







Abanico Veterinario. Enero-Diciembre 2019; 9:1-8. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2019.927>
 Artículo Original. Recibido: 15/04/2019. Aceptado: 09/12/2019. Publicado: 16/12/2019.

Evaluación de la técnica modificada de tinción Giemsa en la valoración acrosomal de espermatozoides de mamíferos

Evaluation of the modified Giemsa staining technique in the acrosomal evaluation of mammalian sperm

Iglesias-Reyes Adrian¹ , Guevara-González Jesús¹ , López-Díaz Osvaldo¹ ,
 Guerra-Liera Juan² , Huerta-Crispín Rubén³ , Sánchez-Sánchez Raúl⁴ ,
 Córdova-Izquierdo Alejandro^{*1} 

¹Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, México, CDMX. ²Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Sinaloa, México. ³Facultad de Veterinaria. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. ⁴Departamento Reproducción Animal Instituto Nacional de Investigación Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid, España. *Autor responsable y de correspondencia: Alejandro Córdova Izquierdo. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Calz. Del Hueso 1100 Col. Villa Quietud C.P. 05960, Coyoacán, CDMX. México. proyo_manuel@hotmail.com, jaggnutricion@yahoo.com.mx, mvz.osvaldo.ld@gmail.com, juan_eulogio_guerra_liera@hotmail.com, rubenhuertac@live.com.mx, raulss@inia.es, acordova@correo.xoc.uam.mx.

RESUMEN

Es importante diseñar técnicas eficientes, prácticas y fáciles de realizar para valorar la integridad acrosomal de los espermatozoides. El objetivo fue evaluar la técnica modificada de tinción Giemsa para valoración del borde apical normal (NAR) en espermatozoides de mamíferos. Se evaluaron 140 laminillas de espermatozoides de 4 diferentes mamíferos (bovinos, ovinos, porcinos y humanos), se dividieron en dos grupos (70 laminillas por grupo). El primer grupo, se evaluó NAR con la técnica clásica de tinción Giemsa y el segundo, con la técnica modificada de Giemsa. Se compararon los porcentajes de acrosomas NAR y los tiempos de cada una de las técnicas. No hubo diferencia entre las medias de acrosomas NAR en ambas técnicas ($p < 0.05$); sin embargo, mientras la técnica convencional tarda 115 min, el tiempo de realización de la técnica modificada fue de 35 minutos, reduciendo el tiempo 80 minutos, con una mejor claridad de la imagen. En conclusión, la técnica de tinción modificada disminuye el tiempo de valoración de NAR y muestra una mejor nitidez de la imagen.

Palabras clave: espermatozoides de mamíferos, Giemsa, integridad acrosomal.

ABSTRACT

It is important to design efficient, practical and easy to perform techniques to assess the acrosomal integrity of the sperm. The objective was to modify the Giemsa staining technique for acrosomal NAR assessment in mammalian sperm. A total of 140 lamellae of spermatozoa from 4 different mammals (bovine, ovine, porcine and human) were evaluated, divided into two groups (70 lamellae per group). The first group was evaluated acrosomal NAR with the classic technique of Giemsa staining and the second, with the modified Giemsa technique. The means of acrosomal NAR and the times of each of the techniques were compared. There was no difference between the means of acrosomal NAR in both techniques ($p < 0.05$); however, while the conventional technique takes 115 minutes, the time of realization of the modified technique was 35 minutes, reducing the time 80 minutes, with better image clarity. In conclusion, the modified staining technique decreases the NAR titration time and shows a better sharpness of the image.

Keywords: mammal sperm, Giemsa, acrosomal integrity.

INTRODUCCIÓN

La congelación de semen puede causar daños en la estructura de los espermatozoides, o cambios en la distribución de enzimas en las membranas; disminuyendo su capacidad fecundante (Hernández *et al.*, 2017). 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 (Díaz *et al.*, 2009; Puente *et al.*, 2016). Las pruebas ideales son aquellas que de forma sencilla y eficaz permiten realizar pruebas diagnósticas para evaluar la capacidad fecundante de un eyaculado (Osorio *et al.*, 2007).

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 espermatozoides (Osorio *et al.*, 2007; Atuesta *et al.*, 2012; Ugarelli *et al.*, 2017); por lo que es importante valorar la integridad acrosomal de los espermatozoides. El acrosoma es una vesícula secretoria del espermatozoide que contiene diferentes enzimas, especialmente acrosina, responsables de la digestión del cumulus oophorus y de la zona pelúcida.

La morfología normal del acrosoma tiene un borde apical normal (NAR, normal apical ridge), La determinación de NAR es uno de los parámetros espermáticos de mayor importancia, debido a su papel en la reacción acrosomal para la fecundación del ovocito: observándose una relación entre el NAR y la tasa de fecundación, por lo que conviene realizar pruebas específicas para la valoración de NAR, como una forma de predicción de fertilidad (Bonet *et al.*, 2006; Nieto, 2010; Puente *et al.*, 2016).

Existen diversas técnicas que permiten realizar la valoración de NAR, 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 realizar (Montesinos *et al.*, 2014; Restrepo *et al.*, 2016). Debido a esto, se han diseñado otras pruebas utilizadas habitualmente en los laboratorios, como práctica de rutina y que son más accesibles, en donde sólo 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; posiblemente siendo esta última la técnica de tinción más utilizada (Bonet *et al.*, 2006; Bernardi *et al.*, 2011; Restrepo *et al.*, 2013). Debido a lo anterior, es importante diseñar técnicas eficientes, prácticas y fáciles de realizar para valorar NAR de los espermatozoides.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la técnica modificada de tinción de Giemsa, para la valoración de NAR en espermatozoides de mamíferos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ubicación. El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Análisis Clínicos y Laboratorio de Histopatología Veterinaria de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, durante los meses de agosto a septiembre de 2018.

Población y muestra. Se valoró NAR de 140 laminillas de espermatozoides de 4 diferentes especies de mamíferos: bovinos (20), ovinos (40), porcinos (50) y humanos (30). En bovinos y ovinos, las muestras fueron obtenidas de semen descongelado, para las muestras de porcinos fue de semen diluido en diluyente comercial MRA[®], se usó dos días después de su extracción; y para el semen de humanos, éstas fueron de semen fresco.

Metodologías de la tinción. Las laminillas se dividieron en dos grupos, con 70 laminillas cada uno; el primer grupo, fue teñido con la metodología clásica de tinción Giemsa, para valorar NAR, propuesta por [Watson y Martín \(1972\)](#).

El segundo grupo, fue teñido con la técnica de tinción Giemsa modificada; donde el procedimiento fue el siguiente: una vez seco el frotis de espermatozoides, 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 continuó durante cinco segundos (figura 1), y se dejó secar en una platina a 36 °C, hasta que el alcohol se deshidrató por completo. Posteriormente se agregó la tinción de Giemsa (Sigma-Aldrich), previamente preparado con 0.6 g de Giemsa, en 20 ml de agua destilada, y se mantuvo durante 25 minutos; enseguida se lavó con agua destilada, a chorro lento y siguió con una inclinación de la laminilla de 35°, procurando que el chorro no tocara la porción donde se encontraba el frotis de espermatozoides (figura 1), dejándose secar en una platina durante dos minutos a 36 °C. La evaluación de NAR se realizó al microscopio óptico en el objetivo de 1000X con aceite de inmersión. El criterio de evaluación del acrosoma fue en clasificar como NAR, aquellos espermatozoides en los cuales el capuchón estaba suavemente adherido al núcleo y poseían un borde apical que formaba una creciente suave.

Evaluación y análisis estadístico. Para ambos grupos, se contaron 200 espermatozoides por laminilla, y se obtuvo el porcentaje de acrosomas NAR, observando si existían diferencias en la nitidez (mejor calidad de la imagen en la membrana acrosomal y borde apical del acrosoma) de las estructuras acrosomales y el tiempo de realización de la técnica en ambos grupos. Se realizó un análisis descriptivo de cada una de las especies en estudio; además de una prueba t-student para el contraste de medias ($p < 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 20.0 ([IBM, 2011](#)).

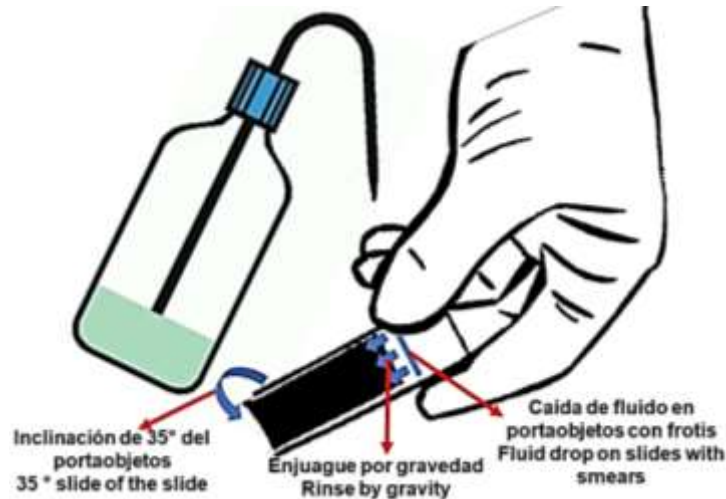


Figura 1. Técnica de colocación de alcohol de 96° para fijación del frotis y enjuague con agua destilada.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestra la fijación del frotis, y en la figura 2 se muestran las fotografías de acrosomas NAR con espermatozoides de bovinos, porcinos, humanos y ovinos, observado con microscopio óptico a 1000X. En las imágenes se observa que en la técnica de tinción Giemsa modificada, la imagen se aprecia más nítida, con membranas acrosomales y bordes apicales acrosomales mejor teñidos; también la cabeza, cuerpo y cola espermática se observan con una mejor definición.

Tabla 1. Medias de acrosomas NAR con tinción Giemsa tradicional y modificada de espermatozoides de bovinos, porcinos, humanos y ovinos

	Tratamientos	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
Bovino	Original	10	83.200	7.4803	2.3655
	Modificado	10	84.600	7.4416	2.3532
Porcino	Original	25	89.320	2.6255	.5251
	Modificado	25	90.800	2.2361	.4472
Humano	Original	15	90.333	3.2440	.8376
	Modificado	15	90.133	3.4614	.8937
Ovino	Original	20	94.550	2.5021	.5595
	Modificado	20	94.850	2.4554	.5490

No se encontró diferencia en los porcentajes de las medias ($p > 0.05$).

No hubo diferencia entre las medias de acrosomas NAR en ambas técnicas de tinción; sin embargo, mientras la técnica convencional tarda 115 minutos, el tiempo de realización de la técnica modificada fue de 35 minutos; reduciendo el tiempo 80 minutos, con una mejor claridad de la imagen.

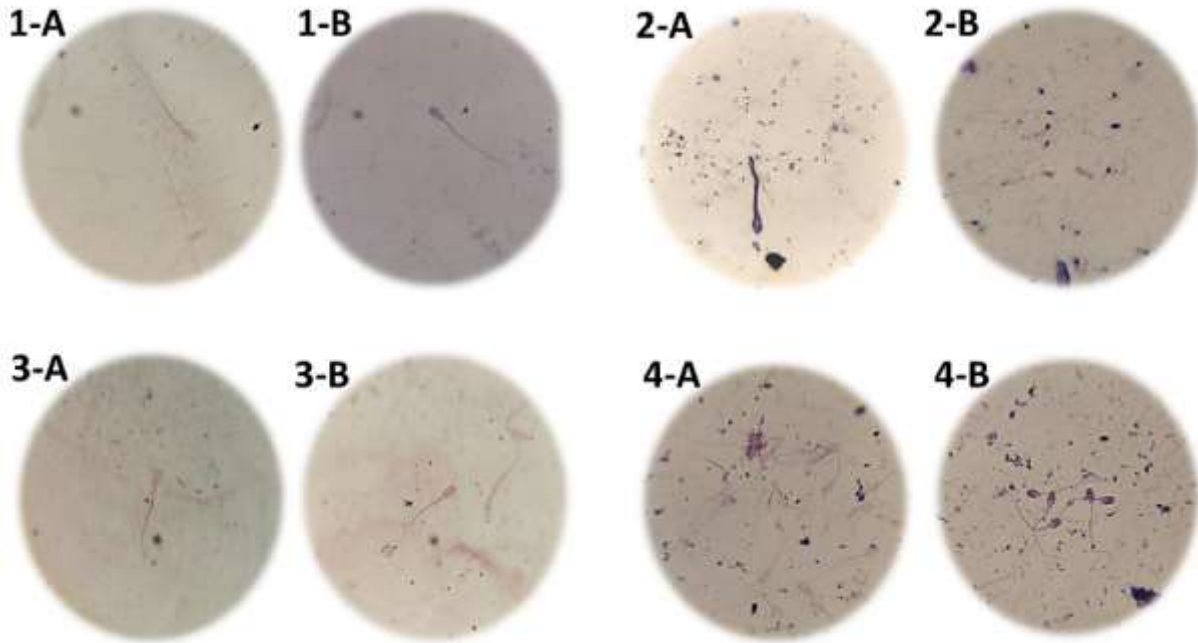


Figura 2. Fotografía de NAR con espermatozoides de bovinos, porcinos, humanos y ovinos, observado con microscopio óptico a 1000X. 1-A espermatozoides de bovinos teñidos con técnica de tinción Giemsa clásica y 1-B espermatozoides de bovinos teñidos con la tinción Giemsa modificada. 2-A espermatozoides de humanos teñidos con técnica de tinción Giemsa clásica y 2-B espermatozoides de humanos teñidos con la tinción Giemsa modificada. 3-A espermatozoides de ovinos teñidos con técnica de tinción Giemsa clásica y 3-B espermatozoides de ovinos teñidos con la tinción Giemsa modificada. 4-A espermatozoides de porcinos teñidos con técnica de tinción Giemsa clásica y 4-B espermatozoides de porcinos teñidos con la tinción Giemsa modificada.

DISCUSIÓN

En cuanto a acrosomas NAR, no hubo diferencia del porcentaje de las medias entre ambos grupos, lo cual significa que se puede utilizar la técnica de tinción Giemsa modificada, obteniendo buena valoración de acrosomas NAR; por otro lado, también se puede observar que la técnica tinción Giemsa modificada, reduce en 80 minutos el tiempo de tinción de acrosomas NAR, al no colocarse durante 90 minutos en la tinción Giemsa y 15 minutos en el formaldehído al 5 %, como en la técnica original. Se puede decir que la técnica de tinción Giemsa modificada, es eficiente, rápida y sencilla de realizar; cumpliendo las características que indicaron [Osorio et al. \(2007\)](#) de las técnicas de laboratorio para evaluación del semen.

La modificación de la técnica de tinción Giemsa, no es afectada por los diluyentes de congelación, lo cual puede ser observado en la figura 2, en 1-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 tinción Giemsa modificada; así como lo indica [Muiño et al. \(2005\)](#), el cual menciona 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 importante el análisis.

En la figura 2, en 1-B, 2-B, 3-B y 4-B se puede observar que al utilizar la técnica de tinción de Giemsa modificada, se tiene una mejor nitidez de la imagen de acrosomas NAR, a comparación de los espermatozoides teñidos con la técnica original como se observa en la figura 2 en 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 espermatozoides en el frotis para su tinción; esto puede ser debido al uso del alcohol de 96° como fijador del frotis, como lo menciona [González et al., \(2015\)](#) y [Gorodner, \(2013\)](#), 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.

El alcohol de 96° es utilizado en aspersion durante pocos segundos y el frotis se deja secar al aire, permitiendo fijar la muestra obtenida y posteriormente colocar la tinción ([López y Casasbuenas, 2015](#)); coincidiendo con [Juárez et al., \(2008\)](#), que menciona el uso del alcohol de 70° en conjunto con alcohol de 96° y su combinación con otros reactivos (xilol, formaldehído, etc.) para la evaluación de la morfología normal del espermatozoide; mientras que [Fernández et al. \(2001\)](#) y [Sánchez et al., \(2014\)](#) utilizaron el alcohol de 96° para fijar muestras de espermatozoides humanos y poder observar el grado de madurez nuclear y morfología espermática, obteniendo buenos resultados.

CONCLUSIÓN

La técnica de tinción Giemsa modificada disminuye el tiempo de valoración de la integridad acrosomal y muestra mejor nitidez de la imagen del acrosoma al momento de la observación.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de análisis clínicos y al Laboratorio de Histopatología Veterinaria de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco por las facilidades brindadas para la realización del trabajo de laboratorio. Al CONACyT por el apoyo de la beca de Maestría en Ciencias Agropecuarias con número de registro 624422, proporcionada al primer autor.

LITERATURA CITADA

ATUESTA BJE, Grajales LHA, López BM. 2012. Evaluación de la integridad de la membrana acrosomal a la inducción física y química de la reacción acrosómica en espermatozoides de conejos línea Caldes. *Revista Spei Domus*. 8 (16): 16-28. ISSN 1794-7928. <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/view/843>

BERNARDI SF, Allende R, Mazzeo MJ, Marini PR. 2011. Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. *Investigación Veterinaria*. 13: 25-38. ISSN 1668-3498. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1668-34982011000200003&lng=es&nrm=iso

BONET S, Martínez E, Rodríguez EJ, Barrera X. 2006. Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino. Universidad de Girona. Red Temática Nacional de Reproducción Porcina. Pp. 306. ISBN: 978-84-8458-241-0 84-8458-241-8.

DÍAZ FO, Mesa H, Valencia MJG, Gómez LGH, Uribe FJ. 2009. Evaluación de la integridad acrosomal y la funcionalidad bioquímica de la membrana espermática en cerdos productores con gotas citoplasmáticas persistentes. *Revista Científica FCV-LUZ*. 19 (5): 500-505. ISSN 0798-2259. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95911615010>

FERNÁNDEZ VR, Hortas NML, Castilla JA, López TCM, Valladares MJC, Alaminos MM, Ruiz MA, Castejón CFJ, Sánchez LT. 2001. Alteraciones de la madurez nuclear en espermatozoides de varones con antecedentes de criptorquidia. *Cirugía Pediátrica*. 14: 95-97. ISSN: 0214-1221. <https://www.secipe.org/coldata/upload/revista/2001;14.95-97.pdf>

GONZÁLEZ VA, Mac DM, Grosman G. 2015. 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. <http://www.saludneuquen.gob.ar/wp-content/uploads/2016/10/35-NORMAS-PROCEDIMIENTO-REGISTRO-HPN-2015.pdf>

GORODNER OZ. 2013. Histología: métodos e instrumentos de estudio de la histología parte 1: Técnicas histológica. Universidad Nacional del Noreste. Facultad de Medicina. 2013: 1-13. https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/histologia_med_cat2/GUIA%201%20%202013.pdf

IBM Corp. 2011. IBM SPSS Statistics para Windows, Versión 20.0. Armonk, Nueva York: IBM Corp

HERNÁNDEZ CL, Quintero MA, Camargo RO, Rojas LM. 2017. Evaluación de la integridad funcional y estructura de espermatozoides caprinos criopreservados mediante diluyentes comerciales. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 27 (1): 35-43. ISSN 0798-2259. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95950495006>

JUÁREZ DPF, De-Dios VMD, Sagrera RJD, Gutiérrez HPR. 2008. Reversión de vasectomía con criopreservación sistemática de espermatozoides testiculares. *Revista Internacional de Andrología*. 7: 215-221. ISSN: 1698-031X. [http://dx.doi.org/10.1016/S1698-031X\(09\)73389-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1698-031X(09)73389-8)

LÓPEZ CP, Casasbuenas AJ. 2015. La biopsia y la citología, pilares del diagnóstico médico (II parte). *Revista Médica Sanitas*. 18 (2): 82-89. ISSN 0123-4250. http://www.unisanitas.edu.co/Revista/55/LA_BIOPSIA_Y_LA_CITOLOGIA.pdf

MONTESINOS IS, Carvalho JO, Malaquias JV, Arnhold E, Freneau GE, Dode MAN, Fioravanti MCS, Sereno JRB. 2014. Evaluación del semen criopreservado de toros

Curraleiro Pé Duro, pertenecientes al banco brasilero de Germoplasma Animal. *Animal Genetic Resources*. 54: 135-140. 2078-6344. <http://dx.doi.org/10.1017/S2078633614000101>

MUIÑO R, Fernández M, Areán H, Viana JL, López M, Fernández A, Peña AI. 2005. Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. *ITEA*. 3: 175-191. ISSN 1699-6887. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1271105>

NIETO DKD. 2010. Técnicas de reproducción asistida. Tinciones para la evaluación de la morfología espermática. Informe de pasantía. Universidad Simón Bolívar. <https://studylib.es/doc/5936981/t%C3%A9cnicas-de-reproducci%C3%B3n-asistida-tinciones-para-la-evalu...>

OSORIO SRE, Giraldo JF, Mesa H, Gómez LG, Henao UFJ. 2007. Evaluación de la integridad acrosómica en el semen de verraco. *Vet.Zootec*. 1 (1): 41-47. ISSN: 2310-2799. <http://vetzootec.ucaldas.edu.co/downloads/v1n1a07.pdf>

PUENTE MA, Rodríguez D, Tataglione M. 2016. Viabilidad y estado acrosomal en espermatozoides de conejo. *Revista Veterinaria Argentina*. 33 (339): 1-7. ISSN: 1852-317X. <https://www.veterinariargentina.com/revista/2016/07/viabilidad-y-estado-acrosomal-en-espermatozoides-de-conejo/>

RESTREPO BG, Úsuga SA, Rojano BA. 2013. Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 8: 115-127. ISSN: 1900-9607. <http://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/2838>

RESTREPO BG, Varela GE, Usuga SA. 2016. Evaluación de la calidad espermática epididimal en hipopótamos *hippopotamus amphibius* (artiodactyla: hippopotamidae) ubicados en el magdalena medio, Colombia. *Acta Zoológica Mexicana*. 32: 158-167. ISSN 2448-8445. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372016000200158&lng=es&nrm=iso

SÁNCHEZ SEM, Oláez HJR, Ávila CA, López ML, Sánchez RSH. 2014. Alteraciones en el semen de pacientes con problemas de infertilidad. *Archivos de Medicina*. 10 (1): 1-17. ISSN-e 1698-9465. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5052080>

UGARELLI A, Evangelista VS, Santiani A. 2017. Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de Alpaca mediante Citometría de Flujo. *Revista de Investigación Perú*. 28: 130-140. ISSN 1609-9117. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i1.12947>

WHATSON PF, Matin ICA. 1972. A comparison of changes in the acrosome of Deep-frozen ram and bull spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 28: 99-101. ISSN 04493087. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0280099>.