



<http://doi.org/10.24245/rmmr.v12id.4712>

# Tinción May-Grünwald en el estudio de los espermatozoides humanos vistas bajo el programa CASA

## May-Grünwald staining in the study of human spermatozoa seen under the CASA program.

Mateo Alberto Herrera-Murillo,<sup>1</sup> Alejandra Pardiñas-Moncada,<sup>1</sup> Geovanna Rodríguez-Santillán,<sup>1</sup> José Luis Arreola-Ramírez,<sup>2</sup> Yadira Libertad Hernández-Rueda,<sup>1</sup> Paloma Neri-Vidaurre,<sup>3</sup> Víctor Manuel Torres-Flores<sup>1</sup>

### Resumen

**OBJETIVOS:** Evaluar la efectividad de la tinción May-Grünwald para el estudio de la morfología espermática, valorando su pigmentación y compatibilidad con el equipo CASA. Además, comparar los resultados del análisis morfológico en el equipo CASA para muestras teñidas con Papanicolaou y May-Grünwald, y distinguir las ventajas y desventajas de ambas técnicas.

**MATERIALES Y MÉTODOS:** Estudio transversal y comparativo efectuado en muestras donadas por hombres entre 18 y 24 años con 3 a 6 días de abstinencia. Enseguida de la espermatobioscopia directa, conforme se señala en la 5a edición del Manual de la OMS, se aplicaron los protocolos de tinción de Papanicolaou y May-Grünwald. Por último, se hizo el análisis con el apoyo del programa IVOS II, como herramienta informática.

**RESULTADOS:** Se analizaron 40 laminillas teñidas para morfología espermática de dos diferentes técnicas de tinción de muestras de 20 varones voluntarios, jóvenes y sanos. Ambas tinciones permiten distinguir las principales partes de los espermatozoides: cabeza, flagelo y acrosoma. La tinción propuesta no incluye el riesgo de distorsionar la estructura celular, incluso tomando en cuenta el método de fijación, que difiere del recomendado en el protocolo de Papanicolaou.

**CONCLUSIONES:** El protocolo propuesto funciona eficazmente y tiene varias ventajas en relación con el recomendado por la OMS: menor cantidad de reactivos y tiempo de realización de la técnica más breve.

**PALABRAS CLAVE:** Tinción; flagelo de la cabeza del espermatozoide; acrosoma; reactivos; colorantes; indicadores y reactivos; cabeza del espermatozoide; cola del espermatozoide.

### Abstract

**OBJECTIVE:** To determine the efficacy of the May-Grünwald protocol in the analysis of sperm morphology.

**MATERIALS AND METHODS:** Cross-sectional and comparative study carried out on samples donated by men between 18 and 24 years of age with 3 to 6 days of abstinence. After direct spermatobioscopy, according to the 5th edition of the WHO Manual, Papanicolaou and May-Grünwald staining protocols were applied. Finally, the analysis was performed with the support of IVOS II software as a computer tool.

**RESULTS:** Forty slides stained for sperm morphology from two different staining techniques from samples of 20 healthy, young, male volunteers were analyzed. Both stains allow distinguishing the main parts of the spermatozoa: head, flagellum, and acrosome. The proposed staining does not include the risk of distorting the cell structure, even considering the fixation method, which differs from that recommended in the Papanicolaou protocol.

<sup>1</sup> Departamento de Farmacología, Laboratorio de Biomembranas, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Ciudad de México.

<sup>3</sup> Centro Especializado en Esterilidad y Reproducción Humana, Hospital Ángeles México, Ciudad de México.

### Recibido:

**Aceptado:** abril 2021

### Correspondencia

Paloma Neri-Vidaurre  
palnevi@hotmail.com

**Este artículo debe citarse como:** Herrera-Murillo MA, Pardiñas-Moncada A, Rodríguez-Santillán G, Arreola-Ramírez JL, Hernández-Rueda YL, Neri-Vidaurre P, Torres-Flores VM.

Tinción May-Grünwald en el estudio de los espermatozoides humanos vistas bajo el programa CASA. Reproducción (México) 2021; 12: 29 de noviembre 1-9.

**CONCLUSIONS:** The proposed protocol works efficiently and has several advantages in relation to the one recommended by the WHO: smaller number of reagents and shorter time to perform the technique.

**KEYWORDS:** Staining; Spermatozoa head flagellum; Acrosome; Reagents; Coloring agents; Indicators and reagents; Sperm head; Sperm tail.

## ANTECEDENTES

La mayoría de los animales se reproducen sexualmente, lo que implica la existencia de un dimorfismo sexual responsable de la producción y fusión de dos gametos: los espermatozoides y el óvulo. Cada uno de los dos gametos ofrecerá la mitad del material genético necesario para la formación de un nuevo ser vivo.<sup>1</sup> El éxito de la reproducción sexual depende de la correcta comunicación entre los dos gametos. Cuando esta comunicación falla, la infertilidad puede ocurrir. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la infertilidad, desde el punto de vista clínico, como la “incapacidad de una pareja sexualmente activa, sin método anticonceptivo, para lograr un embarazo en menos de un año.<sup>1</sup>

En México, la infertilidad es una causa frecuente de consulta ginecológica con una prevalencia de alrededor del 15%; puede deberse a causas muy variables por lo que su estudio debe llevarse a cabo de manera precisa para encontrar el tratamiento mejor indicado para cada caso en particular. En la actualidad se considera una participación del 50% de origen masculino derivado de múltiples factores genéticos y de estilo de vida; se estima que en 30% de los casos la infertilidad es idiopática.<sup>2</sup>

El examen que aporta información del potencial de fertilidad masculina es el espermograma o

el análisis del semen. En ese estudio se hace una evaluación macroscópica y microscópica del semen. En su valoración macroscópica se describen: apariencia, licuefacción, volumen, pH y viscosidad. En la valoración microscópica se evalúan: concentración, motilidad progresiva y morfología espermática.<sup>3</sup> Entre los parámetros analizados, el estudio de la morfología espermática constituye uno de los rubros fundamentales y el que siempre ha generado controversia.<sup>4,5</sup>

La OMS, en la última edición del manual “*WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen*”,<sup>2</sup> incluye una guía elaborada con láminas de la clasificación con las que morfológicamente deben evaluarse los espermatozoides de una muestra seminal. En resumen:

1. La cabeza debe de ser lisa, regularmente contorneada y de una forma ovalada.
2. Debe haber una región acrosomal bien definida que comprenda el 40 a 70% del área de la cabeza. La región acrosomal no debe contener vacuolas grandes, y no más de dos vacuolas pequeñas y no ocupar más del 20% de la cabeza del esperma.
3. La región postacrosomal no debe contener vacuolas.
4. La pieza intermedia debe ser delgada, regular y de la misma longitud que la



cabeza del espermatozoide. El eje mayor de la pieza intermedia debe estar alineado con el eje mayor de la cabeza del espermatozoide. El citoplasma residual es una anomalía solo cuando está en exceso; es decir, cuando excede un tercio del tamaño de la cabeza del espermatozoide.

5. La cola debe tener un calibre uniforme a lo largo de su longitud, ser más delgada que la pieza intermedia y tener, aproximadamente, 45  $\mu\text{m}$  de largo (aproximadamente 10 veces la longitud de la cabeza).

En la morfología de los espermatozoides hay anomalías (**Figura 1**), algunas de ellas mixtas. Los espermatozoides anormales suelen tener un potencial de fertilización más bajo, dependiendo de los tipos de anomalías, y ADN anormal. Así, por ejemplo, en la espermatogénesis defectuosa y algunas afecciones epididimarias suele asociarse mayor porcentaje de espermatozoides con formas anormales. En este tipo de estudios se busca identificar:

**Defectos en la cabeza:** dobles, grandes o pequeños, afilados, piriformes, redondos, amorfos, vacuolados (más de dos vacuolas o más de 20% del área de la cabeza ocupada por áreas de vacuolas sin teñir), vacuolas en la región postacrosomal, pequeñas o grandes áreas acrosómicas (menos de 40% o más de 70% del área de la cabeza) o cualquier combinación de éstas.<sup>3</sup>

**Defectos en el cuello y la pieza intermedia:** inserción asimétrica de la pieza intermedia en la cabeza, gruesa o irregular, muy inclinada, anormalmente delgada o cualquier combinación de éstas.

**Defectos en la pieza principal:** curvas cortas, múltiples, rotas, lisas, curvas muy anguladas, de ancho irregular, enrolladas o cualquier combinación de éstas.

**Exceso de citoplasma residual:** se asocia con espermatozoides anormales debido a defectos en su formación. Se consideran anormales los espermatozoides con grandes cantidades de citoplasma, con tinción irregular en un tercio o más del tamaño de la cabeza del espermatozoide, a menudo asociados con piezas intermedias defectuosas.

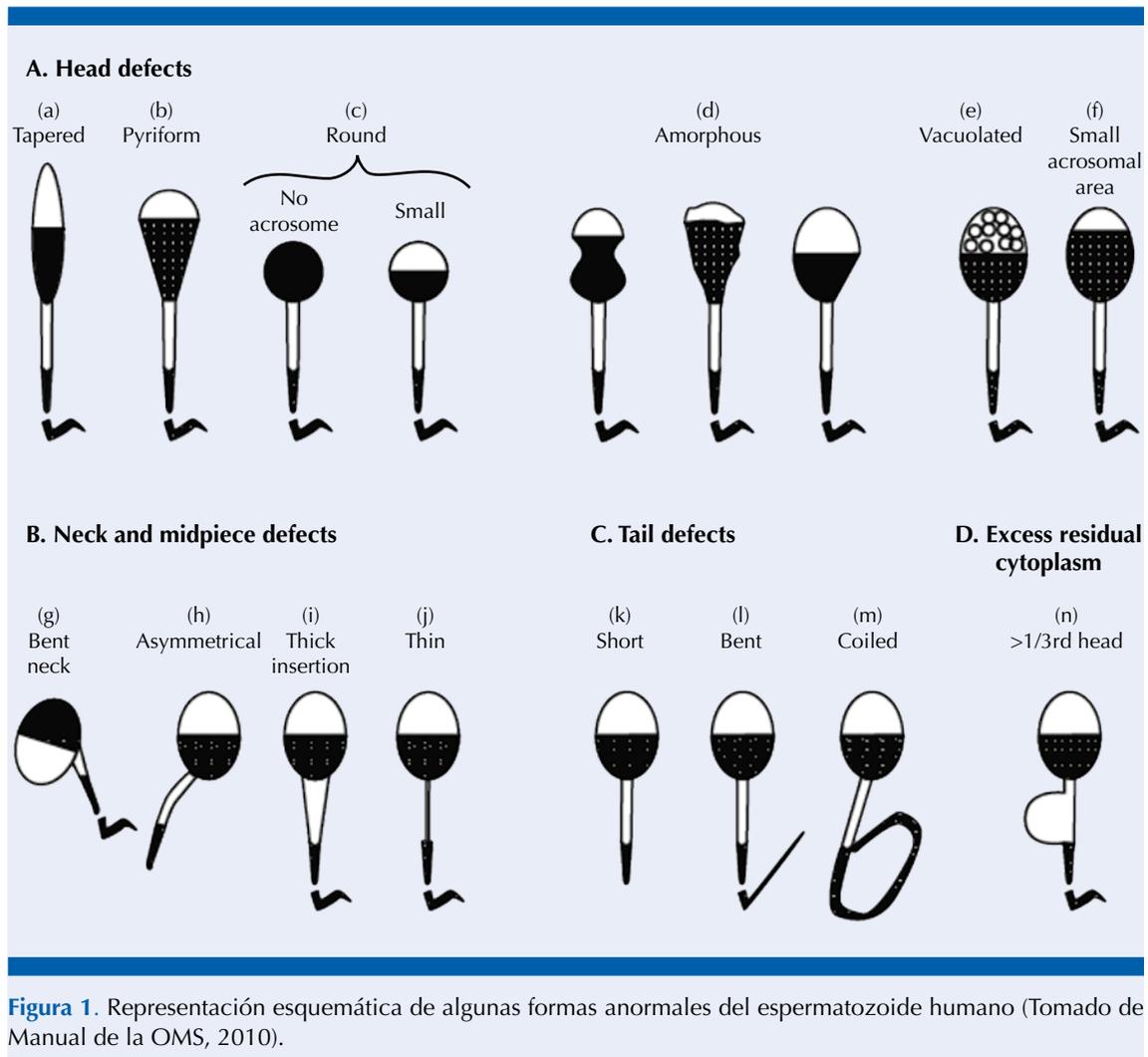
### Tinciones para el análisis morfológico

Para un análisis preciso de la morfología espermática, la OMS recomienda una tinción previa. La aplicación de distintas técnicas histoquímicas para el estudio de este rubro es común en laboratorios que practican estudios clínicos y de investigación.<sup>3</sup> Los mecanismos de tinción son variados, pero destacan las uniones electrostáticas, que consisten en la unión de dos compuestos con cargas parciales opuestas. Estas interacciones son importantes para atraer, diferencialmente, moléculas colorantes de carga opuesta en una solución con mezcla de colorantes de distinta carga.<sup>6</sup>

El *Manual de la OMS* estandariza esos procesos histoquímicos basados en las tinciones de Papanicolaou y Diff-Quik®, que son las más utilizadas en los laboratorios de Andrología.

En laboratorios, principalmente de investigación básica, como el nuestro, para un análisis preciso, se recurre a otras técnicas de tinción que se complementan con herramientas de bioinformática, como el equipo CASA (*computer-assisted sperm motility analyzer*) a través del programa HTM-DIMENSIONS for Windows Morphology para IVOS II. Este sistema puede analizar imágenes microscópicas obtenidas en tiempo real, evalúa la movilidad y, particularmente, la morfología.<sup>7</sup>

La evaluación morfométrica del espermatozoide, mediante el equipo CASA, es una herramienta importante, sobre todo en el ámbito de la reproducción. Las características del análisis estarán



**Figura 1.** Representación esquemática de algunas formas anormales del espermatozoide humano (Tomado de Manual de la OMS, 2010).

en función de la tinción utilizada. Esta tinción se deriva del método Romanowsky que, por principio general, consiste en la acción simultánea de una mezcla de los colorantes primarios eosina (Y o B) y azul de metileno.<sup>5</sup> Ambos componentes actúan conforme a la teoría ácido-base; de este modo, el azul de metileno (que es un colorante básico) encuentra una atracción por las estructuras de naturaleza ácida. Por lo anterior, los objetivos de este estudio fueron: evaluar la efectividad de la tinción May-Grünwald para el estudio de la morfología espermática, valorando su pigmentación y compatibilidad con el

equipo CASA. Además, comparar los resultados del análisis morfológico en el equipo CASA para muestras teñidas con Papanicolaou y May-Grünwald, y distinguir las ventajas y desventajas de ambas técnicas.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio transversal y comparativo efectuado en muestras donadas por hombres entre 18 y 24 años con 3 a 6 días de abstinencia. Todos los voluntarios que aceptaron participar en el ensayo firmaron una carta de consentimiento



informado, aprobada por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina (UNAM) conforma a los principios de investigación donde participan sujetos humanos expresados en la Declaración de Helsinki. Enseguida de la espermatobioscopia directa, conforme se señala en la 5a edición del Manual de la OMS, se aplicaron los protocolos de tinción de Papanicolaou y May-Grünwald.

Las muestras se mantuvieron a 37°C para permitir su licuefacción y 30 minutos después a cada muestra se le practicó un análisis de espermatobioscopia directa conforme a los lineamientos establecidos en el *Manual de la OMS*.

Para el análisis de la morfología espermática, el análisis se hizo por duplicado (uno para cada técnica de tinción) de manera que se tomaron 10 microlitros de cada muestra y se colocaron en una laminilla para realizar un frotis de la misma.

Posteriormente se llevó a cabo el protocolo de tinción.

Para el análisis informático se colocaron los portaobjetos de cada grupo uno a uno en el equipo CASA con aceite de inmersión para el objetivo de 100x.

Para hacer un uso adecuado del equipo se necesita obtener el programa “Dimensions for Windows”. Este programa etiqueta cada espermatozoide en una de las siguientes cinco formas:

1. Normal (verde); 2) anormal (rojo); 3) ligeramente anormal (rojo); 4) cola anormal (rojo); 5) ignorado (azul).<sup>8,9</sup>

Las mediciones reúnen diversos criterios establecidos en el programa. La cabeza deberá tener una longitud normal de 3 a 5 micras y anchura de 2 a 3 y estará comprimida del 40 al 70% y la pieza media deberá tener una micra de anchura y 1.5 veces la longitud de la cabeza.

Para poder obtener esos criterios, el programa CASA efectúa diversos pasos. Primero, la imagen del campo del microscopio se envía desde la cámara y se convierte en una imagen digital. La forma más fácil para que la máquina perciba los espermatozoides es usar un campo oscuro o una imagen de contraste de fase negativa alta, que proporciona cabezas de esperma blancas en un fondo oscuro. Enseguida, se digitaliza la imagen de cada cabeza de esperma y la computadora determina la cantidad de elementos de imagen (píxeles) que cubre la cabeza del esperma (**Figura**

Papanicolaou (20 laminillas)	May-Grünwald (20 laminillas)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fijación</li> <li>• Deshidratación</li> <li>• Alcohol ácido</li> <li>• Hematoxilina</li> <li>• OG-6</li> <li>• EA-50</li> <li>• Rehidratación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fijación</li> <li>• Colorante May-Grünwald</li> <li>• Eosina Azul de metileno según Wright</li> </ul>
<p><b>Total: 12 reactivos (Duración 40 min)</b></p>	<p><b>Total: 12 reactivos (Duración 40 min)</b></p>

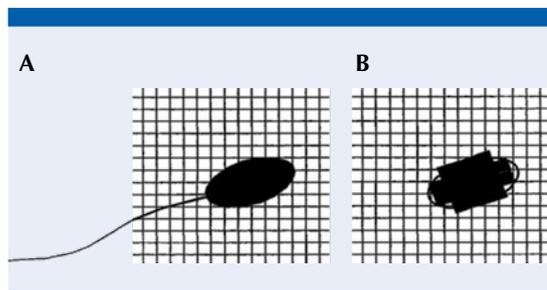
2), esto da como resultado un rango de cantidad de píxeles que es aceptable para una cabeza de esperma, en virtud del tamaño mínimo y máximo esperado para la especie. La computadora reconocerá un objeto que cae dentro del rango esperado como una cabeza de esperma.<sup>10</sup>

Para el análisis estadístico se elaboró una base de datos con Microsoft Excel 2010 para Windows. Para la comparación entre las dos técnicas de tinción se hizo una prueba t de Student de dos colas que consideró significativo el valor de  $p < 0.005$ .

### RESULTADOS

Se analizaron 40 laminillas teñidas para morfología espermática de dos diferentes técnicas de tinción de muestras de 20 varones voluntarios, jóvenes y sanos.

Los resultados promedio obtenidos de la espermabioscopia directa de los 20 varones se muestran en el **Cuadro 1**, donde se observa que los principales parámetros evaluados se encuentran dentro de los valores normales, conforme a lo que se señala en la última edición del Manual de la OMS.



**Figura 2.** Digitalización de la imagen de una cabeza de esperma. Panel A, imagen de espermatozoide con los elementos de imagen superpuestos (píxeles) que se utilizan para componer la imagen de video. Panel B, cómo la computadora “ve” la cabeza del espermatozoide después de la digitalización (Imagen tomada de Mortimer, 2000).

**Cuadro 1.** Principales parámetros seminales evaluados, no se registraron datos de infecciones, cantidad de bacterias ni leucocitos que se sabe pueden alterar la morfología espermática

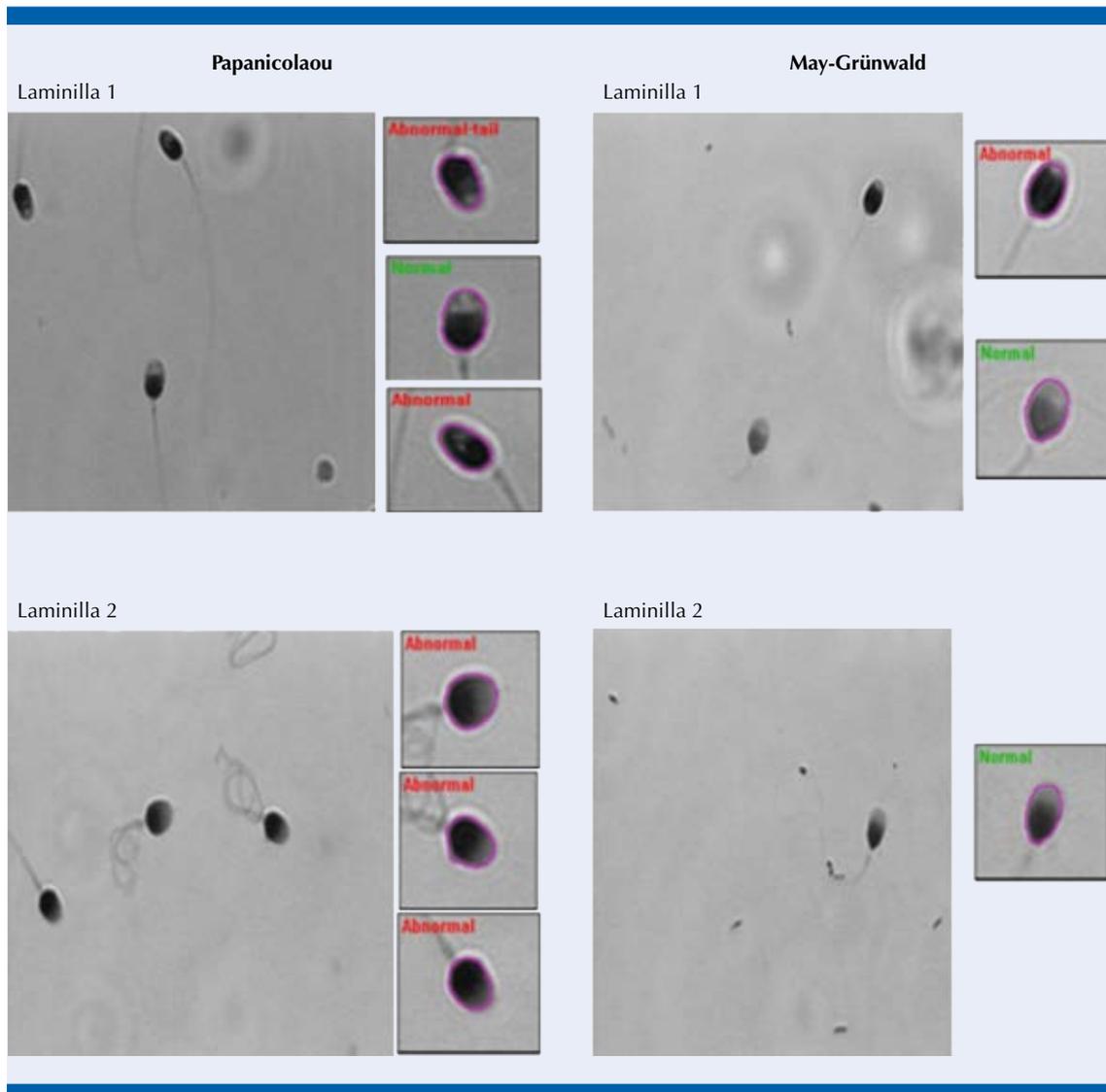
Volumen	Concentración	Movilidad progresiva	Movilidad total
4.5 ± 0.8 mL	75 ± 25 mill/mL	75 ± 5%	85 ± 8%

Por lo que se refiere a la evaluación de la morfología, en la **Figura 3** se comparan la técnica de Papanicolaou con la tinción May-Grünwald.

Entre las principales diferencias se advirtió que con la técnica de Papanicolaou se distinguen con claridad los contrastes de grises, resultado de un buen seguimiento del protocolo, que informa de los espermatozoides descritos por el programa como normales y anormales. En la primera laminilla se observa un espermatozoide con características normales y dos con características anormales. En la segunda laminilla se observan los tres espermatozoides con anomalías.

En el caso de las muestras teñidas con la técnica de May-Grünwald pueden observarse satisfactoriamente los contrastes al igual que en la tinción de Papanicolaou. Esto hace que el programa pueda reconocer a los espermatozoides y efectuar las respectivas evaluaciones de acuerdo con sus características morfológicas. En la primera laminilla se observa un espermatozoide con características normales y otro con características anormales. En el caso de la segunda laminilla solo se observa un espermatozoide de características normales.

Los hallazgos observados con las dos tinciones para morfología espermática se muestran en el **Cuadro 2**, en donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas técnicas de tinción aplicadas.



**Figura 3.** Resultados del protocolo de papanicolaou y May-Grünwald

**Cuadro 2.** Resultados de la comparación de ambas técnicas

Técnica de Papanicolaou	Técnica de May-Grünwald
14 ± 3 %	15 ± 3 %

## DISCUSIÓN

En este ensayo se evaluó la técnica de tinción May-Grünwald como un método alternativo a

las tinciones estandarizadas por la OMS, con la finalidad de encontrar una opción más práctica en relación con la complejidad del protocolo y el tiempo de realización, buscando que a la vez sea compatible con el equipo CASA. Esta tinción sigue el principio general de las tinciones Romanowsky, que utilizan la acción combinada de un colorante básico y uno ácido para crear un contraste entre estructuras

celulares con afinidades determinadas por su composición.<sup>5</sup>

De acuerdo a las características fisicoquímicas de la técnica de May-Grünwald, ésta será capaz de teñir satisfactoriamente a los espermatozoides para el análisis morfológico preciso.

En un análisis seminal se tiene el conocimiento que la morfología espermática es una de los aspectos más importantes y más difíciles de evaluar debido a las diferentes tinciones y criterios utilizados; por ello, la identificación de anomalías morfológicas resulta una parte esencial del examen.<sup>11</sup> En este estudio se observó que después de aplicar las dos diferentes tinciones para la evaluación espermática y observarlas en el equipo CASA, ambas permitieron distinguir las partes principales de la morfología del espermatozoide: cabeza, flagelo y acrosoma. Con la tinción de May-Grünwald no se corre el riesgo de distorsionar la estructura celular, incluso tomando en cuenta el método de fijación, que es diferente al convencional recomendado en el protocolo de Papanicolaou.<sup>12</sup>

Por lo que se refiere al análisis efectuado con el programa para la morfología, la definición de los componentes celulares es suficiente para que reconozca espermatozoides con formas anómalas y diferenciarlos de células normales, capacidad decisiva para completar el análisis seminal durante la espermatobioscopia.

López y colaboradores, en 2015,<sup>13</sup> emprendieron una investigación en la que examinaron la morfología de los espermatozoides con diferentes métodos de tinción con el fin de determinar cuál de ellos era el mejor. Hicieron y tiñeron frotis con hematoxilina eosina (HE), azul de toluidina (AT), giemsa, tinción de Wright, hematoxilina férrica de Weigert, anaranjado G, tinción eosina-anilina, método de Shorr, Papanicolaou, método Berg, tinción

verde brillante, anaranjado de acridina (AO) y tinción verde Janus. Entre sus resultados hubo una diferencia significativa en la longitud de la cabeza con tinción de azul de toluidina y las mediciones en los frotis con técnicas de Shorr y Papanicolaou fueron similares, con valores más altos para la tinción de Papanicolaou. Y aunque la técnica de May-Grünwald no fue probada, en nuestro estudio se demostró que tiene valores muy similares a la técnica de Papanicolaou, que fue la que más recomendaron en ese estudio.

En la bibliografía contemporánea existe muy poca evidencia del uso de esta tinción para la evaluación de la morfología espermática; sin embargo, es muy recomendada en trabajos sencillos de laboratorio y de tinción. Así, pues, este uno de los primeros trabajos experimentales en recomendar su aplicación porque los colorantes de la tinción de May-Grünwald los hacen aptos para el estudio de la morfología espermática, además de que el tiempo en que actúan es relativamente breve.

## CONCLUSIÓN

El protocolo propuesto funciona adecuadamente y tiene varias ventajas en relación con el recomendado por la OMS; entre ellas destacan la cantidad de reactivos y el tiempo de realización de la técnica, que son reducidos. Por lo que se refiere a la calidad de los resultados, el examen en el equipo CASA demostró que es igual o similar a la de Papanicolaou porque permite diferenciar las formas de los espermatozoides para efectuar el análisis morfológico.

## REFERENCIAS

1. Zambrano CA, Carvajal A. Diagnóstico y tratamiento hormonal de la infertilidad masculina. *Actas Urol Esp* 2020; 44 (5): 321-27. <https://doi.org/10.1016/j.acuro.2019.10.013>
2. Fainberg J, Kashanian JA. Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000 Research* 2019; 8. doi. 10.12688/f1000research.17076.1



3. World Health Organization. (2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen [internet]. Switzerland: Publications of World Health Organization.
4. García-Vázquez FA, Gadea J, Matás C, Holt WV. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian J Androl* 2016; 18 (6): 844-50. doi. 10.4103/1008-682X.186880
5. Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci.* 2015; 8 (4): 191-6. doi: 10.4103/0974-1208.170370. PMID: 26752853; PMCID: PMC4691969
6. Montuenga BL, Bodegas FM, De Andrea C, Esteban RF. Técnicas de tinción en Histología. 2ª ed. Madrid: Elsevier Masson, 2014.
7. Dimensions for Windows users handbook for HTM-IVOS and HTM-CEROS. (2011). Version 3.3. USA: Hamilton Thorne Research 100 Cumming Center.
8. Czubaszek M, Andraszek K, Banaszewska D, Walczak-Jędrzejowska R. The effect of the staining technique on morphological and morphometric parameters of boar sperm. *PLoS One* 2019; 4(3): e0214243. doi: 0.1371/journal.pone.0214243
9. García GS, Villegas GM, Juárez PL, Garzón GG. Manual de Prácticas de Laboratorio. Benemérita Universidad de Puebla. Facultad de Ciencias Químicas; 2007.
10. Mortimer ST. CASA-Practical aspects. *J Androl* 2000; 21 (4): 515-24. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb02116.x>
11. Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N. (2007). Principles of Urology. Ankara, Sun Publishing.
12. Koss LG, Melamed MR. Koss'. Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases. 5ª ed. New York: Lippincot Williams and Wilkins, 2006.
13. López JL, Hernández DM, Colín CC, Ortega S, Cerón GG, Franco CR. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad* 2015; 3 (1): 10-18.

### AVISO PARA LOS AUTORES

*Revista Mexicana de la Reproducción* tiene una nueva plataforma de gestión para envío de artículos. En: <https://www.revisionporpares.com/index.php/RMMRepro/login> podrá inscribirse en nuestra base de datos administrada por el sistema *Open Journal Systems* (OJS) que ofrece las siguientes ventajas para los autores:

- Subir sus artículos directamente al sistema.
- Conocer, en cualquier momento, el estado de los artículos enviados, es decir, si ya fueron asignados a un revisor, aceptados con o sin cambios, o rechazados.
- Participar en el proceso editorial corrigiendo y modificando sus artículos hasta su aceptación final.