



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**“ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS TÉCNICAS DE CONTEO CON CÁMARA
DE NEUBAUER, BÜRKER Y FOTÓMETRO DE ESPERMATOZOIDES DE
VERRACO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

BELEM MARTÍNEZ FERNÁNDEZ

Asesores:

Dra. María Elena Trujillo Ortega
MCV. Gerardo Ramírez Hernández

México, D. F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

Dedico la presente a mi familia, que estuvieron durante mi formación tanto personal como académica, hombro con hombro, en buenos y malos momentos. Dándome fuerza, ánimo y palabras de aliento y siempre convencidos de mi capacidad para cumplir mis objetivos.

También la dedico a todos los profesores, que con su apoyo intelectual y personal, logramos concluir esta etapa de mi vida académica, en especial a aquellos que día con día estuvieron presentes en las aulas compartiendo su conocimiento, experiencias y más, con migo.

Por último y no menos importantes, a mis compañeros y amigos que formaron parte importante del proceso para lograr concluir esta etapa.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Granja “La Nopalera” (Grupo Albarrán) por el apoyo y atención brindados para lograr realizar este trabajo.

Agradezco a mi familia por siempre estar conmigo apoyándome y alentándome.

A mis asesores la Dra. María Elena Trujillo Ortega y el MCV. Gerardo Ramírez Hernández, por brindarme siempre su apoyo, atención y paciencia, así como su afecto y amistad.

A la Dra. Susana Espinosa Hernández por apoyarme en el laboratorio y brindarme siempre su atención y aprecio.

Y a mi Magna Casa de Estudios, la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO y su excelente Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

CONTENIDO

	Página.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	20
MATERIAL Y MÉTODOS	21
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIÓN	38
BIBLIOGRAFÍA	39

FIGURAS

	Página.
1. Pipeta de Thoma.	10
2. Cámara de Neubauer (CN).	10
3. Cámara de Bürker (CB).	11
4. Pipeta Pasteur.	11
5. Fotómetro (FT).	15
6. Cubeta para lectura en fotómetro.	15
7. Parafilm para proteger la cubeta del fotómetro.	16
8. Se observan los 5 cuadros que se deben contar de cada una de las platinas de la Cámara de Neubauer.	23
9. Forma de contar en la Cámara de Bürker.	25

CUADROS

	Página.
1. Clasificación de la motilidad expresada en valores.	5
2. Clasificación del grado de aglutinación.	6
3. Registro de muestreos y conteos realizados con los Diferentes métodos.	29
4. T-pareada para comprobar que la muestra es homogénea.	30
5. ANOVA: comprueba que los tres métodos comparados, sí difieren en los resultados obtenidos de cada conteo, respectivamente.	31

RESUMEN

MARTÍNEZ FERNÁNDEZ BELEM. “Estudio Comparativo de las Técnicas de conteo con Cámara de Neubauer, Bürker y Fotómetro de espermatozoides de verraco”. Asesores: Dra. María Elena Trujillo Ortega y MCV. Gerardo Ramírez Hernández.

El presente trabajo se realizó con la finalidad de hacer la comparación de tres técnicas de conteo espermático y al concluir, poder recomendar una de ellas como la más apta a nivel laboratorio de procesamiento de semen, para ello se utilizó el eyaculado de un verraco, que se muestreó cada semana durante 5 semanas. Con la muestra semanal se realizó el procedimiento para las correspondientes diluciones y se procedió al conteo en Cámara de Neubauer (CN), Cámara de Bürker (CB) y Fotómetro (FT), eligiendo el método al azar, respectivamente. Se hicieron cinco lecturas por método y se registraron todos los conteos para después ser analizados a través de un estudio estadístico. Los resultados obtenidos fueron, de acuerdo a las pruebas estadísticas, muestras homogéneas con la T-pareada realizada a partir de los conteos con la CN y la diferencia de los conteos obtenidos entre métodos, comparada con el ANOVA. Por lo tanto, se concluye que el método más recomendable, de acuerdo a la actual investigación, resultó ser el conteo a través del Fotómetro.

INTRODUCCIÓN

La eficiencia reproductiva tiene un impacto importante sobre la producción y el mejoramiento genético; ésta puede mejorarse en la cerda a través de su productividad y optimizando el uso de verracos, con calidad comprobada.¹ Lo anterior, se ve influenciado por numerosos factores, algunos son: calidad del semental, contaminación, transporte y dilución del semen, mala detección del celo, problemas infecciosos, mal manejo tanto de las dosis seminales como de la técnica de Inseminación Artificial (IA) empleada. En la actualidad, la IA porcina es una técnica de amplio uso en todo el mundo, enfocado a la producción y mejoramiento genético en grandes, medianas y pequeñas producciones (ciclo completo, productoras de lechones, pie de cría, etc.).

La IA es una técnica que ha permitido un avance acelerado en los programas reproductivos y genéticos del cerdo. Algunas de las ventajas de ésta tecnología son: mejoramiento genético, reducir las posibilidades de introducción de enfermedades a las explotaciones, disminuir el número de sementales, facilitar el manejo reproductivo del hato al reducir el tiempo y el trabajo necesario, así como mejorar el control de la calidad del semen.² Un aspecto importante a considerar es la calidad de las dosis seminales, la cual puede medirse a través de una espermatobioscopía; a través de éste estudio, se pueden evaluar las características macro y microscópicas de semen fresco y/o dosis seminal, permitiendo distinguir la calidad de los espermatozoides con capacidad para fertilizar los óvulos liberados por la cerda.^{3, 4, 5, 6, 7} De manera rutinaria, en

cualquier granja donde se realice IA, se lleva a cabo la evaluación de los eyaculados con un equipo básico y cuya evaluación consiste en:

Características macroscópicas.

Color

El característico del eyaculado debe ser blanco lechoso, puede ser útil como medida indirecta de la concentración, ya que si esta transparente estará menos concentrado que uno con apariencia más lechoso. Sin embargo, también se pueden dar algunos casos en donde ya sea por enfermedad del verraco colectado, mal manejo al momento de la colección y/o contaminación del eyaculado, se pueden encontrar tonalidades tales como rosado a rojo, lo que indica presencia de sangre, ante la presencia de una tonalidad amarillenta podría indicar que hay contaminación con orina o en el peor de los casos con secreción purulenta, entre otros.^{4, 5, 6}

Olor

No debe ser desagradable, debe ser casi imperceptible, ya que cuando se detecta un mal olor, hay que tener la precaución de que no esté contaminado, básicamente por presencia de orina.

Volumen

Se determina pesando el eyaculado y convirtiendo los gramos a mililitros, ya que la relación gramos: mililitros es 1:1. El volumen de un eyaculado aceptable debería estar entre el rango de 200 a 500 ml.¹⁵

pH

Preferentemente un pH neutro es aceptable. El rango determinado es de 7.2 a 7.8.

Temperatura

Se debe manejar con mucha precaución este parámetro, ya que de ésta dependerá, en gran parte, la evaluación microscópica del eyaculado. Se recomienda manejar un rango de 35 a 38 °C al momento de realizar la colecta de semen.^{3, 4} Debido a esto, es necesario atemperar a 37°C todos los elementos que intervienen en su dilución. Los eyaculados que se detectan con temperaturas menores a 35 °C son desechados, ya que al realizar la evaluación microscópica se observan alteraciones, tales como: baja motilidad, alto grado de aglutinación, mayor porcentaje de anormalidades, entre otras.

Características microscópicas.**Motilidad**

Se evalúa de dos formas:

- a) La motilidad en masa o general, la cual se debe observar en el microscopio con el objetivo de 10x, se obtiene una calificación, la que se expresa en porcentaje, siendo el mínimo aceptable 70%.
- b) La motilidad individual, por su parte, se observa con el objetivo de 40x y se califica de acuerdo a los siguientes criterios, tal como se muestra en el Cuadro 1.^{3,}

Cuadro 1. Clasificación de la motilidad expresada en valores.

VALOR	CRITERIO
0	Sin movimiento.
1	Sin movimiento progresivo, gira sobre sí mismo.
2	Con movimiento anormal y algunos progresivos.
3	Con movimiento progresivo, lento y sinuoso.
4	Con movimiento progresivo, rápido.
5	Con movimiento progresivo muy rápido.

Grado de aglutinación:

El grado de aglutinación se observa a través del microscopio, se ve la sobreposición de células unas sobre otras, evitando u obstruyendo la percepción, dificultando así el poder llevar a cabo el conteo preciso de la cantidad real de células. Los factores predisponentes suelen ser la edad del animal, contaminación del eyaculado o inadecuado manejo haciendo referencia a cambios bruscos de temperatura, tanto al momento de la colecta como durante el examen microscópico, deficiencias nutricionales, fiebre, vacunación reciente contra la enfermedad de Aujeszky o Influenza, genética del animal y la temperatura ambiental. Se califica con cruces dependiendo del grado de la misma, como se puede observar en el cuadro 2.^{3, 4, 6, 9}

Cuadro 2. Clasificación del grado de aglutinación.

CRUCES	GRADO DE AGLUTINACIÓN
-----	NO hay.
+	Leve.
++	Moderada.
+++	Grave.

Anormalidades: generalmente el porcentaje aceptable es <20 % en el eyaculado.¹⁹ Los tipos de anomalías son:

Primarias: son aquellas causadas por falla fisiológica en el testículo (espermatogénesis) y por lo regular se observan deformidades en la cabeza de los espermatozoides.

Secundarias: son provocadas por falla fisiológica en el epidídimo (maduración), por un animal sobre trabajado y/o por un excesivo lapso de descanso. Es frecuente observar la presencia de gota citoplasmática que puede ser proximal (disminuye la motilidad e influye en gran parte de la aglutinación) o distal (no es de tanta preocupación), el resultado de esto es un mayor porcentaje de células inmaduras. Hay algunas anomalías que se pueden observar en los flagelos, ya sea doblados, enrollados, laterales, entre otras.

Concentración espermática

La concentración espermática en el eyaculado debe ser aproximadamente de entre 200 a 300 x 10⁶ en un mililitro y es de gran relevancia para el cálculo del número de dosis seminales, en las cuales se usa una concentración espermática estándar de 3x10⁹/100 ml.¹⁰ Para calcular la concentración espermática por dosis, se requiere conocer la concentración espermática por eyaculado, la cual se puede determinar mediante diversas técnicas de conteo celular, como son las siguientes: fotómetro, cámara de Bürker y cámara de Neubauer, entre otras.

Las ventajas del conteo celular al utilizar las cámaras son: bajo costo, rápidas, prácticas y de fácil cálculo. Sin embargo, también tienen desventajas como: dependiendo del método utilizado varía el tiempo en que se realiza, la precisión puede ser menor y en ocasiones el resultado es diferente dependiendo la persona que lo haga, no coinciden en opinión de los métodos a utilizarse. Cabe señalar que se debe hacer un procedimiento estandarizado, ya que de esto depende la calidad de las dosis seminales; por lo que hay que tomar en cuenta los procedimientos detallados de cada uno de los métodos a comparar.

En el caso de la cámara de Neubauer (CN), existen algunas recomendaciones que se deben tomar en cuenta como son:

- Limpiar la cámara y el cubreobjetos suavemente con alcohol.
- Revisar el cubreobjetos, el cual no debe estar astillado o quebrado.
- Colocar el cubreobjetos sobre la cámara en forma vertical, ésta debe quedar en una posición centrada.

- El procedimiento para llenar la cámara, es muy importante y definitivo en la distribución de las células. Es recomendable llenarla con una micropipeta pequeña o con una jeringa ya que se utiliza solamente una gota. El llenado debe ser continuo y se recomienda que sea en un solo intento.
- La cámara no debe quedar seca, esto se detecta porque en las esquinas del recuadro de llenado se ven porciones secas. Tampoco se debe inundar, ya que la apariencia en la cámara es de líquido abundante en las terminaciones del recuadro y nos impide hacer una lectura adecuada por el continuo movimiento de las células en los cuadros a observar.

Conteo: una vez que la cámara está llena, se coloca en la platina del microscopio y con el objetivo de 40X, se visualiza cada uno de los campos y con ayuda del carro del microscopio se desplaza la cuadrícula hasta contar el total de células en todos los cuadros. El conteo en estos campos de la cámara se conoce como alto poder (AP). Alrededor de cada cuadrícula se observa que hay tres líneas que delimitan el cuadro, que son fundamentales en el momento del conteo ya que definen cuales células son contables o cuales están fuera del campo de conteo. Las células dentro del cuadro que no tocan la segunda línea son contables, si la tocan o están encima de ella no se incluyen. ³

Para determinar la concentración manejando la CN, primero se realiza una dilución 1:200 utilizando una pipeta de Thoma para eritrocitos, dicha dilución se puede hacer con suero fisiológico formolado o bien una solución de citrato de sodio formolado al 3%, después de la dilución se realiza tanto el llenado, siguiendo el procedimiento descrito, como el conteo en la cámara, únicamente se consideran los espermatozoides presentes en 5 cuadros grandes, los cuatro de las esquinas,

uno del centro y las cabezas de los espermatozoides que tocan las líneas izquierda e inferior de cada uno de los cuadros se incluyen en la cuenta de ese cuadro, respectivamente. Para elaborar el cálculo de la concentración espermática, se realiza de la siguiente manera: el número de espermatozoides obtenidos en ambas cuadrículas de la cámara, se divide entre dos para obtener un promedio y el resultado se multiplica por 10 millones para obtener la concentración de espermatozoides por mililitro.²

Córdoba (2007), al evaluar la concentración de espermatozoides, utilizando para ello la cámara de Neubauer y la de Bürker, para inmovilizar las células previamente diluidas en 1:100 o 1:200 uso la solución de citrato de sodio con formol al 3%, concluye que el método más práctico para evaluar la concentración de espermatozoides es el recuento directo con la cámara de Neubauer.³

La CN se usa en laboratorios cuando se evalúa un pequeño número de muestras. La variación en éste método es mayor que la del método de densidad óptica (fotómetro) o el recuento eléctrico.⁴

Flores (1979), realizó un procedimiento distinto para el conteo en la cámara de Neubauer, donde el llenado de la cámara se efectuó con una pipeta de Thoma (**Figura 1**), absorbiendo una gota de semen hasta la marca 0.5 de la pipeta, después se llena ésta con una solución salina al 3% hasta la marca 101, se agita vigorosamente la pipeta cogida entre los dedos pulgar y el índice, teniendo dispuesta la platina de la CN en el microscopio, se desechan las primeras tres gotas de la pipeta y a partir de la cuarta se deposita en la platina entre el cubreobjetos y la cámara, se dejan transcurrir 5 minutos, dando tiempo a la sedimentación de las células en las cuadrículas, y se procede a hacer la lectura

contando en total 80 cuadrillos distribuidos en 5 cuadros medianos, que son los cuatro de las esquinas y el central. El número de espermatozoides contados se multiplica por 10,000 y se obtiene así la concentración en un mm^3 de semen.^{5, 13}



Figura 1. Pipeta de Thoma.

Hughes (1984), utilizando la CN (**Figura 2**), porque la consideraba más precisa, determinó la importancia de la concentración espermática para valorar la calidad del semen, sin embargo, ésta técnica consume mucho tiempo, por lo que actualmente se utiliza el fotómetro, que proporciona resultados con mayor rapidez.⁶

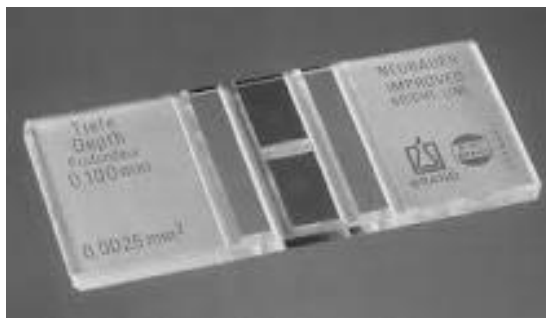


Figura 2. Cámara de Neubauer.

Ahora bien, el recuento en la cámara de Bürker (CB) (**Figura 3**) es el método más recomendado en pequeños centros de IA, debido a su facilidad de cálculo y visualización a través del microscopio.



Figura 3. Cámara de Bürker.

El procedimiento es el siguiente:

- Se realiza una dilución de semen puro 1:100 en citrato de sodio formolado al 3%.
- Se toma una gota con una pipeta Pasteur (**Figura 4**), la cual se deposita en el retículo de la cámara.



Figura 4. Pipeta Pasteur.

- El conteo se realiza en un microscopio a 400 aumentos y contando el número de espermatozoides que se encuentran en 40 cuadritos de la

El recuento no va más allá de contar los espermatozoides que hay en 40 cuadros pequeños, según la técnica, se inicia a partir del margen superior izquierdo y hay que desplazarse hacia la derecha, al final de la hilera para después pasar a la hilera inferior y desplazándose hacia la izquierda; así hasta contar 40 cuadros. Para el cálculo, el total de espermatozoides contados, se multiplica por 10, 000,000 para así obtener la concentración por ml, ésta concentración se multiplica a continuación por la cantidad de ml colectados para obtener el número total de espermatozoides en el eyaculado.

FÓRMULA: $\text{MILLONES ml} = \text{TOTAL DE ESPERMATOZOIDEOS} \times 10,000,000$

$\text{TOTAL EN EYACULADO} = \text{MILLONES ml} \times \text{TOTAL DE ml.}$

Las causas de errores y por ende las precauciones que se deben de tomar durante todo el procedimiento son:

- Preparación de la muestra.
- Preparación de porta y cubreobjetos.
- Limpieza y secado de la cámara de Bürker.
- Recuento: espermatozoides en límite de zona, hay que respetar siempre la misma norma y/o forma de conteo. Ajuste permanente del tornillo micrométrico del microscopio.
- Debe hacerse en un tiempo mínimo de 15 minutos.

El recuento celular sigue siendo el método de referencia.⁷

A pesar de la explicación de Le Coz (2006), se puede realizar la metodología obviando algunos pasos, siempre y cuando se tenga comprensión del procedimiento y cierta experiencia:

- Mezclar bien el eyaculado antes de tomar 1 ml de semen puro con la pipeta.
- Realizar una dilución 1:100 en citrato de sodio formolado al 3%, para lo que se utiliza un matraz aforado de 100 cc.
- Homogenizar suavemente la solución, y tomar con una pipeta Pasteur o micropipeta una gota para llenar la cámara de Bürker, usando el siguiente método: ajustar bien el cubreobjetos en la cámara, situar la pipeta Pasteur entre el cubreobjetos y la cámara, dejando que el retículo de la cámara se llene por capilaridad, observar con el microscopio en campo claro con aumento de 40x. El contaje de espermatozoides se hace en 40 cuadros del retículo de la cámara y se contabilizan aquellos espermatozoides cuya cabeza estén situadas dentro de los cuadros pequeños y aquellos que su cabeza toque el lado superior derecho, esquina superior o inferior del cuadro.

La concentración de espermatozoides por mm^3 es igual a la suma de espermatozoides contados por 10,000.⁸

La cámara de Bürker permite, además de conocer la concentración, determinar la presencia de formas anormales de los espermatozoides como son las gotas citoplasmáticas proximales o distales y las colas en látigo, entre otras.⁹

Por otro lado, el tercer y último método que se ha de mencionar es el fotómetro (**Figura 5**), dicho instrumento mide la cantidad de luz que pasa a través de un medio a una longitud de onda específica. De acuerdo a la ley de Beer, la cual dice que la cantidad de luz absorbida por un medio es proporcional a la concentración del soluto presente.^{10, 11}



Figura 5. Fotómetro.

Así entonces, ésta técnica, se basa en el principio de que el número de espermatozoides por mililitro afecta a la densidad óptica de la muestra.⁶

Le Coz (2006), realizó el conteo a través del fotómetro e hizo énfasis en la utilización de dicho método. El recuento con fotómetro es un método muy utilizado debido a que es una adaptación, es pues imperfecto aún, sin embargo, explica el procedimiento para la concentración espermática de verraco:

- Verter 48 ml de solución de recuento de citrato de sodio (3 ó 4%) en un recipiente graduado de 50 ml.
- Depositar a continuación 2 ml de semen con la micropipeta automática.
- Encender el aparato al menos 15 minutos antes de su utilización.
- Verter solución de recuento (citrato de sodio) en una cubeta (**Figura 6**) para efectuar la calibración.



Figura 6. Cubeta para lectura en fotómetro.

- Después de agitar la dilución, se vierte la preparación en una cubeta y se cubre con parafilm (**Figura 7**) para evitar derrames de la dilución descrita en el paso uno y dos.



Figura 7. Parafilm para proteger la cubeta del fotómetro.

- Se coloca la cubeta en el fotómetro y se anota el valor indicado.

La lectura que se obtiene será en millones de espermatozoides por mililitro, el tiempo entre llenado de la cubeta y la lectura no debe superar 30 segundos, debido a que si pasa más tiempo, las células en la preparación de la cubeta se sedimentarán, por lo que la lectura será menor a lo esperado.

Los puntos clave para conseguir un buen recuento con ésta técnica son:

- Cada fotómetro es único y debe ser calibrado individualmente para los espermatozoides.
- La fometría está pensada para medir soluciones y no suspensiones heterogéneas. Las medidas pueden estar falseadas por la presencia de otros elementos como restos celulares, sangre, tapioca, etc. Para limitar estos errores es preferible trabajar con la fracción rica en espermatozoides.
- El material debe comprobarse y calibrarse regularmente.

- La dilución es la etapa más importante y principal fuente de errores.⁷

Dicho método mencionado es muy utilizado en grandes centros de IA donde se requiere realizar recuento de una gran cantidad de eyaculados. Sin embargo, tiene el inconveniente de presentar errores en la determinación de la concentración de espermatozoides, producidos por la impredecible opalescencia del plasma seminal y por la concentración variable de proteínas presentes en el mismo.⁸

JUSTIFICACIÓN

Debido a que en la actualidad existen diversos criterios en los métodos de conteo, es imprescindible realizar el estudio comparativo entre las cámaras de Neubauer, de Bürker y el fotómetro, para poder implementar alguno de los métodos y/o recomendar el que presente menos variación y sea el que destaque a los laboratorios en donde se lleve a cabo el procesamiento de semen, con la finalidad de mejorar la eficiencia en el cálculo de la concentración espermática y reducir en lo mayor posible los errores, el tiempo y costos para beneficio de las explotaciones que así lo requieran.

HIPOTESIS

No existe diferencia en el conteo espermático al comparar los métodos de cámara de Neubauer, de Bürker y el Fotómetro.

OBJETIVOS

- Comparar los resultados obtenidos del conteo de espermatozoides de cada muestra utilizando los tres métodos (cámara de Neubauer, de Bürker y fotómetro).
- Proponer una de las técnicas como la más apta a utilizarse en laboratorios de procesamiento de semen.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en una granja porcina ubicada en el Estado de Morelos; la cual, tiene su centro de transferencia genético con 6 sementales activos de 2 años de edad, de los cuales se trabajó con uno, el número de identificación del verraco fue el 5059 y se recolectó el eyaculado una vez a la semana hasta tener 5 repeticiones. Para conservar las muestras se utilizó una caja de poliuretano con refrigerantes. Posteriormente, se trasladó al Laboratorio de Diagnóstico del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM en CU, se procedió a su evaluación, utilizando para ello el siguiente material y equipo:

- Muestra fresca del eyaculado.
- Baño María.
- Solución de citrato de sodio con formol al 3%.
- Tinción azul de tripano (para técnica modificada de la cámara de Neubauer y Bürker, con la finalidad de facilitar la observación de los espermatozoides).
- Microscopio óptico (10x, 40x, 100x).
- Tubos vacutainer.
- Gradilla.
- Vaso de precipitado.
- Botella con capacidad de un litro para el agua bidestilada con la que se enjuagan los materiales que se utilizan.

- Agua bidestilada.
- Micropipetas.
- Cámara de Neubauer (CN).
- Cámara de Bürker (CB).
- Fotómetro; el cual contiene cubetas y micropipetas.
- Parafilm (para sellar las cubetas del fotómetro).
- Toallas desechables.
- Contador de células (formatos en papel).³

Una vez que el material está preparado y con la muestra fresca del eyaculado se procedió a evaluar el volumen, para ello se peso y se hizo la equivalencia de 1 gr = 1 ml (con la báscula previamente tarada).³

Para llevar a cabo la evaluación microscópica, se colocó en la platina térmica un portaobjetos y sobre él una gota (25 microlitros) de semen tomada con la micropipeta, posteriormente se puso encima un cubreobjetos (ambos atemperados a 37 °C), se observa el movimiento en masa para lo cual se utilizó un microscopio con el objetivo de 10x, calificando en porcentaje dependiendo de la apreciación del observador; el movimiento individual del espermatozoide o vigor (con objetivo 40x) se califica con valores del 0 al 5, así tenemos que:

0: sin movimiento.

1: sin movimiento progresivo, gira sobre sí mismo.

2: con movimiento anormal y algunos progresivos.

3: con movimiento progresivo, lento y sinuoso.

4: con movimiento progresivo rápido.

5: con movimiento progresivo muy rápido.³

1) Cámara de Neubauer.

Ahora bien, para determinar la concentración del eyaculado con la CN lo que se realizó previo al manejo directo con la muestra fue la limpieza de la cámara y del cubreobjetos, se enjuago perfectamente con agua bidestilada y se seco cada uno con toallas desechables, procurando quitar el exceso de agua haciendo ligera presión, se recomienda hacer este manejo, ya que de otra manera podemos rayar tanto las platinas de la CN y el cubreobjetos, lo que nos provocará una lectura errónea en el microscopio. Si se observa que la cámara está en buenas condiciones, se prosigue a la dilución 1:200 (semen: solución citrato con formol 3%) en un volumen final de 2 ml, de la cual se tomaron 10 microlitros con ayuda de una micropipeta y se llenó una platina de la cámara, se repitió el paso para la otra platina y se lleva la cámara al microscopio, se observa con el objetivo 40x. Se contaron las células de 5 cuadros de la cuadrícula central de cada platina de la cámara (**Figura 8**), tomando en cuenta las células que tocan la línea superior e izquierda; el cálculo se hizo promediando el número de espermatozoides de ambas cuadrículas y multiplicándolo por 10 millones para obtener la concentración espermática por mililitro.^{3, 11}

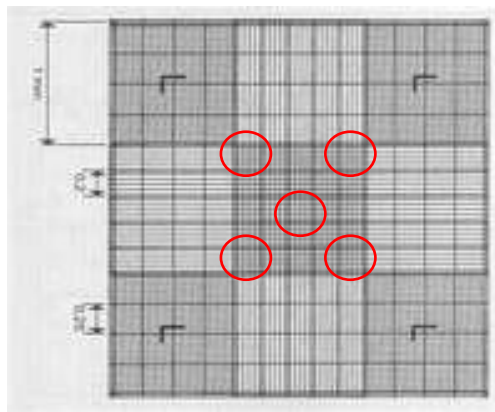


Figura 8. Los cinco cuadros a observar, se marcan con un círculo rojo.

Con la técnica modificada para la CN, utilizando el azul de tripano, se hizo la dilución 1:200 (semen: solución citrato con formol al 3%) y se agregó 0.25 gramos de la tinción (azul de tripano) por cada litro de solución; para realizar el conteo, se ejecutó el mismo procedimiento descrito anteriormente. Cabe señalar que dicha tinción se utilizará para ambas cámaras con la finalidad de definir mejor las células espermáticas al momento del conteo.

2) Cámara de Bürker.

Ahora bien, para el recuento en la cámara de Bürker: se realizó una dilución de semen puro 1:100 en solución de citrato de sodio y formol al 3% en un volumen final de 2 ml, se tomaron con micropipeta 10 microlitros, mismos que se depositaron en una platina de la cámara y se hace lo mismo para la otra platina, el conteo se realizó en un microscopio óptico a 400 aumentos totales y contando el número de espermatozoides que se encuentran en 40 cuadrillos de la cámara. La concentración de espermatozoides por mm^3 es igual a la suma de espermatozoides contados por 10,000.³ Se realizó el conteo de acuerdo a lo descrito por Le Coz (2006), iniciando a partir del margen superior izquierdo y desplazándose hacia la derecha, al final de la hilera se pasa a la inferior y ahora es hacia la izquierda, hasta contar los 40 cuadrillos. Cabe señalar, que se contabilizaron aquellos espermatozoides cuya cabeza estuvo situada dentro de los cuadros pequeños y aquellos que su cabeza toque el lado superior, derecho, esquina superior o inferior del cuadro (**Figura 9**).^{14, 15}

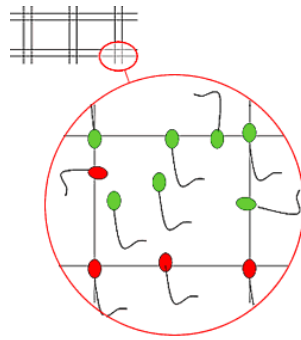


Figura 9. Forma de contar en la CB.

Para el cálculo, el total de espermatozoides que se contaron en 40 cuadros, se multiplican por 10, 000,000 para obtener la concentración por ml, éste número se multiplica a continuación por la cantidad de ml colectados para obtener el número total de espermatozoides en el eyaculado.¹⁴

FÓRMULA: $\text{MILLONES ml} = \text{TOTAL DE ESPERMATOZOIDEOS} \times 10,000,000$


$\text{TOTAL EN EYACULADO} = \text{MILLONES ml} \times \text{TOTAL DE ml.}$

3) Fotómetro.


El último método es el fotómetro (AccuRead imv TECHNOLOGIES), es un aparato eléctrico que mide la densidad espermática por la dificultad que ofrece la suspensión de espermatozoides en una solución que los inmoviliza (formol al 3% con citrato de sodio) al pasaje de haces de luz; se basa ésta técnica, en el principio de que el número de espermatozoides por mililitro afecta a la densidad óptica de la muestra.¹³

Para realizar una medición, cabe señalar que el haz de luz se dirige de adelante hacia atrás a través del recipiente (cubeta) de la muestra; se debe asegurar que

ésta se inserte con la alineación correcta. Las instrucciones para utilizar el fotómetro son (instructivo del fotómetro AccuRead inv TECHNOLOGIES):

- 1) Encender el aparato presionando el botón ON/OFF.
- 2) Comprobar que se encuentra en el modo de concentración por la presencia del símbolo  a la izquierda de la pantalla. Si éste no es el caso, se debe pulsar el botón MODE varias veces hasta que el símbolo aparezca en la pantalla.
- 3) Se coloca el recipiente cero en la cámara de la muestra (recipiente que contiene 3 ml de citrato de sodio con formol al 3%).



- 4) Se presiona y suelta la tecla , y 0.00 aparecerá en la pantalla.
- 5) Se debe retirar el recipiente cero y se sustituye por la muestra de semen previamente diluida (2.4 ml de citrato de sodio con formol al 3% y 0.1 ml de semen fresco), utilizando la tasa de dilución de las especies para las que ha sido configurada la lectura. Previamente, a la cubeta se le puso parafilm para evitar derrames de líquido, ya que posteriormente se debe homogenizar en seis ocasiones, para ello se coloca el recipiente entre los dedos pulgar e índice.
- 6) A continuación, se presiona y suelta el botón de Medición, en la pantalla se indica la concentración en millones (06) o miles de millones (09) por ml. Para este trabajo se utilizó la lectura en millones. Para mostrar en la sucesión de la absorbancia o el % de transmisión, se debe pulsar el botón de Modo (para fines de esta investigación no se realizó la medición de absorbancia).
- 7) Con este aparato se pueden leer en sucesión varias muestras. Se recomienda que el equipo se ponga en cero, en un lapso de tiempo de cada 10 a 15 minutos,

con esto se evita que el instrumento pierda la calibración. En caso de duda, siempre se debe poner en cero.

Los resultados obtenidos se analizaron a través de la prueba de t-pareada y ANOVA para su comprobación estadística.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos de cada uno de los conteos se observan en el cuadro 2. En el cual se representa cada uno de los muestreos realizados en las fechas correspondientes, las técnicas utilizadas para cada uno y las repeticiones, respectivamente, así como el número de células.

Cuadro 2. Registro de muestreos y conteos realizados con los diferentes métodos.

Granja: La Nopalera										
Yautepec Morelos.										
Se eligió al macho 5059 al azar para aplicar las 3 técnicas de conteo espermático (CN, CB, Fotómetro).										
FECHA	Muestra	CN conteo	Millones	CB conteo	Millones	FC1	FC2	FC3	Promedio	Millones
8/11/11	1	21	210,000,000	27	270,000,000	388	391	428	402.33	402,333,333
		37	370,000,000	31	310,000,000	362	377	385	374.67	374,666,667
		34	340,000,000	26	260,000,000	318	345	346	336.33	336,333,333
		37	370,000,000	24	240,000,000	313	310	337	320.00	320,000,000
		31	310,000,000	24	240,000,000	539	491	481	503.67	503,666,667
14/11/11	2	8	80,000,000	15	150,000,000	99.9	104	107	103.63	103,633,333
		7	70,000,000	12	120,000,000	98.3	104	117	106.43	106,433,333
		9	90,000,000	18	180,000,000	91.5	92.8	98	94.00	94,000,000
		13	130,000,000	16	160,000,000	109	97.9	108	104.97	104,966,667
		11	110,000,000	23	230,000,000	101	98.2	156	118.40	118,400,000
23/11/11	3	29	290,000,000	28	280,000,000	296	317	291	301.33	301,333,333
		34	340,000,000	29	290,000,000	289	281	287	285.67	285,666,667
		32	320,000,000	27	270,000,000	275	288	293	285.33	285,333,333
		36	360,000,000	23	230,000,000	290	304	292	295.33	295,333,333
		30	300,000,000	30	300,000,000	301	294	310	301.67	301,666,667
28/11/11	4	22	220,000,000	18	180,000,000	100	105	98	100.87	100,866,667
		31	310,000,000	12	120,000,000	113	122	133	122.67	122,666,667
		10	100,000,000	12	120,000,000	99.9	101	103	101.30	101,300,000
		13	130,000,000	15	150,000,000	103	104	101	102.67	102,666,667
		12	120,000,000	18	180,000,000	96	89.7	92	92.47	92,466,667
5/12/11	5	7	70,000,000	8	80,000,000	91.8	95.2	92	92.87	92,866,667
		10	100,000,000	12	120,000,000	92.7	95.4	129	105.70	105,700,000
		5	50,000,000	9	90,000,000	109	124	104	112.33	112,333,333
		10	100,000,000	6	60,000,000	96.5	89.2	102	95.90	95,900,000
		3	30,000,000	8	80,000,000	95.1	100	98	97.53	97,533,333

Acotaciones:

CN= Cámara de Neubauer.

CB= Cámara de Bürker.

FC1=Fotómetro Conteo 1.

FC2=Fotómetro Conteo 2.

FC3=Fotómetro Conteo 3.

El análisis que se realizó fue una prueba de T pareada para determinar si los eyaculados son homogéneos al paso del tiempo y que el método de observación es el adecuado, en los resultados del cuadro 3, se tiene la comparación entre muestras donde en la última columna se muestra la significancia estadística ($p < 0.05$).

Cuadro 3. T-pareada para comprobar que la muestra es homogénea.

PRUEBA DE MUESTRAS PAREADAS			
CONTEOS	Diferencias Pareadas.		Significancia (2-pareadas)
	95% Intervalo de Confianza de la Diferencia.		
	Mínimo.	Máximo.	
Par 1 CN: conteo 1- conteo 2	14.51763	30.28237	0.001
Par 2 CN: conteo 1- conteo 3	-5.71109	5.31109	0.925
Par 3 CN: conteo 1- conteo 4	0.33572	28.46428	0.047
Par 4 CN: conteo 1- conteo 5	17.29568	32.70432	0.001
Par 5 CN: conteo 2- conteo 3	-26.28337	-18.91663	0.000
Par 6 CN: conteo 2- conteo 4	-21.22824	5.22824	0.168
Par 7 CN: conteo 2- conteo 5	-2.41300	7.61300	0.223
Par 8 CN: conteo 3- conteo 4	3.33571	25.86429	0.023
Par 9 CN: conteo 3- conteo 5	22.50814	27.89186	0.000
Par 10 CN: conteo 4- conteo 5	1.40833	19.79167	0.033

En el cuadro 4, se observa la comparación entre los tres métodos utilizados teniéndose significancia estadística de $p = 0.000$, en todos los casos.

Cuadro 4. ANOVA: comprueba que los 3 métodos comparados, sí difieren en los resultados obtenidos de cada conteo, respectivamente.

A N O V A			
Método.	Suma de Cuadrados.	Media de Cuadrados.	Significancia.
Cámara de Neubauer	345,544	14,397.66	0.00
Cámara de Bürker	146,256	6,094	0.00
Fotómetro	381,836.231	15,909.84	0.00

DISCUSIÓN

En la actualidad, el proceso de evaluación de semen es una herramienta primordial en la aplicación de nuevas biotecnologías, así como en los procedimientos de valoración de futuros reproductores.

Debido a la discrepancia entre los métodos para la determinación de la concentración espermática, se hace indispensable la comparación de los mencionados en éste trabajo. Entre la CN y la CB, aparte de usarlos para la calibración o validación de otros instrumentos, se ha demostrado en algunos experimentos, por ejemplo el que realizó Córdoba-Izquierdo, *et. al* (2007) al utilizar la dilución del eyaculado en citrato de sodio formolado al 3% y con ayuda de la CN, concluyen que la técnica para medir concentración espermática debe ser muy precisa, ya que pequeñas variaciones y/o errores se traducen en enormes diferencias cuando se consideran factores de dilución, por lo que, afirman que dicha técnica se usará en los laboratorios siempre y cuando se evalué un pequeño número de muestras, ya que la variación en éste método es mayor que la del método usando el fotómetro, entonces se determina que la CN subestima, con un gran número de muestras, la concentración de espermatozoides, igual que la comparación con la CB; esta investigación confirma lo anteriormente descrito por Córdoba-Izquierdo (con la CN se subestima el conteo). Por su parte, Flores M. J. A. (1979), efectúa la cuenta espermática o concentración con la Cámara de Neubauer y al ejecutarlo, concluye que la técnica es la adecuada debido a que en el proceso, al dejar caer las primeras 3 gotas, a partir de la cuarta habrá mejor homogeneidad de la dilución, en la comparación de este trabajo hubo

homogeneidad ya que se mezcló perfectamente bien el eyaculado con la solución citrato-formol en un tubo de ensayo y se utilizó una micropipeta para tomar los microlitros suficientes para el llenado de las cámaras y asegurar así que lo que se contó son las células en suspensión, a comparación del uso de la pipeta de Thoma (Flores); al dejar pasar los 5 minutos previos al conteo, éste se realizará mejor ya que las células se sedimentan en la platina, por lo que el método debe ser preciso, sin errores de cálculo y/o conteo. Trujillo et. al. (2002), al realizar la comparación de los tres métodos, recomienda la CB como el más apto en pequeños centros de inseminación artificial, debido a la facilidad de cálculo y visualización a través del microscopio; en la actual comparación, aparte de lo anteriormente descrito, los resultados estadísticos avalan esta aseveración. Cabe mencionar que en el procedimiento realizado por Trujillo, se utiliza la pipeta Pasteur, en el presente trabajo la micropipeta, la que presenta las siguientes ventajas: al homogeneizar la dilución se asegura la suspensión de células, se toma la misma cantidad de microlitros para cada cámara y no hay que dejar caer las primeras gotas, lo que nos ahorra tiempo al momento del conteo; no se omitieron pasos en ningún procedimiento de cada método, por lo que se deben considerar otros factores, como el material utilizado, que pudo hacer más precisa la actual comparación que las anteriores.

Sin embargo, ha habido comentarios respecto a las comparaciones anteriores, por ejemplo el Departamento de Ciencias y Animales (2005), que realizó la comparación entre la CB y la CN haciendo los mismos procedimientos pero por duplicado, concluyeron que estos recuentos, por lo menos con dos técnicos se recomiendan para lograr una alta precisión, pero la precaución particular debe ser

ejercida con respecto a la precisión y exactitud del método de recuento utilizado.¹⁹

Lo que coincide con este trabajo, ya que hubo cinco repeticiones por cada muestreo y de cada método, por lo que se incremento la exactitud, sin embargo lejos de facilitar y agilizar el trabajo en laboratorio, lo haría mucho más tardado y el objetivo de esta investigación fue proporcionar soluciones al proceso de evaluación seminal, enfocándose en el procedimiento más valioso y más eficiente de dicha evaluación, por ende a la medición de la concentración espermática.

Con base en las limitaciones de tiempo consumido y variación de resultados con las cámaras, surge la necesidad de mejorar la técnica y herramientas disponibles, como el Fotómetro, para la determinación de la concentración de espermatozoides que es importante dentro del proceso de evaluación seminal, aun siendo un elemento variable, pues es la que determina la calidad real del eyaculado, dicha medición de la concentración espermática sigue siendo realizada, como ya se mencionó, a través de un conteo de células por medio de cámara de conteo (Neubauer), la cual se considera por la OMS, la prueba de oro para este tipo de mediciones, incluso se ha utilizado para la calibración del fotómetro.²⁰ Para el recuento con fotómetro, Le Cozz P. (2006), describió, en su momento, que es un método muy utilizado, pero que es una adaptación de un método para evaluar la concentración de soluciones químicas, por lo que es imperfecto aún ya que en éste caso se mide la opacidad de una suspensión heterogénea. Sin embargo, se sigue el mismo principio, y en el procedimiento que se llevó a cabo, a partir de la lectura, se determina la concentración en millones de espermatozoides/ml y ésta se multiplica por el total de ml recogidos; concluye que la clave para conseguir un buen recuento con fotómetro es que cada aparato es único y debe ser calibrado

individualmente para espermatozoides, existen tablas de correspondencia entre la densidad óptica y la concentración específica para cada aparato (los fotómetros más recientes ya no la traen, arrojan la lectura en millones de células por ml), los eyaculados no son idénticos, por lo que la fotometría está pensada no para suspensiones, las medidas pueden estar falseadas por la presencia de otros elementos como restos celulares, sangre, tapioca, entre otros, y ya que el fotómetro ha resultado ser más preciso y rápido en ésta comparación, para limitar estos errores todavía es preferible trabajar con la fracción rica en espermatozoides, cabe mencionar que la etapa más importante y principal fuente de errores es al momento de la dilución. En los resultados estadísticos, obteniendo las desviaciones estándar de los conteos de cada método, con respecto al promedio, podemos interpretar como sobreestimación los valores que nos arroja el fotómetro, sin embargo hay que tomar en cuenta toda una serie de factores interferentes en este trabajo.

Se siguen utilizando como “gold standard” los métodos de conteo celular, sin embargo, son técnicas que requieren de experiencia para realizarla adecuadamente y toma alrededor de 15 minutos por muestra, por lo anterior resulta importante que los profesionales dedicados a la evaluación de semen utilicen otros métodos más eficientes, rápidos y de **menor variabilidad entre técnicos** para la evaluación de la concentración espermática, como el **fotómetro**, que P. E. Hughes (1984), utilizó para el conteo y concluyó que proporciona resultados no tan precisos pero más rápidos, es un equipo de bajo costo (relativamente, por los beneficios a largo plazo, es una buena inversión), permite con mínimo entrenamiento medir en pocos minutos y se correlaciona con alto

grado de precisión con la concentración espermática, por lo que agiliza procesos de evaluación reproductiva.^{19, 20, 21}

Ahora bien, la manera más común para determinar la concentración espermática en el eyaculado de verraco, libre de gel (tapioca) y otros contaminantes, es medir el grado de opacidad de la muestra, ésta se estima por lo general con fotómetro, otro método es la CN, pero lleva más tiempo y es poco práctico para laboratorios que llevan a cabo el proceso de semen rutinariamente, por lo tanto, el fotómetro es el recomendado, dependiendo en gran parte del número de células espermáticas y otros componentes del eyaculado que interfieren con el paso de la luz a través de la muestra, es necesario que el aparato esté calibrado específicamente para semen porcino, haciéndolo periódicamente para mantener las lecturas precisas. Las imprecisiones de las lecturas pueden ocurrir por error humano, cuando no se hace bien la dilución, no se deja calentar lo suficiente el aparato antes de usarlo y por diferencias entre eyaculados por características per se, por lo que es importante siempre seguir las recomendaciones del fabricante.¹⁸

Durante el desarrollo del presente trabajo y por los resultados que se obtuvieron con la comparación entre los tres métodos, se sugiere que aun cuando se está acostumbrado a un estilo, no siempre es el mejor, ni el más óptimo para aumentar la precisión y producción a nivel reproductivo. Se puede facilitar el trabajo en laboratorios de procesamiento de semen y más que facilitar, agilizar para que el avance biotecnológico, genético y reproductivo sea de mayor impacto en las producciones, una vez que se comprende y están las muestras plasmadas de que la variación entre cámaras siempre estará presente, es momento de cambiar, la recomendación bien argumentada, se tiene en el presente trabajo, el Fotómetro,

un aparato que sin duda, con un buen manejo y siguiendo las instrucciones de uso, siempre será más preciso en comparación con las cámaras (Neubauer y Bürker). No por lo anterior, se dejarán de usar, pero eso ya se deja a criterio de los laboratorios de procesamiento de semen, que dependiendo de las muestras, trabajo, técnicos y otros factores, decidirán el uso del mejor (es) método (os), incluso pueden hacer uso de más de un método para tener mayor seguridad en sus resultados, independientemente del tiempo extra que les lleve.

CONCLUSIÓN

Una vez analizados los resultados obtenidos en la comparación de los tres métodos, se requiere concluir que, el desarrollo en el presente, como en la visión del futuro, se deben gracias a los nuevos métodos, que por sofisticados que parecen, son de una sencillez de uso y mucho más precisos que los comunes, los cuales son propicios siempre y cuando se establezca un criterio aceptable y se trabajen en pequeños centros de procesamiento de semen, por la facilidad de manejarse ante un número reducido de muestras.

Se espera un impacto favorecedor en el ámbito reproductivo de la especie porcina, entre otras, y la aportación para que el avance fluya es la propuesta de la nueva técnica, el fotómetro en este caso, para los centros de procesamiento de semen, en donde el tiempo es muy valioso, por esto y otras ventajas ya mencionadas, a reserva de la costumbre, los resultados estadísticos obtenidos y/o experiencia de los técnicos, se propone la implementación de dicho aparato que sin duda, con un manejo y uso adecuado deberá prescindir de las sonadas “gold standard”. Sin embargo, muy a pesar de la hipótesis, el presente trabajo nos arroja la más recomendable técnica que es la Cámara de Bürker.

BIBLIOGRAFÍA

1. Levis DG. New reproductive technologies for the AI industry. Ohio Pork dusty Center, USA: The Ohio State University Extension, 2003: 1 - 25.
2. Espinosa HS. Inseminación Artificial. La Piara Reproductora. 1ª ed. México: Ediciones Mundi-Prensa, 2002: 164-188.
3. Trujillo M. E.; R.G. Martínez G; M.A Herradora L. La piara reproductora. 1ª edición. México. Mundi-Prensa, 2002.
4. Rillo S. Martin. Reproducción e Inseminación Artificial Porcina. Barcelona: Aedos, 1982.
5. Martínez R. G. Principales factores que afectan la reproducción en el cerdo. México: Ciencia veterinaria, 1998: 187-222.
6. Cuadros C. M. .A: Características del semen porcino. 2007
 Disponible en: <http://www.agritacna.gob.pe/publicaciones2007/caracteristicas-semen-porcino.pdf> (Consultado en enero 2012).
7. Rodríguez G. Joan E. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis doctoral. Ballaterra. 2003.
 Disponible en:
<http://tdx.cat/bitstream/handle/10803/5644/aqm1de1.pdf?sequence=1> (Consultado en enero de 2012).
8. Gutiérrez P. O. Valoración In Vitro de la capacidad fecundante del espermatozoide de cerdo, crio preservado en diluyentes formulados con

- trehalosa y una baja concentración de glicerol. Tesis Doctorado. México: FMVZ-UNAM, 2009.
9. Lesu L. Manual de porcicultura, una guía paso a paso. México: Trillas, 2003.
10. Williams S. Inseminación Artificial Postcervical. (2003) (6 pantallas).
Disponible en: <http://www.AConTeCe.Com>. (Consultado en febrero de 2012).
11. Anexo 1- Conteo en cámara de Neubauer (Disponible en: <http://bdigital.eafit.edu.co/bdigital/Proyecto/P660.62CDD259/anexi.pdf>).
(Consultado en marzo de 2012).
12. Córdoba-Izquierdo, et. al., Departamento de producción Agrícola. Control Reproductivo del Verraco. México, UAM Xochimilco: Rev. Vet. 18:1, 65-69. 2007.
13. Flores M. J. A. Ganado Porcino, Cría, Explotación e Industrialización. México: Limusa, 1979.
14. Hughes P. E., M.A. Varley. Reproducción del Cerdo. Zaragoza, España: Acriba, 1984.
15. Le Cozz P. Inseminación Artificial. El recuento de espermatozoides. Barcelona, España. 2006.
(Disponible en: http://www3tres3.com/inseminacion_artificial/el-recuento-de-espermatozoides_4031/). (Consultado en marzo 2012).
16. Galina C., Valencia J. Reproducción de los Animales Domésticos. 3ª Ed. México: LIMUSA, 2009.
17. Anderson D.R., Sweeney D.J., Williams T. A. Estadística para administración y economía. 7 Ed. México: Thomson Learning, 1999.

18. US National Library of Medicine National Institutes of Health. Sperm concentration determination between hemacytometric and CASA systems: why they can be different. Kuster Research and Consulting, 22509 E. USA, Agosto 2005.

Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002129> (Consultado en marzo de 2012).

19. Gary C. A. Optimizing Productivity of the Ai Boar. Department of Veterinary Clinical Medicine. University of Illinois.

Disponible en: http://www.ncsu.edu/project/swine_extension/healthyhogs/book1997/althouse2.htm (Consultado en marzo de 2012).

20. Department of Large Animal Sciences, Veterinary Reproduction and Obstetrics, Royal Veterinary and Agricultural University. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. Marzo 2005.

Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15710187> (Consultado en marzo de 2012).

21. Díaz JD, et. al. Estandarización de la espectrofotometría para la medición de la concentración seminal en el perro doméstico. Facultad de Ciencias Veterinarias. Argentina: Universidad Nacional de La Plata, 2011.

22. Rodríguez P., Franco E., Jiménez C. Estandarización de la prueba para espectrofotometría en la medición de concentración de semen bovino,

equino, porcino, ovino y canino. Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional, Clínica de la Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2008.