

EFFECTO DEL TABAQUISMO SOBRE LA ESPERMATOGENESIS EN HOMBRES CON INFERTILIDAD IDIOPATICA.

Beatriz Reina Bouvet¹, Cecilia Vicenta Paparella¹ y Rodolfo Nestor Feldman².

Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas¹. Servicio de Reproducción². Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional Rosario. Rosario. Argentina.

Resumen.- OBJETIVO: Relacionar en hombres con infertilidad idiopática, el tabaquismo con parámetros seminales espermatogénicos, tales como morfología espermática, concentración de espermatozoides y células germinales en muestras de semen fresco.

MÉTODOS: Se realizó un estudio prospectivo en 131 hombres con infertilidad idiopática que asistieron al Servicio de Reproducción del Hospital Centenario de Rosario desde mayo de 2004 a junio de 2006. Se realizó espermograma según normas OMS evaluando células germinales y morfología espermática con tinción Papanicolaou. La concentración de espermatozoides se determinó por el método subjetivo con cámara de Neubauer. La población en estudio se dividió en 3 grupos G1 fumadores de más de 20 cig/día, G2 fumadores de menos de 20 cig/día y G3 hombres no fumadores. Los fumadores lo hacían al menos desde hace un año.

RESULTADOS : Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba t Student, encontrándose diferencia estadísticamente significativa para las 3 variables entre G1 vs G3 ($p < 0.001$) y G2 vs G3 ($p < 0.005$). No se encontró diferencia significativa entre los grupos de fumadores G1 vs G2 ($p > 0.1$).

CONCLUSIONES: El tabaco altera la concentración y morfología espermática con aumento de formas espermáticas inmaduras que manifiestan un proceso espermatogénico alterado. El consumo de tabaco debe ser evaluado al realizar un estudio integral del hombre infértil.

Palabras clave: Tabaquismo. Infertilidad. Semen. Células germinales. Arresto espermatogénico. Morfología espermática.

Summary.- OBJECTIVES: Our objective was to relate the tobacco with seminal spermatogenic parameters such as sperm morphology, concentration of spermatozooids and germinal cells in samples of semen from men with idiopathic infertility.

METHODS: A prospective study was carried out on a population of 131 men with idiopathic infertility that attended the Reproduction Service of Centenario Hospital in Rosario from may 2004 to june 2006. Sperm study according to WHO was carried out evaluating germinal cells and sperm morphology with Papanicolaou. The concentration of spermatozooids was determined by means of a subjective method with Neubauer camera. The studied population was divided in the three groups: G1: smokers more of 20 cigarettes/day, G2: smokers under 20 cigarettes/day, G3 non smokers. The smokers had had the habit for over a year.

Correspondencia

Beatriz Reina Bouvet
Gabriel Carrasco 1854
2000 Rosario. (Argentina)
beatrizbouvet@infovia.com.ar

Trabajo recibido: 29 de agosto 2006

RESULTS: Results were analyzed with the student's t-test. Statistically significant differences between G1 vs G3 ($p < 0.001$) and G2 vs G3 ($p < 0.005$) were found for the three variables. No significant difference was found between the groups of smokers G1 vs G2 ($p > 0.1$).

CONCLUSIONS: The results show that tobacco alters sperm concentration and morphology with an increase of immature forms, demonstrating an altered spermatogenesis process. The consumption of tobacco should be evaluated to carry out the integral study of infertile man.

Keywords: Tobacco. Infertility. Semen. Germinal cells. Spermatogenic arrest. Sperm morphology.

INTRODUCCIÓN

La espermatogénesis es un proceso que se desarrolla en los tubulos seminíferos y requiere elevada sincronización, para que se produzca una población de espermatozoides morfológicamente normales, en adecuada concentración, y viables para fertilizar el ovocito (1).

El epitelio seminífero es un medio rico en andrógenos, requerimiento indispensable para que se lleve a cabo el proceso de proliferación y maduración espermática. Está poblado de células germinales que se distinguen de las celulares somáticas del organismo, porque se dividen no solo por mitosis sino también por meiosis, para originar en la espermiogénesis gametas haploides que son los espermatozoides.

Las diferentes etapas de proliferación y diferenciación celular están reguladas por gonadotropinas y andrógenos, cuyo efecto sobre las células germinales está mediado por las células de Sertoli. Estas células que están localizadas en la región basal del epitelio seminífero, poseen receptores para FSH y andrógenos, que participan del proceso espermatogénico enviando señales a las células germinales adyacentes.

La carencia hormonal produce inmadurez en el eyaculado, arresto madurativo que se manifiesta en el semen con concentraciones elevadas de células germinales y espermatozoides con alteraciones morfológicas.

El tabaco contiene sustancias tóxicas como la nicotina, que disminuye los niveles séricos de gonadotropinas. El humo del cigarrillo posee gran cantidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos

inductores de enzimas como citocromo P450, que interfieren en la producción de esteroides sexuales y alteran el desarrollo armónico del proceso espermatogénico (2).

OBJETIVO

Estudiar en hombres con infertilidad idiopática, la relación del tabaquismo con parámetros seminales que están vinculados con el desarrollo de la espermatogénesis, tales como morfología espermática, concentración de espermatozoides y de células germinales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes:

Se realizó un estudio prospectivo durante un período de dos años, desde mayo 2004 a junio de 2006. Se evaluaron 131 hombres con infertilidad idiopática que asistieron al Servicio de Reproducción del Hospital Centenario de Rosario. Se excluyeron aquellos con historia pasada o actual de alguna patología capaz de alterar la calidad del semen. El semen se obtuvo por masturbación luego de 3 a 5 días de abstinencia sexual, se efectuó espermograma y estudios funcionales según normas OMS (3). Todas las muestras seminales se analizaron antes de la hora de recolección e inmediatamente después de la licuefacción.

La población en estudio se dividió en 3 grupos: G1 (n= 19) fumadores de más de 20 cig/día; G2 (n=43) fumadores de menos de 20 cig/día; G3 (n=69) hombres no fumadores. Los fumadores lo hacían desde un lapso igual o mayor a un año.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba t Student. Un valor de probabilidad de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

Determinaciones:

La concentración de células germinales y morfología espermática se estudió con tinción Papanicolaou modificada para muestras de semen (3). Si bien hay muchas técnicas para evaluar morfología espermática (4), esta tinción es la que mejor permite diferenciar las células germinales de otras células presentes en el semen. La concentración de espermatozoides se determinó por el método subjetivo con cámara de Neubauer (3).

Concentración de células germinales y morfología espermática

Tinción Papanicolaou modificada (3)

Reactivos:

Metanol p.a.

Hematoxilina de Harris 30 % P/V solución acuosa

Orange G 1% P/V en etanol 96 °

E A 36 (Eosina Y 0.5% P/V, Pardo Bismark Y 0.5 %

P/V, Verde Brillante 0.5 % P/V) en etanol 96° y

etanol 96%

Técnica: La tinción se realizó en cámara de Koplín. En portaobjetos desengrasados, se hizo un extendido con 10 ul de semen fresco, se dejó secar al aire y se fijó con metanol durante 10 minutos como mínimo. Se cubrió con Hematoxilina dejando actuar durante 3 minutos. Se lavó con abundante agua corriente suavemente, por inmersión, luego de un pasaje por etanol 96%. se cubrió con Orange G durante 1 minuto, después de 3 pasajes en etanol 96°, se cubrió con E A 36 durante 3 minutos. Finalizando la tinción con 3 pasajes por etanol 96°. Se dejó secar al aire y se observó con microscopio óptico y objetivo de inmersión. Se contaron como mínimo 200 espermatozoides que se clasificaron según sus características morfológicas utilizando ocular micrometrado. Se adoptó los criterios estrictos de clasificación según Kruger (5). En el mismo portaobjetos teñido se contaron las células germinales presentes cada 200 espermatozoides y se calculó su concentración, refiriéndola a la concentración espermática por ml de eyaculado (3). Se utilizó la concentración de 0.5×10^6 CG/ml como valor referencial, acorde con los resultados obtenidos en muestras seminales de hombres fértiles. (6,7).

Concentración de espermatozoides:

Reactivos: Diluyente Mac Comber y Saunders.

Bicarbonato de sodio 0.5 % P/V en solución acuosa de formol 0.5% V/V

Con esta solución se realizó una dilución del semen acorde con la densidad espermática observa-

da en el examen microscópico directo de la muestra en fresco. Se utilizó el método subjetivo en cámara de Neubauer. Expresando el resultado en concentración de espermatozoides/ ml de semen (3).

RESULTADOS

El promedio de concentración espermática (10^6 /ml) en no fumadores (G3) fue de 57.1, mientras que en fumadores de menos de 20 cig/día (G2) fue de 35.0 y en fumadores de más de 20 cig/día (G1) de 33.5 (Tabla I). El análisis estadístico de comparación de los promedios de concentración espermática entre no fumadores y fumadores mostró diferencia estadísticamente significativa tanto en G1 vs G3 ($p=0.001$) como en G2 vs G3 ($p=0.0053$). Mientras que la diferencia fue no significativa entre fumadores G1 vs G2 ($p=0.4201$). (Tabla II).

La evaluación de morfología espermática mostró un promedio de espermatozoides con morfología normal de 10.3 % en hombres no fumadores (G3), 6.9 % en fumadores de menos de 20 cig/día (G2) y 6.7% en fumadores de más de 20 cig/día (G1). Observándose una disminución en el porcentaje de espermatozoides normales mayor al 3 % en los grupos de fumadores (G1 y G2) con respecto al grupo de no fumadores (G3). (Tabla I). La comparación entre los 2 grupos de fumadores fue no significativa (G1 vs G2; $p= 0.41730$), mientras que resultó estadísticamente significativa entre fumadores y no fumadores (G1 vs G3; $p= 0.001$) y (G2 vs G3; $p= 0.0015$). Tabla II.

La concentración promedio de células germinales (10^6 /ml) fue de 0.29 en no fumadores (G3), mientras que en fumadores de menos de 20 cig / día (G2) fue de 0.78 y en fumadores de más de 20

TABLA I. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA, MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS GERMINALES EN LAS POBLACIONES: G1: FUMADORES DE MAS DE 20 CIG/DIA, G2: FUMADORES DE MENOS DE 20 CIG/DÍA , G3: NO FUMADORES.

Variables	Fumadores más 20c/d (n= 19)	Fumadores menos 20c/d (n=43)	No fumadores (n=69)
Concentración Espermática 10^6 /ml	33.5 +/- 2.3	35.1 +/- 2.9	57.1 +/- 4.0
Morfología Espermática (%)	6.7 +/- 2.4	6.9 +/- 5.2	10.3 +/-4.4
Concentración células germinales 10^6 /ml	1.09 +/- 0.7	0.78 +/-0.6	0.29 +/- 0.21

TABLA II. SIGNIFICADO ESTADÍSTICO EN REFERENCIA A CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA, MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS GERMINALES AL COMPARAR LOS GRUPOS G1=FUMADORES DE MÁS 20 CIG/DÍA. G2=FUMADORES DE MENOS DE 20 CIG/DÍA. G3=NO FUMADORES

VARIABLES	G1 vs G2	G1 vs G3	G2 vs G3
Concentración esperm	P=0.4201 (NS)	P= 0.001 (DS)	P=0.0053 (DS)
Morfología esperm	P= 0.4173 (NS)	P=0.0001(DS)	P=0.0015 (DS)
Ccentración Cel germ	P= 0.1205 (NS)	P= 0.0036 (DS)	P=0.0007 (DS)

NS= diferencia estadísticamente no significativa

DS= diferencia estadísticamente significativa

cig/día (G1) de 1.09. (Tabla I). El análisis estadístico mostró diferencia significativa entre fumadores y no fumadores (G1 vs G3; $p=0.0036$) y (G2 vs G3; $p=0.0007$). Mientras que la comparación entre no fumadores fue no significativa (G1 vs G2; $p=0.1205$). (Tabla II).

DISCUSIÓN

La concentración promedio de espermatozoides, está disminuida en forma significativa en hombres fumadores (Figura 1). La reducción en la concentración espermática observada coincide con lo informado por Stillman y cols. (8), Vine y cols. (9). Fraga y cols. (10).

En la población estudiada no se encontró diferencia significativa relacionada con la cantidad diaria de cigarrillos consumidos, a diferencia de lo

publicado por Saaranen y cols. (11) quienes encontraron una tendencia a la disminución en la concentración espermática a medida que aumenta el consumo diario de cigarrillos.

En cuanto a la morfología espermática se observó incremento de formas anormales en hombres fumadores. La diferencia de los valores promedios de espermatozoides morfológicamente normales fue de más del 3% entre fumadores y no fumadores 6.7 % vs 10.3 % y 6.9 % vs 10.3 % (Figura 2). Estas observaciones están de acuerdo con lo publicado por Mak y cols. (12) quienes observaron en semen de hombres fumadores, un aumento en el porcentaje de espermatozoides con alteraciones morfológicas y con resto citoplasmático a nivel del cuello espermático.

Se observó un aumento importante de células germinales en el semen de hombres fumadores, con marcado incremento del arresto espermatogé-

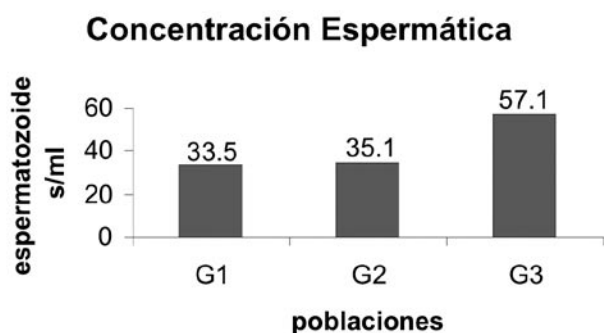


FIGURA 1. Concentración espermática promedio (10⁶ /ml) en las poblaciones: G1: fumadores de más de 20 cig/día, G2: fumadores de menos de 20 cig/día, G3: no fumadores.

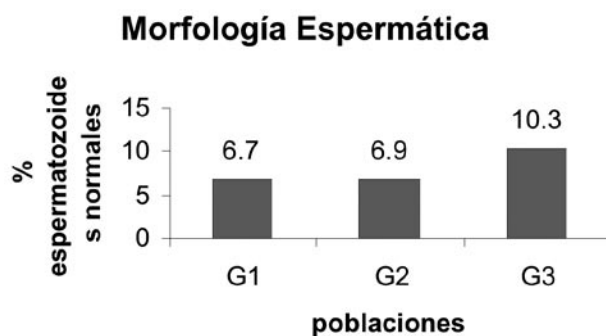


FIGURA 2. Morfología espermática promedio (% espermatozoides normales) en G1: fumadores de más de 20 cig/día, G2: fumadores de menos de 20 cig/día, G3 no fumadores.

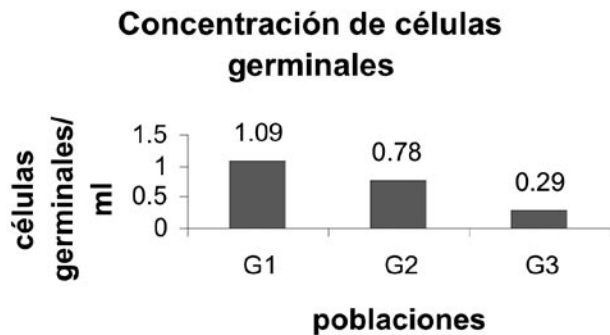


FIGURA 3. Concentración de células germinales promedio (10^6 /ml) en G1: fumadores de más de 20 cig/día, G2 : fumadores de menos de 20 cig/día y G3 no fumadores.

nico a medida que aumenta el consumo diario de cigarrillos. (Figura 3). El humo del tabaco contiene aproximadamente 4.000 compuestos, como alcaloides, nitrosaminas y moléculas inorgánicas, muchas de estas sustancias son especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. (1).

El aumento de especies reactivas de oxígeno en hombres fumadores genera estrés oxidativo, con incremento de citoquinas proinflamatorias, que alteran la regulación de la espermatogénesis y la viabilidad espermática (13). Consideramos que el tabaquismo es un factor muy importante en la infertilidad masculina y debe ser evaluado al realizar el estudio integral del hombre infértil.

BIBLIOGRAFÍA y LECTURAS RECOMENDADAS (*lectura de interés y **lectura fundamental)

- *1. REY, R.; GOTTLIEB, S.; COPELLI, S.: "Regulación de la espermatogénesis de la embriogénesis a la vida adulta". Boletín Informativo Soc. Arg. Andrología, 12: 28, 2003.

2. DE LA PARRA, I.; OIZEROVICH, S.; ESCOBAR, M.E.: "Alteraciones del eje reproductivo por enfermedades crónicas o sistémicas, sustancias tóxicas y drogas ilícitas". Reproducción Humana, 2: 21, 2002.
- **3. WORLD HEALTH ORGANIZATION.: "Who laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical-mucus interaction". Cambridge University Press. Cambridge, 1999.
- *4. CALAMERA, J.C.: "Morfología espermática para todos". Ediciones científicas Dr. José Montes (ed). Montevideo Uruguay. 1, 1999.
- *5. KRUGER, T.F.; ACKERMAN, S.B.; SIMMONS, K.F. y cols.: "A quick reliable staining technique for sperm morphology". Arch. Androl., 18: 275, 1987.
- **6. GATTI, V.; BOUVET, B.; SOLIS, E. y cols.: "Diferenciación de células redondas en semen". Boletín Informativo de la Sociedad Argentina de Andrología, 6: 79, 1997.
- **7. BOUVET, B.; BRUFMAN, A.; GATTI, V. y cols.: "Cellular sub-population in semen". BIOCELL, 24: 164, 2000.
8. STILLMAN, R.J.; ROSENBERG, M.J.; SACHS, B.P.: "Smoking and reproduction". Fertil Steril, 46: 545, 1986.
9. VINE, M.F.; MARGOLIN, B.H.; HOWARD, I.M. y cols.: "Cigarette smoking and sperm density. A meta analysis". Fertil Steril, 61: 35, 1994.
10. FRAGA, C.G.; MOTCHNIK, P.A.; WYROBEK, A.J. y cols.: "Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA". Mutation Res., 351: 199, 1996.
11. SAARANEN, M.; SUONIO, S.; KAUKANEN, O. y cols.: "Cigarette smoking and semen quality in men f reproductive age". Andrología, 19: 670, 1987.
12. MAK, V.; JARVE, K.; BUCKSPAN, M. y cols.: "Smoking is associated with the retention of cytoplasm by human spermatozoa". Urology, 56: 463, 2000.
13. RAMADAN, A.; SALEH, M.D.; ASHOK AGAWAL, P.H.D. y cols.: "Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study". Fertility and Sterility, 78: 491, 2002.