

USO COMBINADO DE LA FLUORESCENCIA Y LA MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA

C. Tomás², J. Gómez-Fernández¹, E. Gómez-Izquierdo¹, E. De Mercado¹

¹ Centro de Pruebas de Porcino, ITACyL. Hontalbilla (Segovia). España

² CITA-IVIA. Segorbe (Castellón). España



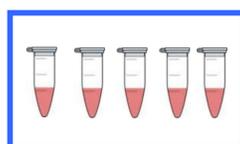
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El grado de viabilidad espermática se determina evaluando la integridad de la membrana del espermatozoide, si la membrana está dañada será susceptible de que algún colorante o fluorocromo pueda entrar dentro de la célula y teñirla para su identificación. El objetivo de este estudio fue evaluar el uso combinado de la fluorescencia y la microscopía de contraste de fases como técnica alternativa para determinar la viabilidad de espermatozoides de porcino.

MATERIAL Y MÉTODOS



Descongelación
a 37°C, 20 segundos



5 pools de 3 verracos fértiles. Congelados con un protocolo estándar para porcino. Tomás et al., 2014; Anim Reprod Sci. 144, 115-121

Se comparó este método con una doble tinción fluorescente con SYBR-14/Ioduro de Propidio (Garner y Johnson, 1995; Biol Reprod. 53, 276-284) para determinar su validez, donde los espermatozoides no viables se visualizaron de color rojo, y los viables de color verde.

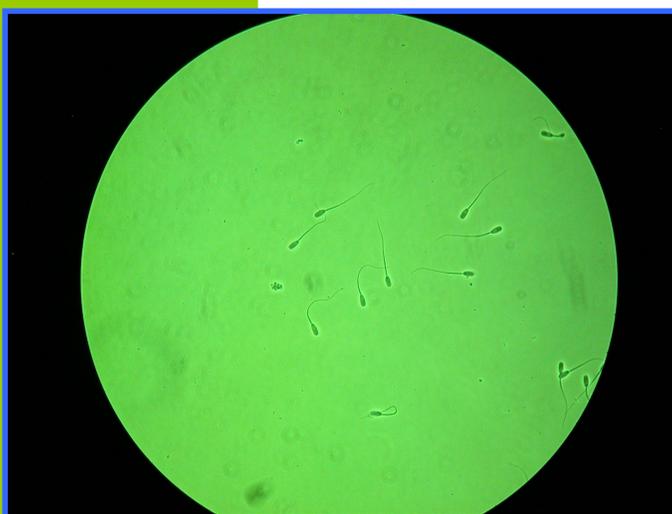


Tinción de las muestras con 5 µL de ioduro de propidio (IP; 0,5 mg/mL), 37°C 10 minutos en oscuridad

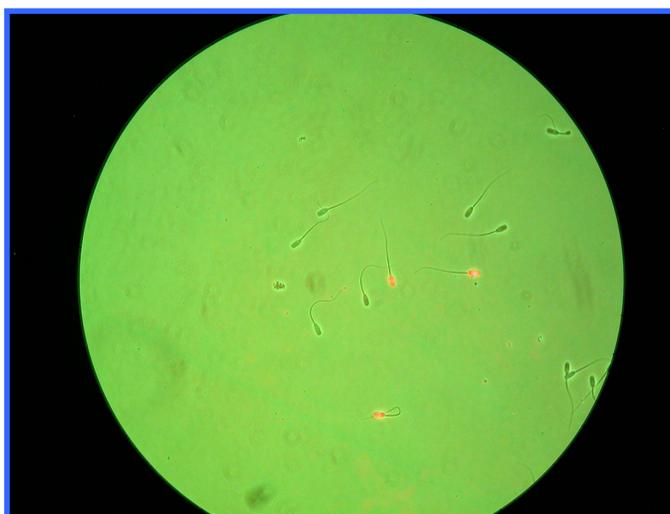
Análisis de la viabilidad con microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse E400, Tokyo, Japan) acoplado a equipo de fluorescencia (Nikon C-SHG1) con una lámpara de mercurio (100W) y un filtro dual Nikon G-2A (510/590 excitación/barrera)

Los espermatozoides no viables se visualizaron de color rojo, y los viables no presentaron tinción.

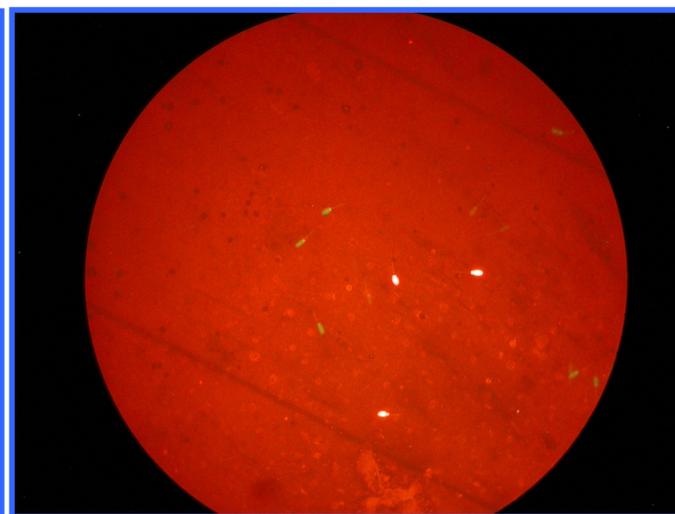
RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Espermatozoides visualizados solo con contraste de fases



Espermatozoides visualizados con contraste de fases y fluorescencia (tinción con IP)



Espermatozoides visualizados solo con fluorescencia (tinción con SYBR-14/IP; técnica de Garner y Johnson, 1995)

No hubo diferencias significativas entre las dos técnicas ($P < 0,05$; 57,6 vs. 57,2±1,5% técnica de Garner y Johnson y la nueva técnica descrita, respectivamente)

CONCLUSIÓN

El uso combinado de fluorescencia y microscopía de contraste de fases utilizando una tinción con IP puede ser utilizada para la determinación de la viabilidad espermática. Por un lado supone un ahorro económico al usar menos fluorocromos, y por otro permite la visualización del espermatozoide completo pudiendo determinar simultáneamente, otros parámetros como formas anormales o acrosomía.