

USO DE LA TÉCNICA DE TINCIÓN GIEMSA MODIFICADA PARA EVALUAR LA INTEGRIDAD ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES DE MAMÍFEROS (NOTA TECNICA)

USE OF THE MODIFIED GIEMSA STAINING TECHNIQUE TO EVALUATE ACROSOMAL INTEGRITY IN MAMMALIAN SPERMES (TECHNICAL NOTE)

Adrian Emmanuel Iglesias-Reyes¹, Jesús Alberto Guevara-González², Osvaldo López-Díaz², Alda Rocío Ortiz-Muñiz³, Rubén Huerta-Crispín⁴, María de Lourdes Juárez-Mosqueda⁵ y Alejandro Córdova-Izquierdo^{2}*

¹Maestría en Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. ²Departamento de Producción Agrícola y Animal. AM-Xochimilco. ³Departamento de Ciencias de la Salud UAM-Iztapalapa. ⁴Facultad de Veterinaria. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. ⁵Departamento de Morfología. FMVZ-UNAM.

*Autor de correspondencia: *acordova@correo.xoc.uam.mx*

RESUMEN

Es importante diseñar técnicas eficientes, prácticas y fáciles de realizar para valorar la integridad acrosomal (VIA) de los espermatozoides (EPZ). El objetivo fue evaluar la modificación de la técnica de tinción Giemsa para valoración de VIA en EPZ de mamíferos. Se evaluaron 140 laminillas con EPZ de 4 diferentes mamíferos (bovinos, ovinos, porcinos y humanos), se dividieron en dos grupos (70 laminillas por grupo). El primer grupo, evaluó VIA con la técnica clásica de tinción Giemsa y el segundo, con la técnica modificada de Giemsa. Se compararon las medias de VIA y los tiempos de cada una de las técnicas. No hubo diferencia entre las medias de VIA en ambas técnicas; la técnica modificada redujo en 90 minutos el tiempo de realización y mejor claridad de la imagen. En conclusión, la técnica de tinción modificada disminuye el tiempo de valoración de VIA y muestra una mejor nitidez de la imagen.

Palabras clave: Espermatozoides de mamíferos; espermatozoides ; Giemsa; integridad acrosomal; valoración

ABSTRACT

It is important to design efficient, practical, and easy-to-perform techniques to assess the acrosomal integrity (AAI) of sperm antes de (SPZ). The objective was to evaluate the modification of the Giemsa staining technique for AAI assessment in mammalian SPZ. One hundred forty SPZ flakes from 4 different mammals (cattle, sheep, pigs and humans) were evaluated, they were divided into two groups (70 flakes per group). In the first group, AAI was evaluated with the classical Giemsa staining technique and the second with the modified Giemsa technique. The AAI means and the times of each of the techniques were compared. There was no difference between the AAI means in both techniques; the modified technique reduced the execution time and improved image clarity by 90 minutes. In conclusion, the modified staining technique decreases the AAI assessment time and shows better image sharpness.

Key words: Acrosomal integrity; assessment; Giemsa; mammalian sperm; sperm

INTRODUCCIÓN

La conservación de semen puede causar daños en la estructura de los espermatozoides (EPZ) o cambios en la distribución de enzimas en las membranas, disminuyendo su capacidad fecundante [8]. Para conocer esto se han creado diversas pruebas en el laboratorio que están basadas exclusivamente en la evaluación de la estructura celular, permitiendo valorar adecuadamente una muestra seminal y así poder predecir la fertilidad del macho [4, 14]. Las pruebas ideales son aquellas que de forma sencilla y eficaz permiten realizar pruebas diagnósticas para evaluar la capacidad fecundante de un eyaculado [13].

El acrosoma es una estructura ubicada en la parte apical de la cabeza espermática, juega un papel fundamental en la fecundación, ya que los daños en la misma generan la liberación de enzimas de su interior, perdiendo la capacidad de fecundación de los EPZ [1, 13, 18]. La determinación de la valoración de integridad acrosomal (VIA) es uno de los parámetros espermáticos de mayor importancia debido a su papel en la reacción acrosomal (RA) para la fecundación del ovocito, observándose una relación entre el VIA y la tasa de fecundación, por lo que conviene realizar pruebas específicas para la valoración de VIA como una forma de predicción de fertilidad [3, 14].

Existen diversas técnicas que permiten realizar la valoración de VIA, entre las que destacan los métodos fluorescentes, donde se conjugan diversas sustancias de alto costo y complicadas de conseguir, con equipo especializado, haciendo a estas técnicas poco comunes de realización [11, 16]. Debido a esto, se han diseñados otras pruebas utilizadas habitualmente en los laboratorios como práctica de rutina y que son más accesibles, en donde solo se requiere un microscopio de contraste de fases, entre las que se pueden mencionar: Eosina-Nigrosina, Eosina-Verde rápido, Tinción triple, Tinción *Spermac* y Tinción de Giemsa (TG), posiblemente siendo esta última la técnica de tinción más utilizada [2, 3, 15]. El objetivo fue evaluar la modificación de la técnica de tinción Giemsa para valoración de VIA en EPZs de mamíferos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron valoradas por una sola persona especializada la VIA de 140 laminillas con EPZ de 4 diferentes especies de mamíferos: bovinos (*Bos taurus*), ovinos (*Ovis aries*), porcinos (*Sus scrofa domestica*) y humanos (*Homo sapiens*). En bovinos y ovinos, las muestras fueron obtenidas de semen descongelado, para las muestras de porcinos fue de semen diluido y para el semen de humanos, estas fueron de semen fresco.

Las laminillas se dividieron en dos grupos con 70 laminillas cada uno. El primer grupo, fue teñido con la metodología clásica de TG para valorar VIA, propuesta por Watson y Martín [19]. El segundo grupo, una vez seco el frotis de EPZ, el proceso de fijación se llevó a cabo mediante la adición de alcohol etílico de 96°, el cual se adicionó con una inclinación en la laminilla de 35° a chorro lento y continuo durante 5 segundos (seg). (FIG. 1) y se dejó secar en un agitador de placa calentadora de cerámica (marca y fabricante Wigger Hauser, modelo MSC-400 Margnetic stirrer, Alemania) a 36 °C hasta que el alcohol se deshidrató por completo. Posteriormente, se agregó la TG (Sigma-Aldrich)

previamente preparado con 0,6 gramos(g) de Giemsa, en 20 mililitros (mL) de agua destilada y se mantuvo durante 15 minutos (min), posteriormente se enjuagó con agua destilada, a chorro lento y continuo con una inclinación de la laminilla de 35°, procurando que el chorro no toque la porción donde se encuentra el frotis de EPZ FIG. 1 dejándose secar en una platina durante 2 min a 36 °C. La evaluación de VIA se realizó, al microscopio óptico (marca OPTISUM, modelo: MIC440 fabricante DESEGO, México) en el objetivo de 1000X con aceite de inmersión. Para ambos, se contaron 200 EPZ por laminilla y se obtuvo el porcentaje de VIA, observando si existían diferencias en la nitidez de las estructuras acrosomales.

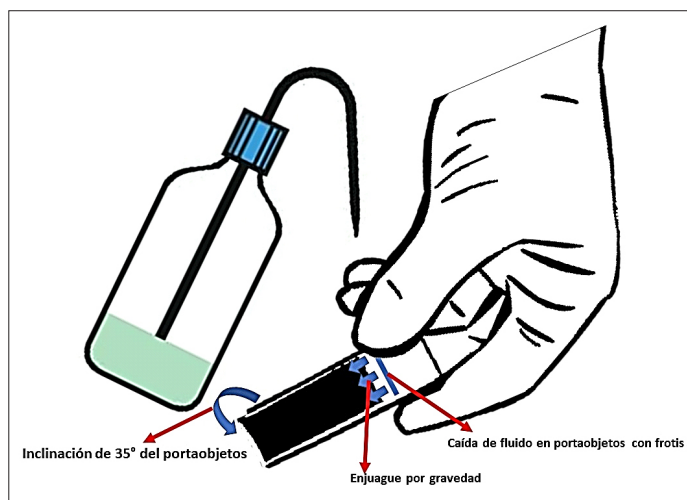


FIGURA 1. TÉCNICA DE COLOCACIÓN DE ALCOHOL DE 96° PARA FIJACIÓN DEL FROTIS Y ENJUAGUE CON AGUA DESTILADA

Se compararon las medias de porcentajes de VIA y se valoró el tiempo de realización de la técnica en ambos grupos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto a VIA, no hubo diferencia entre ambos grupos, lo cual significa que se puede utilizar la técnica de TG modificada, obteniendo buena medición de VIA; por otro lado, también se pudo observar que la técnica modificada reduce en 90 min el tiempo de tinción de VIA, al no colocarse durante 90 min en la TG y 15 min en el formaldehído al 5%, como se debe hacer en la técnica original (TABLA I); se puede decir que la técnica de TG modificada, es eficiente, rápida y sencilla de realizar, cumpliendo las características que indicaron [13] de las técnicas de laboratorio para evaluación de semen.

La modificación de la técnica de TG no es afectada por los diluyentes de congelación, lo cual puede ser observado en las FIGS. 2 (2-B y 3-B), en las cuales se utilizó semen de bovino y ovino descongelado, obteniendo mejor nitidez de la imagen del acrosoma con la técnica de TG modificada; así como lo indicaron Muño y col. [12], quienes mencionan que la mayoría de las tinciones empleadas para microscopía óptica, no son adecuadas para la evaluación de semen, ya que requieren el uso de fijadores, como formaldehído o glutaraldehído, que suelen interferir con los diluyentes utilizados para la congelación, dificultando de manera

TABLA I
PARÁMETROS COMPARATIVOS DE AMBAS TÉCNICAS DE TINCIÓN GIEMSA

Parámetros	Técnica De Tinción Con Giemsa	
	Clásica	Modificada
Media	90, 157%	90, 928%
Desviación Estándar	5.1404%	4.8434%
Primer Cuartil	88%	89%
Segundo Cuartil	91%	91%
Tercer Cuartil	94%	94%
Tiempo De Realización	115 Min	25 Min

importante el análisis.

En las FIGS. 2 (1-B, 2-B, 3-B y 4-B) se puede observar que al utilizar la técnica de TG modificada se tiene una mejor nitidez de la imagen de VIA, a comparación de los EPZ teñidos con la técnica original (FIG. 2 (1-A, 2-A, 3-A y 4-A)), por lo que el alcohol de 96° utilizado, cumple un papel sumamente importante al permitir la fijación de EPZ en el frotis para su tinción; esto puede ser debido al uso del alcohol de 96° como fijador del frotis, como lo indicaron González y col. [6, 7] los cuales mostraron que el alcohol de 96° es un buen fijador que conserva sin alterar componentes celulares, pero con escasa penetración, por lo que se utiliza para fijar extendidos citológicos, en los cuales se utiliza en spray durante pocos segundos (seg) y se deja secar al aire, permitiendo fijar la muestra obtenida y posteriormente colocar la tinción [10], coincidiendo con Juárez y col. [9], que utilizaron alcohol de 70° en conjunto con alcohol de 96° y su combinación con otros reactivos para la evaluación de la morfología normal del EPZ, mientras que varios autores [5, 17] utilizaron el alcohol de 96° para fijar muestras de EPZ humanos, poder observar el grado de madurez nuclear y morfología espermática obteniendo buenos resultados.

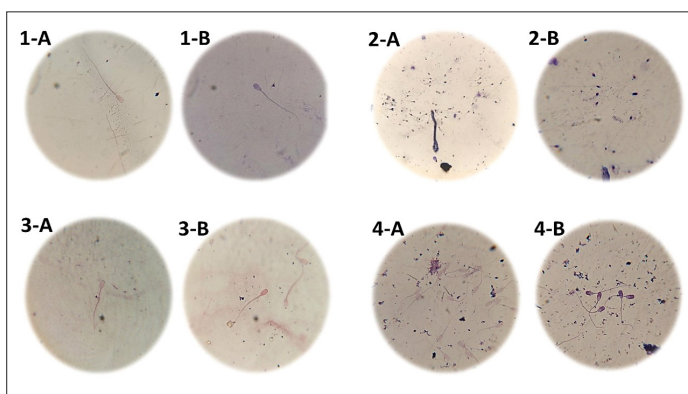


FIGURA 2. FOTOGRAFÍA DE NAR CON EPZS DE BOVINOS, PORCINOS, HUMANOS Y OVINOS OBSERVADO CON MICROSCOPIO ÓPTICO A 1000X 1-A

EPZs de bovinos teñidos con técnica de tinción Giemsa clásica y 1-B EPZs de bovinos teñidos con la modificada. 2-A EPZs de humanos teñidos con técnica de tinción Giemsa clásica y 2-B EPZs de humanos teñidos con la modificada. 3-A EPZs de ovinos teñidos con técnica de tinción Giemsa clásica y 3-B EPZs de

ovinos teñidos con la modificada. 4-A EPZs de porcinos teñidos con técnica de tinción Giemsa clásica y 4-B EPZs de porcinos teñidos con la modificada.

CONCLUSIONES

La técnica de TG modificada disminuye el tiempo de valoración de VIA y muestra mejor nitidez de la imagen del acrosoma al momento de la observación.

AGRADECIMIENTO

Al laboratorio de análisis clínicos y al laboratorio de Histopatología Veterinaria de la Universidad Autónoma Metropolitana Unida Xochimilco por las facilidades brindadas para la realización del trabajo de laboratorio. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México por el apoyo para la beca de Maestría en Ciencias Agropecuarias con número de registro 624422, proporcionada al primer autor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ATUESTA, BJE; GRAJALES, LHA; LÓPEZ, BM. Evaluación de la integridad de la membrana acrosomal a inducción física y química de la reacción acrosómica en EPZs de conejos línea Caldes. **Rev. Spei Domus** 8: 16-28. 2012.
- [2] BERNARDI, SF; ALLENDE, R; MAZZEO, MJ; MARINI, PR. Evaluación de los cambios ocasionados en EPZs bovinos por apariciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. **Invest. Vet.** 13: 25-38. 2011.
- [3] BONET, S; MARTÍNEZ, E; RODRÍGUEZ, EJ; BARRERA, X. Técnicas de análisis rutinario de la calidad espermática: motilidad, viabilidad, concentración, resistencia osmótica y morfología espermática. **Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino**. Universidad de Girona. Red Temática Nacional de Reproducción Porcina. Pp 19-38. 2006.
- [4] DÍAZ, FO; MESA, H; VALENCIA, MJG; GÓMEZ, LGH; URIBE, FJ. Evaluación de la integridad acrosomal y la funcionalidad bioquímica de la membrana espermática en cerdos productores con gotas citoplasmáticas persistentes. **Rev Científ FCV-LUZ**. XIX (5): 500-505. 2009.

- [5] FERNÁNDEZ, VR; HORTAS, NML; CASTILLA, JA; LÓPEZ, TCM; VALLADARES, MJC; ALAMINOS, MM; RUIZ, MA; CASTEJÓN, CFJ; SÁNCHEZ, LT. Alteraciones de la madurez nuclear en EPZs de varones con antecedentes de criptorquidia. **Cirug. Pediát.** 14: 95-97. 2001.
- [6] GONZÁLEZ, VA; MAC, DM; GROSMAN, G. Normas para el procedimiento de registro, rotulación, traslado y recepción de biopsias y citología al servicio de anatomía patología del Hospital Provincia Neuquen. Metodología en elaboración de Guías de Prácticas Clínicas. Comité de Docencia e Investigación. Pp. 1-17. 2015.
- [7] GORODNER, OZ. Técnicas histológica. **Histología: métodos e instrumentos de estudio de la histología.** Universidad Nacional del Noreste. Facultad de Medicina. Pp. 1-13. 2013.
- [8] HERNÁNDEZ, CL; QUINTERO, MA; CAMARGO, RO; ROJAS, LM. Evaluación de la integridad funcional y estructura de EPZs caprinos criopreservados mediante diluyentes comerciales. **Rev. Científ. FVC-LUZ.** XXVII: 35-43. 2017.
- [9] JUÁREZ, DPF; DE-DIOS, VMD; SAGRERA, RJ; GUTIÉRREZ, HPR. Reversión de vasectomía con criopreservación sistemática de EPZs testiculares. **Rev. Intern. Androl.** 7: 215-221. 2009.
- [10] LÓPEZ, CP; CASASBUENAS, AJ. La biopsia y la citología, pilares del diagnóstico médico (II parte). **Rev. Méd. Sanitas** 18: 82-89. 2015.
- [11] MONTESINOS, IS; CARVALHO, JO; MALAQUIAS, JV; ARNHOLD, E; FRENEAU, GE; DODE, M; FIORAVANTI, MCS; SERENO, JRB. Evaluación del semen criopreservado de toros Curraleiro Pé Duro, pertenecientes al banco brasilero de Germoplasma Animal. **Anim. Genet. Res.** 54: 135-140. 2014.
- [12] MUIÑO, R; FERNÁNDEZ, M; AREÁN, H; VIANA, JL; LÓPEZ, M; FERNÁNDEZ, A; PEÑA, AI. Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. **ITEA.** 101: 175-191. 2005.
- [13] OSORIO, SRE; GIRALDO, JF; MESA, H; GÓMEZ, LG; HENAO, UFJ. Evaluación de la integridad acrosómica en el semen de verraco. **Vet. Zoot.** 1: 41-47. 2007.
- [14] PUENTE, MA; RODRÍGUEZ, D; TATAGLIONE, M. Viabilidad y estado acrosomal en EPZs de conejo. **Rev. Vet. Argen** 33: 1-7. 2016.
- [15] RESTREPO, BG; ÚSUGA, SA; ROJANO, BA. Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino. **Rev. CES Med. Vet. Zoot.** 8: 115-127. 2013.
- [16] RESTREPO, BG; VARELA, GE; USUGA, SA. Evaluación de la calidad espermática epididimal en hipopótamos *hippopotamus amphibius* (artiodactyla: hippopotamidae) ubicados en el magdalena medio, Colombia. **Acta Zool. Mex.** 32: 158-167. 2016.
- [17] SÁNCHEZ, SEM; OLÁEZ, HJR; ÁVILA, CA; LÓPEZ, ML; SÁNCHEZ, RSH. Alteraciones en el semen de pacientes con problemas de infertilidad. **Arch. Med.** 10: 1-17. 2014.
- [18] UGARELLI, A; EVANGELISTA, VS; SANTIANI, A. Evaluación de la integridad acrosomal en EPZs epididimarios de Alpaca mediante Citometría de Flujo. **Rev. Invest. Perú** 28: 130-140. 2017.
- [19] WHATSON, PF; MATIN, ICA. A comparison of changes in the acrosome of Deep-frozen ram and bull spermatozoa. **J. Reprod. Fertil** 28: 99-101. 1972.