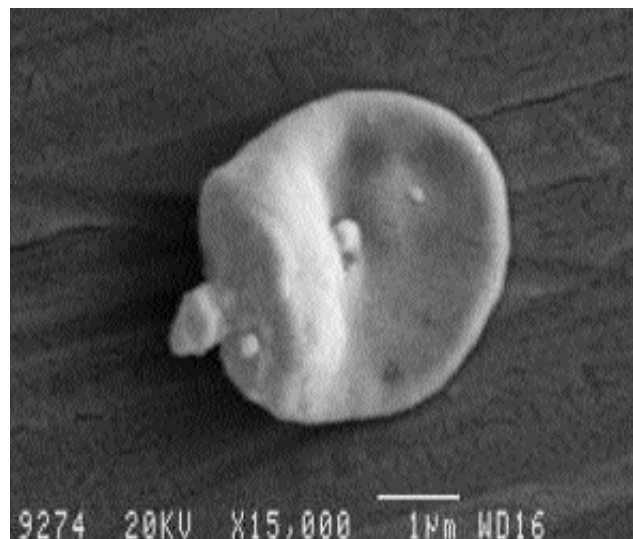


Figura 7

Se observa una cabeza de espermatozoide con ausencia total de flagelo (flecha).

- (A) Espermatozoides con pieza intermedia marcadamente engrosada (Fig 9): En ocasiones se observan espermatozoides cuya pieza intermedia puede incluso superar el tamaño cefálico.
- (B) Espermatozoides con persistencia de gota citoplasmática (Fig 10): Este es un tipo de anomalía difícil de diagnosticar debido a que se pueden confundir con piezas intermedias engrosadas.
- (3) Alteraciones de la forma a nivel del resto del flagelo:
- (A) Espermatozoides con enrollamiento total de la cola con o sin restos citoplasmáticos englobándola: Como se ilustra en la Figura 11, podemos

observar espermatozoides cuyos flagelos están completamente enrollados. Cuando se observan “in vitro” presentan problemas de motilidad.

- (B) Espermatozoides con enrollamiento parcial de la cola (Fig 12): En estos casos observamos que el enrollamiento de la cola afecta solamente al extremo final de la misma.
- (C) Espermatozoides con flagelos truncados: Los flagelos tienen en la parte principal angulaciones de diferentes grados (Fig 13).

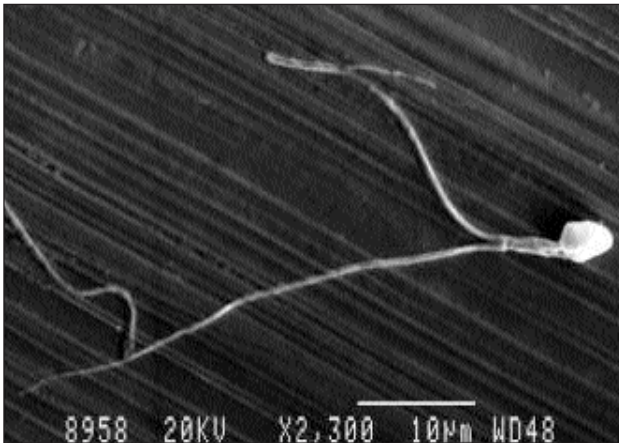


Figura 8
Espermatozoide con dos flagelos.

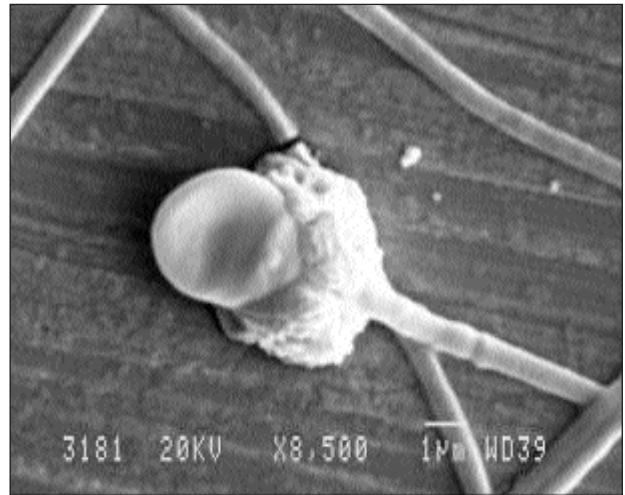


Figura 10
Espermatozoide con gota citoplasmática a nivel de la pieza intermedia (flecha).

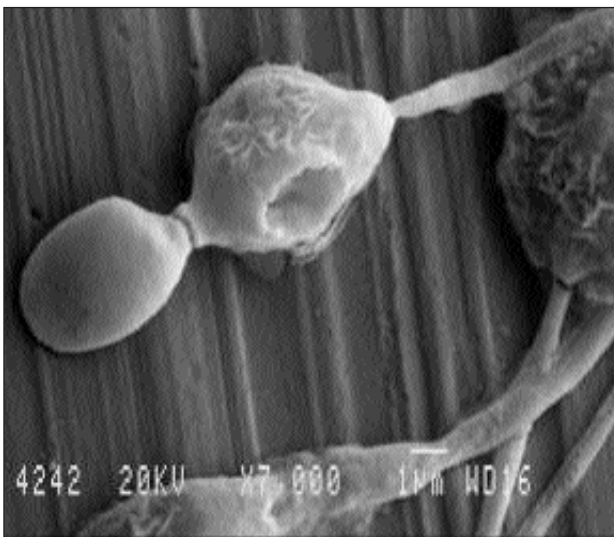


Figura 9
Espermatozoide con pieza intermedia engrosada (flecha).

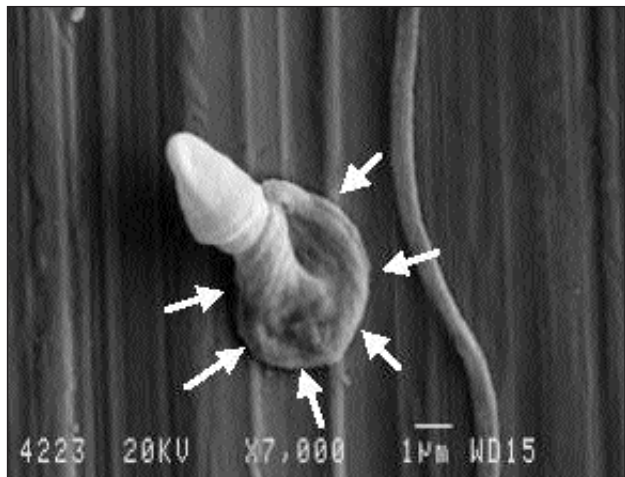


Figura 11
Espermatozoide en el que se observa enrollamiento total del flagelo (flechas).

ALTERACIONES MORFOLÓGICAS Y SUS CORRELACIONES ETIOPATOGÉNICAS.

Cualquiera de las alteraciones morfológicas descritas anteriormente, puede ser considerada potencialmente como causa de disfunción espermática. Pero entre todas las anomalías descritas cabe destacar algunas de ellas por su posible correlación con síndromes teratozoospermicos de probable base genética (Nistal, 04). A continuación se describen algunas de estas alteraciones de la morfología espermática a diferentes niveles de organización:

Anomalías de la cabeza

Espermatozoides con cabezas redondas (Fig 5)

El porcentaje de espermatozoides de cabeza redonda en hombres fértiles es de 0.5 % (0.1 elevándose a 2.3 % (0,5 en subfértiles (Kalahansis et al., 2002). Cuando la mayoría o la totalidad de espermatozoides presentes en un eyaculado presentan esta anomalía constituyen un desorden de posible base ge-

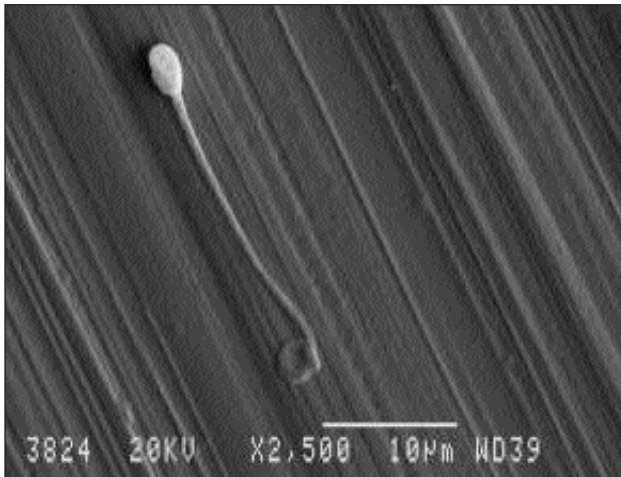


Figura 12

Espermatozoide con enrollamiento a nivel del extremo distal del flagelo (flechas).

nética, denominado globozoospermia. Los espermatozoides de los pacientes con este síndrome, se caracterizan por presentar las siguientes anomalías: núcleo esférico, escasa condensación de la cromatina, fallo en el reemplazamiento de histonas por protaminas, ausencia de acrosoma, etc (Schirren et al., 1971, Nardo et al., 2002, Vicari et al., 2002).

Espermatozoides macrocéfalos o macronucleares

En las muestras analizadas en el presente estudio no ha sido observada esta anomalía. El primer caso de este síndrome en espermatozoides humanos fue caracterizado por Nistal y colaboradores en 1977. Estas células se caracterizan por presentar cabezas de gran tamaño, aumento en el volumen nucleolar, contornos nucleares irregulares, defectos en la condensación de la cromatina, presencia de grandes vacuolas nucleares y restos citoplasmáticos. Además presentan anomalías a nivel del acrosoma. Se han descrito dos variantes de espermatozoides macrocéfalos: espermatozoides con flagelos múltiples y espermatozoides sin flagelo (Nistal et al., 1977). Los espermatozoides macrocéfalos son tetraploides y representan un fallo en la meiosis (Escalier, 2002).

Anomalías de la pieza de conexión

Las alteraciones de la pieza de conexión pueden conducir a la separación de cabezas y flagelos. Esta alteración morfológica tiene un origen testicular y resulta de un fallo durante la migración de los centriolos hacia la posición caudal de la espermátide

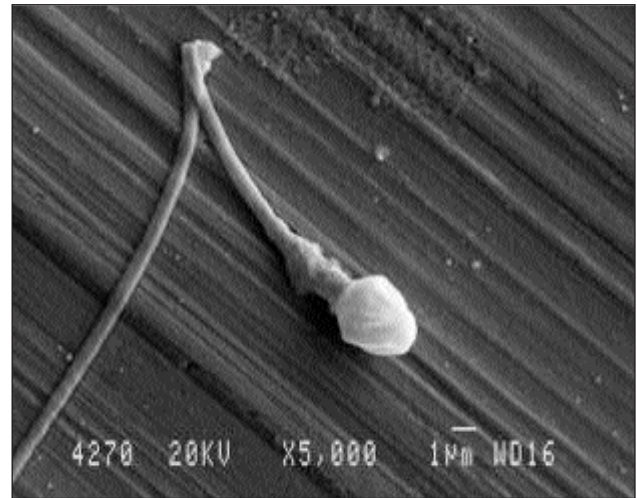


Figura 13

Espermatozoide con flagelo truncado (flecha).

(Chemes et al., 1999) Dependiendo de la gravedad de la lesión los espermatozoides observados pueden mostrar los diferentes cuadros morfológicos:

Espermatozoides sin cabeza (Fig 2)

En estos casos vemos solo flagelos, las cabezas han sido fagocitadas por las células de Sertoli o por macrófagos del epidídimo. Se ha descrito este síndrome en varios miembros de la misma familia (Baccetti et al., 1989, Chemes et al., 1999), por lo que esta anomalía puede ser de tipo genético.

Espermatozoides con implantación axial del flagelo (Fig 6)

La presencia de espermatozoides con estrangulaciones a nivel de la pieza conectante son una manifestación menos severa de la que hemos descrito en el caso anterior. En el eyaculado de pacientes con esta patología pueden aparecer los dos tipos de alteraciones (Chemes et al. 1999).

Anomalías de la pieza intermedia

Espermatozoides con engrosamiento de la pieza intermedia (Fig 9)

La astenozoospermia (alteración de la motilidad espermática), se observa en un 30 % de varones estériles. En un 70 % de pacientes con esta patología se observan anomalías de la vaina mitocondrial, en estos casos los espermatozoides con microscopía óptica tienen flagelos normales (Fig 1a) y en muchas de las cé-

lulas se observan engrosamientos de la pieza intermedia (Piasecka et al., 1998).

Anomalías del flagelo

Espermatozoides con flagelos rudimentarios (flagelos cortos, gruesos y rígidos)

La presencia de este tipo de alteración a nivel de la cola del espermatozoide constituye un síndrome teratozoospermico perfectamente definido, conocido como displasia de la vaina fibrosa (Baccetti et al., 1975, Nistal et al., 1979, Pedersen y Hammen, 1982). Los espermatozoides vistos con microscopia óptica son cortos, con colas rígidas e irregulares. La pieza intermedia normalmente está ausente. Los estudios ultraestructurales muestran importantes aberraciones en la vaina fibrosa en todos los espermatozoides y del axonema en mas de la mitad (Baccetti et al., 1993). Las anomalías de la vaina fibrosa se pueden visualizar con microscopia óptica de fluorescencia, usando anticuerpos anti tubulina y anti-FSC1 (el componente proteico mayor de la vaina fibrosa) (Rawe et al., 2001).

Se distingue una forma completa de manifestación de esta patología, cuando todos los espermatozoides presentan displasia de la vaina fibrosa y una forma incompleta cuando el 20-30 % de espermatozoides tienen una estructura normal. Este síndrome puede ser esporádico o familiar (Chemes et al., 1998).

Se ha observado que en estos pacientes faltan tambien los brazos de dineina de los cilios del árbol respiratorio (Chemes et al., 1990) lo que supone la existencia de una íntima relación entre el síndrome de los espermatozoides con displasia de la vaina fibrosa y el síndrome del cilio inmóvil.

Anomalías del axonema

Las anomalías del axonema mas importantes son las aberraciones numéricas en la organización normal 9+2 y la falta de brazos de dineína. Las aberraciones numéricas mas frecuentes, desde el punto de vista funcional son la ausencia de uno o ambos microtúbulos centrales (Baccetti et al., 1979, Baccetti et al., 1981). En estos últimos, los espermatozoides también carecen de vaina central, al microscopio óptico tienen una configuración normal, pero son inmóviles.

Una variedad importante de alteración ciliar es el grupo denominado discenesia ciliar primaria o síndrome del cilio inmóvil, que hace referencia a un grupo de pacientes con un bajo aclaramiento mucociliar, son portadores de otitis, sinusitis, bronquitis, bron-

quiectasias y espermatozoides inmóviles (Afzalius, 1976, Eliasson et al., 1977). El estudio ultraestructural demuestra que la causa es debida a la falta de los brazos de dineína de los microtúbulos A de los dobles periféricos. Es una enfermedad de origen genético (Pennarun et al., 2002), que afecta a diferentes órganos como tracto respiratorio superior e inferior, trompas de Fallopio y espermatozoides.

El síndrome de Kartagener es otro subtipo de discenesia ciliar primaria que se caracteriza por la triada clásica de situs inversus, bronquiectasias y sinusitis crónica.

En conclusión, el presente trabajo pone de manifiesto que el estudio mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido de las alteraciones morfológicas en espermatozoides humanos puede y debe ser una herramienta precisa para analizar la naturaleza de estos defectos y su posible repercusión sobre la fisiología del espermatozoide humano.

Agradecimientos

Subvencionado por "Ayudas Serono de Investigación 2003" de la Fundación Salud 2000.

Con el apoyo de la Unidad de Microscopia Electrónica de Barrido de los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Andolz P. y Bielsa MA.:** Semen humano: Manual y atlas 1995. 1ª edn: Editorial Garsi, S.A, Madrid.
2. **Kruger TF, Coetzee K.:** The role of sperm morphology in assisted reproduction. Hum Reprod 1999; 5 (2): 172-178.
3. **WHO.:** Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. 4rd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
4. **Chemes HE, Puigdomenech ET, Carizza C, Brugo Olmedo S, Zanchetti F, Hermes R.:** Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head-neck attachment: a human syndrome of genetic origin. Hum Reprod 1999; 14 (7): 1811-1818.
5. **Nardo LG, Sinatra F, Bartoloni G, Zafarana S, Nardo F.:** Ultrastructural features and ICSI treatment of severe teratozoospermia: report of two human cases of globozoospermia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2002; 104: 40-42.
6. **Baccetti B, Capitani S, Collodel G, Strehler E, Piomboni P.:** Recent advances in human sperm pathology. Contracept 2002; 65: 283-287.

7. **Nistal M.:** Patología ultraestructural de los espermatozoides de posible base genética. En: Alvarez JG; Marcos M; (Eds): Factor Masculino. Madrid, Patrocinado por Quermed; 2004. Páginas 53-68.
8. **Eustache F, Auger J.:** Inter-individual variability in the morphological assessment of human sperm: effect of the level of experience and the use of standard methods. *Hum Reprod.* 2003; 18 (5): 1018-1022.
9. **Kalahanis J, Rousso D, Kourtis A, Mavromatidis G, Makedos G, Panidis D.:** Round-headed spermatozoa in semen specimens from fertile and subfertile men. *J Reprod Med* 2002; 47: 489-493.
10. **Schirren CG, Holstein AF, Schirren C.:** Über die morphogenese round-köpfiger spermatozoen des menschen. *Andrología* 1971; 3: 117-125.
11. **Nardo LG, Sinatra F, Bartoloni G, Zafarana S, Nardo F.:** Ultrastructural features and ICSI treatment of severe teratozoospermia: report two human cases of flobozoospermia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 104: 40-42.
12. **Vicari E, Perdichizzi A, De Palma A, Burrello N, D'Agata R, Calogero AE.:** Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities: caso report. *Hum Reprod* 2002; 17: 2128-2133.
13. **Nistal M, Paniagua R, Herruzo A.:** Multi-tailed spermatozoa in a case with asthenospermia and teratospermia. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1977; 26: 111-118.
14. **Escalier D.:** Genetic approach to male meiotic division deficiency: the human macronuclear spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 1-7.
15. **Baccetti B, Burrini AG, Collodel G, Magnano AR, Piomboni P, Renieri T, Sensini C.:** Morphogenesis of the decapitated and decaudated sperm defect in two brothers. *Gamete Res* 1989; 23: 181-188.
16. **Piasecka M, Wenda-Rozewicka L, Kozanecka A, Rozewicki S, Laszczynska M, Marchlewicz, M.:** Changes in sperm mitochondria in patients with asthenozoospermia. *Ginekol Pol* 1998; 69: 479-484.
17. **Baccetti B, Burrini A, Pallini V, Renieri T, Rosati F.:** The short tailed human spermatozoa. Ultrastructural alteration and dynein absence. *J Submicrosc Cytol* 1975; 7: 349-360.
18. **Nistal M, Paniagua R, Herruzo A.:** Absence de la paire centrale du complexe axonémique dans une teratospermia avec flagelles courts et épais. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1979; 8: 47-50.
19. **Pedersen H, Hammen R.:** Ultrastructure of human spermatozoa with complete subcellular derangement. *Arch Androl* 1982; 9: 251-259.
20. **Baccetti B, Burrini A, Capitani S, Collodel G, Moretti E, Piomboni P, Renieri T.:** Notulae seminologicae. 2 The "Short tail" and "Stump" defect in human spermatozoa. *Andrología* 1993; 16:356-371.
21. **Rawe VY, Galaverna GD, Acosta AA, Olmedo SB, Chemes HE.:** Incidence of tali structure distortions associated with dysplasia of the fibrous sheath in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2001; 16: 879-886.
22. **Chemes HE, Olmedo SB, Carrere C, Osés R, Carizza C, Leisner M, Blaquier J.:** Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men. *Hum Reprod* 1998; 13: 2521-2526.
23. **Chemes HE, Morero JL, Lavieri JC.:** Extreme asthenozoospermia and chronic respiratory disease. A new variant of the immotile cilia syndrome. *Int J Androl* 1990; 13: 216-222.
24. **Baccetti B, Burrini AG, Maver A, Pallini V, Renieri T.:** "9+0" immotile spermatozoa in an infertile man. *Andrologia* 1979; 11: 437-443.
25. **Baccetti B, Burrini AG, Pallini V, Renieri T.:** Human dynein and sperm pathology. *J Cell Biol* 1981; 88: 102-107.
26. **Afzelius BA.:** A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* 1976; 193: 317-319.
27. **Eliasson R, Mossberg B, Camner P, Afzelius BA.:** The immotile-cilia syndrome: a congenital ciliary abnormality as an etiologic factor in chronic airway infections and male sterility. *N Engl J Med* 1977; 297: 1-6.
28. **Pennarun G, Bridoux AM, Escudier E, Dastot-Le Moal F, Caheux V, Amselem S, Duriez B.:** Isolation and expression of the human hPF20 gene orthologous to *Chlamydomonas* PF20: evaluation as a candidate for axonemal defects of respiratory cilia and sperm flagella. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26: 362-370.