

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**“EVALUACIÓN DE SEMEN OVINO MEDIANTE LAS PRUEBAS DE
HEMOCITOMETRÍA, ESPECTROFOTOMETRÍA Y TIEMPO DE REDUCCIÓN DEL
AZUL DE METILENO PARA SU POSTERIOR EMPAJILLADO Y CONGELADO”**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

PRESENTA:

MVZ. LUIS ALEJANDRO TAFOLLA ORTEGA

DIRECTOR DE TESIS

DR. VICTOR MANUEL GONZALEZ VIZCARRA

MEXICALI, B. C., MÉXICO

NOVIEMBRE DEL 2010

Reducción de Azul de Metileno como Prueba de Campo para la Evaluación de Semen Fresco en ovinos. Tesis presentada por Luis Alejandro Tafolla Ortega como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité particular indicado:

Dr. Víctor Manuel González Vizcarra
Director principal
Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias

Dr. Martín Francisco Montaña Gómez
Asesor
Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias

Ph.D Rafael Villa Angulo
Asesor
Facultad de Ingeniería

M.C. Olga Maritza Manriquez Núñez
Asesor
Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias

Mexicali, Baja California
Lugar y Fecha

Noviembre de 2011

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por la vida, por la oportunidad que me da de superarme, además por cada una de las promesas que veo cumplidas al finalizar este trabajo y por multiplicar mis fuerzas cuando estaba cansado.

También a mi Papá, a mi Mamá y a mi hermano, agradezco por sus oraciones y aliento que me motivaron a seguir adelante cuando el camino se veía difícil.

Además agradezco profundamente al Dr. Víctor Manuel González Vizcarra por su invaluable apoyo para la realización de este trabajo, así como por sus consejos y guía, porque mas que un tutor es un amigo.

De antemano doy las gracias al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias por haberme permitido llegar a hacer realidad mi sueño de ser primeramente un Médico Veterinario y de allí permitir superarme en mis estudios realizando un Posgrado. Agradezco a CONACYT por el apoyo y la beca proporcionada para poder adentrarme de lleno a mis estudios.

Así mismo agradezco a mis amigos, compañeros y a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	i
LISTA DE CUADROS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
INTRODUCCION.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	2
<i>Reseña Histórica</i>	2
Definición de Conceptos.....	3
<i>Morfología del Esperma</i>	3
<i>Evaluación y Fertilidad</i>	3
<i>Aspecto y Volumen</i>	4
<i>Motilidad Espermática</i>	4
<i>Concentración Espermática</i>	5
Técnicas de Extracción de semen en Animales domésticos.....	5
<i>Recolección Vaginal</i>	5
<i>Método de la Vagina Artificial</i>	5
<i>Electroeyaculación</i>	6
Técnicas para la Evaluación de la Concentración Espermática.....	6
<i>Análisis Asistido por Computadora</i>	6
<i>Hemocitometria</i>	8
<i>Citometro de Flujo</i>	10
<i>Espectrofotometria</i>	11
<i>Reacciones de Oxido-Reducción</i>	11
<i>Reducción del Azul de Metileno</i>	12
<i>Reducción de Resazurina</i>	13
Materiales y Métodos.....	16
<i>Ubicación y Clima</i>	16
<i>Recolección de Semen</i>	16

CONTENIDO

	Pág.
Evaluación de Semen.....	18
<i>Volumen</i>	18
<i>Color y Olor</i>	19
<i>Motilidad Masal</i>	19
<i>Motilidad Individual</i>	19
Concentración Espermática.....	20
<i>Concentración por Spermacue</i>	21
<i>Técnica de Reducción del Metileno</i>	21
Criterios para la aprobación de una muestra.....	22
Análisis Estadístico.....	22
Resultados y Discusión.....	25
Conclusiones.....	29
Literatura Citada.....	30

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo consistió en la utilización de la prueba de Reducción del Azul de Metileno en la evaluación de muestras de semen fresco de ovino, como un indicador de concentración y vigor espermático del semen en condiciones de campo. Se recolectaron 17 eyaculados de ovinos raza kathadin mediante vagina artificial, las muestras se trasladaron al laboratorio de reproducción del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la UABC, en donde se procedió a analizar cada muestra bajo los siguientes criterios: volumen, concentración, pH, color, olor. Cada muestra se analizó mediante fotometría, hemocitometria y mediante tiempo de reducción del Azul de Metileno al 1% hasta retorno a la leucobase, obteniéndose que el porcentaje de motilidad de 85%, concentración de 2314, 2230 y 3.7 minutos, Error Estándar de 1.3, 224.7, 91.4 y 0.18, un rango de 75 a 95, 1000 a 3500, 1800 a 2850 y 2 a 5, con una confianza del 95% y correlación de 0.87.

Abstrac

The objetive of this study was to test use of Methylene Blue Reduction in the evaluation of samples semen fresh from ram, as an indicator of sperm concentration and sperm vigor under field conditions. 17 ejaculates were collected from ram bred by artificial vagina kathadin, samples were taken to the laboratory reproduction of the institute for research in veterinary science UABC, where we proceeded to analyze each under the following criteria: volume, concentration, pH, color, odor. Each sample was analyzed by photometry, hemocitometer and through reduction time of methylene blue 1% to return to leucobase, obtaining the percentage 85% motility, concentration of 2314, 2230 and 3.7 minutes, standard error of 1.3, 224.7, 91.4 and 0.18, a range of 75-95, 1000-3500, 1800-2850 and 2-5, with a confidence of 95% and correlation of 0.87.

Key Words: Methylene Blue Reduction, Photometry, Hemocitometer.

LISTA DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Valores de las 17 Observaciones	25
Cuadro 2	Valores Ordenados en forma Ascendente por Motilidad	27
Cuadro 3	Mediciones promedio hechas por Spermacue y Hemocitometria, y el tiempo de reducción del Azul de Metileno.	28

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Sujeción de una Hembra en un brete que estimula la monta del semental ..	16
Figura 2. Dispositivo empleado para suplir el uso de la vagina artificial.....	17
Figura 3. Momento de aproximación de semental y monta, asi como la actitud y postura del recolector.....	17
Figura 4. Momento del Eyaculado.....	18
Figura 5. Se muestra el fondo de un preservativo de uso humano, conteniendo el volumen seminal obtenido tras la monta.....	18
Figura 6. Momento de la aspiración mediante una aguja hipodérmica.....	19
Figura 7. Medición del volumen seminal colectado.....	19
Figura 8. Momento de la colocación de una gota de semen completo sobre un porta objetos, para la medición de la motilidad.....	20
Figura 9. Spermacue de Minitub para estimar la concentración espermática.....	21
Figura 10. Valores medidos por el Investigador y el Spermacue, graficados con debido al tiempo de reducción del metileno.....	28

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) ha contribuido en forma importante en la mejora de la genética del ganado bovino durante los últimos 50 años. El semen congelado en pajillas de 0.5 y 0.25 mL han sido aceptadas como las unidades de almacenamiento de transferencia de la genética (Baracaldo et al., 2006). Para tener una inseminación artificial exitosa es de gran importancia obtener una alta fertilidad en el semental de todas las pruebas que se tomen de este. La influencia negativa de los espermatozoides anormales y muertos en la fertilidad es muy común que pase por alto debido a que no se realiza una adecuada evaluación seminal (Graham y Graham, 1990). Las pruebas mas utilizadas por empresas para la evaluación del semen fresco de durante los últimos 10 años están asistidas por computadora, esta prueba consta en la lectura de las características del semen a través de una pequeña cantidad de muestra utilizando el principio de espectrofotometría, aun cuando esta tecnología ofrece ventajas, el equipo es muy caro por lo que muchos veterinarios enfocados al área de reproducción aun siguen utilizando la tradicional prueba del hemocitómetro en donde el conteo se hace por observación directa a través de un microscopio (Tardif et al., 1997). La determinación adecuada de la concentración espermática es critica para la industria de la inseminación artificial debido a que provee de seguridad al productor de que la concentración del semen del semental que será evaluado sea la adecuada para poder procesarlo y utilizarlo para la inseminación artificial (Rodríguez-Martínez, 2000).

Existen varias pruebas utilizadas actualmente para tal fin, mostrando cada una de ellas características propias

Por lo anterior el objetivo del presente trabajo es discutir las diferencias entre las principales pruebas para la evaluación de semen fresco en ovinos.

REVISIÓN DE LITERATURA

Reseña Histórica

La inseminación artificial (IA) es la técnica individual más importante creada para el mejoramiento genético de los animales, debido a que unos pocos machos seleccionados producen suficientes espermatozoides para inseminar miles de hembras al año. En contraste, cada hembra seleccionada puede producir relativamente poca progenie, aun mediante transferencia de embriones. La primera aplicación cuidadosamente documentada de la IA se hizo en 1780, cuando Lázaro Spallanzani, fisiólogo italiano, obtuvo cachorros sabueso pequeño. Otros informes aparecieron en el siglo XIX, pero no fue hasta 1900 cuando comenzaron los estudios extensos con animales domésticos en Rusia y poco después en Japón. El mejoramiento genético logrado por la IA de ganado lechero es el resultado del uso de toros probados en pruebas de progenie. Es deseable la obtención del semen a la edad más temprana posible de los machos con potencial genético valioso para acelerar la identificación de los ejemplares superiores. La IA facilita el cruzamiento requiriendo que solamente una raza sea mantenida en la granja. El desarrollo de la IA en ganado productor de carne ha sido más lento en los Estados Unidos y muchos otros países debido a las dificultades en la detección del estro y la inseminación bajo condiciones extensivas. También es posible lograr un mejoramiento genético considerable para rasgos altamente heredables, empleando toros con comportamiento probado sin IA. (Hafez y Hafez, 2000).

Definición de Conceptos

Morfología del esperma

El espermatozoide o gameto masculino, es una célula especializada, que posee un solo juego del número corriente de cromosomas de la especie. Es una célula terminal, cuyo papel único o principal es el de transportar el genoma paterno hasta el óvulo. Para realizar su función el espermatozoide maduro está equipado con estructuras especializadas como son una membrana plasmática organizada en distintos dominios funcionales, la vaina mitocondrial, el flagelo, el acrosoma y la teca perinuclear que constituye un citoesqueleto único (Soares., 2007).

La célula espermática madura ha sido dividida en tres regiones, la cabeza que consiste de un núcleo condensado, la teca perinuclear y el acrosoma, el cuello que une a la cabeza con el flagelo, el flagelo que contiene el axonema, las mitocondrias y otros elementos estructurales responsables del movimiento de la célula (Soares., 2007).

Evaluación y Fertilidad: Aunque ninguna prueba puede predecir con precisión la fertilidad de una muestra de espermatozoides, el examen de diversas características físicas del semen puede determinar mayor potencial de fertilidad. En general los estándares mínimos para la clasificación de una muestra de semen de toro son las siguientes:

- Mas de 500 millones de espermias por ml.
- Mas de 50% de espermias con movimiento progresivo hacia el frente.
- Mas de 80% de células espermáticas con morfología normal. (Hafez y Hafez., 2000).

Aspecto y Volumen: El semen debe tener aspecto opaco y relativamente uniforme, indicativo de la concentración de células espermáticas. Las muestras translucidas contienen pocos espermatozoides. Los toros pueden producir semen de color amarillo debido a la presencia de riboflavina. Los animales jóvenes y los de menor talla dentro de una especie producen menores volúmenes de semen, la elevada frecuencia de eyaculación reduce el volumen promedio pero esto no es problema a menos que vaya acompañada de una baja concentración (Graham., 2001). El volumen se mide generalmente en el recipiente graduado en que se colecta la muestra, siendo en promedio de 1 mililitro. El volumen eyaculado puede variar también por otros factores como la frecuencia de colección y la habilidad del operador (Díaz et al., 2005).

Motilidad Espermática: La valoración de la motilidad espermática implica la estimación subjetiva de la viabilidad de los espermatozoides y la calidad de la motilidad. Por lo general se utiliza el análisis del espermatozoide con microscopio de luz. La evaluación de la motilidad de los espermatozoides se realiza con semen puro y diluido. Debido a que la motilidad espermática es un extremo susceptible a las condiciones ambientales es necesario proteger el semen de agentes o situaciones perjudiciales antes del análisis. Los parámetros de motilidad incluyen:

- Porcentaje de espermatozoides en movimiento entre un 70 y 90%.
- Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva.
- Velocidad espermática (con base en una escala arbitraria de 0 a 4 (donde cero es estacionaria y 4 motilidad rápida) (Graham., 2001).

Existen muchos factores que afectan la viabilidad de los espermatozoides después de la colección de semen, por lo que deben tomarse cuidados para asegurar que el semen no sea expuesto a condiciones desfavorables durante o después de la colección. Particular atención debe ser puesta en la limpieza de los tubos de colección y el manejo subsiguiente del semen de 30 a 33 grados centígrados (baño maria), especialmente en días fríos. (Nur et al., 2003).

Concentración espermática: La concentración espermática indica la riqueza en espermatozoides del semen, y su cantidad es muy importante tanto como para la fecundación natural como artificial. A sido calculada sobre un milímetro cubico de esperma y varía mucho según la especie animal siendo en el ovino 280,000 espermatozoides por milímetro cubico (Vatti., 1981).

Técnicas de Extracción de Semen en Animales Domésticos

Varios métodos han sido ideados para la recolección de semen en los animales domésticos, pero la mayoría de ellos han sido rechazados a favor del uso de la vagina artificial. Todos los centros de inseminación artificial coinciden en afirmar que esta es la metodología más sencilla, sobre todo en animales de gran talla, sin embargo existen otras alternativas (Hernández y Carrillo., 2005).

Recolección Vaginal: Este es uno de los métodos más antiguos de recolección de semen utilizado en los animales. Consiste en la extracción de semen desde el interior de la vagina luego de un servicio natural y utilizando como ayuda espátulas, cucharas, jeringas, etc. Es útil solo como método para evaluar una muestra de semen, pero de ninguna manera sirve en el procesamiento de semen a gran escala para la inseminación artificial. Solo una pequeña proporción del eyaculado es recuperada y se encuentra mezclado con secreciones vaginales, que como es sabido, son desfavorables para la supervivencia de los espermatozoides (Mellisho y Gallegos., 2006).

Método de Vagina Artificial: Éste es un método universalmente utilizado en la mayoría de las especies animales domésticas, aunque en el ganado bovino no es de rutina en la mayor parte de los establecimientos ganaderos sino que es casi exclusivo de los centros de inseminación artificial, ocurriendo lo mismo en los equinos. Mediante esta técnica el macho que eyacula desarrolla totalmente la cadena de reflejos y la mecánica del coito fisiológico, aunque no exista penetración

ni eyaculación en la vagina de una hembra. Los machos seleccionados para la recolección de semen mediante el uso de una vagina artificial deben ser mansos, poseer bozal y ser entrenados con mocheta. El animal de monta debe estar sujeto en un brete angosto por los lados, y aquellos que no estén familiarizados con la VA pueden requerir la presencia de una hembra en celo. Como alternativa, una hembra sedada (xilacina, 0,03 mg/kg) sujeta en el brete de monta puede facilitar la colección. Básicamente la vagina artificial es preparada llenando la camisa interna con agua lo suficientemente caliente para resultar en una temperatura final de 42-50 grados centígrados. Se puede agregar aire para incrementar la presión de la vagina. Finalmente ésta es lubricada con gel estéril no espermicida (Hernández y Carrillo., 2005).

Método de Electro eyaculación: Esta técnica permite extraer semen a los animales sin previo acostumbramiento. Esto es de suma importancia para la evaluación de reproductores a campo, donde la colección de semen se puede realizar en la manga en el mismo momento del examen clínico. Además, es muy utilizada cuando se trabaja con animales no domésticos, sino de vida silvestre o de zoológicos. Fue utilizada primeramente por Gunn (1936) en Australia. Está basada en la aplicación rítmica de un estímulo eléctrico por vía transrectal estimulando el sistema nervioso autónomo y somático, que conduce a la obtención de secreciones de las glándulas accesorias y finalmente a la eyaculación. Existen diferencias en cuanto al modo de operar y en cómo los animales responden a distintos tipos de electroeyaculadores. La elección de éstos es una cuestión de preferencia personal (Mellisho y Gallegos., 2006).

Técnicas utilizadas para la evaluación de la Concentración Espermática

Análisis seminal asistido por computadora (CASA)

En el siglo veinte, los científicos empezaron a investigar las relaciones que existían entre los parámetros seminales y la fertilidad del animal. Sin embargo, la variabilidad de los parámetros seminales debe entenderse antes de hacer una

referencia a estas relaciones. Es bien reconocido que la concentración espermática puede variar considerablemente entre los individuos. El desarrollo del análisis espermático asistido por computadora (CASA por sus siglas en inglés) comenzó a principio de los años 80 y de allí hasta la actualidad es una de las pruebas más utilizadas por las grandes empresas que hacen manejo de semen. Los primeros intentos por objetivizar el movimiento espermático se basaron en exposiciones fotográficas múltiples o video monografías, pero estas eran pruebas muy tediosas. Sin embargo la aparición de los sistemas informatizados de digitalización de imágenes abrió un nuevo campo en el estudio de la motilidad de los espermatozoides. Los parámetros que determina CASA son las trayectorias que realizan la cabeza del espermatozoide, la velocidad de sus recorridos y la frecuencia de cambios de dirección que efectuó. (Wijchman et al., 2001).

Este tipo de prueba para la evaluación de semen representa grandes ventajas debido a que eliminó por completo la evaluación rutinaria de semen la cual era subjetiva produciendo así ciertos errores y además brindó análisis de movimiento muy detallados que no podían ser vistos o realizados por la examinación visual. Este tipo de sistema automatizado se basa en la captura sucesiva de espermatozoides en movimiento provenientes de un microscopio. Estas imágenes se digitalizan identificando las células espermáticas que contiene la primera imagen. De allí se procede al seguimiento de estas células en imágenes sucesivas y al establecimiento de trayectorias bien dirigidas (Brogliatti et al., 2004).

Tardif et al., (1998), comentó que CASA se ha utilizado para evaluar el semen ya sea fresco o congelado de diferentes especies y se ha observado que cuando el semen contiene partículas (por ejemplo por infección) o contiene debris los resultados de CASA pueden ser incorrectos o es imposible la evaluación, por lo que hay que retirarlas y reevaluar el semen. El desarrollo de CASA la medición de las diferentes características seminales de una manera rápida, objetiva y con un número adecuado de espermatozoides para proveer resultados muy sensibles.

Se compararon 2 pruebas para determinar calidad espermática en toros, estas pruebas fueron hematocimetría y análisis espermático asistido por computadora (CASA). Se utilizaron 7 muestras de semen la técnica del hemocitómetro mostró motilidad espermática del 69%, mientras que la técnica de CASA mostró una motilidad del 81% mostrando así su eficacia. (Amann y Hammerstedt., 1980).

2 experimentos fueron realizados para evaluar la calidad seminal de toros estabulados bajo condiciones climáticas controladas con resultados esperados para conocer fertilidad en ellos. El primer experimento se realizó tomando muestras de semen de 6 toros con 6 años de edad, 2 muestras al día con intervalos de 3 a 4 días. En el experimento 2 se realizó la prueba en 11 toros con un promedio de edad entre los 6 y 11 años. CASA fue utilizado en 36 primeros y segundos eyaculados en el experimento 1 y en 44 primeros eyaculados en el experimento 2. 16 campos (2 cámaras con 8 campos cada una) fueron examinados por prueba. En el experimento 1 la correlación entre la concentración estimada por espectrofotometría y CASA fue de 0.91 ($P < 0.01$). Entre los toros el rango en el porcentaje de motilidad espermática fue de 52 a 82 para CASA contra 62 a 69 de medidas subjetivas realizadas por técnicos experimentados, sin embargo CASA con una gran repetibilidad, provee un estimado más discriminativo en el porcentaje de células espermáticas motiles que la evaluación subjetiva. (Tardif et al., 1998).

Hemocimetría

Determinar la concentración de un eyaculado es uno de los pasos más importantes en la evaluación seminal debido a que de ella depende la tasa de dilución a utilizar para el proceso de almacenamiento, sin embargo es uno de los pasos que más se pasa por alto. La concentración se puede calcular mediante pruebas basadas en consistencia o apariencia del semen, usando el hemocitómetro, espectrofotómetro o por medio de citometría de flujo, pero para el

campo el hemocitometro es el mas utilizado desde hace mucho tiempo, es lento pero muy preciso. (Macpherson., 2001).

El hemocitometro es utilizado comúnmente para el conteo de células blancas o rojas y consta de una cámara y un cubreobjetos especial que viene con el hemocitometro, no es posible utilizar uno para microscopio. También consta de una pipeta capilar de volumen exacto. Para realizar el conteo espermático se requiere que tanto la cámara como el cubreobjetos estén perfectamente limpios y libres de grasa. Lo primero que hay que realizar después de tomada la muestra es llenar la pipeta de semen hasta la marca calibrada con 0.5 y seguidamente aspirar sin formación de burbujas el reactivo de Hayem hasta la marca 101, mas sin embargo se busca utilizar diluyentes no tan contaminantes, por lo que es recomendable utilizar la solución de Kolmer (Baracaldo et al., 2006).

Se toma la pipeta entre el pulgar y un dedo colocando el dedo índice en su extremo superior para cerrarla y se desechan 2 o 3 gotas de liquido no mezclado que se encuentran en el capilar graduado de la pipeta, se coloca la punta de la pipeta en la hendidura que separa el borde del cubreobjetos de la cámara, dejando que el liquido llene por capilaridad la totalidad de la misma, no debe permitirse que el liquido fluya por las juntas que circundan el área elevada. Se coloca la cámara sobre la platina del microscopio, el conteo de los espermatozoides se lleva a cabo en el área central finamente graduada de la cámara. Se cuentan los cuadros secundarios de las esquinas y el cuadro central, la suma de los espermatozoides contados en los 5 cuadros pequeños multiplicada por 10 000 nos da la cifra total. (Knox., 2004).

Sugulle et al., 2006. Realizaron un estudio en 5 toros donde determinaron la concentración espermática de estos por medio de hemacitometría. El semen fue diluido con agua destilada en una concentración de 1:200. Se utilizo eosina-nigrosina para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos. 2 de los toros presentaron concentraciones bajas (1607+-50 millones y 983 +- 104

respectivamente) mientras que otros 2 mostraron concentraciones mayores (1333 +-104 y 1483 +-236 millones respectivamente). En general en los 5 toros la morfología de la cabeza del espermatozoide fue buena (90.5 a un 97.9%) y el porcentaje de vivos también fue elevado (80.6 a 89.5%).

Citometria de Flujo

Otra forma de determinar concentración espermática es por medio de citometria de flujo, se puede decir que esta técnica para la evaluación de la concentración espermática en cualquier animal domestico es muy reciente, se habla de unos 15 años atrás. La combinación de una técnica de fluorescencia unida a citometria de flujo nos permite evaluar miles de células espermáticas por muestra y brinda de una precisión mucho más alta que las conseguidas por el análisis por computadora (CASA). Este sistema automático es fácil de utilizar y no se requiere de alguien experto para realizar el análisis. (Christensen et al., 2005).

Takacs et al., describió el conteo espermático utilizando una técnica de esparcimiento de luz en el citómetro de flujo. describió un método que involucra semen teñido diluido con el ADN fluorescente con el tinte Hoescht 33258, esta técnica es de interés pero muchas otras células pueden llegar a presentar mayor sensibilidad que el espermatozoide a esta prueba, lo cual puede causar un error altamente significativo en la estimación del número de espermatozoides.

En un estudio realizado se compararon las pruebas de hemacitometria y citometria de flujo para determinar concentración espermática de semen bovino mostrando una concentración de 2450 (+-.1378) x 10 a la 5 y 2399 (+-.0969) x 10 a la 5 respectivamente. Los resultados muestran que la concentración determinada por las pruebas es muy parecida, mas sin embargo, la técnica de citometria de flujo es mucho más rápida y no es tan subjetiva como la técnica de hematocitometría. (Evenson et al., 1992).

La evaluación de la concentración espermática por medio de citometria de flujo se ha tratado de manejar de una forma rápida debido a la necesidad de tener una respuesta rápida, sensitiva, objetiva, y conseguir medidas múltipara métricas sobre el potencial de fertilidad en el semen. En los últimos años la técnica de citometria de flujo a alcanzado un nivel alto que le permite ser incluida en la lista de métodos disponibles y rutinarios para el estudio de la capacidad reproductiva. Esta técnica permitiendo un análisis rápido de las características biofísicas y bioquímicas, pueden representar una herramienta ideal para dichos propósitos. (Ferrara et al., 1997).

La evaluación microscópica permite una observación directa a dominios de membrana de espermatozoides, sin embargo la citometria de flujo se encuentra basada en un análisis cuantitativo de eventos (células) que emiten ciertas ondas de luz después de haber sido excitados por medio de un láser. Esta técnica a probado tener una gran ventaja sobre la evaluación microscópica, permitiendo la examinación de miles de células espermáticas en un periodo de tiempo mas corto que el utilizado para microscopia. (Januskauskas y Zilinkas, 2002).

Espectrofotometría

La técnica de Espectrofotometria es una prueba que ha sido utilizada últimamente al igual que citometria de flujo ya que es una prueba que nos brinda de resultados de una manera muy rápida y mucho más eficaz que el hemacitómetro. En un estudio realizado en 25 eyaculados de toro se encontró que el hemacitometro nos daba una motilidad entre un 62 a 69%, mientras que espectrofotometria nos mostraba una motilidad del 82% siendo mas eficiente. (Farell et al., 1988).

Reacciones de Oxido-Reducción

Este tipo de reacciones también conocidas como Redox, son las reacciones de transferencias de electrones. Esta transferencia se produce entre un conjunto de elementos químicos, uno oxidante y uno reductor. Para que exista una reacción

Redox, en el sistema debe haber un elemento que ceda electrones y otro que los acepte, el agente reductor es aquel elemento químico que suministra electrones de su estructura química al medio, aumentando su estado de oxidación, es decir oxidándose, y el agente oxidante es el elemento químico que tiende a captar esos electrones, quedando en un estado de oxidación inferior al que tenía. Se debe tener en cuenta que en realidad una oxidación o una reducción en un proceso por el cual cambia el estado de oxidación de un compuesto. Este cambio no significa necesariamente un intercambio de electrones (De Jong et al., 1995)

Reducción del Azul de Metileno

El azul de metileno se conocía en la biología de la célula desde muchos años atrás pero fue hasta 1942 cuando Sorensen lo utilizó para evaluar la calidad espermática. Durante los procesos de respiración del esperma, gracias a la presencia de los sistemas enzimáticos (deshidrogenasas) se libera el hidrógeno que puede reducir a su aceptor, representado en este caso por el azul de metileno, a una leucobase sin color. La duración del proceso de decoloración depende de la intensidad del metabolismo y densidad del semen y se encuentra influida también por varios factores internos y ambientales, de estos últimos, la temperatura, pH, situación osmótica, concentración del azul de metileno, etc. Teniendo en cuenta que el nivel del metabolismo de los espermias es más o menos constante, es posible según el tiempo de la decoloración, en condiciones ambientales constantes, no solamente evaluar la actividad sino también la densidad y desde luego la fertilidad. La metodología consiste en un cristal de reloj se vierten 0.2 mL de semen fresco y 0.2 mL de azul de metileno al 0.1%, se mezcla cuidadosamente agitando el cristal y el semen coloreado se aspira mediante una pipeta capilar (Pasteur) y se tapan ambos extremos con plastilina o parafina, la pipeta con la columna de semen se coloca en baño maría a 40 grados centígrados y se anota el tiempo de decoloración que varía entre 2 a 20 minutos dependiendo la concentración y actividad de las células espermáticas. Existe una correlación positiva entre el tiempo de la

decoloración y la fertilidad, y el semen utilizado en la inseminación artificial debe reducir el azul de metileno durante 3 a 10 minutos. (Lubus Holy, 1983).

La prueba de reducción del MTT depende en la habilidad de las células metabólicamente activas para reducir la sal de tetrazolio a formazan. Se realizó un estudio para examinar y validar de una prueba simple y barata de MTT para determinar la viabilidad del esperma equino y comparar su eficiencia con la prueba de citometría de flujo. El semen fue diluido a 100 millones de células/mL, los rangos de reducción de MTT fueron medidos en platos microtiteros después de una incubación de 1 y 4 horas a 37 grados centígrados usando espectrofotometría con ondas de 550 nanómetros. Simultáneamente muestras del mismo semen fueron evaluados usando citometría de flujo para actividad mitocondrial, viabilidad espermática e integridad acrosomal. Los resultados mostraron una correlación fuerte ($P < 0.001$) entre los resultados de MTT y los resultados para actividad mitocondrial ($r = 0.978, 0.977$), viabilidad espermática ($r = 0.954, 0.977$) e integridad acrosomal ($r = 0.867, 0.886$) mostrando que MTT es una prueba eficaz para determinar viabilidad espermática especialmente en análisis de rutina, donde el tiempo y el costo son importantes. (Aziz et al., 2005).

Otro estudio sobre la reducción de MTT comparado con citometría de flujo demostraron que existía una correlación muy fuerte entre estas 2 pruebas ($P = 0.001$) dando unos coeficientes de correlación de $r = 0.950$ para viabilidad espermática, en actividad mitocondrial $r = 0.926$ y en integridad acrosomal una $r = 0.959$. (Aziz, 2006).

Reducción de Resazurina

Un aceptor semejante al azul de metileno durante el proceso del metabolismo de los espermatozoides es la resazurina. Este colorante cambia por la actividad del hidrogeno su color de azul a rosado (resorrufina) y por fin pierde el color rosado, formándose hidrorresorrufina. La metodología para esta prueba comienza mezclando en un pequeño tubo de ensayo 0.2 mL de solución de resazurina (11mg

de resazurina en 200 mL de agua destilada), la mezcla se cubre con una capa de aceite de parafina y se incuba a 45 grados centígrados. En el semen de buena calidad aparece el color rosado en un minuto y la decoloración se realiza después de 4 minutos o más. (Lubos Holy, 1983).

La prueba de resazurina fue utilizada en pruebas de semen obtenido de 75 y 10 toros subfértiles y fértiles respectivamente. Los resultados fueron comparados con otros parámetros espermáticos para identificar la calidad del semen. La correlación mas alta de la prueba de resazurina fue con motilidad espermática ($r=0.90$, $P<0.001$), viabilidad espermática ($r=0.80$, $P<0.001$) y concentración espermática ($r=0.71$, $P<0.001$). La prueba mostró un valor predictivo positivo de 93.75% en motilidad espermática progresiva en una concentración de $> 20 \times 10^6$ mL. (Reddy et al., 1997).

Fuse et al., 1993 realizaron un estudio sobre la prueba de reducción de resazurina en muestras de semen de 83 toros infértiles no tratados y 9 toros que han sido confirmados como fértiles, los resultados fueron comparados con otros parámetros espermáticos. Las correlaciones mas altas obtenidas con la prueba de resazurina fueron encontrados para concentración motil espermática ($r=0.65$, $P<0.001$), porcentaje de motilidad ($r=0.58$, $P<0.01$) y porcentaje de espermatozoides aumentados de tamaño ($r=0.57$, $P<0.01$). Hubo también correlación pero muy baja por parte de resazurina en concentración y motilidad lineal.

La reducción de rasazurina se utilizo en muestras de semen obtenidas de 225 toros subfértiles y 10 toros fértiles. Los resultados de resazurina fueron determinados visualmente una cámara colorante de resazurina y la extensión de la reducción de resazurina en cada muestra fue leída adicionalmente por pruebas de espectrofotometría para evaluar la calidad de las muestras. Los niveles mas altos de correlación de resazurina fueron observados en motilidad espermática ($r=0.889$, $P<0.001$), seguida de concentración espermática ($r=0.848$, $P<0.001$), morfología

($r=0.660$, $P<0.001$) y viabilidad espermática ($r=0.544$, $P<0.01$), mostrando que es un método simple y de confianza que otras pruebas de análisis seminal rutinarias. (Reddy y Bordekar, 1999).

Ya que se tienen las muestras y han sido evaluadas por cualquiera de estas pruebas, el semen es procesado y congelado por medio de nitrógeno primero con el vapor durante 12 minutos y después en el nitrógeno líquido a -196°C . Después se sacan se evalúan y se meten en el termo con nitrógeno líquido. (Cormier et al., 1997).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y clima

Este experimento fue conducido durante los meses de marzo a septiembre del año 2008, con temperaturas que oscilan entre los 5 °c min. y 30 °c máx. y precipitación pluvial promedio de 0.775 cm,(Centro de clima UABC) en la posta de ovinos del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California, ubicada en el kilómetro 3.5 en el margen derecho de la carretera Mexicali – San Felipe, en domicilio conocido del fraccionamiento campestre de la ciudad de Mexicali Baja California.

Recolección de semen

Los machos fueron seleccionados fueron entrenados para saltar en vagina artificial en presencia de un operador. Para el entrenamiento se contó con una hembra en celo. El mismo se indujo por una inyección intramuscular de valerato de estradiol. Las hembras tratadas presentaron celo 48 horas después de la aplicación, siendo necesaria la aplicación día por medio para mantenimiento de la inducción. Fue aconsejable seleccionar una oveja de temperamento tranquilo para facilitar el entrenamiento.



Ilustración 1. Sujecion de una hembra en un brete que estimula la monta del semental

La colección del semen se realizó en las horas más frescas de la mañana, por medio de una vagina artificial de acuerdo a lo descrito por Hernández y Carrillo

(2005) y Mellisho y Gallegos (2006), con modificaciones que consisten en la utilización de condones de uso humano previamente lavados, esto con la finalidad de eliminar el espermicida que contienen, a su vez se montan a una perilla que su función es mantener abierta la entrada del condón, para facilitar la entrada del pene al mismo, recolectado el semen se procede a desmontar el condón y se deposita en un recipiente térmico de boca ancha a 37°C. Se obtuvieron dos eyaculados por cada semental en cada sesión por extracción.

Inmediatamente después de obtener el eyaculado se procedió a su evaluación tanto macroscópica y microscópica, con el propósito de determinar la calidad del eyaculado para su posterior dilución y congelado.



Ilustración 2 Dispositivo empleado para suplir el uso de la vagina artificial



Ilustración 3 Momento de aproximación del semental y monta, así como la actitud y postura del recolector.



Ilustración 4 Momento del eyaculado



Ilustración 5 Se muestra en el fondo de un preservativo de uso humano, conteniendo el volumen seminal obtenido tras la monta.

Evaluación de semen

Una vez obtenida la muestra se llevó al laboratorio y se mantuvo en un baño maría (37° C) durante su evaluación, la cual se efectuó de la manera siguiente:

Volumen: Se determinó por la observación directa de la escala de una jeringa hipodérmica graduada, la cual recibió la muestra de semen tras la succión mediante la aguja hipodérmica, como se muestra en la ilustración seis y siete.



Ilustración 6 Momento de la aspiración de la muestra mediante una aguja hipodérmica



Ilustración 7 Medición del volumen seminal colectado.

Color y olor: Se efectuó por apreciación visual y olfativa del eyaculado inmediatamente después de recolectar la muestra.

Motilidad masal: La evaluación se realizó por la observación al microscopio (100x) de una gota de semen puro sobre un portaobjetos, el cual se encontraba encima de una plancha térmica con una temperatura de 37° C. La motilidad se determinó observando la intensidad y velocidad de los remolinos que se formaron. La escala de calificación que se uso es de 0 a 5 (Evans y Maxwell, 1990).

Motilidad individual: Para realizar esta evaluación se tomó una gota de semen y se diluyó en una gota de solución de citrato de sodio al 3% previamente atemperado en el baño María, y se colocó entre el portaobjetos y el cubreobjetos,

los cuales se encontraban sobre una plancha térmica a 37° C. Una vez colocada la gota se observó a través del microscopio óptico (400x). Se estimó el porcentaje de los espermatozoides que presentaban un movimiento rectilíneo progresivo, y la escala de calificación que se utilizó fue de 0 a 100%.



Ilustración 8 Momento de colocación de una gota de semen completo sobre un portaobjetos para la estimación de la motilidad.

Concentración Espermática

La cuantificación de espermatozoides por mililitro de semen se realizó con una cámara de Neubauer. Primero se realizó, con una micropipeta, una dilución del semen 1:400 en solución salina fisiológica; con ayuda de una pipeta Pasteur, se tomó una gota de esta dilución y se colocó en cada sección de la cámara de Neubauer. Cada una de las dos secciones de la cámara posee una rejilla formada de cinco cuadros por lado (un total de 25 cuadros), cada uno de los cuales, a su vez, está dividido en 16 cuadros más pequeños. Se contaron los espermatozoides que se encontraban en los 4 cuadros de las esquinas y en el cuadro central de la rejilla de 25 cuadros. Los espermatozoides que se hallaban sobre los bordes derecho e inferior de cada cuadro no se contabilizaron.

Para el cálculo de la concentración de espermatozoides en el semen evaluado se contaron las dos secciones de la cámara de Neubauer y se obtuvo un

promedio de las dos; este número se multiplicó por 20000 (considerando el volumen, la superficie y profundidad de la cuadrícula), lo que daba el número de espermatozoides en 1mm^3 . Este valor se multiplicó por 1000 para obtener la concentración por mL y luego por el volumen obtenido para tener el número de espermatozoides por eyaculado (López-Valdez y Mellado-Bosque, 2001).



Ilustración 9 Spermacue de Minitub usado para estimar la concentración espermática.

Concentración por Spermacue de Minitub: Esta técnica consistió mediante la colocación de una gota de semen fresco en la cámara del fotómetro y esperar que se hiciera la lectura dando este automáticamente la concentración espermática.

Técnica de Reducción del Azul de Metileno: Para la realización del azul de metileno se mezclaron 100 gramos de azul de metileno en 1 litro de agua destilada, para comprobar que esta solución funcionaba se mezcló una gota de azul de metileno, con una gota de agua de canal, formándose una leucobase a los 2 minutos de haberse mezclado. Durante el experimento se creó un dispositivo en una hielera chica en la cual se introdujo un galón en el cual se colocaría el agua a temperatura de entre 38 y 39 grados centígrados la cual fue medida constantemente por medio de un termómetro. Ya que la concentración espermática

había sido obtenida por medio de hemocitometria y espectrofotometría, se continuó a la evaluación de reducción de azul de metileno, del eyaculado ya obtenido se tomaron 0.2 ml de semen ovino y 0.2 ml de azul de metileno, se mezclaron en un portaobjetos para luego ser introducidos en una pipeta de Pasteur (Pipeta Capilar), sellando las orillas con plastilina, colocándolas después dentro de la hielera en la cual se simula un baño maria y cronometrando el tiempo para verificar con exactitud cuándo dicha muestra haya pasado a ser una leucobase.

Criterios para la aprobación de una muestra

Una muestra se consideró como apta para su procesamiento cuando cumplió con los siguientes criterios: color blanco lechoso, volumen de 0.5 a 2.0 ml, concentración espermática superior a 2×10^9 espermatozoides por ml, motilidad espermática mínima de 70%, y un 80% de espermatozoides morfológicamente normales y un tiempo de reducción del Azul de metileno de 0 a 4 minutos.

Análisis Estadístico

Para saber si las mediciones por inspección visual son iguales a las mediciones hechas de forma automática (medición del aparato), debemos hacer un análisis estadístico de muestras capturadas con ambas técnicas. La medida de igualdad se realizó una prueba estadística prueba t para verificar la igualdad de las medias de dos muestras independientes. Esta prueba t existe en dos variantes, una es utilizada cuando las varianzas de ambas muestras son iguales, y la otra cuando son distintas. De esto que, nuestro primer paso fue verificar si las varianzas de nuestras muestras son iguales. Esto lo hacemos utilizando una prueba estadística llamada F para verificar la igualdad de las varianzas de dos muestras independientes. Dependiendo del resultado de la prueba de varianzas, será la variante de la prueba t que nos ayudara a decidir si las medias son iguales o no. Las pruebas se realizaron mediante un programa de computadora llamado R.

Prueba estadística F para verificar la igualdad de las varianzas de dos muestras independientes

La hipótesis que debemos probar es: $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ versus $H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$ con un nivel de significancia α . Donde, α corresponde es la probabilidad de rechazar H_0 dado que H_0 es verdad. Es un valor que asignamos para garantizar la precisión de nuestros resultados.

1. Calcular el valor $F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$, donde S_1^2 es la varianza de la muestra 1 y S_2^2 es la varianza de la muestra 2.

2. Si $F > F_{n_1-1, n_2-1, 1-\frac{\alpha}{2}}$ o $F < F_{n_1-1, n_2-1, \frac{\alpha}{2}}$, entonces las varianzas son distintas.

Si $F_{n_1-1, n_2-1, \frac{\alpha}{2}} \leq F \leq F_{n_1-1, n_2-1, 1-\frac{\alpha}{2}}$, entonces las varianzas son iguales.

donde $F_{n_1-1, n_2-1, \frac{\alpha}{2}}$ es el $\frac{\alpha}{2}$ th percentil de una distribución F con grados de libertad n_1-1 y n_2-1 .

1.

Prueba estadística T para verificar la igualdad de las medias de dos muestras independientes, con varianza distinta

La hipótesis que debemos probar es $H_0: \mu_1 = \mu_2$ versus $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ con un nivel de significancia α .

1. Calcular el valor $t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$

Donde, \bar{x}_1 y \bar{x}_2 son las medias, S_1^2 y S_2^2 son las varianzas y n_1 y n_2 los tamaños de nuestras muestras

2. Calcular el grado de libertad aproximado d' , donde:

$$d' = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{(n_1-1)} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{(n_2-1)}}$$

3. Redondear d' al entero inferior d''

Si $t > t_{d'', 1-\frac{\alpha}{2}}$ o $t < -t_{d'', 1-\frac{\alpha}{2}}$, entonces las medias no son iguales.

Si $-t_{d'', 1-\frac{\alpha}{2}} \leq t \leq t_{d'', 1-\frac{\alpha}{2}}$, entonces las medias son iguales.

Donde, $t_{d'', 1-\frac{\alpha}{2}}$ es el $\frac{\alpha}{2}$ th percentil de una distribución de *Student* con d'' grados de libertad.

Calculo del coeficiente de correlación

La correlación entre los vectores de las distintas mediciones es obtenida utilizando al coeficiente de correlación de Pearson, cuya fórmula es la siguiente:

$$r_{x,y} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{(n-1)S_x S_y}$$

Donde \bar{x} y \bar{y} son las medias de los vectores x y y , S_x y S_y son las desviaciones estándar de x y y .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Se realizaron 17 mediciones con ambas técnicas. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Porcentaje de Motilidad	Medición del Spermacue	Medición por Hemocitometría	Tiempo de Decoloración
80	3195	2850	2
85	2758	2500	3
90	3200	2500	3
95	2800	2560	3
85	3400	2580	3
80	3200	2650	3
80	1191	1900	4
90	1198	1850	4
90	1000	1800	4
75	1233	1860	4
90	1254	1950	4
90	1251	1900	4
85	2500	1950	4
80	3500	2750	4
85	2800	2450	4
90	2890	1980	5
90	1980	1890	5

Tabla 1 Valores de 17 muestras

2.- Se introdujeron al programa R dos vectores de datos, un vector x con los 17 valores de las mediciones hechas con el Spermacue, y un vector y con las mediciones hechas por el investigador (Hemocitometria).

3.- Para probar la igualdad de las varianzas se utilizó una función ya implementada en R, que ejecuta la prueba F . La manera de interpretar los resultados es de la siguiente manera:

Si $p > 0.05$ las varianzas son iguales,

Si $0.05 > p > 0.01$ las varianzas son significativamente distintas,

Si $0.01 > p > 0.001$ las varianzas son altamente distintas,

Si $p < 0.001$ las varianzas son extremadamente distintas.

Para probar si había igualdad de varianzas utilizando la prueba F , se obtuvo un resultado de $p = 0.0008377$, el cual nos muestra que las varianzas son extremadamente distintas.

Para verificar la igualdad de las medias se utilizó la prueba t que verifica la igualdad de las medias para dos muestras independientes con varianza distinta. Dado que las varianzas fueron distintas se utilizó la variante de la prueba t que verifica la igualdad de las medias para dos muestras independientes. El resultado de $p = 0.7322$ nos muestra que las medias de ambas muestras son estadísticamente iguales, por lo que podemos concluir que tanto espectrofotometría y hemocitometría arrojan los mismos resultados en sus mediciones. En términos prácticos, los resultados de las mediciones hechas por el investigador son iguales que las mediciones hechas por el espectrofotómetro.

Análisis de correlación entre motilidad y tiempo de reducción del Azul de Metileno.

Para verificar si existe una relación predictiva, o dependencia, entre la motilidad y la decoloración, podemos calcular su índice de correlación. Esto nos ayudara a comprobar, dada la muestra, si existe señal de dependencia entre estas dos variables. Para esto se utilizó el programa R, el cual implementa el coeficiente de correlación de Pearson. En R, se capturaron los dos vectores de información de motilidad y tiempo de decoloración, ordenado de forma ascendente los valores de motilidad, esto se muestra en la siguiente tabla:

Porcentaje de Motilidad	Tiempo de Reducción
80	2
85	3
90	3
95	3
85	3
80	3
80	4
90	4
90	4
75	4
90	4
90	4
85	4
80	4
85	4
90	5
90	5

Tabla 2 Valores ordenados en forma ascendente por motilidad.

Se introdujeron al programa R los dos vectores con los nombres de motilidad y decoloración, respectivamente. El cálculo de correlación se realizó como sigue: En R: > cor (motilidad, decoloración). El resultado para la correlación entre motilidad y tiempo de decoloración arrojó un valor de $p= 0.2172$, este resultado sobre la muestra, significa que hay muy poca correlación entre la motilidad y el tiempo de reducción del azul de metileno, esto nos indica que aunque el semen ovino tenga una muy buena motilidad, puede que tenga muy poca concentración o muy poco vigor.

Para ver de forma gráfica el comportamiento de los valores medidos por el investigador y por espectrofotometría, se obtuvo una gráfica de los valores medidos con respecto al tiempo de decoloración. Para cada valor de tiempo de decoloración, se obtuvo el promedio de todas las mediciones que se hicieron, cuyo tiempo de decoloración fue igual. La siguiente tabla muestra los valores promedio de las mediciones y los tiempos de decoloración. La figura 10 muestra la gráfica de comportamiento de ambas mediciones.

Tiempo de Decoloración	Medición promedio de Spermacue	Medición por Hemocitometria
2	3195	2850
3	3071.6	2558
4	1769.66	2045.55
5	2435	1935

Tabla 3 Mediciones promedio hechas por Spermacue y Hemocitometria, y el tiempo de reducción del Azul de Metileno.

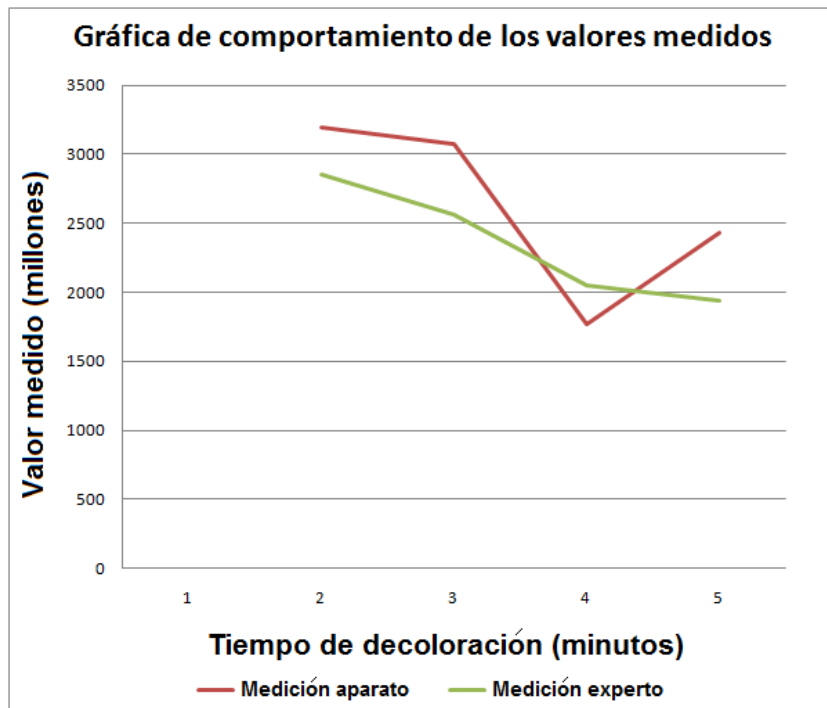


Figura 10. Valores medidos por el aparato y por el experto, graficados con respecto al tiempo de decoloración

CONCLUSIONES

Sin duda alguna una de las mediciones más importantes en la evaluación del semen de cualquier especie es la concentración espermática y el vigor que tenga este. Se observó que existen diferentes métodos que son completamente confiables, sin embargo no todos están al alcance ya sea debido a los precios elevados de o que son de tecnología que no se puede utilizar en campo. Los tres métodos evaluados en este trabajo son de los pocos que se pueden utilizar para una evaluación de campo y el objetivo es demostrar que la técnica de reducción del azul de metileno es una prueba confiable y sobre todo que es una técnica que se encuentra al alcance para todo especialista en reproducción y que no se requiere de una suma de dinero alta, como en un spermacue y que es mucho más rápida que la evaluación por hemocitometría. Observando los resultados obtenidos en este estudio nos muestra que la leucobase es más rápida cuando la concentración es elevada, sin embargo hubo veces que la concentración era alta sin embargo el tiempo de reducción también, esto nos habla que el vigor espermático era bajo, en cambio hubo ocasiones en que la concentración era baja y aun así la reducción a una leucobase se manifestaba en un tiempo de dos o tres minutos, mostrando un vigor espermático elevado. En este trabajo queda demostrado que la evaluación seminal es de suma importancia realizarla debiendo ser de rutina diaria antes del congelamiento, post congelamiento y sobre todo antes de la inseminación de una hembra, ya que comúnmente cometemos el error de creer que la causa de ausencia de preñez es debido a un problema reproductivo de la hembra, cuando gran porcentaje del tiempo podría ser un pésimo semen empajillado.

LITERATURA CITADA

- Amann R.P. and R.H. Hammerstedt. 1980. Validation of a System for Computerized Measurements of Spermatozoal Velocity and Percentage of Motile Sperm. *J Biol. Reprod.* 23:647-656.
- Aziz D.M., L. Ahiswede and H. Enbergs. 2005. Application of MTT reduction assay to evaluate Equine sperm viability. *J. Of Theriogenology*, Vol. 64 (6):1350-1356
- Aziz D.M. 2006. Assesment of bovine sperm viability by MTT reduction assay. *J. Of Theriogenology*, Vol. 92 (1):1-8
- Baracaldo M.I., A.D. Barth and W. Bertrand. 2006. Steps for Freezing Bovine Semen: Fron Semen Collection to the Liquid Nitrogen Tank. *J. IVIS.* 5:1-10.
- Brogliatti G., F. García Migliaro, R. Cavia, G. Larraburu and A. Albrecht. 2004. 12 CASA parameters of fresh bull semen collected by artificial vagina or electroejaculation in Argentina. *J. of Reproduction, Fertility and Development.* Vol. 17 (2):156-159.
- Christensen P., D. Boelling, K. M. Pedersen, I.R. Korsgaard and J. Jensen. 2005. Relationship Between Sperm Viability as Determined by Flow Citometry and Nonreturn rate of Dairy Bulls. *J. Androl.* 26:98-106.
- Cormier N., M. A. Sirard and J.L. Bailey. 1997. Premature Capacitation of Bovine Spermatozoa Is Initiated by Criopreservation. *J. of Androl.* 18:461-468.
- Diaz-Güemez, R. P., M. Figueroa-Gómez y P. Mejia-Gutierrez. 2005. Memorias de Congelacion de semen. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia de la Univercidad Nacional Autonoma de Mexico.
- Evans, G. y W.M. Maxwell.1990. Salamons Artificial Insemination of Sheep and Goats. 5:613-638.
- Evenson D.P., J.E. Parks, M.T. Kaproth and L.K. Jost. 1992. Rapid Determination on Sperm Cell Concentration in Bovine Semen by Flow Citometry. *J. Dairy Sci* 76:86- 94.

- De Jong, O., J. Acampo, A. Verdonk. 1995. Problems in teaching the Topic of Redox Reactions: Actions and Conceptions of Chemistry Teachers, *J. Res. Sci. Teach.* 32, 1097-1110.
- Farrell, P.B, G.A. Presicce, C.C. Brockett and P.H. Foote. 1988. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility.
- Ferrara F., R. Daverio, G. Mazzini, P. Bonini and G. Banfi. 1997. Automation of human sperm cell analysis by flow cytometry. *Clinical Chemistry.* 43:801-807.
- Fuse H., Okumura M., Kazama T., Katayama T., *Comparison of resazurin test results with various sperm parameters*, *Andrologia* (1993), Vol.25, pp.153-157
- Graham E.F. and J.K. Graham. 1989. The Effect of Whole Ejaculate Filtration on the Morphology and the Fertility of Bovine Semen. *J Dairy Sci* 73:91-97.
- Graham J.K. 2001. Assessment of Sperm Quality. *J. IVIS.* 47:301-306.
- Hafez, E.S.E. y Hafez B., 2000. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Ed. McGraw-Hill Interamericana, 7ª ed. México, D.F. p.387
- Hernández BJA y Carrillo DFB. Manual de Reproducción en Ovinos. Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nayarit. 2005.
- Holy L. 1983. Bases Biológicas de la reproducción bovina. Ed. Diana. Pág. 347
- Januskaukas A. and H. Zilinskas. 2002. Bull Semen Evaluation Post-Thaw and Relation of Semen Characteristics to Bulls Fertility. *J. Veterinarija ir Zootechnika.* 17:39-46.
- Knox R.V. 2004. Practicalities and Pitfalls of Semen Evaluation. *J. Advances in Pork Production.* 15:315-322.
- López-Valdez G. y M. Mellado-Bosque. 2001. Estimación de la concentración y motilidad de espermatozoides de toros y machos cabrios utilizando un patrón de fotografías de eyaculados y pruebas de nado ascendente. *Agrociencia.* 35:407-412.
- Macpherson M.L. 2004. How to Evaluate Semen in the Field. *J. IVIS.* 47:410-416.
- Mellisho SE y Gallegos A. Manual de laboratorio de reproducción animal. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. 2006.

- Nur Z., I.Dogan, M.K. Soylu and K. AK. 2003. Effect of different thawing procedures on the quality of bull semen. *J. Med. Vet.* 7:487-490.
- Reddy K.V., Meherji P.K., Gokral J.S., Shanani S.K., *Resazurin reduction test to evaluate semen quality*, *Indian Journal of Experimental Biology* (1997),Vol.35,No.4,pp.369-373
- Reddy K.V., Bordekar A.D., *Spectrophotometric analysis of resazurin reduction test and semen quality in men*, *Indian Journal of Experimental Biology* (1999),Vol.37,No.8,pp.782-786
- Rodríguez-Martínez H. 2000. Evaluación del Semen Congelado: Métodos Tradicionales y de Actualidad. *J. IVIS.*
- Soares-Valente, S. I. 2007. Criopreservacion de semen ovino: Comparacion entre dos dilutores. Licenciatura em biología Universidad de Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Portugal.
- Sugulle A.H., M.M.U. Bhuiyan and M. Shamsuddin. 2006. Breeding oundness and the quality of their frozen semen used in cattle artificial insemination in Bangladesh. *Journal of Livestock Research for Rural Development.* 18:1-11.
- Takacs L., L. Pohubi, M. Balazs, J. Szollosi, L.J. Matko and S. Damjanovich. 1998. Mediciones de monitor; propiedades dinámicas de las membranas celulares. *Pubmed Abstract*, Vol. 33 (1):19-31
- Tardif A.L, P.B. Farrell, V. Trouern-Trend, M.E. Simkin and R.H. Foote. 1998. Use of Hoechst 33342 Stain to Evaluate Live fresh and Frozen Bull Sperm by Computer-Assisted Analysis. *J. Androl.* 19:201-206.
- Tardif A.L., P.B. Farrell, V. Trouern-Trend and R.H. Foote. 1997.Computer-Assisted Sperm Analysis for Assessing Initial Semen Quality and Changes During Storage at 5°C. *J Dairy Sci* 80:1606-1612.
- Vatti Giuseppe. 1981. Ginecologia y obstetricia veterinarias. Ed. Hispano americana. México D. F.
- Wijchman J.G., B.T. De Wolf, R. Graaff and E.G. Arts. 2001 Variation in Semen Parameters Derived From Computer-Aided Semen Analysis, Within Donors and Between Donors. *J. Androl.* 22:773-780.