

CALIBRACION DE UN ESPECTROFOTOMETRO Y FOTOCOLORIMETROS PARA LA ESTIMACION RAPIDA DE LA CONCENTRACION DE ESPERMATOZOIDES EN EL SEMEN DE BOVINOS

OSCAR L. RODRIGUEZ R. ¹

ROBERTO RUIZ D. ²

La determinación rápida y exacta de la concentración de espermatozoides es indispensable cuando se trabaja con semen, ya sea que éste se emplee en forma experimental o para la inseminación artificial, sobre todo si se toma en consideración que la concentración de espermatozoides es una de las características más variables en la evaluación de una muestra de semen (Hafs *et al.*, 1958).

Dentro de los métodos que se han utilizado para medir concentración espermática se encuentran: estimación de la muestra a simple vista, utilización del hemacitómetro, espermatocrito, métodos fotoeléctricos y conteo electrónico.

La forma más simple para determinar la concentración de espermatozoides es mediante el uso del hemacitómetro, sin embargo con esta técnica se pierde mucho tiempo y es difícil adaptarla a las condiciones de campo.

En los últimos años se han desarrollado diversas técnicas para la determinación de la concentración de espermatozoides, que se basan en la densidad óptica. Dichos métodos son rápidos, bastante exactos y se adaptan fácilmente a las condiciones de campo.

En el año 1939 Comstock y Green describieron el uso de un "fotolóme-

tro" como un método simple y exacto para la determinación rápida de la concentración de espermatozoides del semen de borrego. Métodos similares utilizando fotolómetros y colorímetros se han empleado posteriormente para estimar la concentración en el semen del perro (Foote y Boucher, 1964), y en el de los bovinos (Willetty y Buckner, 1951).

La estimación del número de espermatozoides en el semen mediante el uso de un espectrofotómetro y fotocolorímetro está basada en el hecho de que a medida que el número de células espermáticas por mililitro aumenta, la opacidad de la muestra también aumenta, y por consiguiente pasará menos luz a través de la solución donde está diluido el semen. Mediante una dilución adecuada de las muestras de semen, la cantidad de luz que pasa a través de ellas puede ser medida cuantitativamente por un espectrofotómetro o colorímetro. Las lecturas de los aparatos a su vez pueden ser relacionadas con el número de espermatozoides en la muestra, siempre y cuando dicho parámetro sea estimado previamente mediante un conteo, similar al que se utiliza para contar glóbulos rojos (Bratton, Foote y Shipman, 1956). Con el método de la cámara del hemacitómetro se ha encontrado una relación altamente significativa entre la cuenta espermática y las lecturas

¹ Coordinación Regional del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, Ferín, Yuc. Av. Colón 205-A x 30 C.P. 97070, Mérida, Yuc.

² Moneda 125, Querétaro, Qro. C.P. 76050.

de la densidad óptica de las mismas muestras de semen (Comstock y Green, 1939).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar y comparar la calibración de un espectrofotómetro y 3 colorímetros para la determinación rápida de la concentración de espermatozoides en el semen bovino. Se calibraron 3 fotocolorímetros de baterías y un espectrofotómetro modelo Spectronic 20.

Para la determinación de la concentración de espermatozoides se utilizó una cámara de hemacitómetro y se siguió la técnica descrita por Coffin (1953), y como diluyente para el semen se utilizó el colorante rosa de Bengala.

El procedimiento para obtener la densidad óptica en el caso de los fotocolorímetros es el siguiente: Se prepara una solución de citrato de sodio al 2.9% (solución base). Se enciende el aparato y se deja calentar por 10 minutos, después se ajusta para que lea 0% de transmisión; se colocan 4 ml de la solución base, con la que se ajusta para que dé una lectura de 100%.

Después de la colección del semen, se mezcla cuidadosamente el eyaculado invirtiendo el tubo 10 veces y se extrae 0.1 ml del semen que se deposita en el tubo con 7.9 ml de la solución de citrato de sodio, lo cual nos da una dilución de 1:80. Estos 8 ml proporcionan suficiente material para que se puedan hacer las lecturas con el hemacitómetro y con el fotocolorímetro utilizando la misma muestra del semen y evitar así errores en el muestreo. De este último tubo se toman 4 ml y se colocan a su vez en un tubo especial del fotocolorímetro, cuyas superficies externas deberán estar perfectamente limpias y libres de huellas digitales. Con la solución base del citrato de sodio se ajusta el aparato para obtener 100% de trans-

misión, se retira esta solución y se inserta el tubo con la muestra de semen. La lectura se toma cuando la aguja del aparato se detiene por primera vez. Se quita la muestra de semen y se pone nuevamente la solución base para comprobar que haya 100% de transmisión de la luz; si el instrumento no registra nuevamente el 100% de transmisión entonces se debe ajustar el aparato y hacer otra lectura. En nuestro estudio se tomaron dos lecturas, las cuales se promediaron para el análisis estadístico.

Con relación al espectrofotómetro, éste se debe colocar en un lugar en el que no le dé la luz solar, ni sufra vibraciones, y debe calentarse por 10 minutos antes de usarse. Se procede entonces a seleccionar la longitud de onda deseada, la cual fue de 630 en nuestro estudio (como precaución, se debe asegurar el botón selector de la longitud de onda con un pedazo de tela adhesiva).

El instrumento se debe ajustar para que con la solución base de una lectura de 100% de transmisión y para que registre 0% de transmisión sin solución alguna. La superficie exterior de los tubos se debe limpiar perfectamente con papel especial para limpiar lentes.

Para efectuar la lectura del porcentaje de transmisión, se toma 0.1 ml del semen, se remueve el exceso de la punta y parte externa de la pipeta con un papel fino y se coloca en uno de los tubos con 7.9 ml de la solución del citrato. La punta de la pipeta con el semen se debe colocar 0.5 cm dentro del citrato y el semen debe fluir por gravedad; cuando el semen deja de fluir se enjuaga unas tres veces la pipeta con el citrato; después se tapa el tubo y se invierte cuidadosamente sin agitarlo, unas 5 veces, evitándose la salida del líquido, posteriormente se procede a hacer la

lectura como en el caso de los colorímetros.

Para disminuir el margen de error, en nuestro estudio los conteos hechos con la cámara del hemacitómetro correspondiente a determinado porcentaje de transmisión fueron promediados, utilizándose estas medias para hacer el análisis de regresión, para el cual se utilizaron 32 medias en el caso del Spectronic 20 y para los fotocolorímetros 26, 25 y 28 respectivamente.

Para obtener la densidad óptica se realizó una transformación logarítmica del porcentaje de transmisión y convertirlo en una correlación lineal y se le restó a 2 para que dicha correlación fuera positiva; ($D = 2 - \log \% \text{ transmisión}$).

Para la ecuación de regresión se siguió el método descrito por Snedecor y Cochran (1971), que fue $\hat{Y} = a + bx$ donde x , es la densidad óptica y \hat{Y} la lectura del hemacitómetro.

Tomando en consideración que la obtención de una determinada ecuación no fue aplicable a los otros aparatos, en el cuadro 1 se enlistaron solamente parte de las lecturas obtenidas para que sirvan de ejemplo o como base de comparación para la calibración de otros aparatos.

CUADRO 1
Lecturas del porcentaje de transmisión, transformaciones logarítmicas y cuentas con el hemacitómetro.

MUESTRA Nº	PORCENTAJE TRANSMISIÓN (T)	TRANSFORMACION LOGARITMICA (X)	CUENTA HEMACITOMETRO ² (Y)
1	42.0	.37675	1770
2	56.5	.17718	1140
3	66.0	.18046	1010
4	42.5	.37161	1680
5	28.5	.54516	3030
6	45.5	.34399	1710
7	36.5	.43771	2250
8	54.0	.26761	1070
9	24.5	.61083	3680
10	56.5	.24795	870
11	39.5	.40340	2210
12	42.5	.37161	1900
13	55.5	.25571	850
14	52.5	.27984	1290
15	43.5	.36151	2040
16	31.5	.50169	2430
17	28.5	.54516	3050
18	29.0	.53760	2720
19	41.5	.38195	1940
20	52.5	.27984	1290

¹n=6115 4214X-389.31

1 Solamente se presenta parte de la información
2 Millones de espermatozoides por mililitro.

Una vez obtenida la ecuación, se procedió a elaborar un cuadro en donde a cada lectura del espectrofotómetro, se le da su valor en número de espermatozoides por mililitro, de tal forma que en cuanto se vea la lectura del espectrofotómetro, se sabrá la concentración de la muestra que se evalúa. Estos cuadros se elaboran abarcando lecturas del 20 al 80. En el cuadro 2 se encuentra parte de este tipo de información que se obtuvo de acuerdo a la ecuación de regresión.

CUADRO 2
Concentración de espermatozoides que corresponden a lecturas del espectrofotómetro

Lectura 1	Concentración 2
20.0	3885
20.5	3820
21.0	3756
21.5	3693
22.0	3632
22.5	3572
23.0	3514
23.5	3457
24.0	3401
24.5	3346
25.0	3292
25.5	3240
...	...
40.0	2044
40.5	2011
41.0	1979
41.5	1946
42.0	1915
42.5	1883
...	...
80.0	203

1 Porcentaje de transmisión del espectrofotómetro
2 Millones de espermatozoides por mililitro.

En el cuadro 3 se muestran parte de las lecturas obtenidas en los 4 aparatos que se calibraron y se presentan con el objeto de poder apreciar diferencias de lecturas entre los diferentes aparatos.

Se puede observar que los valores son bastante diferentes entre el espectrofotómetro y los colorímetros aún cuando se trataba del mismo eyaculado; por ejemplo en la muestra No. 3 del mismo cuadro, el semen a probar dio una lectura de 29.0 en el espectrofotómetro mientras que en los fotocolorímetros los valores fue-

ron de 52.0, 50.0 y 47.0%, con la misma muestra de semen.

Asimismo se aprecia que aunque la diferencia entre los valores de transmisión de los 3 colorímetros es menor, la variación existente no nos permite utilizar una misma ecuación para 2 o más aparatos aunque éstos sean de la misma marca, por lo que es recomendable calibrarlos en forma individual. Inclusive es conveniente recalibrar los colorímetros por lo menos cada 6 meses, sobre todo cuando se utilizan constantemente a nivel de campo. Para esta recalibración se ha estado utilizando un procedimiento más sencillo a base de partículas de látex (Foote, 1968).

CUADRO 3

Lecturas obtenidas al calibrar un espectrofotómetro y 3 fotocolorímetros

Muestra Nº	LECTURAS			
	Espectrofotómetro	Fotocolorímetros		
		1	2	3
1	21.5	43.0	43.0	40.0
2	25.5	47.5	46.0	45.0
3	29.0	52.0	50.0	47.0
4	39.0	62.0	61.0	60.0
5	40.5	62.0	62.0	61.0
6	43.0	63.0	62.0	60.0
7	49.5	70.0	69.0	66.0
8	49.0	66.0	66.0	62.0
9	53.0	70.0	70.0	68.0
10	52.5	70.0	69.0	69.0
11	53.0	72.0	71.0	67.0
12	57.0	74.5	74.0	73.5
13	56.5	73.0	72.0	71.0
14	63.0	78.0	76.0	76.5
15	69.0	80.0	79.0	78.0

1 Sólo se presenta parte de la información.

Aunque en la actualidad se recomienda una longitud de onda de 550 nanómetros por ser bastante sensitiva (Foote, 1968; Foote, Arriola y Wall, 1978), lo verdaderamente importante es utilizar la misma longitud de onda en la calibración y durante el trabajo rutinario.

Finalmente se deberá poner especial cuidado en la calibración de estos aparatos, ya que aunque representan una gran ayuda dentro del trabajo rutinario de procesamiento del semen, una calibración errónea repercutirá

posteriormente en la exactitud de la estimación de la concentración de semen de las muestras a probar.

SUMMARY

A procedure for the calibration of one photometer and three colorimeters is described. These were a spectrophotometer Bausch and Lomb model Spectronic 20 and three battery operated Cenco B-2 units.

A wave length of 630 nanometers was used. Readings for the same sperm concentration were quite different between Spectronic 20 and Cenco units, although values among these were similar.

LITERATURA CITADA

BRATTON, R.W., R.H. FOOTE and K. SHIPMAN, 1956. Procedure for counting bovine sperm with a hemocytometer and the calibration and operational use of a photometer to estimate sperm count by optical density. **Laboratory of Animal Breeding and Artificial Insemination**. Cornell Univ.

COFFIN, D.F., 1953. Manual of Veterinary Clinical Pathology, 3rd Ed. **Com. stock Publ. Co.** Ithaca, N.Y.

COMSTOCK, R.E. and W.W. GREEN, 1939. Methods for semen evaluation. I. Density, Respiration. Glycolysis of semen. **Am. Soc. Anim. Prod. Proc.** 32:213-216.

FOOTE, R.H., 1968. Standards for sperm concentration: polystyrene latex particles as an aid in quality control. **Proc. 2nd Tech Conf. on Anim. Reprod. and A.I.** p. 95-97.

FOOTE, R.H. and J. H. BOUCHER, 1964. A comparison of several photoelectronic procedures for estimating sperm concentration in dog semen. **Am. J. Vet. Res.** 25 (10):558.

FOOTE, R.H., J. ARRIOLA and R. J. WALL, 1978. Principles and procedures for photometric measurement of sperm cell concentration. **Proc. 7 th Tech. Conf. on Anim. Reprod. and A.I.** p. 55-61

HAFS, H.D., R. W. BRATTON, C.R. HENDERSON and R.H. FOOTE, 1958. Estimation of some variance components of bovine semen criteria and their use in the design of experiments. **J. Dairy Sci.** 41:96-104.

SNEDECOR, G.W. and W.G. COCHRAN, 1971. Statistical Methods, 6 th Ed. **The Iowa State University Press.**, Ames, Iowa.

WILLET, E.L. and P.J. BUCKNER, 1951. The determination of numbers of spermatozoa in bull semen by measurement of light transmission. **J. Anim. Sci.** 10(1)219.