

Protocolo SpermBlue®

TINCIÓN PARA EVALUAR LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA DE HUMANOS Y ANIMALES

Principio:

La tinción se ha desarrollado para teñir todas las estructuras del espermatozoide (acrosoma, cabeza, pieza media, pieza principal de la cola y pieza final) de forma diferencial en diferentes intensidades de azul. El procedimiento de la tinción es muy simple y solo implica dos pasos principales, fijar/teñir en un medio (menos de un minuto) y sumergir en agua de tres a seis segundos.

Contenido SpermBlue®:

Todos los paquetes de SpermBlue® contienen un frasco con 250mL con una mezcla de fijador y tinción suficiente para teñir aproximadamente 500 frotis de esperma en el portaobjetos.

Se recomienda que la tinción del frotis se realice en recipientes estandarizados, p. Ej. tarros Coplin de plástico / vidrio.

Si el SpermBlue® se almacena a 4°C durará un año o más. El almacenamiento a temperatura ambiente (20 - 25°C) no está garantizado, pero normalmente dura un año. Tome nota de la fecha de caducidad.

Procedimiento de la tinción:

Para conseguir los resultados óptimos, recomendamos lavar la muestra de semen antes de iniciar el procedimiento [Ej., Mezclar 200µL de muestra sin procesar con 400µL de PBS y centrifugar a 300g durante 10 min. Retirar el sobrenadante y diluir el sedimento con PBS para tener una concentración aproximadamente de 50 millones de

espermatozoides/mL, o aquella que sea cómoda para la persona que realiza el análisis).

Paso 1: hacer una extensión usando 10µL de semen o de 10 a 15µL de espermatozoides de swim-up/lavados (adaptar el volumen de concentración de espermatozoides) y dejar secar al aire. El ángulo ideal para usar para hacer la extensión es de alrededor de 45°. Para más información, consulte la 6ª ed. del Manual de la OMS.

Si la concentración de espermatozoides en el semen es menor de 20 millones/mL, 1) use 15µL de semen por extensión y 2) disminuya el ángulo del portaobjetos a 20° para hacer la extensión. Asegúrese de que el frotis de espermatozoides está completamente seco antes del llevar a cabo el siguiente paso.

Paso 2: coloque con cuidado el frotis seco en vertical en la bandeja de tinción (frasco tipo Coplin) que contiene SpermBlue®. Tenga cuidado de sumergir lentamente los portaobjetos en la solución entre 20 y 25°C.

Tiempos de tinción de referencia para diferentes especies:

Humano/Primate	50 seg
Cerdo/Caballo/Rata	1 min
Toro/Perro/Carnero	2 min

Alternativa: sumergir el portaobjetos durante 45 segundos en SpermBlue® y lavarlo durante 5 segundos en agua destilada.

Tenga en cuenta que estos periodos de tinción pueden variar según la temperatura del laboratorio, la humedad o el pH del agua desionizada utilizada para lavar los portaobjetos. Encuentre los mejores tiempos para su laboratorio.

Paso 3: retire con cuidado el portaobjetos de la bandeja de tinción y manténgalo en un ángulo de 60 a 80° para retirar el exceso de fijador/colorante.

Paso 4: sumerja lentamente en un recipiente/jarra Coplin que contenga agua destilada, sumerja dos veces durante tres segundos cada una y deje que el exceso de líquido se escurra sobre el papel. Permita que se seque verticalmente. Asegúrese de que el ángulo del portaobjetos sea de unos 60° y compruebe que el papel no “succione” toda la tinción del portaobjetos.

Paso 5: si el color azul no es lo suficientemente intenso, tiña durante otros 5-10 segundos. Si el azul es demasiado intenso, tiña durante 40 segundos y sumerja en agua destilada durante 3 segundos (realizando movimientos circulares muy suaves con la jarra Coplin para retirar el exceso de colorante).

Paso 6: asegúrese de que el portaobjetos esté completamente seco y luego monte el portaobjetos con DPX, Eukitt o un medio sintético equivalente para hacer el portaobjetos permanente. Los pasos a seguir son:

1. Poner unas gotas de Eukitt en el cubreobjetos.
2. Colocar el portaobjetos, con el frotis hacia abajo, sobre el cubreobjetos.
3. Presionar sobre el portaobjetos para extender el Eukitt.
4. Colocar el portaobjetos hacia arriba y en horizontal, y dejar secar.

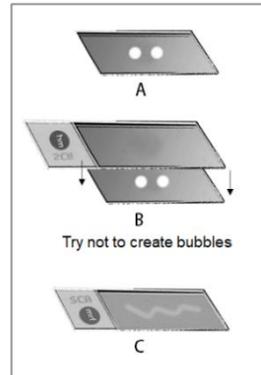


Figura 1: Montaje con Eukitt.

Comentarios importantes:

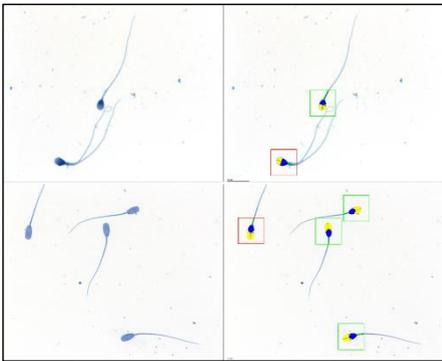
Los resultados de la tinción inicial pueden sugerir una tinción débil en algunos espermatozoides, así como diferencias en la intensidad de la tinción en el mismo portaobjetos. Cada investigador tiene que experimentar para optimizar sus resultados. Probar y adaptar los tiempos de tinción en condiciones de temperatura entre 20 y 25°C.

Muchas de las técnicas de tinción de espermatozoides existentes se basan en “teñir el espermatozoide”, lo cual no es citológicamente aceptable. El **SpermBlue®** diferencia claramente las estructuras del espermatozoide con precisión y es particularmente bueno en la identificación del acrosoma del espermatozoide (van der Horst and Maree, [2009] **SpermBlue®**: A new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis, *Biotechnology and Histochemistry* 84:299-308).

Ejemplo:

Con los espermatozoides de primates, caballos y delfines, el acrosoma se tiñe de azul claro y la cabeza de azul oscuro. La pieza intermedia se tiñe claramente de azul oscuro, el resto de la cola de un azul ligeramente más claro y la pieza final de un azul aún más claro.

En animales domésticos como el toro, jabalí y carnero: el acrosoma se tiñe de azul oscuro, el área post acrosomal y particularmente la zona ecuatorial se tiñe de azul claro. La pieza intermedia se tiñe de azul más oscuro y el resto de la cola un poco más claro.



A la izquierda, espermatozoides humanos (arriba) y cerdo (abajo) teñidos con SpermBlue®. A la derecha, los campos correspondientes analizados con el Sperm Class Analyzer (SCA).

Hoja de datos de seguridad para SpermBlue®:

SpermBlue® contiene componentes tóxicos como todas las tinciones citológicas, pero no es peligroso. El principal componente activo es un ligero irritante cutáneo, oral / nasal y la tinción debe realizarse preferiblemente en una campana extractora. Si la tinción se pone en contacto con la piel, lave bien el área afectada con agua.

Precauciones:

Todas las tinciones citológicas son tóxicas y deben manipularse con cuidado. Trabajar siempre con guantes y preferiblemente en una campana extractora. Teñir solo cuando los espermatozoides estén fijos (muertos). NO lo use para células vivas no fijadas.

Referencias:

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2021, Sixth edition. Geneva: World Health Organization All rights reserved. Publications of the World Health Organization Press, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland.

Distributed by:

Microptic S.L.

Av. Josep Tarradellas, 8, 1º 6ª – 08029 Barcelona (Spain)

Tel. +34 93 419 29 10

Fax +34 93 419 94 26

www.micropticsl.com