

## Estudio de las variaciones de la movilidad progresiva del espermatozoide (a+b% OMS) a diferentes pHs “in vitro”, medidas con un sistema automático de análisis de semen (CASA)

*Study of the variations of the progressive sperm mobility (a+b%WHO) to different pHs “in vitro”, measured with an automatic system análisis semen (CASA)*

Pilar Fernández \*, Marieta Gutiérrez \*, José M. Gris.\*\*, Carlos Aulesa\*

(\*)Unidad de Semiología, Laboratorio, (\*\*) Servicio de Esterilidad Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebrón, Barcelona.

### Resumen

*Introducción: El semen se deposita en el fondo de saco de la vagina y dado que fisio o patológicamente se pueden producir variaciones del pH vaginal dependiendo de la fase del ciclo menstrual o por situaciones clínicas patológicas o tratamiento farmacológicos, Los espermatozoide del semen también pueden verse afectado por estos cambios de pH.*

*Objetivo: Se quiere estudiar “in vitro” como pueden afectar estas variaciones del pH a la movilidad progresiva de los espermatozoides .*

*Diseño: Añadir a diversas fracciones de un mismo semen cantidades crecientes de ácido cítrico,metabolito natural del semen para bajar el pH o añadir bicarbonato para subirlo, determinar el pH de cada fracción y medir la movilidad con un sistema automático de análisis de Semen tipo CASA(Compuyer assisted semen assay).*

*Resultados: La adicción del ácido cítrico al semen, ocasiona la bajada media del pH de 7,35 a 5,33 y una disminución estadísticamente significativa, de las medias de movilidad progresiva (a+b% OMS) de 59% al 2,6% (p=0,001). La adicción de bicarbonato otras 5 muestras de semen, ocasiona un aumento medio del pH de 7,12 a 10,0 y también una disminución estadísticamente significativa de las medias de la movilidad progresiva del 49% al 3,15% (p=0,001).*

*Conclusiones: Se ha encontrado una disminución muy significativa en la media de la movilidad progresiva de los espermatozoides de las muestras estudiadas, tanto al subir como al bajar el pH, que nos pueden ayudar a entender los efectos que se producen “in vivo” cuando hay cambios del pH de la mucosa vaginal en la fase premenstrual o por vaginitis bacterianas o infecciones por trichomonas, pudiéndonos ayudar a explicar los casos de la infertilidad de la pareja, que se produce en estas situaciones dñicas.*

---

**Correspondencia:** Dr. Carlos Aulesa  
Unidad de Semiología, Hospital Infantil.  
Ciudad Sanitaria Valle de Hebrón, Barcelona.  
Paseo Valle de Hebrón 119-129  
Barcelona (08035), Spain.  
e-mail: caulesa@vhebron.net

**Palabras clave:** Ph Vaginal. Vaginitis bacteriana. Movilidad progresiva del espermatozoide. Metodos CASA( Computer assisted semen assay).

### **Summary**

**Introduction:** *The semen is deposited into the deep down of the vagina and as physio or pathologically the vaginal pH may suffer variations, depending on the phase of the cycle menstrual or for pathological situations clinics or pharmacological treatment. Sperm can also be affected by these changes in pH.*

**Objective:** *To study in vitro, if these pH vaginal variations can affect the progressive mobility of sperm.*

**Design:** *Add to several fractions of a single sperm, increasing amounts of citric acid, natural metabolite of semen to lower the pH or bicarbonate to upload also the pH. Afterwards the pH of each fraction was determined and the mobility was quantified with a system of automatic analysis of Semen type CASA(Computer assisted semen assay).*

**Result:** *The addition of citric acid the sperm, resulting in the lowered average pH of 7.35 to 5.33 and a statistically significant decrease in the average mobility progressive ( a+b% WHO) from 59% to 2.6% (p = 0.001). The bicarbonate addition to 5 samples of semen ,causes an average increase of pH of 7.12 to 10.0 and also a statistically significant decrease of the mean mobility progressively from 49% to 3.15% (p = 0.001).*

**Conclusions:** *We found a very significant decline in the average mobility progressive sperm of the samples studied, both high or low pH, which can help us understand the effects that occur "in vivo" when there are changes pH of the vaginal mucosa, at the stage premenstrual or for vaginitis or bacterial infections trichomonas, these effects can be explained some cases of couple's infertility, which occurs in these situations clinics.*

**key words:** pH Vaginal. Bacterial vaginitis. Progressive sperm mobility. Methods CASA(Computer assisted semen assay).

## **INTRODUCCIÓN**

El cérvix uterino es la puerta de entrada de los espermatozoides en el tracto uterino y tiene diversas funciones desde el punto de vista de la fertilidad de la mujer, la más importante es la de proteger a los espermatozoides del medio ácido hostil de la vagina, ya que la secreción del moco cervical producido por las células epiteliales del cérvix uterino compuesto de mucopolisacáridos presenta un pH entre 6-7,2 pH neutralizando el pH de las secreciones vaginales(1). El semen con un pH ligeramente alcalino (pH 7,2-7,5) se deposita durante el coito, en el fondo de saco de la vagina que presenta valores de 3,8-4,2 pH(en la fase premenstrual) y se produce la coagulación y la formación del moco seminal, que es el mecanismo fisiológico de evitar la expulsión de los espermatozoides por las contracciones vaginales.

Seguidamente por la acción de las proteasas prostá-

ticas del semen que actúan sobre el moco seminal, se produce la licuefacción del mismo y la liberación de espermatozoides al cérvix uterino(2).

Se han descrito alteraciones del pH vaginal dependiendo de la fase del ciclo menstrual y situaciones clínicas que modifican el pH vaginal como las vaginosis con proliferación excesiva del *Lactobacillus acidophilus* que llevará a la vagina a un pH < 4. Infecciones vaginales por hongos (*Candida albicans*) ocasiona también una disminución de el grado de acidez de la vagina a valores de pH inferiores a 4 y las infecciones por protozoos (*Trichomonas* vaginales) que no es infrecuente que presenten un ascenso del pH vaginal entre 5-6,5.(3,4).

Luego en este contexto de alteración del pH vaginal y de modificación también del pH de la mucosa del endocervix por diversas situaciones clínicas y tratamientos farmacológico y su posible relación con la infertilidad de la pareja. Hemos creído necesario realizar este trabajo, en el que se estudia el comporta-

miento del semen licuado a diferentes pHs "in vitro", con la progresiva acidificación del mismo semen con cantidades crecientes de ácido cítrico componente natural del semen, o su alcalinización con bicarbonato para reproducir "in Vitro" las diferentes situaciones clínicas descritas. El análisis de la movilidad se efectúa mediante el analizador automatizado de Semen Sperm Class Analyzer(SCA) (®) tipo CASA (Computer assisted semen assay ) de reconocida fiabilidad (5,6) y que permite el estudio secuencial rápido del mismo semen a diferentes pHs con una reducida variabilidad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Pacientes y recogida de muestras

El estudio se llevó a cabo con un total de 9 muestras de semen normales procedentes de pacientes del Servicio de Esterilidad. Las muestras fueron obtenidas siguiendo la normativa de la ESHRE y OMS (7-9) y recogidas por los pacientes mediante masturbación tras un periodo mínimo de abstinencia de 2 días y máximo de 7 días. El tiempo transcurrido entre la llegada de las muestras al laboratorio y su análisis fue de una hora como máximo.

### Protocolo de tratamiento de las muestras.

Todas las muestras fueron procesadas para la realización un seminograma completo. Posteriormente, se seleccionaron aquellas muestras para el ensayo que presentaban un volumen adecuado (>3 ml) y con una concentración espermática superior a  $50 \times 10^6$  millones espermatozoides/ml y con un porcentaje de espermatozoides progresivos(a+b% OMS) superior al 50% y morfología normal superior al 14% .

Cada muestra de semen termostata a 37°C y con agitación suave rotacional, se fraccionó en 4 alícuotas de 0,5 ml, a las cuales se añadieron secuencialmente concentraciones crecientes de una solución madre de ácido cítrico al 10 g/100 ml (fracciones de 25,50,100 y 200 microlitros). La adición de ácido cítrico a cada fracción se llevó a cabo inmediatamente, antes de la determinación de la movilidad y tras una homogeneización suave por inversión del tubo, se efectuó la determinación de la movilidad con el SCA. La adición de bicarbonato a los otros cinco semen, se hizo siguiendo el mismo protocolo a partir de una solución saturada de bicarbonato sodico a una concentración superior al 10 g/100 ml y añadiendo también fracciones secuencialmente de 25,50,100 y 200

microlitros a cada alícuota del 0,5 ml del mismo semen. Paralelamente también se determino el pH de cada fracción con ayuda de tiras reactivas Merk rango de 3-12 de pH.

### Determinación automatizada de la movilidad espermática

Sperm Class Analyzer(SCA)(®) es un equipo automatizado de análisis de Semen tipo CASA (Computer Assay Semen Análisis). Este analizador está integrado por los siguientes componentes: un hardware compuesto por ordenador, cámara digital, microscopio Nikon Eclipse E200, placa calefactora Omron y platina termostata y un Software Sperm Class Analyzer(SCA)(®). El principio de la medición de la velocidad( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) de los espermatozoides, es el calculo computerizado del movimiento del espermatozoide por la captura de 25 imágenes/seg de cada fotograma y su cuantificación en un software específico en % de espermatozoides de movilidad a,b,c o d% según los criterios clasificación de la OMS(a>25  $\mu\text{m}/\text{seg}$ , b 5-25  $\mu\text{m}/\text{seg}$ , c<5  $\mu\text{m}/\text{seg}$  y de inmóviles).

El análisis de la movilidad con el SCA se efectúa tomando 3 microlitros de semen del paciente y se sitúa en una de las cámaras de Leja desechable de 10 micrómetros( $\mu\text{m}$ ) de espesor, previamente atemperada a 37°C en placa calefactora. Se coloca la cámara de Leja cargada con la muestra de semen en la platina termostata del microscopio, enfocándose la imagen y se captura hasta 10 campos o fotogramas y un número ilimitado de espermatozoides dependiendo del conteo de la muestra (en nuestro caso 2000-3000 espermatozoides por muestra). El analizador una vez efectuado el análisis computerizado, clasifica los espermatozoides por su velocidad de desplazamiento e imprime los resultados de la concentración y los porcentajes de espermatozoides de movilidad a,b,c y d% de OMS de la muestra.

### Métodos estadísticos

El análisis estadístico se ha realizado con ayuda de los programas estadísticos SPSS(Chicago,IL,USA) y MedCalc software(Mariakerke,Bélgica) aplicando el test de Kolmogorov-Smirnov para analizar la distribución normal de las variables, el test de Levene para comprobar la homogeneidad de las varianzas y el test paramétrico de ANOVA de comparación de medias y el test de Fisher(LSD) para determinar los grupos de medias estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

Las medias de la movilidad progresiva (a+b% OMS) del semen original y de sus alícuotas tratadas con ácido cítrico y el pH final resultante se muestran en la Tabla 1 y su representación que presenta una curva parabólica se muestra en la Fig 1 (regresión cuadrática  $y=a+bx+cx^2$ ) y el análisis estadístico de estos resultados, aplicando el test paramétrico de ANOVA previa comprobación de la homogeneidad de varianzas con el test de Levene ( $p=0,267$ ), muestra que existen diferencias significativas entre los diferentes grupos de pH ( $F= 11,6, p=0,001$ ) y aplicando el test de Fischer (LSD) a un nivel de  $p=0,05$ , nos indica que las variaciones entre el grupo de semen original pH 7,35 y el de 6,85 aun no muestran diferencias significativas ( $p=0,059$ ), pero con las medias de los demás grupos de 6,45 de pH, 5,9 y 5,33 la diferencia ya es estadísticamente significativa ( $p<0,05$ ). Asimismo se determino el % de espermatozoides vitales de cada alícuota con el método manual eosina-nigrosina 10% y la variación del pH ocasionaba, además de la disminución de su movilidad, una pérdida de la viabilidad del espermatozoide (necrozoospermia) cuantificada por la disminución de % de espermatozoides vitales, paralela a la disminución de la movilidad, pero que al ser medida por técnicas manuales, la variabilidad de las medidas no permitió un estudio estadístico comparativo de los resultados. Asimismo se estudio la morfología espermática de cada fracción y no se apreció cambios morfológicamente muy evidentes con la variación de pH a pesar de los cambios de la viabilidad.

A los otros 5 sémenes restantes se les trató con el mismo protocolo, pero añadiendo cantidades crecientes de una solución de bicarbonato sódico saturada, para conseguir en este caso aumentar el pH del semen añadiendo cantidades de 25, 50, 100 y 200 microlitos de un componente natural del semen, las alícuotas así tratadas se procesaron de la misma manera por el SCA y la media de los resultados de pH y movilidad progresiva se muestran en la Tabla 1 y su representación que presenta una curva parabólica se muestra en la Fig 1 (regresión cuadrática  $y=a+bx+cx^2$ ). El análisis estadístico de estos resultados aplicando el test paramétrico de ANOVA previa comprobación de la homogeneidad de varianzas con el test de Levene ( $p=0,09$ ), muestra que existen diferencias significativas entre los grupos de pH ( $F=17,30, p=0,001$ ) y aplicando el test de Fischer (LSD) a un nivel de  $p=0,05$ , nos indica que las variaciones entre el grupo de semen original pH 7,1 y las medias de los demás grupos con aumento del pH, muestran diferencias significativas, ya desde la primera alícuota de 8,78 de

**Tabla 1**

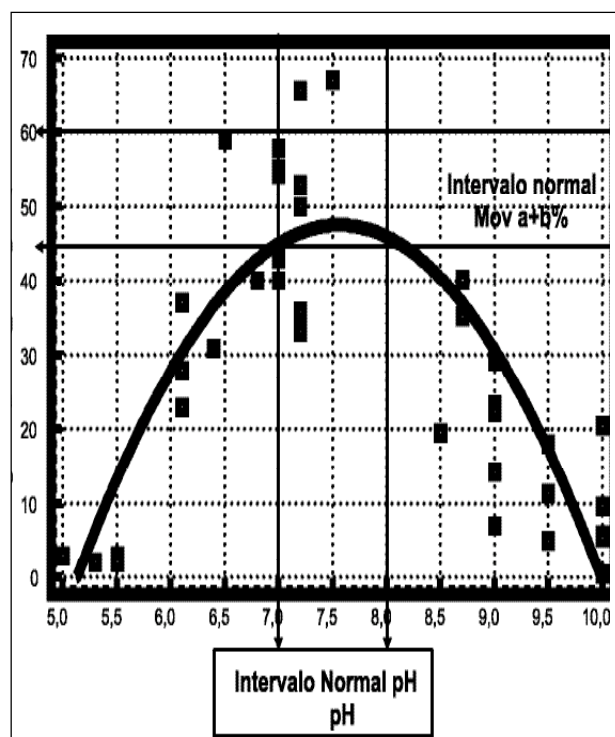
Variación de la movilidad con los cambios de pH

Disminución de Ph (ácido)		
n	pH	Mov (a+b%) OMS
4	7,35	59,25
4	6,85	42,25
4	6,45	38,25
4	5,90	22,5*
4	5,33	2,67*

\* $p<0,05$  diferencia significativa

Aumento del pH (básico)		
n	pH	mov (a+b%) OMS
5	7,12	49,38
5	8,78	28,49*
5	9,30	16,46*
5	9,75	7,87*
5	10,0	3,15*

\* $p<0,05$  diferencia significativa



**Figura 1**

Variación de la movilidad con el pH

pH ( $p=0,003$ ), luego la subida del PH del semen in vitro, ocasiona una bajada estadísticamente significativa de la movilidad del espermatozoide al menor aumento del pH. Estudios de la vitalidad de cada fracción, han mostrado similares resultados como al acidificar la muestra, con disminuciones importantes de la vitalidad con el cambio de pH, lo que nos puede indicar parecidos mecanismos bioquímicos de pérdida de la movilidad y de la viabilidad celular espermática, por afectación posiblemente de la permeabilidad de la membrana citoplasmática del espermatozoide que no provoca un cambio muy evidente en las morfologías de las muestras estudiadas.

### CONCLUSIONES

El presente trabajo ha querido estudiar el efecto de las variaciones del pH en el parámetro de la motilidad semen "in vitro" con la utilización de sistemas automáticos de medición (SCA), que disminuyen las variaciones de su medición. Los resultados obtenidos muestran claramente que el aumento o disminución mínima del pH, afecta de una manera significativa la movilidad espermática y a la viabilidad celular espermática, posiblemente por un mecanismo bioquímico osmótico que modifica la permeabilidad celular y que ocasiona una lisis espermática.

Luego, una vez demostrada la hipótesis de que verdaderamente el cambio del pH afecta de una manera importante la movilidad/vitalidad del espermatozoide, creemos que las variaciones observadas "in vitro" se pueden extrapolar "in vivo" y contribuir al conocimiento fisiopatológico de su incidencia en los cuadros de infertilidad que pueden presentar estas parejas, como cuando la mujer sufre vaginitis por hongos, tricomonas y hay una alteración de pH vaginal o cuando también es el hombre el que presenta inicialmente un pH patológico del semen, como se ha descrito con infecciones crónicas urogenitales, así como

en otras patologías urológicas como agenesia vesícula seminales, hiperplasias prostáticas etc.

Así pues en ambos casos, el espermatozoide vital se encuentra en un medio con un pH extremo, que como hemos demostrado afecta mucho a la movilidad y vitalidad del espermatozoide y podría explicar la causa de los problemas de fertilidad que presentan algunas parejas en las situaciones clínicas descritas.

### BIBLIOGRAFÍA

1. **Fernandez-Cid A, Fernandez Cid M.:** El pH vaginal y su importancia clínica. *Ginecología y Obstetricia* 2004; 5(2):75-80
2. **Andolz P, Bielsa MA.:** Semen humano manual. Ed Garsi, SA, 1995. Madrid.
3. **Carreras Collado R, Checa Vizcaino MA.:** Consideraciones generales sobre infección genital y las enfermedades de transmisión sexual. *Tratado de Ginecología y Obstetricia L-Cabero* ed Iberoamericana 2004, Barcelona, pag 1167-1170.
4. **Caillouette J, Sharp C, Zimmerman J, Roy S.:** Vaginal pH as a marker for bacterial pathogens and menopausal status. *Amer Jou of Obsteric & Gynecology* 1997; 176,6,1270-1277.
5. **Irvine Stewart D.:** Computer assisted semen analysis systems: sperm motility assessment. *Human Reprodu* 1995; 10,1,53-57
6. **Centola GM.:** Comparison of manual microscopic and computer assisted methods for analysis of sperm count and motility. *Arch. Androl* 1996; 36,1-7
7. **WHO laboratory:** Manual for the examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction 3rd edn (1999). Cambridge University Press, Cambridge, UK
8. **Manual on Basic Semen Analysis, ESHRE Monographs.** ed. U. Kvist and L. Bjorndahl, Oxford University press, 1999
9. **ESHRE Monografias.:** Manual de Análisis básico de Semen. SEQC, 2002, Ed Vigor. Barcelona.