

# ESTANDARIZACIÓN DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA PARA LA MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN SEMINAL EN EL PERRO DOMÉSTICO

Díaz JD, Valiente C, Corrada Y, Gobello C.

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

**RESUMEN:** Los objetivos de este trabajo fueron: determinar la repetibilidad de las lecturas seminales realizadas con el espectrofotómetro y compararlas con aquellas del hemocitómetro, realizar una curva de estandarización de lectura espectrofotométrica de concentración seminal y, finalmente, correlacionar los resultados obtenidos por ambos métodos en la especie canina. Con este fin se evaluaron 9 eyaculados de 5 perros machos reproductivamente aptos. Cada uno de los eyaculados se fraccionó en cuatro partes iguales las que posteriormente se diluyeron 1:25, 1:50, y 1:75 en agua destilada, dejando una de las fracciones sin diluir. Se realizaron tres lecturas consecutivas con cada uno de los métodos. Se calculó la repetibilidad de cada método y el coeficiente de correlación entre ambos. Así, los coeficientes de variación fueron 7,8% y 16,9% para el espectrofotómetro y el hemocitómetro, respectivamente y el coeficiente de correlación entre la absorbancia y la concentración fue de  $r = 0,89$  ( $p < 0,01$ ). Estos hallazgos reivindican el uso de la espectrofotometría en la especie canina como un método no solo rápido y económico sino también con una precisión aceptable.

**Palabras Clave:** canino, espermatozoide, semen, hemocitometría, espectrofotometría.

## STANDARDIZATION OF SPECTROPHOTOMETRY FOR THE ASSESSMENT OF SPERM CONCENTRATION IN THE DOMESTIC DOG

**ABSTRACT:** The aims of this study were to determine the repeatability of semen measures carried out by spectrophotometry and to compare them with that of the hemocytometer, to design a standard spectrophotometric curve for canine seminal concentration, and to correlate results obtained by both methods. For these purposes, 9 ejaculates were obtained from 5 normal male dogs. Each ejaculate was divided into four parts, and then diluted 1:25, 1:50, 1:75 in distilled water; the last fraction was not diluted. All the samples were measured three consecutive times by each method. Repeatability and correlation coefficient were calculated for both methods. The coefficient of variation of the spectrophotometer and hemocytometer was 7.8 % and 16.9 %, respectively and the correlation between absorbance and sperm count was  $r=0.89$  ( $p < 0.01$ ). These findings further present spectrophotometry not only as a rapid and low cost method but also precise for semen evaluation in this species.

**Key words:** canine, spermatozoo, semen, hemocytometry, spectrophotometry.

Fecha de recepción: 19/04/11

Fecha de aprobación: 20/11/11

**Dirección para correspondencia:** J. D. Díaz, Laboratorio de Fisiología Reproductiva. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

**E-mail:** [j.diaz@fcv.unlp.edu.ar](mailto:j.diaz@fcv.unlp.edu.ar)

## INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de la hemocitometría produjo un hito en la evaluación de la calidad seminal del macho. Desde entonces esta técnica se ha llamado oficialmente por la OMS como el "gold standard" para el conteo espermático (1). No obstante, a pesar de la fe depositada en ella, son varias las limitaciones observadas desde su descubrimiento, tales como el tiempo insumido en la ejecución de la misma (2), la variación de resultados entre los diferentes hemocitómetros disponibles (3), e incluso entre dos conteos de una misma muestra en el mismo hemocitómetro (4) o entre distintos operadores (5). En base a esto, surge la necesidad de mejorar la técnica y las herramientas disponibles para el conteo espermático, lo que fomentó el desarrollo de dispositivos con un grado mayor de eficiencia. Es así, que hoy en día se ofrecen al mercado numerosos equipos; entre ellos pueden mencionarse como los más usados, el CASA (Computer-Assisted Semen Analyzer) y el Spermacue® de Minitub, como así también un nuevo y prometedor método, la citometría de flujo. Algunos de estos dispositivos han logrado vencer los inconvenientes de la hemocitometría, pero presentan otra importante restricción a tener en cuenta: su elevado costo.

El espermatocrito por ejemplo, es una técnica práctica y económica, pero no ha podido ser reproducida en caninos (6).

Por otra parte, el espectrofotómetro convencional además de ser un equipo de bajo costo, permite con un mínimo entrenamiento medir en pocos minutos (2 a 3 minutos, 7) la cantidad de luz que absorbe una muestra de semen, correlacionándola con un alto grado de precisión con la concentración seminal (8). Quizás con el surgimiento de dispositivos con mayor grado de desarrollo como los mencionados anteriormente, se ha llegado a desestimar la utilidad de la espectrofotometría para el conteo seminal. No obstante, es factible de demostrar que la espectrofotometría es uno de los métodos con mejores resultados para este fin; además, por su moderado costo, podría considerarse como una herramienta de considerable valor para laboratorios de bajos a medianos recursos.

Es sabido que las diferentes glándulas accesorias de las especies mamíferas secretan partículas (9) y que hay una variación biológica en la calidad y cantidad de estas entre las especies. Considerando estas diferencias, así como también las de tamaño y concentración seminal, resulta razonable validar y estandarizar el conteo seminal por espectrofotometría en cada una de las especies. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron: determinar la repetibilidad de las lecturas realizadas con el espectrofotómetro y compararlas con aquellas del hemocitómetro,

realizar una curva de estandarización de lectura espectrofotométrica de concentración seminal canina y, finalmente, correlacionar los resultados obtenidos por ambos métodos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ANIMALES Y RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS SEMINALES

Se utilizaron un total de 5 caninos machos adultos de entre 2 y 5 años de edad, saludables y con parámetros reproductivos normales, que fueron proporcionados por sus propietarios previo consentimiento escrito. La recolección de las muestras se realizó en forma higiénica mediante masturbación (10); para dicho procedimiento se utilizaron recipientes de plástico, calibrados y limpios. Se realizaron dos extracciones de semen por animal con un intervalo de 3 días entre cada una de ellas. Uno de los eyaculados no pudo ser utilizado por derramarse fuera del recipiente, por lo que se procesaron un total de 9 eyaculados.

### DILUCIÓN DE LOS EYACULADOS

Cada uno de los eyaculados se fraccionó en 4 partes iguales las que posteriormente se diluyeron 1:25, 1:50, y 1:75 en agua destilada, dejando una de las fracciones sin diluir. De esta forma se generaron un total de 36 muestras. La finalidad de estas diluciones fue obtener distintos valores de concentración que permitieran crear una mayor variabilidad entre los datos a analizar y por consiguiente un rango más amplio de absorbancia.

### CONTEOS EN EL HEMOCITÓMETRO

Para el conteo en cámara de Neubauer (Neubauer improved, BOECO, Germany) cada una de las muestras generadas por dilución y las fracciones no diluidas, se mezclaron con solución fisiológica formolada (CINa 0,9 g, agua destilada 100 ml y formol 40 %, 0,3 ml) en una proporción 1:20 ó 1:200. La elección de la dilución a utilizar se basó en el aspecto macroscópico de la muestra (grado de opacidad), teniendo así diluciones 1:200 para las muestras con mayor opacidad y 1:20 para aquellas translúcidas. Utilizando una micropipeta autoajustable (PZ HTL, Daniszewska 4, 03-230 Warsaw, Polonia) se tomó una alícuota de cada muestra por separado, se cargaron las cámaras, y se procedió al conteo bajo microscopio de luz a 40 aumentos. Fueron contabilizados los espermatozoides de 5 cuadrados equidistantes entre sí delimitados por 3 líneas paralelas. Se tuvo la precaución de no superar el 10% de diferencia de conteo entre ambas cámaras del hemocitómetro. Los conteos fueron realizados en 3 réplicas para calcular la repetibilidad de los resultados.

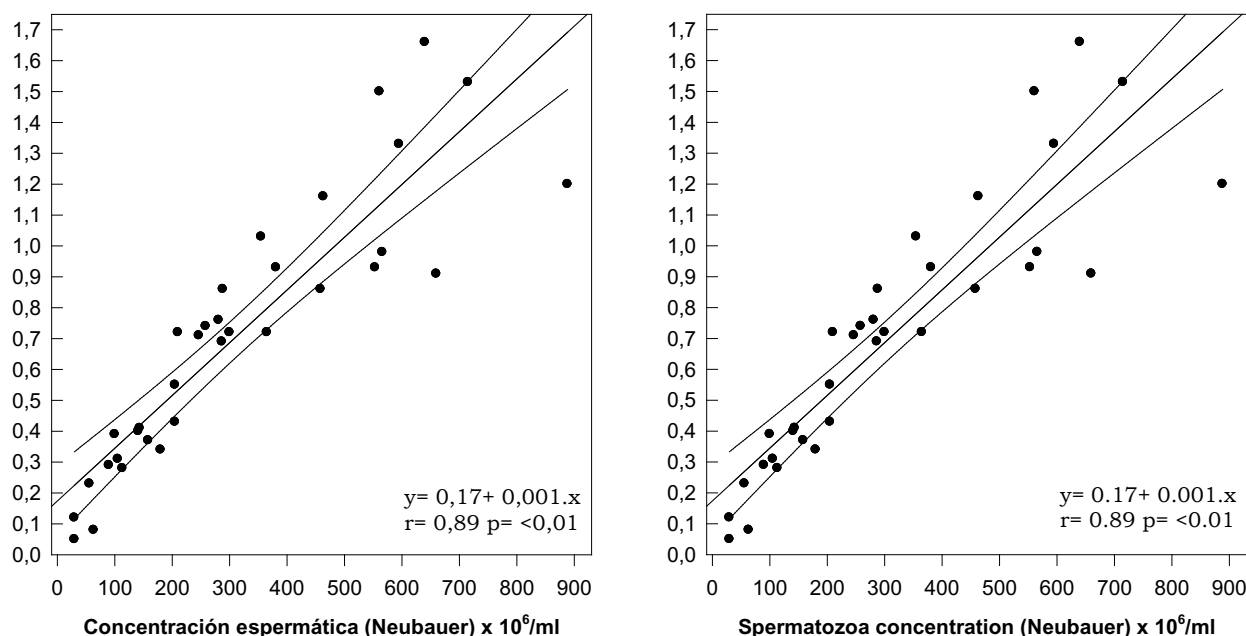


Figura I: Relación entre la concentración espermática medida por hemocitometría (cámara de Neubauer) y la absorbancia por espectrofotometría de muestras seminales caninas.

### LECTURAS EN EL ESPECTROFOTÓMETRO

Para la medición en el espectrofotómetro (Metrolab RC 325 junior, Argentina) la dilución se hizo en agua destilada 1:30 (0,05 ml de la muestra en 1,5 ml de agua destilada), y la longitud de onda utilizada en dicho procedimiento fue de 620 nm.

Previo a la lectura, el aparato fue calibrado a 0 de absorbancia y transmitancia utilizando como blanco un tubo de vidrio limpio y sin rayaduras, al cual se le agregó 1,5 ml de agua destilada en su interior. Luego a ese mismo tubo, se le colocó la muestra diluida como se detalló más arriba, se ajustó la longitud de onda indicada y se procedió a la lectura. Cada una de las lecturas se realizó 3 veces consecutivas.

### ANÁLISIS DE DATOS

Se calculó la repetibilidad de cada método mediante el análisis del coeficiente de variación ( $CV = \sigma/X \cdot 100$ ) de las tres réplicas realizadas en cada una de las muestras. Luego, se realizó una curva de estandarización entre los valores de absorbancia y de concentración mediante la utilización de la *ecuación de regresión lineal*, según la fórmula  $y = a + bx$ , donde "x" fue el conteo en cámara e "y" los valores de absorbancia. Por último, se compararon las concentraciones seminales obtenidas por cada equipo a través de un Test de Student. De no hallar diferencias significativas entre los conteos se calculó del coeficiente de correlación de Pearson para dichos datos.

### RESULTADOS

Los valores obtenidos a través del cálculo del CV fueron 7,8 % y 16,9 % para el espectrofotómetro y la cámara de Neubauer, respectivamente. Mediante la ecuación de regresión general se logró la alineación de la dispersión de los datos, lo cual permitió la estandarización de los valores tanto de absorbancia como de concentración (Figura I).

No se encontraron diferencias significativas entre los conteos espermáticos obtenidos con ambos equipos ( $p > 0,05$ ). El coeficiente de correlación entre la absorbancia y la concentración fue de  $r = 0,89$  ( $p < 0,01$ ).

### DISCUSIÓN

A nuestro conocimiento, no existen reportes acerca de la repetibilidad de las mediciones realizadas por espectrofotometría en semen canino. Este dato permite, no solo el conocimiento de la misma sino también comparar la repetibilidad con la de otros métodos, e incluso con la del "gold standard". Este conocimiento comparativo en la especie canina es de ayuda en la toma de decisiones para la elección y compra de equipamiento en un laboratorio de reproducción.

En nuestro trabajo la cámara de Neubauer mostró tener menos de la mitad de la precisión del espectrofotómetro. Similar proporción entre la precisión de ambos métodos fue previamente reportada en la especie bovina (11).

En este trabajo, al igual que en un estudio anterior en la misma especie ( $r = 0,99$ ; 12) y en otras especies como bovinos ( $r = 0,99$ ; 11), cerdos

( $r= 0,96$ ; 13) y conejos ( $r= 0,97$ ; 14) entre otros, se encontró una alta correlación para los conteos espermáticos obtenidos por ambos métodos.

Por otro lado, la alta correlación entre los aparatos permitió 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 de los mismos, como se realizó en anteriores trabajos (15,16), ya que su modelo de comportamiento fue similar. Estos hallazgos reivindican el uso de la espectrofotometría en la especie canina como un método no solo rápido y económico sino también con una precisión aceptable.

## BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press 1987; p. 14-7.
2. Mahmoud AM, Depoorter B, Piens N, Comhaire FH. The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. *Fertil Steril* 1997; 68 (2):340-345.
3. Christensen P, Stryhn H, Hansen C. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Burker-Turk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology* 2005; 63:992-1003.
4. Johnson JE, Boone WR, Blackhurst DW. Manual versus computer-automated semen analyses. Part I. Comparison of counting chambers. *Fertil Steril* 1996; 65:150-155.
5. Brazil C, Swan SH, Tollner CR, Treece C, Drobnis EZ, Wang C, Redmon JB, Overstreet JW. Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *J Androl* 2004b; 25:645-656.
6. Kustritz MV, Kilty C, Vollmer M. Spermocrit as a measure of the concentration of spermatozoa in canine semen. *Vet Rec* 2007; 161 (16):566-567.
7. Brillard JP, McDaniel GR. The reliability and efficiency of various methods for estimating spermatozoa concentration. *Poult Sci* 1985; 64:155-158.
8. Hansen C, Christensen P, Stryhn H, Hedeboe AM, Rode M, Boe-Hansen G. Validation of the FACSCount AF system for determination of sperm concentration in boar semen. *Reprod Domest Anim* 2002; 37:330-334.
9. Minelli A, Moroni M, Castellini C. Isolation of the IGF-I protein complex from rabbit seminal plasma: effects on sperm mobility and viability. *J Exp Zool* 2001; 290:279-290.
10. Linde Fosberg C. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen thawed semen in the dog. *Semin Vet Med. Surge (Small Anim)* 1995; 10:48-58.
11. Prathalingam NS, Holt WW, Revell SG, Jones S, Watson PF. The precision and accuracy of six different methods to determine sperm concentration. *J Androl* 2006; 27 (2):257-262.
12. Rodríguez P, Franco E, Jiménez C. Estandarización de la prueba para espectrofotometría en la medición de concentración de semen bovino, equino, porcino, ovino y canino. *Rev Med Vet Zoot* 2008; 55:22-28.
13. Paulenz H, Grevle IS, Tverdal A, Hofmo PO, Andersen Berg K. Precision of the Coulter counter for routine assessment of boar-sperm concentration in comparison with the haemocytometer and spectrophotometer. *Reprod Dom Anim* 1995; 30:107-111.
14. Castellini C, Lattaioli P, Cardinali R, Dal Bosco A, Mourvaki E. Validation of a spectrophotometric method used for the measurement of spermatozoa concentration in rabbit semen. *World Rabbit Sci* 2007; 15:115-119.
15. Haag. Determination of the approximate sperm concentration of horse semen with the aid of a spectrophotometer. *J Am Vet Med Assoc* 1959; 134 (7):314-316.
16. Anzar M, Kroetsch T, Buhr M. Comparison of Different Methods for Assessment of Sperm Concentration and Membrane Integrity With Bull Semen. *J Androl* 2009; 30(6): 661-668.