ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA PARA ESPECTROFOTOMETRÍA EN LA MEDICIÓN DE CONCENTRACIÓN DE SEMEN BOVINO, EQUINO, PORCINO, OVINO Y CANINO

Rodríguez P[1], Franco E[2], Jiménez C[3]

Universidad Nacional, Clínica de la Reproducción Animal,
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue comparar dos métodos para la medición de concentración espermática, espectrofotometría y cámara de Neubauer, para las especies bovina, equina, porcina, ovina y canina, verificando el porcentaje de correlación existente entre las pruebas y generando así un índice que permitiera la lectura equivalente en ambos métodos.

Se evaluaron 20 eyaculados por especie, de distintos machos escogidos al azar. Cada una de las muestras fue diluida a 1:100 en citrato de sodio al 2,9%, y procesadas tanto en la cámara de Neubauer como en el espectrofotómetro. Arrojando valores equivalentes por densidad y conteo celular con una alta correlación (r = 0,97; 0,97; 0,96; 0,92; 0,99), en bovinos, equinos, porcinos, ovinos y caninos, respectivamente. De esta manera, se generó una tabla por especie para la determinación del número real de espermatozoides en la muestra medida por espectrofotometría. Los resultados del presente estudio demuestran que la medición de concentración espermática por medio de espectrofotometría es un método rápido y preciso que permite la agilización en el proceso de evaluación reproductiva del macho en diferentes especies.

Palabras clave: espectrofotómetro, hematocitómetro, semen, concentración.

STANDARDIZATION OF AN SPECTROPHOTOMETRIC TECHNIQUE TO MEASURE SPERM CONCENTRATION IN THE BULL, STALLION, BOAR, RAM AND DOG

ABSTRACT

The present study was conducted to standardize a spectrophotometric technique for the measurement of sperm concentration in the bull, stallion, boar, ram and dog. Ten ejaculates were obtained from each species from males collected from different sources. A 10-fold dilution of each ejaculate was made,a calibration curve was created and the sperm concentration of each sample was determined and compared by two techniques: haemocytometer and spectrophotometer. The comparison bewteen the two measurement methods showed high correlation with values ranking from 0.92 to 0.99. Using a linear regression equation, a table to calculate a sperm sample concentration was made for each species. Another equipment, RA 50, that also measures sample density was used. The results were compared

1 prodriguezv@unal.edu.co
2 enfrancoh@unal.edu.co
3 cjimeneze@unal.edu.co

with the haemocytometer. The correlation between the two tests was good, with values that ranged between (0.90-0.99).
The study corroborated the feasibility of using the spectrophotometer or any other density measurement equipment for sperm concentration in several species; it is also a faster method that allows the practitioner or the laboratories to run several samples in a shorter period of time.

Key words: Sperm concentration, espectrophotometry, haematocytometer, semen.

INTRODUCCIÓN

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

El objetivo de este trabajo es proporcionar soluciones al proceso de evaluación seminal, enfocándose en el procedimiento más dispendioso y menos eficiente de la evaluación seminal, la medición de la concentración espermática. La determinación de la concentración de espermatozoides es importante dentro del proceso de evaluación seminal, aún siendo un elemento variable, pues es la que determina la calidad real del eyaculado (1).

La medición de la concentración espermática es realizada comúnmente a través de un conteo de células por medio de cámaras de conteo (Neubauer o hematocitómetro), la cual se consideran la prueba de oro para este tipo de mediciones, en donde se ha visto que la variabilidad de los resultados puede ser del 7,1 al 12%; sin embargo, es una técnica que requiere de experiencia para realizarla adecuadamente y toma alrededor de 15 minutos por muestra (2, 3). 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 la espectrofotometría.

El método de espectofotometría permite la medición de la muestra bajo parámetros de longitud de onda, determinada según el tamaño celular y volumen de la muestra, transmitancia y absorbancia, como resultado del nivel de densidad de la misma.

Este método es de rápida aplicación sin importar el grado de concentración del eyaculado o la especie del macho que es evaluado (4). Además de ofrecer una menor variabilidad con respecto al método directo de conteo en cámara de Neubauer.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron entre 10 a 21 machos adultos por especie, sanos, aptos para la reproducción, distribuidos en cinco grupos según la especie, escogidos al azar, conformando así un grupo de trabajo heterogéneo.

La obtención de las muestras fue realizada de forma higiénica, por medio de electroeyaculación para el caso de los bovinos y ovinos, vagina artificial para bovinos, ovinos y equinos, y por el método manual para el caso de los porcinos y caninos.

Para los grupos donde las muestras presentaban concentraciones similares se realizaron diluciones de los eyaculados iniciales para la proporción de distintas densidades, que crearan una mayor variabilidad entre los datos y un mayor rango en la medición de valores de concentración.

Grupo 1 Bovinos (n= 29), con 21 muestras procedentes de diferentes machos y 8 generadas por dilución; Grupo 2 Equinos (n= 19), con 13 muestras de diferentes machos y 6 generadas por dilución; *Grupo 3* Porcinos (n=19), con 10 muestras de machos

diferentes y 9 generadas por dilución; *Grupo 4* Ovinos (n= 22), con 17 muestras de machos diferentes y 5 generadas por dilución y, por último, el *Grupo 5* Caninos (n= 19), con 10 muestras de machos diferentes y 9 generados por dilución.

Todo el proceso de evaluación seminal restante se llevó a cabo en el laboratorio de andrología y gineco-obstetricia de la Clínica de la Reproducción de la FMVZ.

Al semen puro de cada animal muestreado se le realizó una dilución en citrato de sodio al 2,9%, 1:100 (0,05 ml de semen en 5 ml del citrato al 2,9%), para su lectura en cámara de Neubauer (Neubauer Improved Bright-Line®, Loptik Labor), y en el espectrofotómetro (Spectronic 20® Bausch & Lomb). Adicionalmente, a la muestra original de semen se le realizó una serie de diluciones, teniendo en cuenta la concentración según la especie. De esta forma se efectuaron diluciones 1 en 100, 50, 60, 70, 80, 90, 120, 130 y 200, generando así mayor número de muestras, con una mayor variabilidad de resultados, que ampliarían el rango de medición.

Para la lectura en el espectrofotómetro se calibró la longitud de onda según la especie, para los *grupos 1, 2 y 5* (bovinos, equinos y caninos respectivamente), se realizó la lectura con una longitud de onda de 620 nm, como se recomienda en la literatura (5, 6, 7); para los g*rupos 3 y 4* (porcinos y ovinos) se recomienda la longitud de onda de 550nm (8, 4).

Cada una de las lecturas fue realizada en dos o en algunos casos, tres réplicas, para comprobar la repetibilidad de los resultados.

ANÁLISIS DE DATOS

Se creó una matriz de correlación entre la transmitancia, la absorbancia y la concentración, para así establecer el coeficiente de determinación para cada prueba según la especie.

Igualmente, se procedió a la determinación de las curvas de estandarización y se compararon según especie, a través de la ecuación de regresión, que para este caso fue Y= a+bx, donde X es la lectura en hematocitómetro y Y es la lectura del transmitancia. La densidad óptica se realizó bajo la transformación logarítmica de D= 2-log de transmitancia. De esta forma se obtuvieron los demás porcentajes de transmitancia para los distintos valores de concentración.

RESULTADOS

Se demostró una alta correlación entre el espectrofotómetro, la cámara de Neubauer para cada una de las especies: bovinos ($r^{2=}$ 0,97), equinos ($r^{2=}$ 0,97), porcinos ($r^{2=}$ 0,96), ovinos ($r^{2=}$ 0,92) y caninos ($r^{2=}$ 0,99). Esta correlación permitió la generación de una tabla de equivalencias para cada una de las especies, que facilitara la lectura de los eya-

Figura 1. Rectas de estandarización en las especies bovina y equina realizada con diferentes concentraciones

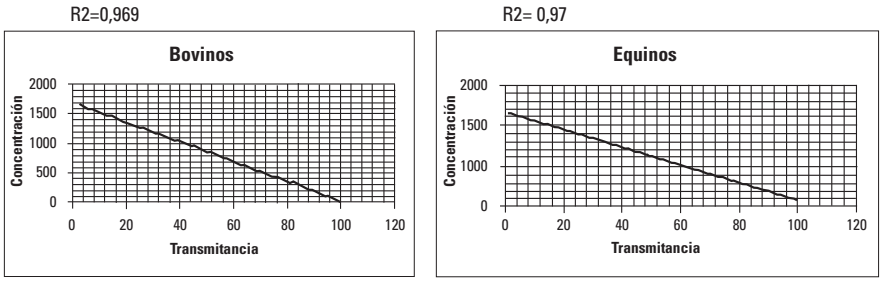

Tabla 1. Tabla de equivalencias (transmitancia/concentración) para bovinos (0,05 ml de semen en 5 ml de citrato de sodio al 2,9% a una longitud de onda de 620 nm)

Trasm	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
Conc	1159	1142	1126	1109	1092	1076	1059	1042	1026	1009
D. Opt	0,495	0,481	0,469	0,456	0,444	0,432	0,42	0,409	0,398	0,387
Trasm	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
Conc	992	976	959	943	926	909	893	876	859	843
D. Opt	0,377	0,367	0,357	0,347	0,337	0,328	0,319	0,31	0,301	0,292
Trasm	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
Conc	826	809	793	776	759	743	726	710	693	676
D. Opt	0,284	0,276	0,268	0,26	0,252	0,244	0,237	0,229	0,222	0,215

Tabla 2. Tabla de equivalencias (transmitancia/concentración) para equinos (0,05 ml de semen en 5 ml de citrato de sodio al 2,9% a una longitud de onda de 620 nm)

Trasm	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
Conc	500	489	478	467	456	445	434	423	412	401
D. Opt	0,215	0,208	0,201	0,194	0,187	0,18	0,174	0,167	0,161	0,155
Trasm	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Conc	390	380	369	358	347	336	325	314	303	292
D. Opt	0,149	0,143	0,137	0,131	0,125	0,119	0,114	0,108	0,102	0,097

Tabla 3. Tabla de equivalencias (transmitancia/concentración) para porcinos (0,05 ml de semen en 5 ml de citrato de sodio al 2,9% a una longitud de onda de 550 nm)

Trasm	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Conc	1093	1075	1057	1038	1020	1002	983	965	946	928
D. Opt	0,387	0,377	0,367	0,357	0,347	0,337	0,328	0,319	0,31	0,301
Trasm	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Conc	910	891	873	855	836	818	799	781	763	744
D. Opt	0,292	0,284	0,276	0,268	0,26	0,252	0,244	0,237	0,229	0,222

Tabla 4. Tabla de equivalencias (transmitancia/concentración) para ovinos (0,05 ml de semen en 5 ml de citrato de sodio al 2,9% a una longitud de onda de 550 nm)

Trasm	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Conc	4099	4010	3920	3831	3742	3652	3563	3473	3384	3295
D.Opt	0,959	0,921	0,886	0,854	0,824	0,796	0,77	0,745	0,721	0,699
Trasm	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Conc	3205	3116	3026	2937	2848	2758	2669	2579	2490	2401
D.Opt	0,678	0,658	0,638	0,62	0,602	0,585	0,569	0,553	0,538	0,523

Tabla 5. Tabla de equivalencias (transmitancia/concentración) para caninos (0,05 ml de semen en 5 ml de citrato de sodio al 2,9% a una longitud de onda de 620 nm)

Trasm	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
Concen	962	937	912	887	862	837	812	787	762	737
D.Opt	0,215	0,208	0,201	0,194	0,187	0,18	0,174	0,167	0,161	0,155
Trasm	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Concen	712	687	662	637	612	587	562	537	512	487
D.Opt	0,149	0,143	0,137	0,131	0,125	0,119	0,114	0,108	0,102	0,097

culados tanto por espectrofotómetro como por cámara de Neubauer con resultados muy similares.

Los coeficientes de relación entre las pruebas fueron altos en todas las especies, demostrando una correlación positiva entre las dos variables (transmitancia/concentración).

La ecuación de regresión general permitió la alineación de la dispersión de datos como en los bovinos y equinos (figura 1), que permitieron la estandarización y determinación del resto de valores tanto de transmitancia como de concentración, generando la tabla de equivalencias entre las lecturas en espectrofotómetro y en cámara de Neubauer para cada especie, (tablas 1, 2, 3).

DISCUSIÓN

La determinación de la concentración espermática es un proceso dispendioso cuando se realiza manualmente. Reportes de literatura han mostrado que la determinación de la concentración espermática sigue siendo un procedimiento que consume mucho tiempo dentro de la evaluación seminal (2, 9), por lo tanto existe la necesidad de buscar nuevas opciones de evaluación como son el Coulter counter® (3), Bullmate ™ (9), Spermacue®, el espectrofotómetro (10, 11), o el espermatocrito (12), que faciliten la lectura.

La utilización del espectrofotómetro para medir la concentración de semen ha permitido que el procesamiento de muestras sea cada vez más rápido en comparación con el uso del aparato de rutina, la cámara de Neubauer o hematocitómetro.

Se ha demostrado que la estimación de la concentración por densidad es limitada. Woelders, Paulenz *et al*. y Palmer *et al*. (13, 3, 9), usaron el Coulter counter® y el Bullmate™ respectivamente para medir la concentración de semen encontrando una subestimación de los valores arrojados por estos aparatos, cuando las concentraciones eran muy altas o muy bajas. Estos resultados son similares a lo encontrado en este experimento, en donde la medición por medio de espectrofotometría presentó variabilidades en muestras con concentraciones mayores a la de los parámetros normales, y en eyaculados contaminados en donde la presencia de detritos celulares variaba la densidad de las muestras, haciendo que los resultados no coincidieran con el resto de datos.

Solo en este tipo de casos se daría como recomendación la utilización de una contramuestra por el método de conteo celular directo, para disminuir el margen de error, ya que fueron claros los tipos de muestras que precisarían de una segunda lectura.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron una relación muy similar de datos con una alta correlación (promedio 0,96) entre el espectrofotómetro y el hematocitómetro. Estos resultados de correlación son similares (14, 13), o incluso mayores (15, 6),

a los reportados por la literatura en ocasiones anteriores.

Las altas correlaciones entre los aparatos permitieron generar un índice de equivalencias para la lectura de la concentración en el espectrofotómetro a partir de los datos obtenidos por cámara de Neubauer.

Debido a la dispersión de dichos datos fue necesario su alineamiento por medio de una ecuación de regresión lineal para la homogeneización y la generación de los datos restantes, como se había realizado en anteriores estudios (6, 16), ya que su modelo de comportamiento fue similar.

En el caso de los ovinos, el comportamiento de los resultados no fue del todo satisfactorio; la generación de los valores restantes presentó un gran porcentaje de números negativos. Estos números igualmente no tuvieron ninguna influencia y pudieron ser despreciados debido a que los valores de concentración para la especie tienen su equivalencia de transmitancia y pueden ser leídos.

Las tablas finales con las equivalencias para cada especie contienen los valores más allá de los estándares de cada una, con excepción de los ovinos, lo que permite leer cualquier muestra seminal sin importar la raza o calidad espermática de los individuos de cada una de las especies.

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que la medición de la concentración por medio de espectrofotometría es un método rápido y preciso, que nos permitirá procesar un mayor número de muestras en menor tiempo.

REFERENCIAS

1. Hafs HD, Bratton RW, Henderson CR, Foote RH. Estimation of some variance components of bovine semen criteria and their use in the design of experiments. J Dairy Sci 1958; 41: 96-104.
2. Mahmoud AM, Depoorter B, Piens N, Comhaire FH. The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. Fertility and Sterility 1997; 68 (2).
3. Paulenz H, Grevle IS, Tverdal A, Hofmo PO, Andersen. Precision of the coulter counter for routine assessment of boar-sperm concentration in comparison with the hemocytometer and spectrophotometer. Reprod Dom Anim 1995. 30: 107-111.
4. Knox RV, Rodríguez-Zas SL, Roth S, Ruggiero K. Use and accuracy of instruments to estimate sperm. University of Illinois at Urbana Champaign; 2004.
5. Bouchard GF, Morris JK, Sikes JD, Youngquist RS. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. Theriogenology 1990; 34 (1):147-157.
6. Haag. Determination of the approximate sperm concentration of horse semen with the aid of a spectrophometer. JAVMA 1959. April 1.
7. Rodriguez ROL, Ruiz DR. Calibración de un espectrofotómetro y fotocolorímetro para la estimación rápida de la concentración de espermatozoides en el semen de bovinos. Tecnológica Pecuaria de México 1985; 48: 116.
8. Gutiérrez CJP, Rodríguez ROL. Modificación al método de determinación de la concentración de espermatozoides en el semen ovino. Tecnológica Pecuaria de México 1987; 36: 39.
9. Palmer CW, Barth AD. Comparision of the BullMate® sperm quality analyzer with conventional means of assessing the semen quality and breeding soundness of beef bulls. Animal Reproduction Science 2003; 173-185.
10. Foote RH, Arriola J, Wall RJ. Principles procedures for photometric measeurement of sperm cell concentration. Proc. 7th Tech

Conference on animal Reproduction and A.I.; 1978. p. 55 -61.

11. Urueña FR, Rodríguez P. Estandarización de la prueba de espectrofotometría en la medición de la concentración seminal de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Memorias Segundo Congreso Colombiano de acuacultura 2004; p. 122-123.

12. Cruz-Casallas PE, Velasco YM, Medina VM, Morales JA. Relación entre espermatocrito y concentración espermática, y variación de la calidad seminal durante la estación reproductiva del Yamú (*Brycon siebenthalae*). Memorias Segundo Congreso Colombiano de Acuacultura. p 111-113.

13. Woelders H. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. Proc 2nd International Conference Boar Semen Preservation 1990; p. 145-164.

14. Foote RH, Boucher JH. A comparison of several photoelectric procedures for estimating sperm concentration in dog semen. Am J. Vet 1964; March 25: 105.

15. Cabra MJR, Quintero GGA. Estudio comparativo de la calidad de semen porcino obtenido por electroeyaculación y mano enguantada. Tesis de Zootecnia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia.

16. Sarmiento JE. Conservación de semen canino. Tesis Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia; 1988.

Recibido 01-08-07 y aprobado 21-04-08