

**MODIFICACION AL METODO DE DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ESPERMATOZOIDES EN EL SEMEN OVINO<sup>a</sup>**

JUAN P. CELIS GUTIERREZ<sup>b</sup>

OSCAR L. RODRIGUEZ RIVERA<sup>c</sup>

**RESUMEN**

Se comparan dos metodos para la concentración espermática en carneros. El método modificado consiste en la obtención de 0.01 ml de semen con una micropipeta de dilución, el cual se mezcla con 3.99 ml de citrato de sodio. Se obtuvieron 50 eyaculados por vagina artificial y muestras de ellos se diluyeron por ambos métodos. Los resultados muestran que el método modificado es seguro ( $r = .98$ ) y hubo un menor porcentaje de semen desperdiciado.

La determinación de la concentración espermática es de gran importancia para la evaluación del semen, es útil en la selección de muestras con alto potencial de fertilidad y determina la dilución óptima para su preservación, sin menoscabo de la fertilidad.

Debe realizarse en forma rápida y exacta, sobre todo si se toma en cuenta que la concentración de espermatozoides es una de las características más variables en la evaluación de una muestra de semen<sup>1, 7</sup>.

Dentro de los métodos que se han utilizado para medir la concentración espermática se encuentran: estimación de la muestra a simple vista, utilización del hemocitómetro, espermatocrito,

métodos fotoeléctricos y conteo electrónico<sup>11</sup>.

De éstos métodos, los de empleo común son el hemocitómetro<sup>3, 6, 9, 10</sup> y el del espectrofotómetro<sup>1, 5, 12</sup>. De éstos, el primero es un método sencillo, sin embargo es lento.

La estimación del número de espermatozoides en el semen mediante el uso del espectrofotómetro se basa en que a medida que aumenta el número de células espermáticas por ml, la opacidad de la muestra también aumenta y por consiguiente pasará menos luz, la cual es medida por el aparato<sup>5</sup>.

El método para medir la concentración de semen con el uso del espectrofotómetro, contempla en uno de sus pasos, el tomar 0.1 ml de semen y mezclarlo con 7.9 ml de una solución de citrato de sodio, sin embargo si se toma en consideración que en el borrego Pelibuey se obtienen volúmenes de 0.3 a 1.2 ml<sup>2</sup>, sólo en conocer su concentración se desperdicia del 8 al 33% del semen disponible para su congelación. Hernández, Rodríguez y González<sup>8</sup> al utilizar vagina artificial para colectar el semen de borrego Pelibuey obtuvieron promedios de volumen de 0.8±0.3 ml para el primer eyaculado y 0.7±0.3 ml para el segundo; lo que aún representa en forma conservadora un 12.5% de pérdida al utilizar dicho sistema.

<sup>a</sup> Recibido para su publicación el 10 de abril de 1987.

<sup>b</sup> Campo Experimental Mocochá. Apdo. Postal 100 Sucursal "D". Mérida, Yuc.

<sup>c</sup> Centro de Investigaciones Forestales y Agropecuarias en el Estado de Yucatán. Calle 62 x 55 No. 462, Depto. 209, Edificio Santa Lucía. C.P. 97000-1. Mérida, Yuc.

Con la utilización del hemocitómetro, el volumen del semen requerido es mucho menor, sin embargo como el semen ovino es muy concentrado, con esta dilución de 1:200 en muchas ocasiones es por completo imposible realizar un conteo preciso en dicho aparato. Además, se pierde semen al sumergir la pipeta cuentaglóbulo en la muestra, es decir, lo que se adhiere a las paredes externas de la pipeta. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue modificar el método tradicional de conteo de espermatozoides con espectrofotómetro, para lograr un menor desperdicio de células espermáticas, sin menoscabo en la precisión del método.

Se utilizaron 50 eyaculados provenientes de carneros Pelibuey, obtenidos mediante vagina artificial. La muestra de semen se homogeneizó por medio de la inversión del tubo de colección por 10 veces. Se realizó un conteo con el método tradicional que consistió en obtener 0.1 ml de semen, mezclarlo con 7.9 ml de citrato de sodio al 2.9% con lo que se obtuvo una dilución de 1:80. Estos 8.0 ml proporcionaron suficiente material para hacer lecturas en el hemocitómetro y en el espectrofotómetro, para el que se utilizaron 4.0 ml de acuerdo con el método sugerido por Rodríguez y Ruiz<sup>11</sup>.

De los restantes 4.0 ml se tomó 1.0 ml y se mezcló con 4.0 ml de una solución de rosa de bengala, con lo que resultó una dilución de 1:400. De esta dilución, con una pipeta cuentaglóbulo se llevó hasta la marca 101 y se agitó por 2 min, se desecharon las primeras gotas y se llenó el hemocitómetro para efectuar el conteo respectivo.

Con el método modificado, de la misma muestra original de semen, se tomó 0.1 ml con una micropipeta de dilución y se mezcló muy bien con 3.99 ml de una solución de citrato de sodio, con lo que se obtuvo la dilución de 1:400, con estos 4.0 ml se procedió a

realizar la lectura con el espectrofotómetro en la forma tradicional y después de esta misma muestra, se llenó la pipeta cuentaglóbulo y el hemocitómetro.

Tanto las lecturas del hemocitómetro como las del espectrofotómetro, se hicieron por dos ocasiones y se utilizaron los promedios para realizar los análisis correspondientes. La longitud de onda empleada en el espectrofotómetro fue de 550 nanómetros<sup>4, 5</sup>.

Para elaborar las tablas de concentración y comparar ambos sistemas, se realizaron ecuaciones de regresión<sup>13</sup>. La ecuación utilizada fue  $Y = a + bx$ , en donde  $x$  es la densidad óptica y la  $Y$  la lectura del hemocitómetro. 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, ( $D = 2 - \log \% \text{ transmisión}$ ), de acuerdo a lo descrito por Bratton, Foote y Shipman<sup>1</sup>, y por Rodríguez y Ruiz<sup>11</sup>.

En el Cuadro 1 se presentan las correlaciones encontradas en el método tradicional ( $r = .95$ ) y en el método modificado ( $r = .98$ ). Como se puede observar ambos valores son altos y se encuentran dentro de los rangos mencionados por otros autores<sup>5, 12</sup>. La importancia del valor encontrado para el método modificado estriba en que el desperdicio de células espermáticas se reduce en forma considerable, pues con volúmenes promedios de .8 ml por eyaculado, este desperdicio no excede del 1.2% mientras que para el tradicional, dicho valor podría ser hasta del 23%, según el volumen del eyaculado.

Al correlacionar las lecturas de un sistema contra otro, se observa que éstas disminuyen de manera considerable, a pesar de que las diluciones con ambos métodos son iguales (1:400), esto se puede atribuir a que con el método tradicional se realizan más pasos para llegar a la dilución final, lo

C U A D R O 1

CORRELACIONES ENTRE ESPECTROFOTOMETRO Y HEMACITOMETRO CON LA UTILIZACION DE DOS METODOS DE DETERMINACION ESPERMATICA

APARATO Y METODO		
E. Tradicional	- H. Tradicional	0.955
E. Modificado	- H. Modificado	0.980
E. Tradicional	- H. Modificado	0.841
E. Modificado	- H. Tradicional	0.387

E. ESPECTROFOTOMETRO  
H. HEMACITOMETRO

cual aumenta las posibilidades de error.

Con la ecuación obtenida se procedió a elaborar las tablas en donde a cada lectura del espectrofotómetro se le da su valor de espermatozoides por ml, de tal forma que en cuanto se vea la lectura se conocerá la concentración de la muestra. Estas tablas abarcaron lecturas del 2.0 al 35.0 para el método tradicional y del 10.0 al 75.0 para el método modificado. En el Cuadro 2 se presenta parte de esta información.

Como se puede observar los valores del método modificado tienen un rango mayor, lo que es debido a la dilución que con éste método se tiene (1:400) y la cual es mayor a la del método tradicional (1:80). Estos datos con concuerdan con lo mencionado por Rondeau y Rouleau<sup>12</sup>, quienes afirman que no hay efecto de dilución en la determinación espermática, aunque por otro lado el efecto aquí encontrado es el mismo que menciona Foote, Arriola y Wall<sup>5</sup> y Rodríguez y Ruíz<sup>11</sup>.

Se concluye que el método modificado aquí presentado, es eficaz y confiable en la determinación espermática del semen ovino cuando se utiliza el espectrofotómetro.

SUMMARY

A modified procedure for the sperm cell concentration in rams is compared with the traditional. This procedure consists in taking only 0.01 ml of semen by using a microplpete

C U A D R O 2

CONCENTRACION DE ESPERMATOZOIDEOS QUE CORRESPONDEN A LAS LECTURAS DEL ESPECTROFOTOMETRO PARA LOS DOS METODOS

METODO TRADICIONAL (0.1 ML DE SEMEN) 1:80		METODO MODIFICADO (0.01 ML DE SEMEN) 1:400	
LECTURA (% TRANSM.)	CONCENTRACION (MILLONES DE ESPERM.)	LECTURA	CONCENTRACION (MILLONES DE ESPERM.)
2.0	6837	20.0	6939
2.5	6379	20.5	6835
3.0	6005	21.0	6732
3.5	5689	21.5	6632
4.0	5415	22.0	6535
4.5	5173	22.5	6439
.	.	.	.
.	.	.	.
.	.	50.0	3048
20.0	2112	50.5	3006
20.5	2061	51.0	2964
21.0	2012	51.5	2923
21.5	1964	52.0	2882
22.0	1916	52.5	2841
22.5	1870	.	.
.	.	.	.
.	.	.	.
.	.	75.0	1326
35.0	964	.	.

and mixing with 3.99 ml of sodium citrate. Fifty ejaculates were obtained by artificial vagina and split samples were used for conventional and modified dilutions. The results showed that the modified procedure was accurate ( $r = .98$ ) and a low percentage of semen wastage was obtained.

#### LITERATURA CITADA

- 1 BRATTON, R.W., FOOTE, R.H. and SHIPMAN, K., 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. Lab. Proc. No. 4, Cornell University, USA.
- 2 CASTILLO, R.H., BERRUECOS, V.J.M., PEREZ, S.J.M., HERNANDEZ, L.J.J. y QUESADA, B.R., 1976. Comportamiento reproductivo del borrego Tabasco mantenido en clima tropical. II. Características seminales *Téc. Pec. Méx.* 31:63.
- 3 ENTWISTLE, K.W. and MARTIN, I.C.A., 1972. Effects of the number of spermatozoa and of volume of diluted semen on fertility in the ewe. *Aust. J. Agric. Res.* 23:467.
- 4 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. 1. p. 95.
- 5 FOOTE, R.H., ARRIOLA, J. and WALL, R.J., 1978. Principles and procedures for photometric measurement of sperm cell concentration. Proc. 7th Tech. Conf. on Anim. Reprod. and A.I. p. 55.
- 6 FUKUI, Y. and ROBERTS, E.M., 1977. Fertility of ewes treated with prostaglandin F2a and artificially inseminated at predetermined intervals thereafter. *Aust. J. Agr. Res.* 28:891.
- 7 HAFS, H.D., BRATTON, R.W., HENDERSON, C.R., and FOOTE, R.H., 1958. Estimation of some variance components of bovine semen criteria and their use in the desing of experiments. *J. Dairy Sci.* 41:96.
- 8 HERNANDEZ, L.J.J., RODRIGUEZ, R.O., y GONZALEZ, P.E., 1976. Evaluación de cuatro métodos para colección de semen en borrego Tabasco o Pelibuey. *Téc. Pec. Méx.* 30:45.
- 9 LIGHTFOOT, R.J., and RESTALL, B.J., 1971. Effects of site of insemination, sperm motility and genital tract concentrations on transport of spermatozoa in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 26:1.
- 10 MORRANT, A.J., and DUN, R.B., 1960. Artificial insemination of sheep. II. Techniques and equipment used at Trangie Agric. Exp. Stn. *Aust. Vet. J.*
- 11 RODRIGUEZ, R.O.L. y RUIZ, D.R., 1985. Calibración de un espectrofotómetro y fotocolorímetro para la estimación rápida de la concentración de espermatozoides en el semen de bovinos. *Téc. Pec. Méx.* 48:116.
- 12 RONDEAU, M., and ROLEAU, M., 1981. Effects of dilution rates, animal species and instruments on the spectrophotometric determination of sperm counts. *Rev. Can. Biol.* 40(2):173.
- 13 SNEDECOR, G.W. and COCHRAN, W.G., 1967. Statistical methods. 6th ed. Iowa State University Press. Ames Iowa.