



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN.

**CORRELACIÓN ENTRE LA CÁMARA DE NEUBAUER
Y EL ESPECTROFOTÓMETRO MICROREADER I.
PARA EVALUAR LA CONCENTRACIÓN
ESPERMÁTICA BOVINA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.

PRESENTA:

AMADO LUIS BERNAL FLORES.

ASESOR: DR. ARMANDO ENRIQUE ESPERÓN SUMANO.

COASESORES: DR. BENITO LÓPEZ BAÑOS.

MVZ. ZOILA ERIKA CATELLANOS BRAVO.

QFB. JUANA ALICIA ALQUICIRA CAMACHO.



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.

DEDICATORIA

A DIOS:

Por permitirme concluir una página más de vida ¡Muchas gracias Señor!

A MI PADRE:

Amado Bernal.

Por que nunca me faltó lo necesario durante este tiempo de mi vida y durante la realización de mis estudios. ¡Gracias papi!

A MI MADRE:

Luisa Flores

Por que nunca me faltó su cariño aun en tiempos difíciles y porque siempre encontraba una palabra de aliento en cualquier situación ¡Gracias mami!

...Y a ambos por quienes he sentido el deseo de poder ayudarlos esperando que así sea

A MIS HERMANOS:

Álvaro, Maricruz, José Alberto y Rosa Elena, por el cariño que me tienen por ser el hermano menor y por su apoyo durante las épocas de estudiante que ayudaron a mi formación y contribuyeron para esta meta.

A MIS TIOS Y ABUELOS:

Especialmente a los que han estado cerca de mí y me han ayudado en mi formación como estudiante y como persona.

A TODOS MIS DEMAS FAMILIARES

A MIS AMIGOS

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM

Al Dr. Armando Enrique Esperón por su amistad, apoyo durante mi estancia en el programa de servicio social y la realización de esta tesis.

Al Dr. Benito López por su amistad, sus valiosos comentarios y su ayuda para realizar la parte estadística de este trabajo.

A la MVZ Erika Castellanos y a la QFB Alicia Alquicira, por haber sentado las bases de este trabajo y su ayuda durante el diseño experimental.

A mis profesores el Dr. Enrique Esperón, Dr. Carlos Gerardo García, MVZ Hugo Bernal, MVZ Antonio Licea Vega, MVZ Víctor Quintero, MVZ Rafael Ordoñez, MVZ Irma Tovar Corona, MVZ Carlos García Alcaraz, MVZ Eugenio Bravo Quintanar, a quienes admiro y ayudaron a mi formación en la carrera. En general a todos aquellos que muestran un gran compromiso con los alumnos y con la universidad.

A mis compañeros en especial a Luis Alberto Pérez, Erandi Pastrana, Lizbeth González por su amistad durante toda la carrera y a todos aquellos de quienes no hago mención pero cada uno de ellos sabe que les estimo mucho.

A Rosalba Rodríguez Rosales por su cariño durante estos meses y su apoyo incondicional desde el inicio de esta tesis.

A todos mis amigos de la Rondalla de San Juan con quienes he compartido inolvidables momentos y el gusto por la música.

A Juan José de Jesús quien ha compartido sus valiosos conocimientos durante el ejercicio práctico de esta bonita profesión.

... Y a todos aquellos que tal vez olvide mencionar o que no se encuentran en este momento en mi mente pero que de alguna manera han contribuido en mi formación como persona y profesionalista.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
3. OBJETIVO	4
4. MATERIALES Y MÉTODOS	4
5. RESULTADOS	10
6. DISCUSIÓN	12
7. CONCLUSIONES	14
8. BIBLIOGRAFÍA	15
APÉNDICE	17

RESUMEN

La densidad óptica es el principio en el cual se basa el espectrofotómetro para medir indirectamente la concentración espermática de una muestra. Cuanto más elevada sea la opacidad o en este caso la concentración, pasa menos luz a través de la muestra. El espectrofotómetro se calibra mediante un hemocitómetro (cámara de Neubauer), así es posible leer la concentración de una muestra en una tabla que relacione la absorción o transmisión de luz y la concentración. Debido a que este método es de gran utilidad, en la actualidad es el más utilizado para determinar la concentración espermática en los grandes centros de inseminación artificial, según una encuesta realizada en el 2000. Además de ser rápido para determinar la concentración de un gran número de muestras a la vez, existen algunos aparatos que también nos determinan el número de dosis que podemos obtener de un eyaculado, así como la cantidad de diluyente a añadir en la dilución final. El objetivo del presente trabajo fue determinar la correlación que existe entre la cámara de Neubauer y el espectrofotómetro "Microreader I" en sus dos modos de operación: absorbancia y concentración, para lo cual se determinó la concentración espermática en semen de toro de 2 razas obteniendo la concentración de 20 muestras mediante los dos métodos. Las dos lecturas obtenidas por el aparato en este caso absorbancia y concentración fueron comparadas con las lecturas directas obtenidas en la cámara de Neubauer. Obteniendo una correlación de 0.99969256 y 0.99959029 respectivamente, además al graficar los valores se obtuvo una curva de absorbancia que fue analizada mediante los siguientes modelos matemáticos: Lineal, Logarítmica, Exponencial y Curva a una potencia, siendo este último, el que explica los resultados obtenidos con un coeficiente de determinación de 0.9990279 contra 0.8448345 del Lineal, 0.9510354 del exponencial y 0.9567125 del Logarítmico. Lo que significa que el "Microreader I" puede utilizarse con ventaja para obtener la concentración espermática de semen bovino por su gran exactitud y velocidad de lectura, ya sea indirectamente por medio de una tabla en el modo absorbancia, o calibrándolo con una muestra "x" en su modo de concentración.

1. INTRODUCCIÓN

Un aspecto muy importante a evaluar en el procesamiento de semen, es la concentración, ya que es la característica seminal más variable, por lo que errores en su medida pueden contribuir mayormente a errores cuando se estima el número total de espermatozoides por dosis (Hafez, 1987). La determinación del volumen, la concentración y el porcentaje de anomalías primarias y secundarias, de las características anteriores depende el número de dosis que se pueden obtener de un eyaculado para la inseminación artificial (Ibarguengoitia, 1982). Además la concentración espermática está relacionada con la capacidad testicular, la disminución de la concentración en un grado severo va a menudo acompañada de otros signos de patología testicular (Esperón y López, 1993).

La concentración se determina de diversas maneras. Algunos de los métodos son practicables bajo ciertas circunstancias, mientras que otros no (Sorensen 1982). Básicamente puede ser determinada por cinco métodos diferentes.

Observación visual. Densidad/concentración. Bajo condiciones de campo se realiza observando la opacidad de la muestra dentro del tubo de recolección sobre un fondo oscuro, para que por contraste en forma cualitativa se determine esta característica (Esperón y López, 1993; Sorensen 1982). Sin embargo esta determinación por inspección visual es subjetiva y por lo tanto solo dan una idea aproximada de la concentración de células espermáticas (Zemjanis, 1966).

Hemocitómetro (Cámara de Neubauer). Es el método más exacto y más económico, aunque no aplicable a rutinas de manejo de muchos toros diariamente (Esperón y López 1993). En donde una muestra de semen se mezcla en una pipeta de Thoma que proporciona una dilución estándar 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 periodo de agitación de la dilución, no menor a 2 minutos para asegurar una adecuada suspensión de espermatozoides (Ibarguengoitia, 1982). La cámara de Neubauer tiene un volumen de 0.1 mm^3 y una superficie de 1 mm^2 dividida esta en una cuadrícula microscópica que consta de 25 cuadros grandes subdivididos en 16 pequeños (Ibarguengoitia, 1982; Sorensen 1982). Para el conteo no es necesario contar todas las células del campo; basta con las que ocupan cinco cuadros en diagonal (o los de las cuatro esquinas y el centro). Para obtener el número de espermatozoides se hace de la siguiente manera:

- El volumen se diluyó en una proporción de 1:200
- Se contaron los espermatozoides de un volumen de $1/50 \text{ mm}^3$
- Por lo tanto el número de espermatozoides contados, multiplicados por la tasa de dilución y la fracción del volumen nos da el número de células por mm^3

$$\text{Número de espermatozoides} \times 50 \times 200 = 10000 \text{ X/mm}^3$$

La concentración se expresa en ml, es decir en cm^3 , por lo tanto el resultado anterior se multiplicará por 1000. En forma práctica se añaden siete ceros al resultado de la suma de espermatozoides en 5 cuadros (Sorensen 1982).

Espectrofotómetro. Es un método ampliamente utilizado, que da una estimación indirecta ya que evalúa el grado de luminosidad que pasa a través de una suspensión de espermatozoides (Remberg, 1995). Así es posible leer

la concentración de una muestra que relacione la transmisión de la luz y la concentración (Sorensen, 1982).

Nefelómetro. Este instrumento es similar al fotómetro, excepto que mide la luz dispersada por la muestra en vez de calcular la luz transmitida (Sorensen, 1982). Un nefelómetro permite medir la cantidad de un haz de luz determinada que se desvía y absorbe por un volumen estándar de semen diluido en una proporción establecida. Conforme aumenta el número de células por unidad de volumen, el semen se hace más opaco (Salisbury *et al.*, 1978).

Espermatocitómetro o espermatocrito. Se basa en el principio del hematocrito, al centrifugar el semen en una micropipeta se separa el paquete celular y el plasma seminal. La relación entre los dos permite calcular el número de espermatozoides en un volumen fijo (Galina y Valencia, 2006).

Aunque actualmente existen otros aparatos como el coulter counter (cuenta partículas) que calculan las partículas en base a su tamaño, dando una medida mucho más exacta, este tipo de aparatos por su alto costo no se utilizan en México y solo se emplean en contados laboratorios de E.U.A y Europa (Sanchez, 2000).

Los recuentos directos de células en el hemocitómetro son tediosos, lentos y no más exactos que los que se utilizan actualmente, sin embargo puede ser sustituido por otras técnicas que tienen una precisión ligeramente menor pero con ventajas operativas como reducir el tiempo de lectura y el margen general de error, que se presenta al tener que realizar muchas observaciones microscópicas en el hemocitómetro (Remberg, 1995; Martínez, 1985). De estas técnicas la más utilizada es la nefelométrica o espectrofotométrica en la que se ha reportado un margen de error de 5 a 8% (Martínez, 1985).

En una encuesta realizada por Sánchez (2000), el espectrofotómetro es el instrumento para medir la concentración más utilizado para el procesamiento del semen en México. De ahí y de otros aspectos como el factor tiempo, radica la importancia de la utilización de este método en los grandes centros de Inseminación artificial.

PROPIEDADES DEL SEMEN DE TORO.

El semen normal de toro eyaculado recientemente, que contiene espermatozoides activos y móviles, presenta un movimiento en ondas que observado a través de las paredes de un recipiente de vidrio presenta el aspecto de que “hierve”. El color es blanco lechoso, variando a un color crema, sin embargo algo más del 10% de los toros producen un semen normalmente amarillo. (Salisbury *et al.*, 1978). El volumen del eyaculado fluctúa de 2-8 y puede llegar de 10-15 ml, varía con los distintos toros y en diferentes momentos de cada toro.(Zemjanis 1966; Salisbury *et al.*, 1978).

En general, el volumen aumenta con la edad y el tamaño corporal del toro, se modifica con su salud y vigor reproductor y con la frecuencia de los servicios (Derivaux, 1961). La concentración del semen de toro varía de 800-1200 x 10⁶ con una media de 1000 x 10⁶ (Sorensen, 1982 Salisbury *et al.*, 1978). La concentración varía con el desarrollo sexual y la madurez del toro, con el régimen de alimentación y con el estado de salud reproductiva y tamaño de los testículos, además existen diferencias reales entre toros, entre grupos de toros

de diferentes edades, en la época del año y en localidades geográficas diferentes. (Salisbury *et al.*, 1978).

2. ANTECEDENTES

El espectrofotómetro es un método ampliamente utilizado, se basa en el grado de luminosidad que pasa a través de una suspensión de espermatozoides o en su defecto, la luz que se desvía y absorbe por un volumen estándar de semen diluido en el caso del nefelómetro. Estos instrumentos se calibran por medio de un hemocitómetro, así es posible leer la concentración de una muestra que relacione la transmisión o absorción de luz con la concentración. Comstock y Green (1939) en el Carnero, Salysbury y col. (1943) en el toro y posteriormente Willet y Büchner (1951) y Perez (1957). En base a lo anterior mostraron que se establece una curva de calibración para estos aparatos con muestras de semen a diluciones conocidas (Derivaux, 1961) Desde entonces, cada vez se ha perfeccionado la técnica espectrofotométrica para numerosas especies animales, obteniendo correlaciones aceptables entre los dos métodos. En el toro se han obtenido las siguientes correlaciones 0.963 (Plut *et al.*, 1972), 0.86 usando un fotómetro Spekol 10 (Nehring *et al.*, 1987), 0.92 (Neubert *et al.*, 1983), 0.95 mediante un fotómetro Spectronic 20 (Sorensen, 1982), 0.93 usando un espectro fotógrafo (López y Mellado, 2001). Así mismo 0.98 al utilizar semen de toro en dilución inicial con yema de huevo, triton y solución salina (Lorton *et al.*, 1984). En el carnero se han obtenido correlaciones de: 0.823 usando el Spectronic 20 a una longitud de onda de 600nm (Ibarguengoitia, 1982), 0.66 (Neubert *et al.*, 1983), 0.77 usando un fotómetro Spekol 10 (Nehring *et al.*, 1987). En el macho cabrío 0.96 usando un espectro fotógrafo (López y Mellado, 2001). En el cerdo 0.67 usando un fotómetro Spekol 10 (Nehring *et al.*, 1987). En el perro 0.808 (Cardoso *et al.*, 2003). En pavos 0.996 y 0.992 usando un densímetro modelo 534-B-Mod1 y un foto colorímetro Klett respectivamente (Donoghe *et al.*, 1996). En conejos 0.94 (Castellini *et al.*, 2007), así también se ha descrito el método fotométrico para determinar concentración espermática en algunas especies de pescado, correlacionándolo con el espermatocrito, concluyendo que las lecturas se realizan de manera rápida y precisa (Ciereszko y Dabrowski, 1993). Así mismo en un estudio realizado por Rondeau y Rouleau (1984) usando semen de toro, verraco y garañón, citan que la curva de calibración varía de acuerdo con el espectrofotómetro utilizado y deben utilizarse diferentes tasas de dilución para calibrarlo de acuerdo a la especie, a causa de las diferencias en concentración.

3. OBJETIVO

- Determinar la correlación que existe entre el conteo directo en la cámara de Neubauer y el espectrofotómetro Microreader I (Modo absorbancia y modo concentración)

4. MATERIALES Y MÉTODO

El presente trabajo se realizó en laboratorio de Reproducción Animal y el Centro de Enseñanza Agropecuario, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, ubicada en el municipio de Cuautitlán Izcalli Edo. México.

Se utilizaron 2 toros, 1 Holstein y 1 Charolais.

Material de laboratorio:

1 espectrofotómetro: "Microreader 1"

Cubetas para el microreader I

3 cámaras de Neubauer

Cubreobjetos

3 micropipetas (2-20 mcl, 20-200mcl, 200-1000mcl),

Puntas para micropipetas

Agua bidestilada desionizada

1 gradilla

7 tubos de ensaye con tapón de hule

1 microscopio óptico

1 contador de teclas

1 vaso de precipitado de 100 ml

5 pipetas de Thoma

Pipetas Pasteur

1 agitador eléctrico

Solución de citrato de sodio al 2.9 %

Colorante rosa de Bengala al 2%

Toallas de papel

Material para la recolección de semen:

3 vaginas artificiales

Tubos colectores para semen

3 conos de silicón

1 equipo de electroeyaculación (tomas de corriente y cables)

1 cafetera para calentar agua

Ligas

1 termómetro de columna

1 termo

Guantes de palpación

MÉTODO

Obtención del semen.

Se utilizó la vagina artificial. Esta consta de un soporte externo, rígido o poco flexible, con un forro interno lleno de agua, a temperatura y presión controladas, y un cono colector que termina en una probeta graduada. El uso de la vagina artificial requiere que el toro sea entrenado previamente para que aprenda a eyacular en ella; bajo estas condiciones, este es el método de elección, pues las características del eyaculado obtenido con la vagina artificial son similares a las de un eyaculado normal; además con este método se pueden evaluar algunos aspectos de la conducta sexual del toro y su capacidad de monta.

La vagina artificial se arma de la siguiente manera: Colocar el hule de látex (previamente calentado para facilitar su manejo y evitar su ruptura) en el tubo cilíndrico de aproximadamente 45 cm. de largo, se asegura el hule con tres ligas en cada extremo y se le coloca un cono y una probeta graduada para poder medir el volumen del eyaculado, esta a su vez debe estar en baño María entre 35-37 °C y protegida de la luz solar con una funda, asegurando también estos accesorios con ligas; después de terminar el armado se le coloca agua caliente y la vagina debe tener una temperatura final entre 39 y 42 °C; además de tener una presión adecuada tomando como referencia que pase un dedo en el espacio interior y, entonces se asegura la válvula de seguridad que nos ayuda a mantener la presión y evitar pérdidas de agua y de aire.

Una vez obtenido el semen, se puede conservar en baño María entre 35-37 °C o bien a temperatura ambiente, ya que solo es de interés para este estudio la determinación de la concentración espermática y no es necesario que mantenga la viabilidad.

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

Preparación de las diluciones.

Se hicieron siete diluciones en siete tubos utilizando el citrato de sodio al 2.9 % y la muestra de semen fresco para obtener una suspensión entre ellos, iniciando con la dilución 1/100, 1/150, 1/200, hasta 1/400, para medir el volumen se utilizaron las micropipetas de 20-200 µl, 200-1000 µl, para una mejor exactitud. Al terminar las diluciones los tubos se taparon para evitar su contaminación.

Manejo del Microreader I

Puntos que deben ser tomados en cuenta para un adecuado funcionamiento

- 1.- Conectar el adaptador dentro del puerto del Microreader I
- 2.- Conectar el adaptador a la electricidad dentro del voltaje adecuado (125 v), al mismo tiempo aparecerá un mensaje de bienvenida en la pantalla.
- 3.- Dejar calentar el aparato durante 5 minutos para que la lámpara se estabilice y funcione adecuadamente.

Realización de las lecturas.

- 1.- Las lecturas se hicieron con el aparato en el modo de operación absorbancia y concentración siguiendo las indicaciones del manual.
- 2.- Las soluciones deben estar libres de burbujas y las cubetitas deben estar llenas por lo menos a la mitad de su capacidad.
- 3.- Antes de leer cada tubo se agitó manualmente de un lado a otro por 10 veces y después mediante el agitador eléctrico por 10 segundos, hasta lograr una mezcla perfectamente homogénea (muy importante para evitar variación en la lectura).
- 4.- La lectura se realizó inmediatamente por medio del aparato, hasta que esta se estabilice en la pantalla al presionar la tecla "Read/Yes", esto se logra presionando la tecla de dos a tres veces.
- 5.- En cada tanda se enjuagaron y secaron las cubetitas con agua destilada por lo menos dos veces, para evitar residuos que nos alteren las lecturas de los siguientes tubos.

Procedimiento para el modo de operación de absorbancia.

Mensaje	Respuesta
Standardize? Y/N (Estandarizar Si/No)	Presionar Zero/No
Zero Blank (tubo blanco con citrato de sodio)	Introducir el tubo blanco con citrato de sodio y presionar el botón Zero/No
Read 000.000 ABS (Lectura 000.000 Absorbancia)	La lectura del tubo blanco automáticamente es cero absorbancia
Read Sample (Lectura de la muestra)	Introducir la muestra problema y presionar el botón Read/Yes
Read 01 x.xxx ABS (Lectura de la primer muestra de absorbancia)	La lectura de la muestra es desplegada, para realizar mas lecturas repetir los pasos anteriores.

Procedimiento para el modo de operación de concentración.

Mensaje	Respuesta
Standardize? Y/N (Estandarizar Si/No)	Presionar Read/Yes
Std. Conc? xxx (estandarizar concentración Si/No?)	Presionar nuevamente Read/Yes, después la concentración estándar es introducida digito a digito de la siguiente manera: presionar Zero/No hasta el digito deseado y presionar Read/yes para cambiar al siguiente digito y así sucesivamente hasta introducir los tres dígitos (concentración estándar)
Zero Blank (tubo Blanco con citrato de sodio)	Introducir el tubo blanco con citrato de sodio y presionar el botón Zero/No
Read 000.000 ABS (Lectura 000 Absorbancia)	La lectura del tubo blanco automáticamente es cero absorbancia
Read Std (Lectura del estándar)	Introducir el tubo que corresponde a la concentración estándar que se introdujo anteriormente para leer su absorbancia
S x.xxxx ABS (Valor del estándar)	La lectura de absorbancia del tubo es desplegada
Read Sample (Lectura de la muestra)	Introducir la muestra problema y presionar el botón Read/Yes
Read 01 xxxxx CON (lectura de la primer concentración)	La lectura de la muestra es desplegada, para realizar mas lecturas repetir los pasos anteriores.

Procedimiento para el conteo directo en la cámara de Neubauer

Se toma una muestra inicial con una pipeta Pasteur de semen fresco para poder llenar la pipeta de Thoma lo más exacto posible con la muestra de semen hasta la marca de 0.5, posteriormente se llena con colorante de rosa de Bengala al 2% hasta la marca de 1.01, después se agita unas 120 veces o un periodo no menor a 2 minutos. Después de la dilución, esta se introduce al hemocitómetro por capilaridad. La cámara de Neubauer tiene un volumen de 0.1mm^3 y la superficie para el conteo espermático de 1mm^2 dividido en 25 cuadros grandes y estos a su vez subdivididos en 16 pequeños. Después de 2 minutos que los espermatozoides se han asentado se inicia el conteo. Se cuentan solo 5 cuadros grandes; ya sea en diagonal o uno de cada esquina y el central. Teniendo en cuenta la regla de que solo se cuentan las células que se encuentran dentro de cada cuadro así como los que tocan las líneas superior e izquierda. Para incrementar la precisión el conteo se hace por duplicado y los resultados se promedian.

Con este procedimiento se obtiene el conteo de la dilución 1:200 que da la concentración real que tiene la muestra, pero de esta misma muestra se

hicieron seis diluciones más, por lo tanto la concentración de los demás tubos se obtiene de la siguiente manera:

De las diluciones 1:100 y 1:400 se utilizó el mismo procedimiento anteriormente descrito con algunas variantes, la dilución 1:100 la pipeta se llenó de semen fresco hasta la marca de 1 y posteriormente con rosa de Bengala hasta la marca de 1.01, y para la dilución 1:400 la pipeta se llenó a la mitad de la marca de 0.5 de semen fresco y posteriormente con rosa de Bengala hasta la marca de 1.01.

Para realizar el conteo de las demás diluciones (1:50, 1:250, 1:300 y 1:350), se hizo directamente de el tubo que contiene la dilución con citrato de sodio, antes de llenar el hemocitómetro, los tubos se sumergían en baño María a 80 °C por un lapso de 2 minutos para matar a los espermias, después se agitaba perfectamente el tubo previamente tapado mediante el agitador eléctrico para homogeneizar la suspensión y lo más rápido posible, se llenaba la cámara de Neubauer con la pipeta de Thoma. Para el conteo se seguía el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Método Estadístico

VARIABLES ESTUDIADAS.

Las variables que se evaluaron en este trabajo fueron:

Dilución (1/100, 1/150, 1/200, 1/250, 1/300, 1/350, 1/400), Absorbancia, Concentración espermática de la cámara de Neubauer y Concentración del espectrofotómetro portátil.

Las cuatro variables estudiadas fueron correlacionadas entre si, por medio del coeficiente de correlación lineal de Pearson (Christensen, 1983)

Así también para caracterizar la curva y su mejor ajuste se utilizaron cuatro modelos matemáticos:

1.- Modelo de regresión lineal:

$$Y = A + (B \cdot X)$$

Donde:

Y = Absorbancia x (1000), concentración cámara de Neubauer, Concentración del espectrofotómetro.

X = Dilución

A, B = Son parámetros del modelo

2.- Modelo exponencial:

$$Y = A \cdot \text{EXP} (B \cdot X)$$

Donde:

Y = Absorbancia x (1000), concentración cámara de Neubauer, Concentración del espectrofotómetro.

X = Dilución

A, B = Son parámetros del modelo

3.- Modelo Logarítmico

$$Y = A+B*\text{LOG}(X)$$

Donde:

Y = Absorbancia x (1000), concentración cámara de Neubauer, Concentración del espectrofotómetro.

X = Dilución

A, B = Son parámetros del modelo

4.- Modelo curva a una potencia.

$$Y = A*X^B$$

Donde:

Y = Absorbancia x (1000), concentración cámara de Neubauer, Concentración del espectrofotómetro.

X = Dilución

A, B = Son parámetros del modelo

Para lo cual se utilizó el paquete estadístico NWA STATPAK (López y Chávez 1994), y se usó como criterio de decisión el coeficiente de determinación (R^2), más alto.

5. RESULTADOS

Los resultados se muestran en este trabajo en dos cuadros y un gráfico.

Cuadro 1. Coeficientes de Correlaciones entre las cuatro variables estudiadas.

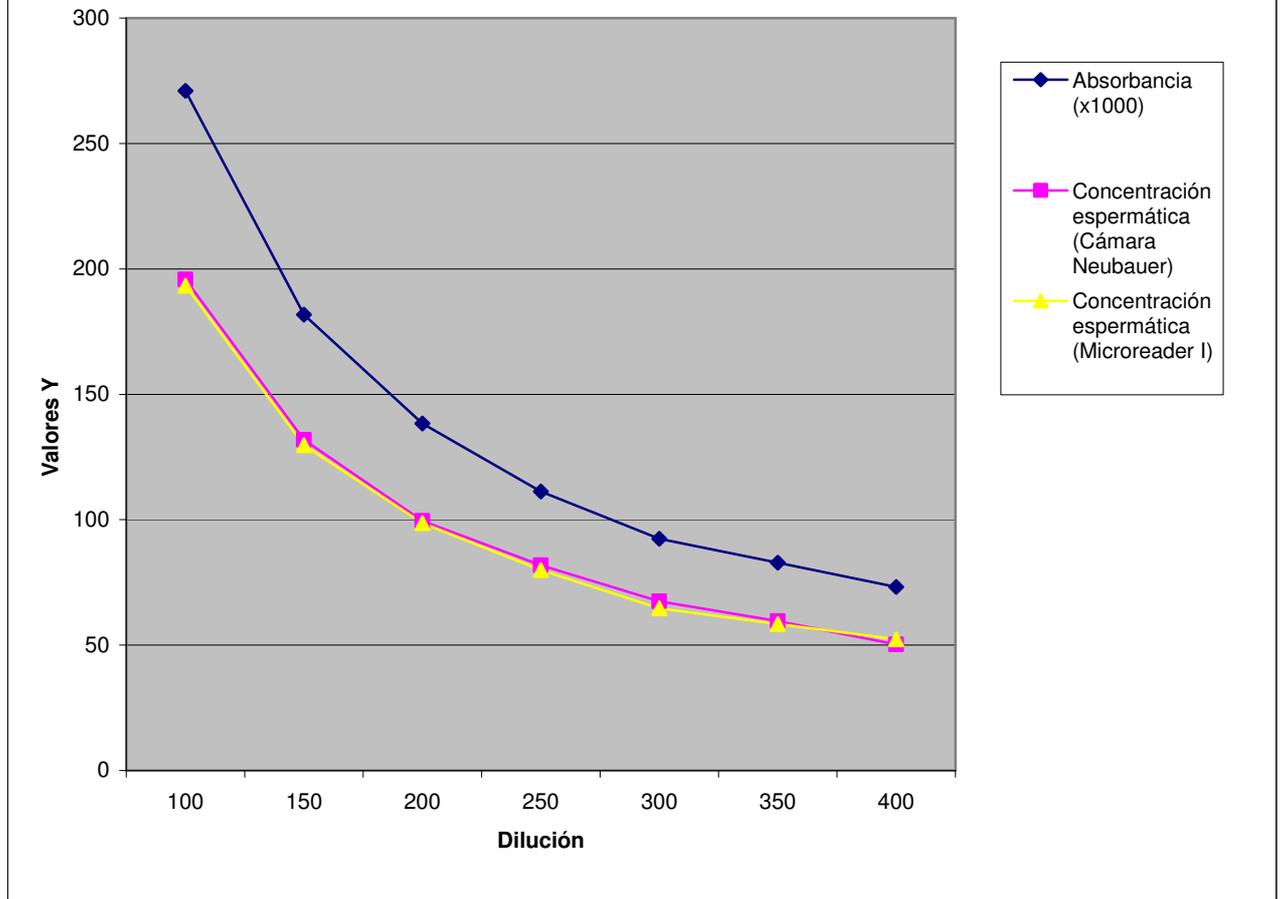
Variable	Dilución	Absorbancia	Concentración cámara Neubauer	Concentración Microreader I
Dilución	1			
Absorbancia	- 0.91914906	1		
Concentración cámara Neubauer	- 0.92604298	0.99969256	1	
Concentración Microreader I	- 0.91981447	0.99992422	0.99959029	1

Cuadro 2. Valores obtenidos para los parámetros de los cuatro modelos evaluados.

Parámetros	Lineal	Exponencial	Logarítmico	Potencia
A	285.607	353.0902	894.3794	21121.19
B	-0.5988085	-0.004218105	-139.7603	-0.9481975
R	-0.9191488	-0.9752104	-0.9781168	-0.9995138
R ²	0.8448345	0.9510354	0.9567125	0.9990279

Nota: A y B son parámetros de los modelos, r es el coeficiente de correlación y R² El Coeficiente de Determinación.

Gráfico 1. Las tres curvas que se forman con el modelo de Potencia, que muestra la relación que existe entre ellas usando las tres variables contra las diluciones.



Nota: Los parámetros para construir las curvas se tomaron del cuadro 2.

6. DISCUSIÓN

En el cuadro 1 se muestran los valores de correlación entre las cuatro variables, se puede observar que la correlación que existe entre la cámara de Neubauer y el Microreader I es 0.99969256 para su modo de operación absorbancia y 0.99959029 para su modo de operación concentración, estos resultados al compararlos con los encontrados en la literatura son superiores, y depende en parte en el tiempo que se ha venido perfeccionando la técnica fotométrica, pero más que todo se apegan a lo mencionado en el estudio realizado por Rondeau y Rouleau (1984) los cuales citan que al utilizar semen de toro, verraco y garañón, la curva de calibración varía de acuerdo con el espectrofotómetro utilizado y deben utilizarse diferentes tasas de dilución para calibrarlo de acuerdo a la especie, a causa de las diferencias en concentración. A pesar de que el estudio es muy antiguo sigue vigente y se coincide en que la efectividad del método fotométrico varía de acuerdo con el aparato utilizado, y dentro del aparato pueden citarse algunos errores como por ejemplo la longitud de onda y la especie para la cual se va a calibrar. De lo anterior se corrobora con el estudio realizado por Nehring *et al.*, (1987) donde al determinar la concentración espermática en el toro, verraco y carnero por medio de un Fotómetro Spekol 10 y mediante un hemocitómetro las correlaciones entre los dos métodos fueron: 0.86, 0.77, y 0.67 para los tres tipos de semen respectivamente. Por su parte Ibarguengoitia, (1982) menciona que la mejor correlación usando el Spectronic 20 se obtiene a una longitud de onda de 600nm, obteniendo una correlación de 0.823 entre los dos métodos para el semen de carnero.

Otros resultados obtenidos son los siguientes: Neubert L. *et al.*, (1983) obtuvieron una correlación de 0.92 entre los 2 métodos, Sorensen (1983) cita que con un poco de práctica puede obtenerse una correlación de 0.95 entre los 2 métodos usando un fotómetro Spectronic 20.

Resultados mejores en años anteriores son los obtenidos por Plut *et al.*, (1972) obteniendo una correlación de 0.963 entre los dos métodos, utilizando semen fresco y almacenado a 4° C por 4 o 5 días no teniendo efecto sobre la precisión del método. Así mismo Lorton *et al.*, (1984) obtuvieron una correlación de 0.98 al utilizar semen de toro en dilución inicial con yema de huevo, tritón y solución salina.

En un trabajo realizado más recientemente se ha obtenido una correlación de 0.93 para el toro y 0.96 para el macho cabrío, por López y Mellado (2001) usando un espectro fotógrafo.

Así también podemos citar resultados obtenidos anterior y recientemente, en diferentes especies animales y con diferentes tipos de aparatos: En el perro, Cardoso *et al.*, (2003) obtuvo una correlación de 0.808. En pavos Donoghe *et al.*, (1996) obtuvo una correlación de 0.996 y 0.992 usando un densímetro modelo 534-B-Mod1 y un foto colorímetro Klett respectivamente. En conejos Castellini *et al.*, (2007) obtuvieron una correlación de 0.94, así también Ciereszko y Dabrowski, (1993) describen el método fotométrico correlacionándolo con el % de espermatozoides en algunas especies de pescado.

Además de determinar la correlación que existe entre los 2 métodos, al observar el gráfico 1 se puede ver que los valores para cada variable se comportan como una curva, por lo que se buscó el mejor modelo que explique el comportamiento de dichos valores. Solo en el estudio realizado por Rondeau y Rouleau (1984) mencionan que existe una curva de calibración, pero no da más referencias sobre esto; tradicionalmente se ha asumido que la concentración y absorbancia se comportan de una manera lineal, siendo este modelo el usado frecuentemente (Ciereszko y Dabrowski, 1993; Makler *et al.*, 1984) mas sin embargo no se adapta a la manera de comportarse de dichas variables, así por ejemplo, en el presente trabajo se puede observar en el cuadro 2, que el mejor modelo que explica el comportamiento de dichos valores es el modelo Curva a una Potencia, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9990 contra 0.9567, 0.9510 y 0.8448 del Logarítmico, Exponencial y el Lineal respectivamente. Mismo que se puede verificar en el gráfico 1, por la asociación que se observa entre las variables estudiadas.

Con todo lo descrito anteriormente puede observarse que la efectividad del método se debe en mayor proporción a que el aparato empleado se diseñó específicamente para determinar concentración espermática en bovinos a una longitud de onda de 540 nm, además de que este cuenta con la función de obtener la concentración espermática sin necesidad de elaborar la tabla que correlacione la absorbancia y la concentración espermática. No obstante debe tomarse en cuenta que la metodología utilizada fue perfeccionada en diferentes ocasiones, hasta determinar cuantas diluciones hacer y donde iniciar con la primera de ellas, antes de tomar las lecturas que se reportan para este trabajo, algunos de los contratiempos para obtener buenos resultados fueron por ejemplo: el método de colección siempre fue lo más limpio posible, lográndose esto con mucha práctica, al realizar las diluciones las pipetas por su gran precisión y sensibilidad tenían que ser manejadas adecuadamente poniendo la cantidad correcta de semen y citrato de sodio, de lo contrario cualquier excedente o faltante altera los resultados, el material y las soluciones tenían que ser preparados lo más limpio posible, todo esto tomando en cuenta que el método se basa en la cantidad de absorción que tiene la muestra, y al encontrarse sucia cualquiera de las sustancias utilizadas así como del material usado, tenía efecto negativo sobre los resultados deseados.

Otro problema fue que al realizar el conteo de espermatozoides de las diluciones hechas en citrato de sodio usando la cámara de Neubauer, había una variación mayor que al utilizar colorante rosa de Bengala al 2%, esto posiblemente por que el citrato de sodio no es un medio capaz de matar, mas bien de conservar viable al esperma, ni teñir ni dispersar como puede ocurrir con el colorante, de manera que se optó por realizar además de la dilución 1:200 que es la que da la concentración real que tiene la muestra, la dilución 1:100 y 1:400 mediante la pipeta de Thoma y el colorante rosa de Bengala, y las diluciones 1:150, 1:250, 1:300 y 1:400 que no podían realizarse mediante la pipeta de Thoma debido a su forma de graduación, por lo que se realizaban utilizando la dilución hecha con citrato de sodio. Para el conteo, antes de introducir la muestra en el hemocitómetro, el tubo que contenía la dilución se homogenizaba perfectamente y la cámara se llenaba lo más rápido posible, así

también para tratar de incrementar la precisión del método el conteo se realizaba cuatro veces y se promediaba, llegando a muy buenos resultados con un poco de práctica.

7. CONCLUSIONES

La correlación obtenida entre los dos métodos fue significativamente muy alta, lo que quiere decir que el método fotométrico y en particular el uso del Microreader I puede utilizarse con mucha ventaja para evaluar la concentración espermática en bovinos por su gran exactitud y velocidad de lectura en sus dos modos de operación.

Además, se determinó que la relación entre absorbancia y concentración (dilución) es una curva que puede ser explicada mejor con el modelo Curva a una Potencia.

8. BIBLIOGRAFÍA

Cardoso RCS, Silva AR, Silva LDM, Determination of sperm count in canine semen by spectrophotometry. Revista Brasileira de Reproducao Animal. Colegio Brasileiro de Reproducao Animal, Belo Horizonte, Brazil: 2003. 27: 3, 384-386. 6 ref

Castellini C, Lattaioli P, Cardinali R, Bosco A. dal, Mourvaki E, Validation of spectrophotometric method used for the measurement of spermatozoa concentration in rabbit semen. World Rabbit Science. Universidad de Politecnica de Valencia, Valencia, Spain: 2007. 15:2, 115-119. 17 ref.

Christensen HB, Estadística paso a paso. 3ª Edición México: Trillas, 1990

Ciereszko A, Dabrowski K, Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. Aquaculture. 1993. 109: 3-4, 367-373. 15 ref.

Derivaux J, Fisiopatología de la reproducción e inseminación artificial de los animales domesticos España: Acribia, 1961

Donoghue AM, Thistlethwaite D, Donoghue DJ, Kirby JD, A new method for rapid determination of sperm concentration in turkey semen. Poultry Science. 1996. 75: 6, 785-789. 10 ref

Esperón SAE, López BB, Parámetros reproductivos de toretes cebú brahman implantados con anabólicos. Avances en investigación agropecuaria 1993: 2: 53-64

Galina C, Valencia J, Reproducción de los animales domésticos 2ª edición. México, DF: Limusa, 2006

Hafez ESE, Reproducción e inseminación artificial en animales. 5ª edición México: Interamericana, 1987

Ibarguengoitia TMEA, Técnica de calibración de un espectrofotómetro para determinar la concentración espermática en semen de carnero. (tesis de licenciatura) Cuautitlán (Edo México) México: Facultad de estudios superiores Cuautitlán (UNAM), 1982

López BB, Chávez GME, Manual de uso del paquete nwa statpak un enfoque a la biomedicina. México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM), 1994

López VG, Mellado BM, Estimation of bull and buck semen concentration and motility by a photograph spectrum of ejaculates and a swim-up technique. Agrociencia (Montecillo). Especialidad de Postgrado en Genetica. IREGEP. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Mexico: 2001. 35: 4, 407-412. 10 ref.

Lorton SP, Pace MM, Sullivan JJ, Determination of spermatozoal concentration in initially extended bovine semen. 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, June 10-14 1984, University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois, USA. Volume II. Brief communications.. University of Illinois, Urbana, USA: 1984. Paper 60, 3 pp. 7 ref.

Martínez CA, Correlaciones de tres métodos para determinar la concentración espermática de semen de ovinos y caprinos. (tesis de licenciatura) Cuautitlán (Edo México) México: Facultad de estudios superiores Cuautitlán (UNAM), 1985.

Makler A, Fisher M, Lissak A, A new method for rapid determination of sperm concentration in bull and ram semen. Theriogenology. 1984. 21: 4, 543-554. 4 ref.

Nehring H, Ueckert H, Zeuner A, Haberzettl R, Rothe L, Photometric determination of sperm concentration - a more objective method of semen evaluation. Archiv fur Experimentelle Veterinarmedizin. 1987. 41: 3, 301-308. 15 ref.

Neubert L, Menger H, Rudolph K, Wenig H, Measurement of sperm concentration in ram and bull semen by means of a Spekol instrument. Monatshefte fur Veterinarmedizin. 1983. 38: 6, 220-222. 6 ref.

Plut DL, Gouvea AC, Campos B do ES, Determination of sperm concentration in bull semen by means of the spectrophotometric method. Boletim de Industria Animal. 1973. 30: 2, 227-236

Remberg BWB, Efecto de la raza y zona de procedencia sobre las características del semen bovino en un centro de procesamiento de semen. (tesis de licenciatura) Cuautitlán (Edo México) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM), 1995

Rondeau M, Rouleau M, Effects of dilution rates, animal species and instruments on the spectrophotometric determination of sperm counts. Revue Canadienne de Biologie. 1981. 40: 2, 173-180. Secondary Journal Source: (Biological Abstracts 73, 28302.).

Salisbury GW, VanDemark NL, Lodge JR, Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. 2ª edición España: Acribia, 1978

Sánchez OH, Estado actual del procesamiento de semen bovino y la inseminación artificial en la republica Mexicana. (tesis de licenciatura) Cuautitlán (Edo México) México: Facultad de estudios superiores Cuautitlán (UNAM), 2000

Sorensen AM, Reproducción Animal. Principios y prácticas Mexico: McGraw-Hill, 1982.

Zemjanis R, Reproducción animal. Diagnóstico y técnicas terapéuticas.
México: Limusa-Wiley, 1966

APENDICE

TABLA DE EQUIVALENCIAS ABSORBANCIA, CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA X MILILITRO DE SEMEN FRESCO

Caso	Absor	Conc x 10⁷	Caso	Absor	Conc x10⁷	Caso	Absor	Conc x 10⁷	Caso	Absor	Conc x 10⁷
1	0.025	17.569	15	0.095	67.475	29	0.165	117.709	43	0.235	168.118
2	0.030	21.114	16	0.100	71.055	30	0.170	121.305	44	0.240	171.723
3	0.035	24.663	17	0.105	74.637	31	0.175	124.901	45	0.245	175.330
4	0.040	28.216	18	0.110	78.220	32	0.180	128.498	46	0.250	178.937
5	0.045	31.773	19	0.115	81.804	33	0.185	132.097	47	0.255	182.544
6	0.050	35.332	20	0.120	85.390	34	0.190	135.696	48	0.260	186.152
7	0.055	38.895	21	0.125	88.977	35	0.195	139.295	49	0.265	189.761
8	0.060	42.460	22	0.130	92.565	36	0.200	142.896	50	0.270	193.370
9	0.065	46.028	23	0.135	96.154	37	0.205	146.497	51	0.275	196.979
10	0.070	49.598	24	0.140	99.744	38	0.210	150.099	52	0.280	200.590
11	0.075	53.170	25	0.145	103.335	39	0.215	153.701	53	0.285	204.200
12	0.080	56.744	26	0.150	106.927	40	0.220	157.304	54	0.290	207.811
13	0.085	60.319	27	0.155	110.520	41	0.225	160.908	55	0.295	211.423
14	0.090	63.896	28	0.160	114.114	42	0.230	164.513	56	0.300	215.035

NOTA: LA ABSORBANCIA Y LA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA FUERON OBTENIDAS MEDIANTE EL MICROREADER I