

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



TECNICA DE CALIBRACION DE UN ESPECTROFOTOMETRO  
PARA DETERMINAR LA CONCENTRACION ESPERMATICA  
EN SEMEN DE CARNERO

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

MARIA ELENA ALICIA IBARGUENGOITIA TEJEDA

Asesor: M. V. Z. ARTURO A. TREJO GONZALEZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

	PAG.
I    INTRODUCCION	1
II   ANTECEDENTES	8
III  OBJETIVOS	11
IV   MATERIAL Y METODOS	11
V    RESULTADOS Y DISCUSION	20
VI   CONCLUSIONES	25
VII  BIBLIOGRAFIA	32

## RESUMEN

La técnica espectrofotométrica para determinar la concentración espermática de semen, se basa en la medición de la cantidad de luz que pasa a través de una muestra de semen diluido a una concentración conocida.

Este método es más rápido que el conteo directo en el hemocitómetro, siendo de gran utilidad cuando se tiene que determinar la concentración espermática de un número grande de muestras en poco tiempo.

En el presente trabajo se calibró un espectrofotómetro "Spectronic 20", para determinar la concentración espermática en semen de carnero de 5 razas diferentes.

Las lecturas en el espectrofotómetro fueron comparadas con lecturas directas en el hemocitómetro.

Los resultados fueron analizados estadísticamente por el método de correlación y regresión simple, encontrándose que la mayor correlación ( $r=0.823$ ) se obtiene cuando el aparato se calibra a una longitud de onda de 600 nm.

## I. INTRODUCCION.

Para poder determinar la capacidad reproductiva de un semental, es necesario efectuar una serie de pruebas, tanto en el animal como con su semen para poderlo considerar reproductivamente apto. Además es importante tanto económica como biológicamente, procesar y distribuir únicamente semen de alta calidad y elevada probabilidad de fecundidad.

Las características más importantes a evaluar en el semen de manera rutinaria son: la concentración, morfología y motilidad espermática ( 12, 13, 14, 16 ).

Existen exámenes más detallados y laboriosos que involucran la determinación del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos; características metabólicas de los espermatozoides y la evaluación de la resistencia de las células espermáticas a las condiciones adversas ( 14 ).

Un examen inicial que muestre que un semen no reúne los estándares para una fecundidad adecuada debe ser descartado. Es por ésto que se debe insistir en ciertas evaluaciones de rutina para todos los eyaculados, registrando los resultados de una

manera adecuada ( 14 ).

La determinación de la concentración espermática es una de las pruebas más importantes a realizar en el semen, ya que de la concentración así como del volumen, depende el número de dosis que se puedan obtener de un eyaculado para la inseminación artificial.

El volumen del semen varía según la especie, raza, edad, frecuencia de eyaculación y método de recolección de la muestra. Las recolecciones a intervalos de tiempo cortos pueden aumentar el volumen y el número total de espermatozoides eyaculados; sin embargo la concentración por eyaculado disminuye. Para evitar ésto, es aconsejable, en el caso del carnero, de que exista una preestimulación a la recolección de la muestra, ya que ésto -- tiende a incrementar el volumen y la concentración ( 13, 14 ).

#### DETERMINACION DE LA CONCENTRACION ESPERMATICA.-

La concentración espermática (número de espermatozoides por unidad de volumen), básicamente puede ser determinada por cinco métodos diferentes, los que a continuación se describen.

a) Método de conteo directo.- Para este método se utiliza

un hemocitómetro (Neubauer o Fuchs-Rosenthal); en donde una muestra de semen se mezcla en una pipeta calibrada que proporciona una dilución estandar que usualmente es de 1:200. El medio de dilución debe ser capaz de matar y dispersar las células por todo el líquido, así mismo debe haber un período de agitación de la dilución, no menor de 2 minutos para asegurar una adecuada suspensión de espermatozoides (12). Recientemente se ha señalado que al aumentar el volumen de la dilución se incrementa la precisión de ésta; es por esto que se recomienda efectuar la dilución en tubos de ensaye, con volúmenes de 10 ml. Después de haberse realizado la dilución, ésta se introduce al hemocitómetro por capilaridad. Esta cámara tiene un volumen conocido y marcas que lo dividen en 25 subunidades. Después de que los espermatozoides se han asentado se inicia el conteo. En la cámara de Neubauer se cuentan solo 5 cuadros; generalmente uno de cada esquina y el central. Teniendo en cuenta la regla ya preestablecida de que solo se cuentan los espermatozoides que se encuentran dentro de cada cuadro así como los que tocan las líneas superior e izquierda. Para incrementar la precisión del conteo se debe hacer por duplicado y promediarse los resultados. (12, 14, 16).

b) Método del Nefelómetro.- Este método se basa en que la opacidad puede ser medida objetivamente por medio de un absorbómetro. El método depende de un principio en el que la corriente eléctrica generada por una celda fotoeléctrica, es proporcional a la luz que recibe. Cuando se coloca una muestra diluida de semen en el trayecto de la luz que recibe, es posible medir la reducción de la luz que llega a la celda fotoeléctrica. La corriente generada por la luz de la muestra es comparada con aquella producida cuando se coloca el diluyente solo, en el paso de la luz. Las lecturas efectuadas en un galvanómetro pueden ser calibradas para dar la concentración de espermatozoides a una dilución conocida de una muestra. La calibración debe ser hecha contra cuentas en hemocitómetro o contador electrónico.

Este tipo de instrumentos son vendidos con tubos transparentes, en los cuales se coloca la muestra diluida 1:100 con -- solución Buffer. Un tubo con solución Buffer es colocado primero en el aparato ajustando la lectura del galvanómetro a 100% de Transmitancia Optica ( T. O. ), después se coloca la muestra y se lee nuevamente. Posteriormente se coloca el tubo con solución Buffer tomando la lectura y confirmando que sigue siendo 100% de T. O. Este procedimiento de la doble lectura de la solución Buffer, se lleva a cabo para evitar errores debidos a --



las fluctuaciones en el voltaje que llega a la lámpara que es la fuente de luz. En algunos lugares puede ser necesario instalar reguladores de voltaje. Este método tiene los mismos errores que otros métodos que dependen de estimaciones de la opacidad, ya -- que ésta es alterada por la presencia de pus u otros contaminantes ( 3,6,7,12,13,14,15,16).

c) Método del contador electrónico de partículas.- El conta dor electrónico de partículas es un instrumento en el cual se re gistran cambios de voltaje cuando una célula espermática pasa a través de una abertura que da lugar a un cambio de la resisten-- cia eléctrica. Este cambio de voltaje puede ser amplificado y - contado electrónicamente. Para utilizar este instrumento el semen es diluido en una solución salina Normal en una proporción - de 1:6000 y la suspensión hecha se hace fluir a través de una - abertura circular en la cual se mantiene un voltaje. Este método es preciso pero el equipo caro y por lo tanto no se justifica su uso de rutina ( 114 ).

d) Método de comparación visual.- Se basa en el empleo de - los tubos de opacidad de Brown's que son tubos especialmente pre parados para estimar la densidad del semen. Estos tubos poseen una opacidad graduada que se compara con la opacidad de una mues

tra del eyaculado diluida en una concentración conocida y colocada en un tubo similar. El tubo muestra es comparado con los tubos graduados, colocándolo entre los tubos que más se aproximen en densidad, según el criterio del observador, colocándolos delante de un papel blanco. La densidad y por lo tanto la concentración de espermatozoides puede ser entonces calculada. Debe tenerse en cuenta que este método solo mide la densidad y dará resultados falsos si el eyaculado contiene otros materiales opacos, tales como pus, células rojas u otros contaminantes(12,14).

e) Método del volumen celular.- Este método se basa en el principio empleado en el hematocrito, en el cual el semen es -- centrifugado de 10,000 a 13,000 rpm, durante 10 min. midiéndose posteriormente el volumen proporcional del paquete celular respecto al volumen total de la muestra. En base a esta medición se determina la concentración de los espermatozoides, que ya ha sido preestablecida por un método de conteo directo (1,8,11). - Los inconvenientes de este método son que no se pueden hacer mediciones de diferencias menores al 1% que implican variaciones de hasta 100 millones de espermatozoides ( 8 ). Este método es de una precisión similar a la del método Nefelométrico aunque - es más tardado y por lo tanto no es muy empleado (14).

## CARACTERISTICAS DEL SEMEN DE CARNERO.

El semen de carnero es un líquido blanco, cremoso, normalmente más denso que el del toro, muestra ondas de movimiento macroscópicas. Sus características varían dependiendo del método de colección además de otros factores. El volumen puede variar de 0.3 a 1.6 ml, habiendo considerables variaciones entre carneros individualmente, aunque no parece haber marcada diferencia entre razas. ( 4, 9, 10 ).

El volumen es influenciado por la estación del año y los valores más bajos que se registran entre marzo y junio para el hemisferio norte. La concentración normal de espermatozoides varía de  $1.6 \text{ a } 6.0 \times 10^9 / \text{ml}$  con un promedio de  $3.6 \times 10^9 / \text{ml}$ . -- (9, 14).

La proporción de espermatozoides morfológicamente anormales presentes en el semen de carnero normales, es usualmente muy pequeña y no debe exceder del 10%; cuando ésto sucede el semen puede ser considerado anormal (6, 7, 12, 16).

## II. ANTECEDENTES.

Los conteos directos en el hemocitómetro son tediosos, lentos y no más seguros que otros métodos que actualmente se emplean. A medida que el número de células por unidad de volumen aumenta, el semen se torna más opaco. En base a esta característica, Comstock y Green en 1939 fueron los primeros en usar la técnica del Nefelómetro para medir la diferencia de absorbancia del semen diluido de carnero a concentraciones variadas. Más tarde una técnica similar fue usada para estimar el número de células espermáticas en estudios del metabolismo en semen de toro por Henle y Zittle en 1942 y Salisbury en 1943, para la práctica de la rutina en la inseminación artificial. Posteriormente Emik y Sidwell en 1947 (citados por Salisbury 1961) hicieron estudios acerca del método fotométrico para determinar la concentración del semen en carneros. Más tarde Willett y Buckner perfeccionaron los métodos de medición por transmisión de luz en 1951. Desde entonces se ha ido perfeccionando la técnica de medición por transmisión de luz, básicamente mediante el empleo de aparatos más precisos (14, 15).

## FUNCIONAMIENTO DEL ESPECTROFOTOMETRO.

El nefelómetro, Espectrofotómetro, Fotelómetro, Absorsiómetro; son instrumentos que se basan en la medición de la cantidad de luz que es reflejada y/o absorbida por un volumen estandar de partículas seminales diluido a una proporción constante. Aunque los detalles de la técnica varían con el instrumento usado, el objetivo es diluir el semen y usar una luz de un color que provean una relación directa entre la densidad óptica y la concentración de células.

( Figura No. 1 ) ( 14 ).

## ESPECTROFOTOMETRO DE BAUSCH & LOMB "SPECTRONIC 20".

Es el aparato que más recientemente se ha usado para la medición espermática, este aparato se ha utilizado para determinar la concentración de semen bovino, a una longitud de onda de 550 nm. El modelo empleado en este experimento, es el modelo estandar que funciona con una fuente de corriente alterna de 115 V y 60 Hz, tiene un rango de longitud de onda de 340 a 600 nm y se recomienda su uso en lugares donde la línea de voltaje y frecuencia varíen menos del 1%. La operación del sistema óptico se muestra en la figura No. 2 . ( 2 ).

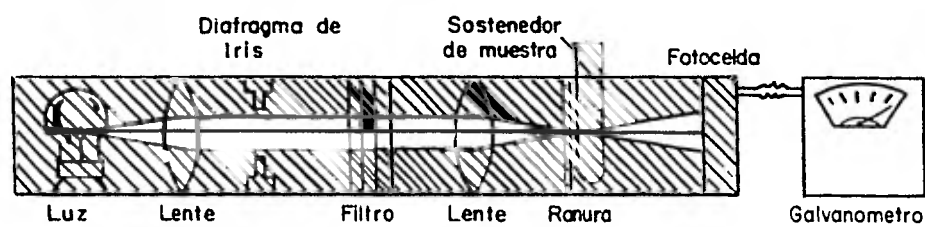


Fig. 1. Diagrama del mecanismo de un Nefelometro

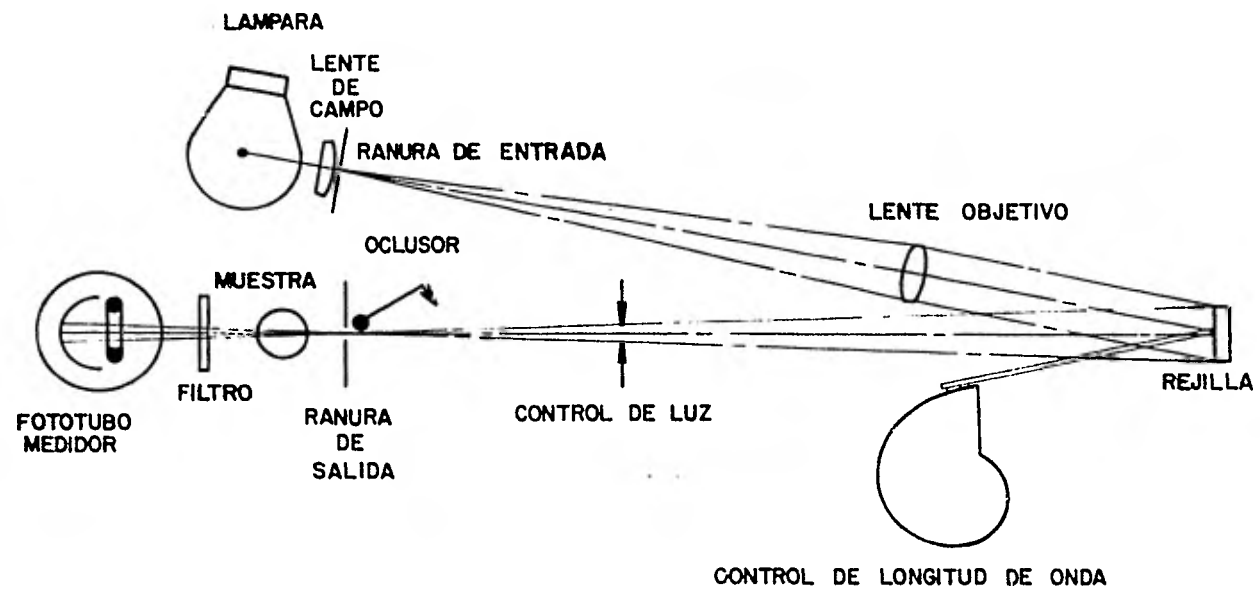


FIG. 2 - SISTEMA OPTICO DEL SPECTRONIC 20.

## Optica:

La luz blanca producida por una lámpara de Tungsteno pasa a través de la ranura de entrada y es enfocada por lentes de campo sobre lentes objetivos. El lente objetivo enfoca la imagen en la entrada de la ranura de salida después de que la luz ha sido dispersada y reflejada por la rejilla de difracción.

Cuando se escoge una longitud de onda, una serie de engranes colocan la rejilla de tal manera que solo la longitud de onda deseada pasa a través de la ranura de salida. La luz monocromática que sale pasa a través de la muestra contenida en el tubo de prueba o cuvette colocado en su camino. El rayo de luz termina en el fototubo de medición, en el cual la energía de la luz es convertida en una señal eléctrica. Cuando la muestra se retira del instrumento, una tapa cae automáticamente en el camino de la luz, bloqueando el paso de la luz al fototubo. El operador puede ajustar entonces el instrumento a 0 % de transmitancia en la escala de medición ( 2 ).

Cada aparato debe ser calibrado, según el sitio donde se va a trabajar. El presente estudio se realizó en el centro experimental de Chapa de Mota.



### III. OBJETIVOS.

1. Calibración de un Spectofotómetro (Spectronic 20, - Bausch & Lomb), para la estimación de la concentración del - semen de carnero.

2. Determinar la correlación entre el conteo en el hematocitómetro y la lectura en el espectrofotómetro a diferentes longitudes de onda.

3. Establecer cual es la longitud de onda más adecuada para estimar la concentración espermática en semen de carnero.

### IV. MATERIAL Y METODOS.

#### 1. MATERIAL.

Centro experimental de Chapa de Mota: Localización.

10°46' Latitud

99°29' Longitud

2400 mt de altura sobre el nivel del mar.

Borregos: 4 Sulffolk

3 Criollos

3 Pelibuey

5 Rambouiet

3 Rommney marsh

Un espectrofotómetro: "Spectronic 20" de Baush & Lomb

Tres cámaras de Neubauer (Hematocitómetro)

Cubreobjetos

Pipetas: 10 ml, 5 ml, 1 ml.

Solución de Citrato de Sodio al 2.9%

Colorante de rosa de bengala

Agua destilada

Dos gradillas

Veinte tubos de ensaye

Dos termómetros

Cuatro vaginas artificiales

Un baño maría

Toallas de papel

Un microscopio: Optico, marca Olympus, aumentos de: 10X, 40X,  
y 100 X.

Un contador de teclas

Quince tubos de ensaye graduados para recolectar semen

Veinticuatro tubos de prueba para el Spectronic

Cinco conos de latex

Un millar de fundas de polietileno

Ligas

Fundas para tubos de recolección

## 2. METODO.

### Limpieza del material.-

El material de cristalería, se lava perfectamente con agua y jabón comunes, enjuagando el material 10 veces con agua de la llave y después 5 veces con agua destilada. Se dejan secar perfectamente antes de usarlos.

En el caso de las vaginas artificiales se emplean fundas - de polietileno desechables; por lo que únicamente se lavan el cono, los tubos de colección del semen y las ligas. El cono - solo se lava con agua, no se emplean detergentes.

### Obtención del semen.-

Hay que tener en cuenta que el carnero necesita estímulos de presión y temperatura para eyacular ( 13 ). Por lo que las vaginas que se usan comunmente, para la obtención de semen en carnero, además de la entrada del agua, poseen mecanismos para inyectar aire dentro de la vagina, proporcionando de esta manera la presión necesaria para que el borrego eyacule adecuadamente.

Inicialmente se diseñaron vaginas que tenían un mecanismo para inyectar aire y de esta manera se proporcionaba la pre-

sión necesaria. Posteriormente al utilizar las fundas de polietileno se observó que no era necesario inyectar aire a las vaginas, ya que si éstas se llenaban completamente con agua, con -- esto se conseguía la presión necesaria.

Las vaginas originales, medían 30 cm de largo X 8 cm de -- diámetro, pero después se redujeron a la mitad de su longitud, -- ya que se observó que con la medida anterior una buena parte del semen quedaba en las paredes de ésta.

La vagina artificial se arma de la siguiente manera:

Perfectamente seca, se introduce la funda de polietileno, -- asegurándola junto con el cono de recolección de semen en uno de los extremos con ligas. Se llena la cámara formada por las paredes de la funda y la vagina con agua caliente a 42°C, asegurando el extremo libre de la funda a la vagina con ligas, verificando que no haya fugas de agua. Se coloca el tubo de recolección en el extremo del cono asegurándolo con otras ligas y protegiéndolo con una funda.

Los borregos que se emplearon en este experimento, fueron entrenados para montar, empleando una borrega en estro, el cual fué inducido mediante la inyección de estrógenos (cipionato de

estradiol, 5 mg intramuscular) y la aplicación intravaginal de esponjas con progesterona (Acetato de fluorogestona 20 mg intravaginal).

Una vez que los borregos están entrenados ya no es necesario el empleo de borregas en celo. El lugar donde se recolecta el semen es un sitio cerrado que cuenta con una fosa que -- permite que la persona que recolecta el semen quede a un nivel más bajo que el carnero por lo que se facilita el manejo de la vagina para obtener el semen.

Los borregos se trabajan por lotes de 5, los cuales se rotan de tal manera que cada borrego trabaja una vez cada 15 días obteniéndose en cada ocasión 3 eyaculados.

Una vez obtenido el semen se pone en baño maría a 37°C mientras se preparan las diluciones.

El semen obtenido para la lectura en el espectrofotómetro se diluye en una proporción de 1:100 y para el conteo directo 1:200.

## MANEJO DEL "SPECTRONIC 20" .

El "Spectronic 20", se caracteriza por su operación y ajuste sencillos. Es necesario hacer notar que para el uso exitoso de este instrumento se requiere una cuidadosa atención a los procedimientos de laboratorio que se empleen; algunos puntos -- que se mencionan a continuación deben ser tomados en cuenta -- para una operación adecuada del instrumento.

1. Todas las soluciones deben estar libres de burbujas. --
2. Todos los recipientes de muestra deben estar llenos -- cuando menos hasta la mitad de su capacidad.
3. Para mayor precisión, se deben usar "cuvettes".
4. Para un óptimo rendimiento con los recipientes de muestra hay que asegurarse que la marca en el tubo coincida -- con la del adaptador.
5. Durante operaciones prolongadas a una longitud de onda fija, se deben hacer ajustes regulares para el 100% de -- transmitancia.

#### PROCEDIMIENTOS BASICOS DE OPERACION.-

- 1.- Encender el aparato cuando menos 15 min. antes de empezar a usarlo, para que se caliente. (Control de encendido y ajuste a cero).
- 2.- Seleccionar la longitud de onda. (Control de longitud de onda).
- 3.- Ajustar a cero la escala. (Control de cero).
- 4.- Insertar el blanco de referencia y ajustar a 100% de T. O.
- 5.- Insertar la muestra desconocida y leer en T.O.

#### PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.-

- 1.- Tomar cuatro muestras de 0.1 ml cada una, del eyaculado obtenido y ponerlas en tubos de ensaye.
- 2.- Agregar a cada tubo 9.9 ml de solución de citrato de sodio al 2.9%.
- 3.- Agitar suavemente hasta lograr la completa dilución del semen.
- 4.- Llenar los tubos de prueba del espectrofotómetro cuando menos hasta la mitad, con la dilución hecha en cada tubo.
- 5.- Llenar aparte otro tubo de prueba con una dilución de citrato de sodio puro, sin semen ( tubo blanco).
- 6.- Seleccionar la longitud de onda deseada.

7.- Ajustar el "Spectronic 20" según el procedimiento de operación ( pasos 3,4,5) .

8.- Se registran las lecturas obtenidas, verificando que la variación entre las lecturas de cada uno de los cuatro tubos no sea mayor de 4% de T.O.; en caso de que hubiera una variación mayor, se desecha la muestra para evitar errores de medición.

9.- Se ajusta el aparato a la siguiente longitud de onda y se repiten los pasos 7 y 8.

10.- Para hacer las lecturas, se utilizaron las siguientes longitudes de onda: 325, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650 nm.

#### PROCEDIMIENTO PARA CONTEO DIRECTO EN LA CAMARA DE SPENCER.

1.- Se toma 1 ml de la dilución 1:100 utilizada en el espectrofotómetro.

2.- Se coloca en un tubo de ensaye perfectamente limpio.

3.- Se adiciona 1.0 ml de una solución de rosa de Bengala como colorante, obteniéndose de esta manera una dilución de 1:200.

4.- Se arma la cámara de Spencer (Neubauer), que debe -- estar limpia y seca.

5.- Se agita suavemente el tubo con el semen diluido y se toma con una pipeta una muestra de la dilución.



6.- Se introduce el semen diluido en el espacio que queda entre el cubreobjetos y la cámara, teniendo cuidado que el líquido solo cubra el área donde se encuentra el cuadrículado y que no se derrame por las ranuras de los lados.

7.- Se deja reposar por 5 minutos, para que los espermatozoides se asienten y sea más fácil su conteo.

8.- Se coloca la cámara en el microscopio y se localiza la zona cuadrículada con el objetivo de 10X.

9.- Una vez localizada la zona cuadrículada, se enfoca con el objetivo de 40X y se procede al conteo de los espermatozoides, siguiendo las normas ya citadas anteriormente.

10.- Este conteo se hace doble para cada muestra.

11.- El conteo de espermatozoides obtenidos de la cámara, deberá ser ajustado a espermatozoides / ml, ya que es la unidad de volumen comúnmente utilizada. Para lograr esto último, es necesario tener en cuenta los siguientes parámetros:

a) La dilución del semen es de 1:200 por lo tanto el número de espermatozoides contados es  $1/200$  de la concentración original del eyaculado fresco.

b) La zona cuadrículada del hemocitómetro tiene una superficie de  $1 \text{ mm}^2$ . La distancia que existe entre la cuadrícula y el cubreobjetos que forma la cámara, es de  $0.1 \text{ mm}$ ; por lo tanto el volumen de la cámara formada es de  $0.1 \text{ mm}^3$  ( $1.0 \text{ mm}^2 \times -$

$0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3$  ), o sea  $1/10$  de  $\text{mm}^3$  .

c) De la superficie de la cámara, que consta de 25 cuadros, solo se cuentan 5 lo que representa  $1/5$  de la superficie total.

En base a las consideraciones anteriores, el número de espermatozoides contados representan  $1/10\ 000$  parte de lo que hay en un milímetro cúbico de semen sin diluir (  $1/5 \times 1/10 \times 1/200 = 1/10\ 000$  ). Como un milímetro cúbico representa  $1/1000$  parte de un mililitro, ésto significa que lo contado en la cámara o hemocitómetro es una  $1/10\ 000\ 000$  parte de un mililitro; o sea para obtener la concentración original del eyaculado en mililitros, el número de espermatozoides contados deberá multiplicarse por  $10^7$  ( 14 ).

#### V. RESULTADOS Y DISCUSION.

A cada lectura de transmitancia óptica, le corresponde un valor de concentración espermática, obtenido mediante el conteo directo ( hemocitómetro ). Los valores generados de manera pareada, fueron posteriormente sometidos a un análisis de regresión y correlación simple, utilizando los métodos descritos por Steel y Torrie ( 1980 ) y Daniels (1977). Los resultados de dicho análisis se presentan a continuación.

ECUACIONES DE REGRESION Y COEFICIENTES DE CORRELACION

LONGITUD DE ONDA	ECUACION	CORRELACION
650 nm	$y = 511.58 + (-9.60) X_i$	$r = -0.8164$
600 nm	$y = 507.99 + (-11.80) X_i$	$r = -0.8233$
550 nm	$y = 506.84 + (-12.86) X_i$	$r = -0.8209$
500 nm	$y = 505.67 + (-14.02) X_i$	$r = -0.8174$
450 nm	$y = 502.57 + (-15.42) X_i$	$r = -0.8100$
400 nm	$y = 502.31 + (-18.23) X_i$	$r = -0.8055$
350 nm	$y = 499.04 + (-21.48) X_i$	$r = -0.8060$
325 nm	$y = 497.37 + (-21.98) X_i$	$r = -0.7970$

Como se puede observar, las ecuaciones de regresión y los coeficientes de correlación fueron negativos, ya que al incrementar la concentración espermática disminuye la cantidad de luz que puede atravesar la muestra.

Para poder determinar si las ecuaciones de regresión no eran debidas al azar, se procedió a efectuar los análisis de varianza para la pendiente de cada una de las ecuaciones. Dichos análisis se presentan en los cuadros 1 a 8. En todos los casos la pendiente fué altamente significativa ( $p < 0.01$ ).

Esto significa que la regresión es válida ya que la suma de cuadrados explicada es ampliamente mayor que la suma de -- cuadrados inexplicada.

Dentro del análisis también se obtuvieron los intervalos de confianza para la pendiente (  $p < .05$  y  $p < .01$  ); que a continuación se muestran.

#### INTERVALOS DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE

LONGITUD DE ONDA	INTERVALOS
650 nm	( -11.5731, - 7.6365) .95
	( -12.449 , - 6.7647) .99
600 nm	( -14.1619, - 9.4464) .95
	( -15.2062, - 8.4021) .99
550 nm	( -15.4533, - 10.2685) .95
	( -16.6016, - 9.1202) .99
500 nm	( -16.8851, - 11.1579) .95
	( -18.1535, - 9.8895) .99
450 nm	( -18.6532, - 12.1846) .95
	( -20.0859, - 10.7519) .99
400 nm	( -22.1116, - 14.3405) .95

	( -23.8327, - 12.6194) .99
350	( -26.0526, - 16.9121) .95
	( -28.0770, - 14.8878) .99
325	( -26.8117, - 17.1572) .95
	( -28.9499, - 15.0190) .99

Como se puede observar en ninguno de los intervalos de confianza, existe la posibilidad de que la pendiente sea cero. Por lo tanto se puede asumir que las pendientes observadas son válidas y no producto del azar. Además se puede establecer que con un determinado porcentaje de probabilidad (95 ó 99%), las pendientes de un número infinito de muestras caerán dentro de los rangos marcados por cada intervalo de confianza.

En el presente trabajo, no se utilizó una transformación señalada por algunos autores ( 2 - Log. de T.O. ) para producir una correlación y regresión positivas. El propósito de esto fue el de obtener una ecuación de regresión que no requiera de dicha transformación, haciéndola más útil a nivel de campo.

De las correlaciones obtenidas, la más elevada fue la lograda con una longitud de onda de 600 nm ( $r = -0.8233$ ). Este último

valor, es inferior al señalado por otros autores (2,13,14), - los cuales en trabajos similares han obtenido correlaciones - superiores a 0.90. La causa principal de esta situación no - pudo ser determinada, sin embargo se observó que parte de la variación inexplicada de los datos fué debida a fluctuaciones en el suministro de energía eléctrica que abastecía a los diferentes aparatos.

Al graficarse las correlaciones obtenidas de los diferentes grupos de datos (Figura 3); se puede observar que existe un incremento en el coeficiente de correlación, a medida que aumenta la longitud de onda ( rango de 325 a 500 nm). Posteriormente existe una estabilización del coeficiente de correlación (500 a 600 nm), para finalmente descender a un valor menor (650 nm). En base a las observaciones antes señaladas, los datos sugieren que la longitud de onda más adecuada para la calibración del espectrofotómetro "Spectronic 20" es la de 600 nm, sin embargo al efectuarse la prueba de homogeneidad de correlaciones, se determinó que no existe diferencia significativa entre los diferentes coeficientes de correlación. Los resultados de esta prueba se muestran en el cuadro 9.

Para poder hacer más expedita la utilización de la ecuación de regresión generada en este trabajo, en el cuadro 10 -

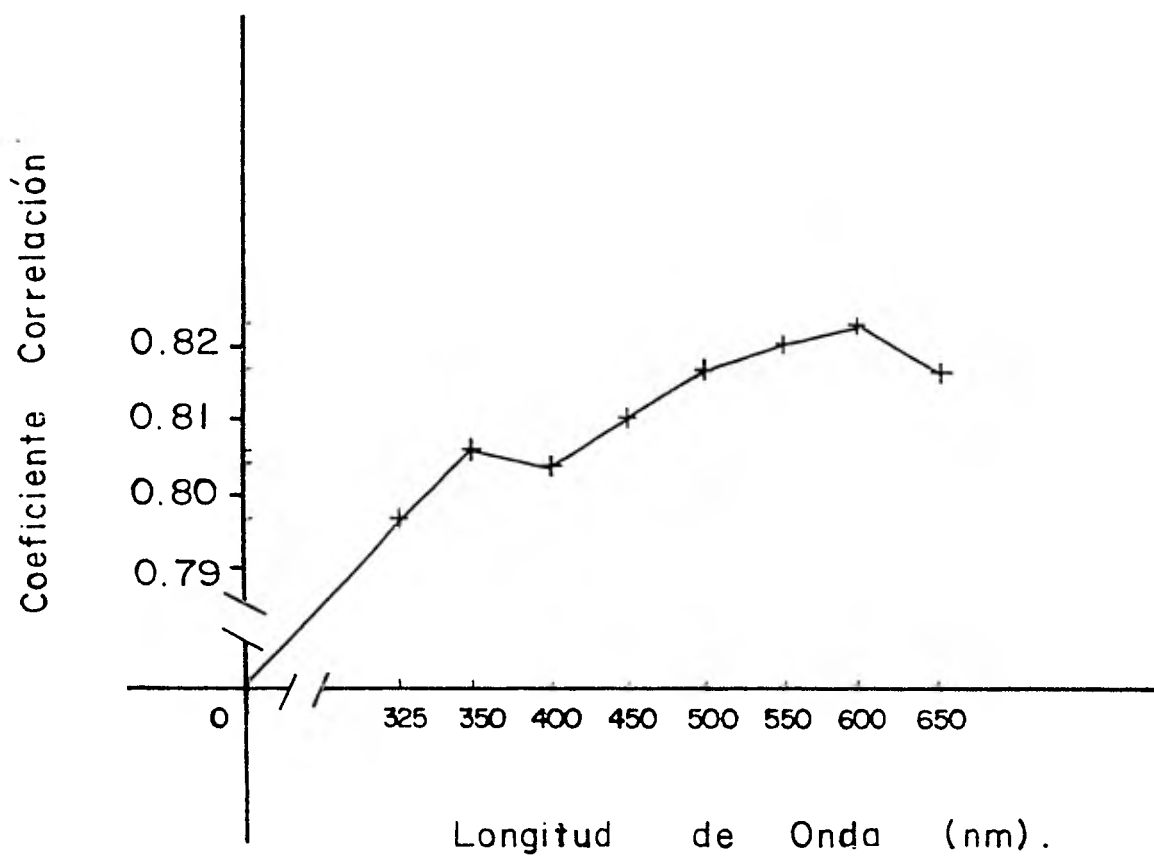


Fig. 3

Comparación de los diferentes coeficientes de Correlación

se presenta el desarrollo de dicha ecuación, en donde como -  
renglones se presentan diferentes valores de Transmitancia -  
Optica y como columnas el volumen en mililitros de semen eya-  
culado. En el cuerpo de la tabla se encuentra la concentra-  
ción (  $\times 10^7$  ) espermática del eyaculado.

Los valores de longitud de onda de 325 y 650 nm quedan -  
fuera del rango normal de funcionamiento del aparato. Por lo  
que para poder utilizarlas, es necesario emplear filtros espe-  
ciales, que no fueron utilizados en el presente trabajo.  
( 5, 17 ).

## VI. CONCLUSIONES.

El método del Spectrofotómetro para determinar la concen-  
tración espermática es adecuado y existe una elevada correla-  
ción entre éste y el método de conteo directo.

La determinación de la concentración espermática mediante  
el uso del espectrofotómetro es más exacta, rápida y presenta  
menor variación que con el conteo directo, ya que a cada deter-  
minación de transmitancia óptica corresponde una población nor-  
malmente distribuida de conteos directos de los cuales se toma  
como valor representativo a la media.



Aun cuando no hubo diferencia significativa entre los -  
diversos coeficientes de correlación es de hacerse notar que  
a medida que aumenta la longitud de onda de manera concomitante  
se incrementa el grado de asociación entre las dos varia-  
bles llegándose al valor más elevado a los 600 nm.

C U A D R O 1.  
ANALISIS DE VARIANZA

650 nm

FUENTE	GRADOS	SUMA	CUADRADO	
	LIBERTAD	CUADRADOS	MEDIO	F
TOTAL	35	331096.34		
EXPLICADA	1	220707.46	220707.46	67.98**
INEXPLICADA	34	110388.89	3246.73	

\* (P < .05)

\*\* (P < .01)

N.S. ( No Significativo)

C U A D R O 2.  
ANALISIS DE VARIANZA

600 nm

FUENTE	GRADOS	SUMA	CUADRADO	
	LIBERTAD	CUADRADOS	MEDIO	F
TOTAL	35	331096.34		
EXPLICADA	1	224450.15	224450.15	71.56**
INEXPLICADA	34	106646.19	3136.65	

\* (P < .05)

\*\* (P < .01)

N.S. ( No Significativo)

C U A D R O 3.

ANALISIS DE VARIANZA

550 nm

FUENTE	GRADOS	SUMA	CUADRADO	
	LIBERTAD	CUADRADOS	MEDIO	F
TOTAL	35	331096.34		
EXPLICADA	1	223122.24	223122.24	70.26**
INEXPLICADA	34	107974.10	3175.71	

\* (P < .05)

\*\* (P < .01)

N.S. ( No Significativo).

C U A D R O 4.

ANALISIS DE VARIANZA

500 nm

FUENTE	GRADOS	SUMA	CUADRADO	
	LIBERTAD	CUADRADOS	MEDIO	F
TOTAL	35	331096.34		
EXPLICADA	1	221208.79	221208.79	68.44**
INEXPLICADA	34	109887.55	3231.99	

\* (P < .05)

\*\* (P < .01)

N. S. (No Significativo).

C U A D R O 5  
ANALISIS DE VARIANZA

450

FUENTE	GRADOS	SUMA	CUADRADO	
	LIBERTAD	CUADRADOS	MEDIO	F
TOTAL	35	331096.34		
EXPLICADA	1	217247.40	217247.40	64.88**
INEXPLICADA	34	113848.95	3348.50	

\* (P < .05 )

\*\* (P < .01 )

N.S. ( No Significativo).

C U A D R O 6  
ANALISIS DE VARIANZA

400

FUENTE	GRADOS	SUMA	CUADRADO	
	LIBERTAD	CUADRADOS	MEDIO	F
TOTAL	35	331096.34		
EXPLICADA	1	214815.86	214815.86	62.81**
INEXPLICADA	34	116280.48	3420.01	

\* (P < .05)

\*\* (P < .01)

N.S. (No Significativo).

C U A D R O 7

ANALISIS DE VARIANZA

350 nm

FUENTE	GRADOS LIBERTAD	SUMA CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F
TOTAL	35	331096.34		
EXPLICADA	1	215131.43	215131.43	63.07**
INEXPLICADA	34	115964.92	3410.73	

\* (P < .05)

\*\* (P < .01)

N.S. (No Significativo).

C U A D R O 8

ANALISIS DE VARIANZA

325 nm

FUENTE	GRADOS LIBERTAD	SUMA CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F
TOTAL	35	331096.34		
EXPLICADA	1	210324.50	210324.50	59.21**
INEXPLICADA	34	120771.84	3552.11	

\* (P < .05)

\*\* (P < .01)

N.S. (No Significativo).

C U A D R O 9

PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE CORRELACIONES

FUENTE	n	r	$Z_i'$	$Z_i' - \bar{Z}_w'$	$(n-3)(Z_i' - \bar{Z}_w')^2$
650	36	-0.8164532	-1.14609	-0.01248	0.00514
600	36	-0.8233468	-1.16712	-0.03351	0.03705
550	36	-0.8209076	-1.15959	-0.02598	0.02227
500	36	-0.81738	-1.14887	-0.01526	0.00768
450	36	-0.8100282	-1.12711	-0.00650	0.00140
400	36	-0.8054823	-1.11403	-0.01958	0.01266
350	36	-0.8060737	-1.11572	-0.01789	0.01057
325	36	-0.7970173	-1.09038	-0.04323	0.06168

## C U A D R O 10

	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9	2.0
0.5	50	100	151	201	251	301	351	402	452	502	552	602	653	703	753	803	853	904	954	1004
1.0	50	99	149	199	248	298	347	397	446	496	546	595	645	694	744	794	843	893	942	992
1.5	49	98	147	196	245	294	343	392	441	490	539	588	637	686	735	784	833	882	931	980
2.0	48	97	145	194	242	290	339	387	436	484	532	581	629	678	726	774	823	871	919	968
2.5	48	96	143	191	239	287	335	382	430	478	526	574	621	669	717	765	812	860	908	956
3.0	47	95	142	189	237	284	331	378	426	473	520	568	615	662	710	757	804	851	899	946
3.5	47	93	140	187	234	280	327	374	420	467	514	560	607	654	701	747	794	841	887	934
4.0	46	92	138	184	231	277	323	369	415	461	507	553	599	645	692	738	784	830	876	922
4.5	46	91	137	182	228	273	319	364	410	455	501	546	592	637	683	728	774	819	865	910
5.0	45	90	135	180	225	270	314	359	404	449	494	539	584	629	674	718	763	808	853	898
5.5	44	89	133	177	222	266	310	354	399	443	487	532	576	620	665	709	753	797	842	886
6.0	44	87	131	175	219	263	306	350	393	437	481	524	568	612	656	699	743	787	830	874
6.5	43	86	129	172	216	259	302	345	388	431	474	517	560	603	647	690	733	776	819	862
7.0	43	85	128	170	213	255	298	340	383	425	468	510	553	595	638	680	723	765	808	850
7.5	42	84	126	168	210	251	293	335	377	419	461	503	545	587	629	670	712	754	796	838
8.0	41	83	124	166	207	248	290	331	373	414	455	497	538	580	621	662	704	745	787	828
8.5	41	82	122	163	204	245	286	326	367	408	449	490	530	571	612	653	694	734	775	816
9.0	40	80	121	161	201	241	281	322	362	402	442	482	523	563	603	643	683	724	764	804
9.5	40	79	119	158	198	238	277	317	356	396	436	475	515	554	594	634	673	713	752	792
10.0	39	78	117	156	195	234	273	312	351	390	429	468	507	546	585	624	663	702	741	780
10.5	38	77	115	154	192	230	269	307	346	384	422	461	499	538	576	614	653	691	730	768
11.0	38	76	113	151	189	227	265	302	340	378	416	454	491	529	567	605	643	680	718	756
11.5	37	74	112	149	186	223	260	298	335	372	409	446	484	521	558	595	632	670	707	744
12.0	37	73	110	146	183	220	256	293	329	366	403	439	476	512	549	586	622	659	695	732
12.5	36	72	108	144	180	216	252	288	324	360	396	432	468	504	540	576	612	648	684	720
13.0	36	71	107	142	178	213	249	284	320	355	391	426	462	497	533	568	604	639	675	710
13.5	35	70	105	140	175	209	244	279	314	349	384	419	454	489	524	558	593	628	663	698
14.0	34	69	103	137	172	206	240	274	309	343	377	412	446	480	515	549	583	617	652	686
14.5	34	67	101	135	169	202	236	270	303	337	371	404	438	472	506	539	573	607	640	674
15.0	33	66	99	132	166	199	232	265	298	331	364	397	430	463	497	530	563	596	629	662
15.5	33	65	98	130	163	195	228	260	293	325	358	390	423	455	488	520	553	585	618	650
16.0	32	64	96	128	160	191	223	255	287	319	351	383	415	447	479	510	542	574	606	638
16.5	31	63	94	125	157	188	219	250	282	313	344	376	407	438	470	501	532	563	595	626
17.0	31	61	92	123	154	184	215	246	276	307	338	368	399	430	461	491	522	553	583	614
17.5	30	60	90	120	151	181	211	241	271	301	331	361	391	421	452	482	512	542	572	602
18.0	30	59	89	118	148	178	207	237	266	296	326	355	385	414	444	474	503	533	562	592
18.5	29	58	87	116	145	174	203	232	261	290	319	348	377	406	435	464	493	522	551	580
19.0	28	57	85	114	142	170	199	227	256	284	312	341	369	398	426	454	483	511	540	568
19.5	28	56	83	111	139	167	195	222	250	278	306	334	361	389	417	445	473	500	528	556
20.0	27	54	82	109	136	163	190	218	245	272	299	326	354	381	408	435	462	490	517	544
20.5	27	53	80	106	133	160	186	213	239	266	293	319	346	373	399	426	452	479	505	532
21.0	26	52	78	104	130	156	182	208	234	260	286	312	338	364	390	416	442	468	494	520
21.5	25	51	76	102	127	152	178	203	229	254	279	305	330	356	381	406	432	457	483	508
22.0	25	50	74	99	124	149	174	198	223	248	276	298	322	347	372	397	422	446	471	496

22.5	24	48	73	97	121	145	169	194	218	242	266	290	315	339	363	387	411	436	460	484
23.0	24	47	71	94	118	142	166	189	213	236	260	284	307	331	354	378	402	425	449	472
23.5	23	46	69	92	116	139	162	185	208	231	254	277	300	323	347	370	393	416	439	462
24.0	23	45	68	90	113	135	158	180	203	225	248	270	293	315	338	360	383	405	428	450
24.5	22	44	66	88	110	131	153	175	197	219	241	263	285	307	329	350	372	394	416	438
25.0	21	43	64	85	107	128	149	170	192	213	234	256	277	298	320	341	362	383	405	426
25.5	21	41	62	83	104	124	145	166	186	207	228	248	269	290	311	331	352	373	393	414
26.0	20	40	60	80	101	121	141	161	181	201	221	241	261	281	302	322	342	362	382	402
26.5	20	39	59	78	98	117	137	156	176	195	215	234	254	273	293	312	336	351	371	390
27.0	19	38	57	76	95	113	132	151	170	189	208	227	246	265	284	302	321	340	359	378
27.5	18	37	55	73	92	110	128	146	165	183	201	220	238	256	275	293	311	329	348	366
28.0	18	35	53	71	89	106	124	142	159	177	195	212	230	248	266	283	301	319	336	354
28.5	17	34	52	69	86	103	120	137	154	172	189	206	224	241	258	275	292	310	327	344
29.0	17	33	50	66	83	100	116	133	149	166	183	199	216	232	249	266	282	299	315	332
29.5	16	32	48	64	80	96	112	128	144	160	176	192	208	224	240	256	272	288	304	320
30.0	15	31	46	62	77	92	108	123	139	154	164	185	200	216	231	246	262	277	292	308
30.5	15	30	44	59	74	89	104	118	133	148	163	178	192	207	222	237	252	266	281	296
31.0	14	28	43	57	71	85	99	114	128	142	156	170	185	199	213	227	241	256	270	284
31.5	14	27	41	54	68	82	96	109	123	136	150	164	177	191	204	218	232	245	259	272
32.0	13	26	39	52	65	78	91	104	117	130	143	156	169	182	195	208	221	234	247	260
32.5	12	25	37	50	62	74	87	99	112	124	136	149	161	174	186	198	211	223	236	248
33.0	12	24	35	47	59	71	83	94	106	118	130	142	153	165	177	189	201	212	224	236
33.5	11	23	34	45	57	68	79	90	102	113	124	136	147	158	170	181	192	203	215	226
34.0	11	21	32	43	54	64	75	86	96	107	118	128	139	150	161	171	182	193	203	214
34.5	10	20	30	40	51	61	71	81	91	101	111	121	131	141	152	162	172	182	192	202
35.0	10	19	29	38	48	57	67	76	86	95	105	114	124	133	143	152	162	171	181	190
35.5	9	18	27	36	45	53	62	71	80	89	98	107	116	125	134	142	151	160	169	178
36.0	8	17	25	33	42	50	58	66	75	83	91	100	108	116	125	133	141	149	158	166
36.5	8	15	23	31	39	46	54	62	69	77	85	92	100	108	116	123	131	139	146	154
37.0	7	14	21	28	36	43	50	57	64	71	78	85	92	99	107	114	121	128	135	142
37.5	7	13	20	26	33	39	46	52	59	65	72	78	85	91	96	104	111	117	124	130
38.0	6	12	18	24	30	35	41	47	53	59	65	71	77	83	89	94	100	106	112	118
38.5	5	11	16	22	27	32	38	43	49	54	59	65	70	76	81	86	92	97	102	108
39.0	5	10	14	19	24	29	34	38	43	48	53	58	63	67	72	77	82	87	91	96



## VII. BIBLIOGRAFIA

1. Arscott, G. H. (1969); Packed sperm volume versus density as a measure of semen concentration; Poultry Science 48:1126 - 1127.
2. Bausch & Lomb; Analytical Systems division; The Bausch & Lomb Spectronic 20 Spectrophotometer; Operator's Manual; - Sixth Edition; Second Printing; pp 3-11.
3. Bratton, R. W.; R. H. Foote; K. Shipman; (1956); Procedure for counting bovine sperm with a hemocytometer and the calibration an operational use of a photelometer to estimate - sperm count by optical density; Laboratory of animal breeding and artificial insemination; Animal husbandry department, Cornell University Ithaca, N. Y.; pp 1-12.
4. Comstock, R.E.; and W.W. Green; ( 1939); Methods for semen evaluation; I. Density, respiration, glucolysis of semen Am. Soc. Animal Prod. Proc. 32: 213 - 216.
5. Daniel, W. W.; (1977); Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud; 1a. edición; Editorial Limusa.

6. Faulkner, L. C. y M. H. Pineda; (1980); Artificial Insemination; Veterinary Endocrinology and Reproduction, Edited by: L.E. Mc Donald; 3a. edición; Lea & Febiger; Cap. 11; - - pp 331-366.
  
7. Foote, R. H. Artificial Insemination; (1980); Reproduction in Farm Animal; Editado por: E.S.E. Hafez; 4a. edición; Lea & Febiger; Cap. 26; pp 521-545.
  
8. Foote, R. H.; (1958); Estimation of bull sperm concentration by packed cell volume; Journal Dairy Science 41: 1109/1110.
  
9. Gomes, W.R.; (1977); Artificial Insemination; In: Reproduction in Domestic animals; Editado por: H.H. Cole and P. T. Cupps; 3a. edición; Academic Press, Inc. Cap. 10; pp 257-285.
  
10. Henle G., and C.A. Zittle; (1942); Studies of the metabolism of bovine epididymal spermatozoa pp 70-78.
  
11. Hickman, C.G.; (1958); Spermatocrit values in facilitating - the estimation of spermatozoa concentration; Journal Dairy Science 41:318-319.

12. Moss, J.A.; D.R. Melrose; H.C.B. Reed & M. Vandeplassche;  
(1979); Spermatozoa, Semen and Artificial Insemination; In:  
Fertility and Infertility in Domestic Animals. Editado por:  
J.A. Laing; 3a. edición; Bailliere Tindall; Cap. 4; pp 59-91.
13. Roberts, S.J.; (1971); Infertility in Male Animals; In: -  
Veterinary Obstetrics and Genital Diseases; 2a. edición;  
Edwards Brothers, Inc.; Cap. 18; pp 604 - 697.
14. Salisbury, G.W.; N. L. Van Demark and J.R. Lodge; (1978);  
Semen evaluation; In: Physiology of Reproduction and Artifi-  
cial insemination of cattle; 2a. edición; Freeman & Co.;  
Cap. 14; pp 400 - 427.
15. Salisbury, G.W.; G.H. Beck; I. Elliott and E.L. Willett;  
(1943); Rapid methods for estimating the number of spermato-  
zoa in bull semen; Journal dairy Science 26:69-79.
16. Sorensen, A.M.; (1979); Animal Reproduction principles and  
practices; 1a. edición; McGraw Hill, Inc.
17. Steel, R.G.D. and J. H. Torrie; (1980); Principles and -  
Procedures of Statistics, A Biometrical Approach; 2a. edición;  
McGraw Hill, Inc.