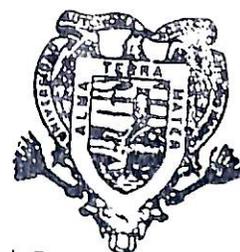


ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y  
MOTILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES DE TOROS Y MACHOS CABRÍOS  
UTILIZANDO UN PATRÓN DE FOTOGRAFÍAS DE EYACULADOS Y  
PRUEBAS DE NADO ASCENDENTE

GILBERTO LÓPEZ VALDEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
EN PRODUCCIÓN ANIMAL



BIBLIOTECA  
EGIDIO G. REBONATO  
BANCO DE TESIS  
U.A.A.A.N.



Universidad Autónoma Agraria

Antonio Narro

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila

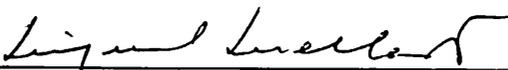
Marzo de 2003

13776

Tesis elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada como requisito parcial, para optar al grado de:

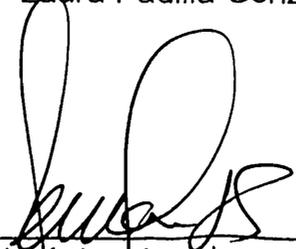
MAESTRO EN CIENCIAS EN  
PRODUCCION ANIMAL

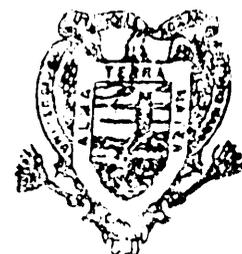
COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal:   
Dr. Miguel Mellado Bosque

Asesor:   
M. Sc. Fernando Ruiz Zárate

Asesor:   
M. C. Laura Padilla González

  
Dr. Jerónimo Landeros Flores  
Subdirector de postgrado



BIBLIOTECA  
EGIDIO G. REBONATO  
BANCO DE TESIS  
U.A.A.A.N.

Buenavista, Saltillo, Coahuila. Marzo de 2003

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesor Dr. Miguel Mellado Bosque, por aceptarme como su asesorado, darme su confianza y apoyarme en el transcurso, desarrollo y finalización de esta investigación.

A mis coasesores M. Sc. Fernando Ruiz Zárate y M. C. Laura Padilla González por demostrarme con su actitud, que el conocimiento sobre las cosas carece de sentido su existencia, cuando éste no ha sido socializado.

A mis profesores por aceptarme en su salón de clase y por recalcaros que el conocimiento sobre las cosas es de quien lo ha buscado, aún a costa de todo.

A mis amigos Ing. Víctor Gómez, Larry y su Tata, Nacho, Freddy y el Sr. Burciaga por su valiosa ayuda, al proporcionar los toros y machos cabríos necesarios para el desarrollo de ésta investigación.

A mis amigos de Sinaloa, Alfredo, Adriana, Raquel y Claudio, por ayudarme a disipar la incertidumbre y la nostalgia que provoca el estar en un lugar nuevo y separado de mi familia.

A todas las secretarías del Postgrado y del Departamento de Producción Animal, por demostrarnos que siempre detrás de un alumno despistado, existe el toque mágico de su presencia, para reestructurar y organizar nuestras catastróficas formas de vida estudiantil y que no obstante, en algunas ocasiones, hasta llegan a regalar una sonrisa, que a fin de cuentas eso lo paga todo.

A mi colega y amigo Eric por haberme ayudado a coleccionar las muestras de semen en cada una de las especies en estudio.

A todas las muchachas laboratoristas de ciencias básicas, por facilitar con su clásica amabilidad, algunos materiales de laboratorio de los que se carecía.

Al servicio de choferes por cumplir de forma puntual, disciplinada y sin distinción alguna, su trabajo de transporte del personal y el alumnado.

A todos los servicios departamentales, en general a toda la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" por el apoyo técnico, económico, científico, político y social.

## DEDICATORIA

### A MI FAMILIA:

Por creer en mí, a pesar de  
mis múltiples defectos

# COMPENDIO

Estimación de la concentración y motilidad de los espermatozoides de toros y machos cabríos utilizando un patrón de fotografías de eyaculados y pruebas de nado ascendente

Por

**Gilberto López Valdez**

**Maestría en Producción Animal**

**Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**

**Saltillo, Coahuila, Abril de 2003**

Dr. Miguel Mellado Bosque- Asesor-

Palabras claves: toro, macho cabrío, evaluación del semen, nado ascendente.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar técnicas simples para estimar la concentración y motilidad de eyaculados de toros y machos cabríos. Para la estimación de la concentración de células espermáticas en el semen, se utilizaron veinticinco eyaculados de 5 toros Charolais y 3 Hereford, de 24 a 36 meses de edad y 25 eyaculados de 2 machos cabríos Granadinos y 3 Nubios adultos. Estos eyaculados se compararon con un patrón de fotografías de eyaculados de concentración de espermatozoides conocida. De estos eyaculados se tomaron 0.05 ml de semen, los cuales se colocaron en el fondo de un tubo de

sedimentación de sangre, el cual contenía 0.35 ml de solución bufer fosfatada (SBF). Estos tubos se mantuvieron a 36° C en un baño de agua María y la columna de espermatozoides desprendida se midió a los 20, 40, 60, 80 y 100 minutos. Se observó una alta correlación ( $P < 0.01$ ) entre los valores de concentración de espermatozoides determinados por el patrón de fotografías y el hemocitómetro ( $r = 0.93$  para toros;  $r = 0.96$  para machos cabríos). Correlaciones más bajas, pero significativas ( $P < 0.01$ ), se observaron entre valores de motilidad individual determinados por las pruebas de nado ascendente durante 20 minutos y las observaciones con el microscopio ( $r = 0.59$  para toros y machos cabríos). Se concluyó que la concentración de los espermatozoides puede ser estimada fácilmente y con una precisión razonable, comparando los eyaculados de toros y macho cabríos con un patrón de fotografías de eyaculados de concentración conocida. También, la distancia recorrida por los espermatozoides en pruebas de nado ascendente en una solución bufer fosfatada y con duración de 20 minutos, es indicativa, con buena precisión, de la motilidad de los espermatozoides.

## **ABSTRACT**

Estimation of bull and buck semen concentration and motility by a photograph spectrum of ejaculates and a swim-up technique

By

**GILBERTO LÓPEZ VALDEZ**

**MASTER OF SCIENCE**

**ANIMAL PRODUCTION**

**Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**

**Buenvista, Saltillo, Coahuila, Abril 2003**

Dr. Miguel Mellado Bosque - Advisor -

Key words: Swim-up, bucks, bulls, semen evaluation.

Twenty-five fresh ejaculates from 5 Charolais and 3 Hereford bulls (24 to 36 month-old), and 25 ejaculates from 2 adult Granadino and 3 Nubian bucks were used to assess sperm cell concentration by comparing these ejaculates with a photograph spectrum of ejaculates of know concentration. From the same

ejaculates, 0.05 ml of semen was layered at the bottom of a blood sedimentation tube containing 0.35 ml Phosphate Buffer Solution (PBS). Tubes were maintained at 36° C in water bath, and the length of column of spermatozoa that moved upwards were registered at 20, 40, 60, 80 and 100 minutes. There were strong correlations ( $p < 0.01$ ) between values of sperm cell concentration determined by the photograph spectrum and hemocytometer ( $r = 0.93$  for bulls;  $r = 0.96$  for bucks). A weaker but significant ( $P < 0.01$ ) correlations were observed between motility values determined by swim-up technique after 20 minutes of incubation, and microscope assessment ( $r = 0.59$  for both, bulls and bucks). It was concluded that sperm cell concentration can be estimated easily and with a reasonable accuracy by contrasting bull or buck ejaculates with a spectrum of semen photographs of known sperm cell concentration. Also, the distance traveled upward by spermatozoa in a swim-up procedure with a PBS medium and during 20 minutes, is indicative, although with a moderate accuracy, of spermatozoa motility.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	xii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Objetivos .....	2
Hipótesis .....	2
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
Pruebas de nado ascendente de los espermatozoides .....	3
Evaluación del semen .....	4
Variables más importantes en estudio .....	5
Concentración espermática .....	6
Densidad y peso específico del semen .....	7
Motilidad en masa y progresiva .....	9
Otras variables microscópicas importantes .....	14
Volumen del eyaculado .....	14
pH .....	14
Porcentaje de células normales .....	15
Porcentaje de espermatozoides vivos .....	15
Hemocitómetro .....	17
Espectrofotómetro .....	18
Otras variables importantes de la aptitud reproductiva del toro y al macho cabrío .....	21
Testículos .....	22
Circunferencia escrotal .....	22
Prepucio .....	24
Pene .....	25
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	26
Localización del área de estudio .....	26
Iniciación y duración del estudio .....	26
Definición y características de la población .....	27
Preparación del patrón de fotografías de eyaculados .....	27
Estimación de la concentración de espermatozoides para evaluaciones objetivas del semen con el patrón de fotografías .....	28

Estimación de la motilidad con el nado ascendente de espermatozoides . . . . .	28
<b>RESULTADOS.</b> . . . . .	31
<b>DISCUSIÓN</b> . . . . .	40
Concentración de espermatozoides . . . . .	40
Motilidad de los espermatozoides . . . . .	40
<b>CONCLUSIONES</b> . . . . .	46
<b>RESUMEN</b> . . . . .	47
<b>LITERATURA CITADA</b> . . . . .	49

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro No.</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
2.1.	Concentración del semen de borrego y el macho cabrío valorada por su consistencia. ....	10
2.2.	Sistema de valoración de la onda de movimiento del semen... ..	12
4.1.	Coefficientes de correlación entre algunas variables del semen de toros y el nado ascendente de los espermatozoides. ....	34
4.2.	Coefficientes de correlación entre algunas variables del semen de machos cabríos y el nado ascendente de los espermatozoides.....	35
4.3.	Velocidad y nivel de avance ascendente (cm) de los espermatozoides del toro, en tubo conteniendo una solución tampón fosfatada (STF). ....	36
4.4.	Velocidad y nivel de avance promedio (cm) de los espermatozoides del macho cabrío, en tubo conteniendo una solución tampón fosfatada (STF). ....	37
4.5.	Los colores del semen en el toro y el macho cabrío y su frecuencia de casos medidos en porcentajes.....	38
4.6.	Los valores promedio de las variables del semen en el toro y el macho cabrío... ..	39
4.7.	Variables importantes de la aptitud reproductiva del toro y el macho cabrío. ....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura No.</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
3.1.	Esquema del patrón de fotografías de eyaculados de toros, utilizado para estimar, por comparación, la concentración de espermatozoides. Cifras en la base del tubo indican millones de espermatozoides $\text{ml}^{-1}$ . . . . .	29
3.2.	Medición de la motilidad de las células espermáticas del toro y el macho cabrío, medidas con pruebas de nado ascendente, utilizando tubos de sedimentación de sangre, con una solución tampón fosfatada. . . . .	30
4.1.	Correlación entre la concentración de espermatozoides de toros Charolais y Hereford, medida con hemocitómetro o a través de la comparación del semen con un patrón de fotografías de eyaculados de concentración conocida. . . . .	32
4.2.	Correlación entre la concentración de espermatozoides de machos cabríos, medida con hemocitómetro o a través de la comparación del semen con un patrón de fotografías de eyaculados de concentración conocida. . . . .	33

## INTRODUCCIÓN

La concentración de los espermatozoides y sus características de desplazamiento (proporción de células móviles y patrón de movimiento) son los indicadores más importantes de la calidad del semen. El proceso de cuantificación de las células espermáticas en el eyaculado con el hemocitómetro es tardado y laborioso, por lo que es deseable una alternativa rápida, barata y confiable para estimar la concentración de los espermatozoides en el eyaculado.

La viabilidad de los espermatozoides comúnmente se estima microscópicamente en forma subjetiva midiendo su motilidad masal, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (semen diluido) y la velocidad de desplazamiento de las células espermáticas, o con métodos objetivos mediante el uso de equipo computarizado (Farell *et al.*, 1988), las pruebas de nado ascendente (Suttiyotin y Twaites, 1992, 1993) y la transmigración de los espermatozoides (Schafer *et al.*, 1997; Schafer y Holzman, 2000). Considerando lo costoso del equipo para evaluaciones objetivas del semen y la subjetividad de la medición de la motilidad con microscopio, conviene explorar técnicas más prácticas para medir las características descritas del semen.

## **Objetivos**

El objetivo del presente estudio fue evaluar si el uso de un patrón de fotografías de eyaculados y las pruebas de nado ascendente de los espermatozoides, pueden ser utilizados para estimar la concentración y motilidad del semen de toro y macho cabrío, con una metodología simple y rápida.

## **Hipótesis**

El uso de un patrón de fotografías de semen, podría ser un método sencillo para la estimación de la concentración comparativa en eyaculados de toros y machos cabríos.

El desplazamiento ascendente de los espermatozoides en un medio que contenga una Solución Tampón Fosfatada (STF), permitirá definir con buena precisión la motilidad de los espermatozoides de toros y machos cabríos

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Pruebas de nado ascendente de los espermatozoides

En un estudio de Pérez *et al.* (1999) combinaron las lectinas (aglutinadoras de espermatozoides) combinadas con una solución de dextran, para seleccionar espermatozoides de carneros en pruebas de nado ascendente.

Se utilizó el semen de 3 carneros maduros de la raza Saltz. Este semen fue mezclado y alícuotas de 0.5 ml se incubaron con 4 lectinas fluorescentes (ECL, JAC, PSA y RCA). Luego, una solución de dextran se añadió lentamente. El mejor semen se obtuvo con la incubación de dextran más RCA, obteniéndose una recuperación de células espermáticas de 64 por ciento, con una viabilidad de 86 por ciento. Se demostró que con este método se obtiene una alta proporción de espermatozoides con su membrana plasmática íntegra y con alta motilidad.

Palomo *et al.* (1999) utilizaron eyaculados de 3 machos cabríos de probada fertilidad. El semen fue sometido a los siguientes tratamientos: 1) centrifugación en TALP, 2) centrifugación en un medio Ficol basado en sucrosa, 3) centrifugación en

gradientes de percol a 40 y 80 por ciento, 4) pruebas de nado ascendente y 5) dilución de espermatozoides (1:40) en (1:1) TALP. En todas las pruebas los espermatozoides fueron incubados durante 45 minutos en un medio conteniendo heparina. Los diferentes tratamientos no fueron diferentes en cuanto a la penetración y división de ovocitos madurados in vitro. Solamente el protocolo del nado ascendente mejoró sustancialmente la motilidad y viabilidad de los espermatozoides.

Jaakma *et al.* (1997) llevaron a cabo un estudio donde los ovocitos de bovino madurados in vitro fueron expuestos a espermatozoides tratados con: 1) nado ascendente en Fert-TALP suplementado con ácido hialurónico y heparina, 2) lavado por centrifugación en un medio Brackett-Oliphant modificado suplementado con cafeína y benzoato de sodio. Una mayor cantidad de ovocitos se desarrolló después de la fertilización con espermatozoides sometidos al nado ascendente (17.9 vs. 7.1).

### **Evaluación del semen**

La evaluación del semen de los animales de la granja, fauna silvestre y el hombre, ha recibido considerable atención, especialmente como resultado de la aceptación que ha tenido la inseminación artificial en la reproducción de los animales. La meta de crear un método que permita estimar la calidad del semen, basándose en una simple y objetiva prueba, no ha sido aún alcanzada (Embert,

1978). El grado de fertilidad de un eyaculado es la prueba más importante de éste y la mayor parte de las compañías dedicadas a la inseminación artificial (I.A.) utilizan el porcentaje de hembras no repetidoras como parámetro de fertilidad en los machos (Bearden y Fuquay, 1995). El semen se evalúa para determinar la utilidad del semental o la de un eyaculado en particular. Esto no debe confundirse con una prueba de fertilidad, ya que esta última se cuantifica mediante las tasas de concepción y la producción de crías viables (Sorensen, 1982). La combinación de los resultados de varias pruebas sirve para determinar la calidad del eyaculado y los principales caracteres que se valoran son la concentración y la motilidad progresiva (Embert, 1968; Bearden y Fuquay, 1995).

### **Variables más importantes en estudio**

Las características del semen son indicativas de su calidad, estando relacionadas éstas con la fertilidad o infertilidad según sea el caso, existiendo una correlación positiva entre ellas (Derivaux, 1982). De todos los aspectos cualitativos y cuantitativos acerca de la calidad seminal, los que se consideran más importantes para estimar la fertilidad, son la motilidad progresiva y la morfología de las células espermáticas (Ramírez y Miller, 1995).

Para controlar la calidad del semen se utilizan varios parámetros: densidad o concentración, motilidad, proporción de espermatozoides vivos, proporción de células espermáticas anormales y una serie de medidas bioquímicas. Existe una

amplia variedad de esos parámetros, tanto entre eyaculados como entre distintos animales, por lo que la importancia en determinar la fertilidad es una cuestión muy debatida (Watson, 1979). Burbank (1935), asegura que la concentración de espermatozoides es una propiedad del semen y es tan importante como el porcentaje de motilidad, el volumen o el porcentaje de células vivas en un eyaculado. Agrega que el color de un eyaculado en el toro refleja la densidad y la concentración de espermatozoides en la muestra.

*Concentración espermática.* Esta es una de las características más variables en la evaluación de una muestra de semen y se define como el número de espermatozoides por ml de semen. Este rasgo tiene gran importancia debido a que de éste dependerá el número de dosis para la inseminación artificial. Un indicador de la concentración es el color de la muestra. El color crema indica que la muestra es densa con alta concentración y conforme la muestra adquiere un color más lechoso, la concentración disminuye. Una muestra color café o amarillo café, generalmente contiene muchas células muertas. Un toro con buena calidad de semen debe tener por lo menos 500 millones de células/ml (Ramírez y Miller, 1995; Hafez, 1985).

Sorensen (1982) considera que el color es el primer factor a examinarse después de la colección y que en el toro las muestras buenas presentan una apariencia aperlada. Agrega que la concentración espermática normal en el toro es de 800 a 1,200 millones/ml. Nuti (1990) agrega que el color de blanco grisáceo

a amarillento es normal en caprinos. Arbiza (1978) reporta que el color del semen en caprinos varía de acuerdo a la estación del año, siendo éste crema pálido, crema fuerte y pálido, en el otoño, invierno, primavera y verano, respectivamente. La alimentación tiene un efecto en el color del semen según datos de Quiroga (1978), quien encontró que en caprinos estabulados, el color del semen fue blanquecino grisáceo y en animales en pastoreo tomó un color verde-amarillento.

En bovinos, la concentración espermática es más baja comparada con los caprinos; sus valores se encuentran al rededor de 850 millones/ml. Mientras que en caprinos, la concentración promedio reportada por Trejo (1984) es de  $3.46 \times 10^9$  por ml, coincidiendo con lo reportado por Muhuyi *et al.* (1982) en 833 muestras analizadas. Zerfas y Steibach (1982) reportan  $3.6 \times 10^9$  y  $4.0 \times 10^9$  en cinco machos de la raza Alpina y cinco Boer, respectivamente. Sorensen (1982) agrega que la concentración de espermatozoides es necesario determinarla utilizando el número de espermatozoides por unidad de volumen, ya que esto, multiplicado por el volumen, permite conocer el número total de espermatozoides por eyaculado.

Un aumento de la concentración normal de espermatozoides en un eyaculado, disminuirá la tasa metabólica. El potasio es el principal catión en el espermatozoide, en tanto que el sodio es el principal catión del líquido seminal. Un incremento en la concentración celular incrementa la proporción potasio-sodio en el semen. El potasio es un inhibidor metabólico natural. Un incremento en su

concentración reducirá la actividad metabólica del semen (Bearden y Fuquay, 1995).

*Densidad y peso específico del semen.* La densidad del eyaculado depende de la concentración de espermatozoides y puede variar entre límites muy amplios. La densidad media del eyaculado del toro se sitúa en 3.74 con relación al valor de 1 correspondiente al agua destilada. Existe una correlación positiva altamente significativa ( $r= 0.89 \pm 0.04$ ) entre la densidad total y la concentración espermática y no entre ésta y la densidad del plasma seminal.

La densidad del esperma depende igualmente de la carga y de la conductividad eléctrica. En el toro, el peso específico medio del esperma es proporcional a la concentración de espermatozoides. Los eyaculados con escaso peso específico, generalmente son poco concentrados y de mala calidad, ocurriendo lo contrario con aquellos que tienen una buena calidad. Las variaciones del peso específico de los espermatozoides del toro son imputables a las distintas proporciones entre espermatozoides maduros (más pesados) e inmaduros (más ligeros) (Derivaux, 1982).

La siguiente clasificación aproximada se basa en el número de células.

- Semen cremoso: La concentración de espermatozoides excede de 1, 000, 000 por ml.

- Semen grueso: A semeja la leche entera: La concentración varía de 750,000 a 1,000,000 por ml.
- Semen delgado: Nos recuerda la leche descremada: Aproximadamente 500,000 espermatozoides por ml.
- Semen acuoso: Menos de 250,000 células espermáticas por ml.

Tal estimación puede satisfacer la evaluación ordinaria del semen, la cual es dirigida a determinar si una muestra de éste reúne las normas mínimas para la especie. Pero el cálculo de la dilución del semen para la inseminación artificial requiere una cuantificación más exacta (Embert, 1968).

En caprinos y ovinos se determina también la concentración del semen haciendo una evaluación del grosor o a simple vista de la siguiente forma:

*Motilidad en masa y progresiva.* Esta variable en el semen se expresa como el porcentaje de células móviles y proporciona una valoración aproximada de la viabilidad del semen (Peters y Ball, 1991). Se considera como la prueba de calidad individual más importante, para fines de fecundación, ya que cuanto mayor es el número de espermatozoides que la poseen, mayores son las probabilidades de que el semen fecunde al o los óvulos (Bearden y Fuquay, 1995).

La fertilidad está altamente correlacionada con el número de espermatozoides móviles inseminados y el porcentaje de motilidad de un eyaculado puede variar de 0 a 80 por ciento (Bearden y Fuquay, 1995; Bonadonna, 1989).

Cuadro 2.1 Concentración del semen de borrego y el macho cabrío valorada por su consistencia.

N° de espermatozoides ( $\times 10^9$ ) por ml			
Valor	Consistencia	Media	Valores extremos
5	Creмоса espesa	5.0	5 - 6.0
4	Creмоса	4.0	3.5 - 4.5
3	Creмоса tenue	3.0	2.5 - 3.5
2	Lechosa	2.0	1.0 - 2.5
1	Nebulosa	0.7	0.3 - 1.0
0	Clara (acuosa)	Insignificante	

Tomado de Evans y Maxwell (1990).

Si el evaluador del semen es lo suficientemente experto, el aspecto del material seminal puede adquirir un notable significado indicativo. En general, el material rico en espermatozoides móviles tiene un aspecto relativamente homogéneo. En cambio, si los espermatozoides son poco móviles, el aspecto se vuelve más granuloso.

El llamado movimiento de masa, es un dato empírico de juicio, que se refiere a la motilidad en masa como resultado del movimiento conjunto de los

espermatozoides. Es particularmente evidente en el semen rico en elementos celulares vivos y activos y se le puede evaluar poniendo a contra luz. Sin embargo, la aparente ausencia y escasez de actividad masiva no es un elemento suficiente para juzgar que determinado semen es menos bueno que otros (Bonadonna, 1989).

La motilidad masal u onda de movimiento es la estimación de la motilidad de los espermatozoides y se hace sobre la base del vigor o potencia de la onda, según si ésta presenta o no dicho movimiento. Los eyaculados muy buenos o de buena motilidad (clasificación 4 ó 5) se pueden usar para I.A., las muestras con valoración de 3 ó menos pueden dar una fertilidad menor, por lo que se aconseja desecharlas. Evans y Maxwell (1990) y Drayson (1982) proponen esta escala para evaluación y se presenta a continuación en Cuadro 2.2.

Las pruebas de nado ascendente para evaluar la motilidad del semen se han hecho en borregos (Suttiyotin y Thwaites, 1992), machos cabríos (Majunder y Chakrabarti, 1984), toros (Deana *et al.*, 1986) y humanos (Sokoloski *et al.*, 1977). En ellas se utilizaron métodos espectrofotométricos para medir la turbidez de la columna de semen desprendida durante el ascenso de los espermatozoides. Los resultados de estas pruebas (protocolos distintos en cada caso) muestran coeficientes de correlación entre la turbidez de los espermatozoides suspendidos en la solución fisiológica y la motilidad de éstos de 0.63 a 0.91.

Esta motilidad debida a la contracción del filamento axial, se encuentra ligada al metabolismo de la lactomiosina A.E.P. bajo la acción de la adenosintrifosfatasa. Normalmente los espermatozoides se desplazan gracias a los movimientos de la cola, al mismo tiempo que experimentan un movimiento de rotación alrededor de su eje longitudinal, de tal forma que su progresión es rectilínea (Derivaux, 1982).

Cuadro 2.2. Sistema de valoración de la onda de movimiento del semen.

Valor	Clase	Descripción
5	Muy buena	Densas ondas de movimiento muy rápidas. No observación de células individuales. El 90 por ciento ó más de los espermatozoides son activos.
4	Buena	Movimiento vigoroso, pero las ondas y remolinos no son rápidos como los de valor 5. Alrededor de 70-85 por ciento de células activas.
3	Regular	Sólo aparecen ondas de movimiento lento. Se pueden ver espermatozoides aislados. El 45-65 por ciento de las células son activas.
2	Pobre	No aparecen ondas aunque se observan movimientos de espermatozoides. Sólo viven el 20-40 por ciento de las células espermáticas y su movilidad es pobre.
1	Muy pobre	Muy pocos espermatozoides (alrededor del 10 por ciento) presentan signos de vida, pero con movimientos débiles.
0	Muertos	Ningún espermatozoide presenta movimiento.

Tomado de Evans y Maxwell (1990) y Drayson (1982).

La motilidad progresiva es otra evaluación microscópica del semen, la cual se realiza utilizando un lente de alto aumento; en este sentido se puede observar un movimiento seminal rápido, lento o nulo, siendo posible observar uno de ellos que caracteriza al movimiento espermático o es posible también observar los tres tipos de motilidad progresiva (Ramírez y Miller, 1995).

En toros, la velocidad de movimiento hacia adelante de un espermatozoide suspendido en plasma seminal, es de 4.5-5.0 mm por minuto, bajo un campo microscópico. Mientras que en el macho cabrío el avance es de 5-15 mm por minuto (promedio 7 mm/min). La velocidad y tipo de movimiento de los espermatozoides puede variar según un gran número de factores: método de colección del semen, factores ambientales, manejo del semen después de colectado, intervalo entre la colección y la valoración y variaciones individuales del propio semental.

También existen variaciones estacionales relativas a la motilidad de los espermatozoides del macho cabrío; sin duda, estas variaciones están relacionadas con diferencias en fertilidad en esta especie (Evans y Maxwell, 1990).

Cuando se observa el semen al microscopio con poco aumento, en una gota de éste se pueden ver las ondas de movimiento, que son debidas a los movimientos de los espermatozoides en diferentes direcciones. La presencia y

velocidad de tales ondas se puede utilizar como criterio adecuado de valoración, bajo condiciones de campo. La onda de movimiento sólo se puede observar en las especies que poseen una alta concentración espermática, como es el caso de los caprinos y ovinos.

En el semen normal los espermatozoides tienen cargas eléctricas negativas, con lo que se repelen entre sí. Si los espermatozoides pierden su carga negativa, éstos tienden a agruparse. Este fenómeno recibe el nombre de aglutinación y puede ser debido a la degeneración de los procesos enzimáticos a nivel intracelular, por el aumento de la acidez del medio o la presencia de iones metálicos, bacterias u otras impurezas y aglutininas generadas por el propio organismo (Evans y Maxwell, 1990; Cheville, 1980).

### **Otras variables microscópicas importantes**

*Volumen del eyaculado.* El volumen del eyaculado tiene mucha variación entre especies y a veces en el mismo animal. En el toro el volumen del eyaculado es de 5-15 ml; mientras que para el caprino es de 1.1 ml (Sorensen, 1982; Quiroga, 1978; Trejo, 1984). Este es uno de los pocos caracteres de las muestras que pueden ser medidos directamente con tubos de colección graduados y el volumen depende del método de obtención del semen (Anderson, 1945) y de la época del año de colección en el caso de los caprinos.

*pH.* Un pH cercano a 7 (de 6.9 a 7.5 para las diferentes especies) permite la calidad óptima de la mayoría de los espermatozoides. Conforme los espermatozoides envejecen, éstos producen ácido láctico, como resultado de la glucólisis y la acumulación de este ácido disminuye el pH, lo que a la vez reduce la motilidad de los espermatozoides.

En promedio el pH del semen de bovino tiende a ser neutro, al igual que en el semen de caprinos. Se considera que para el toro el pH fluctúa entre 6.3 y 6.9 y para el caprino fluctúa entre 6.5-7.4 (Bearden y Fuquay, 1995; Sorensen, 1982; Trejo, 1984; Nuti, 1990; Salisbury *et al.*, 1978).

*Porcentaje de células normales.* Generalmente, en las muestras de semen con suficiente concentración y movilidad satisfactoria, la mayoría de las células aparecen normales (Ortavant, 1959). La fertilidad en el toro no se ve afectada hasta que el número de espermatozoides anormales es mayor de 20 a 25 por ciento. Se considera el semen del macho cabrío útil para congelarse cuando el porcentaje de anomalías morfológicas (primarias y secundarias) no exceda del 15 por ciento (Bearden y Fuquay, 1995; Nuti, 1990). Las anomalías primarias de los espermatozoides corresponden a las que son de origen testicular y las secundarias aparecen durante el paso de los espermatozoides por el sistema de conductos, después de salir de los tubos seminíferos y los testículos (Sorensen, 1982).

El porcentaje de células anormales se determina mediante la preparación de un "frotis" de semen teñido con eosina al 1 por ciento. Para el conteo se utiliza un microscopio de contraste de fases, con un objetivo de 100 x, en aceite de inmersión (Sorensen, 1982).

*Porcentaje de espermatozoides vivos.* Los espermatozoides vivos resisten los colorantes supravitales, mientras que los muertos los absorben. Esta diferencia ofrece un método sencillo de conteo de células vivas y por lo tanto, de determinación del porcentaje de espermatozoides vivos en la muestra. Son varios los colorantes que pueden usarse, pero existen otros dos de gran aceptación:

a) Eosina - Verde resistente FCF

b) Eosina - Nigrosina

- Eosina B: 1g
- Nigrosina: 5g
- Citrato de sodio deshidratado 3 por ciento:100 ml mezcle los colorantes con el citrato.

Este producto permanece estable durante un año, pero debe refrigerarse para evitar el desarrollo de bacterias contaminantes (Sorensen, 1982).

La forma más simple para determinar la concentración de espermatozoides es mediante el uso del hemocitómetro, sin embargo, con esta técnica se pierde

mucho tiempo y es difícil adaptarla a las condiciones de campo (Rodríguez y Ruiz, 1985). Mientras que Bloom (1950), considera que el valor de la motilidad basado en observaciones microscópicas es subjetivo y por lo tanto sujeto a variaciones y errores.

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, métodos fotoeléctricos, espermocrito y conteo electrónico. De ellos, se utilizan con mayor frecuencia el hemocitómetro y espectrofotómetro.

*Hemocitómetro.* Emplea el equipo ordinario para el conteo de eritrocitos. Consiste de una laminilla especial de vidrio, la cual tiene dos cámaras de conteo con 0.1 mm de profundidad y un área graduada en el fondo de la cámara de un mm. Dicha cámara se compone por una cuadrícula que delimita un grupo de 25 cuadros, cada uno de los cuales se halla dividido a su vez en otros 16 cuadros pequeños. Ayudándose de un microscopio, se contabilizan los espermatozoides contenidos en cinco cuadros grandes, es decir en 80 cuadritos pequeños. Al saberse la profundidad y el área graduada, se puede determinar el número de espermatozoides en un volumen dado (Sorensen, 1982).

Los cuadros donde se realiza la lectura pueden ser los cinco cuadros en diagonal o bien, los de las cuatro esquinas y el del centro. Al sumar las células

espermáticas, se deben de incluir las que están tocando las líneas de los lados derechos e inferior de cada cuadro, de modo que no se les cuente dos veces (Rodríguez y Ruiz, 1985).

Para realizar los cálculos tomando como ejemplo un volumen de  $1/50 \text{ mm}^3$  y una dilución de 1:200, el número de células contadas, multiplicado por la fracción de volumen estimado y por la tasa de dilución, es igual al número de células por  $\text{mm}^3$  ( $X \times 50 \times 200 = 10,000 \times /\text{mm}^3$ ).

Por lo regular, la concentración se expresa en ml, es decir en  $\text{cm}^3$ ; por lo tanto, hay que multiplicar el resultado anterior por 1,000 y así se obtiene el número total de células por mililitro de semen. Si se observa, el resultado final es equivalente al conteo inicial de espermatozoides multiplicado por 10,000,000; éste cálculo simple ahorra el proceso del cálculo anterior (Sorensen, 1982).

Una de las pipetas tiene un factor de dilución de 1 en 100 y 1 en 200. Por lo general se utiliza, un factor de dilución de 1:200 para el toro y diluciones superiores 1:300 a 1:400 para el macho cabrío. El disolvente debe de matar a los espermatozoides y evitar la aglutinación de éstos. El método requiere tiempo y la precisión y repetibilidad de los resultados dependen de la preparación técnica y la eficiencia del operador (Rodríguez y Ruiz, 1985; Coffin, 1986).

*Espectrofotómetro.* 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 habrá menor transmisión de luz, la cual es medida por el aparato.

El espectrofotómetro debe calibrarse a una longitud de onda de 550 ó 630 nanómetros. Para efectuar la lectura del porcentaje de transmisión, se toma 0.1 ml de semen, se remueve el exceso de la punta y parte externa de la pipeta con un papel fino y se coloca en un tubo con 7.9 ml de una solución de citrato de sodio al 2.9 por ciento (solución base). La punta de la pipeta con el semen se debe colocar 0.5 cm dentro del citrato y el semen debe fluir por gravedad. Cuando el semen deja de fluir se enjuaga unas tres veces la pipeta con el citrato, después se tapa el tubo y se invierte cuidadosamente sin agitarlo, unas 5 veces, evitando la salida del líquido.

Con la solución base del citrato de sodio se ajusta el aparato para obtener el 100 por ciento de transmisión. Enseguida, se retira ésta y se inserta el tubo con la muestra de semen. La lectura se toma cuando la aguja del aparato se detiene por primera vez. Se quita la muestra de semen y se pone nuevamente la solución base para comprobar que halla 100 por ciento de transmisión de luz. Si el instrumento no registra nuevamente el 100 por ciento de transmisión, entonces se debe ajustar el aparato y hacer otra lectura (Gutiérrez y Rivera, 1988).

Para obtener la densidad óptica se realiza una transformación logarítmica del porcentaje de transmisión y se convierte en una correlación lineal y se le resta a 2 para que dicha correlación sea positiva ( $D=2-\log$  por ciento de transmisión) (Rodríguez y Ruíz, 1985).

Al comparar la motilidad de los espermatozoides obtenida con métodos objetivos (análisis asistido por computadoras; CASA) y el método subjetivo tradicional, se encontraron grandes variaciones (de 52 a 82 por ciento para CASA y 62 a 69 para mediciones con el microscopio; Farrell *et al.*, 1988). Además, con el microscopio se visualiza sólo la motilidad progresiva, pero no la velocidad de los espermatozoides y en las pruebas de nado ascendente de la velocidad de los espermatozoides tiene influencia sobre su desplazamiento. Pruebas de penetración del moco cervical por los espermatozoides, basadas en el mismo principio que el método de nado ascendente, han mostrado correlaciones positivas y significativas entre la distancia de penetración y la motilidad masal e individual de los espermatozoides (Prasad *et al.*, 1999).

Por otra parte, los valores del movimiento de los espermatozoides medidos con la técnica de la transmigración (se mide en porcentaje de espermatozoides que se mueven consistentemente hacia delante en un medio de STF), han mostrado una asociación débil con la motilidad estimada a través de la observación directa del semen con el microscopio (Schafer y Holzmann, 2000).

Se ha recurrido también al método eléctrico para evaluar la cinética de los espermatozoides, con la creación de un puente de impedancia, con el cual medir la intensidad de motilidad del semen fresco y no diluido (de carnero y de toro). El método se basa, fundamentalmente, sobre las variaciones de impedancia eléctrica, en muestras de material seminal con elevada densidad y dinamismo de espermatozoides y tales variaciones estarían relacionadas con los movimientos ondulatorios (wave-motions) de los espermatozoides.

La fotografía de tiempo se ha combinado como un método objetivo para determinar la motilidad de los espermatozoides. Se puede determinar la motilidad en cualquier etapa del procedimiento. Sin embargo, el procedimiento se ha utilizado principalmente para determinar la movilidad después de la congelación (Bearden y Fuquay, 1995).

### **Otras variables importantes de la aptitud reproductiva del toro y al macho cabrío**

*Testículos.* Un examen adicional de los sementales para completar la estimación de su capacidad reproductiva es la palpación de los testículos. Al tacto los testículos deberán sentirse firmes, sin protuberancias y libres en el escroto, sin adherencias. La cola del epidídimo deberá presentar el tamaño de un huevo de paloma (deberá estar bien delimitado) y sin estados inflamatorios. Las

características anteriores son signos de abundantes reservas de espermatozoides en este segmento del epidídimo (Neville *et al.*, 1979).

*Circunferencia escrotal.* La clasificación de la circunferencia escrotal en toros es considerada de calidad regular cuando mide de 33 a 40 cm, en aquellos toros con edad superior a los 30 meses de edad. Existen tres clasificaciones de la aptitud reproductiva de los toros: satisfactorio, dudoso e insatisfactorio. Estas se basan en la medida de la circunferencia escrotal, el porcentaje de células normales y la motilidad (Sorensen, 1982). La medición de la circunferencia escrotal es simple, rápida y exacta. Esta se hace con una cinta métrica y flexible, en la parte más ancha de los testículos. La circunferencia escrotal es un buen indicador de la pubertad en los toros jóvenes (Lunstra *et al.*, 1978) y de la cantidad y calidad del semen de los toros adultos; aunque la circunferencia escrotal tiene una baja correlación con la fertilidad de los toros (Farin *et al.*, 1982; Farin *et al.*, 1989; Neville *et al.*, 1988; Thompson y Johnson 1995; y con la morfología de los espermatozoides (Pelasz *et al.*, 1994). Otras correlaciones importantes de la circunferencia escrotal se presentan con las reservas espermáticas en el epidídimo y con el grado de pérdida del epitelio germinal ( $r=0.61$  y  $-0.50$  respectivamente; Palasz *et al.*, 1994).

Independientemente de la raza, la pubertad de los toros se alcanza cuando la circunferencia escrotal llega a los 28 cm y ésta continúa aumentando 0.032 cm/d en promedio entre los 300 y 400 días de edad. En toros adultos la circunferencia escrotal se correlaciona positivamente con la cantidad de

espermatozoides en el eyaculado, la motilidad de estos, así como el porcentaje de células espermáticas normales (Gipson *et al.*, 1987; Knights, *et al.*, 1984; Neely *et al.*, 1982). Cabe aclarar, sin embargo, que la circunferencia no es un predictor confiable de la producción de espermatozoides en toros de un año, ya que la correlación entre el tamaño testicular y la producción diaria de espermatozoides en animales jóvenes ha sido entre 0.18 y 0.53 (Johnson *et al.*, 1988).

En caprinos la disminución de la calidad seminal observada durante el invierno y la primavera podría ser un reflejo no únicamente al incremento de días largos, sino también al decremento en el tamaño testicular en este tiempo (Roca *et al.*, 1992). Lo anterior coincide con Ahmad y Noakes (1993), en su investigación que comprendió 12 meses, en donde el peso corporal aumentó durante este periodo, el tamaño testicular bajo de octubre a enero, alcanzando el valor máximo en agosto. Machado *et al.*, (1992) encontraron una correlación ( $r=0.21$ ) entre circunferencia escrotal y calidad seminal de caprinos.

Mellado (1991) determinando los criterios para evaluar machos caprinos adultos en su capacidad reproductiva, menciona que las medidas de circunferencia escrotal de 23-26 cm, 19-22 cm y < de 19 cm corresponden a satisfactorio, cuestionable y no satisfactorio, respectivamente.

*Glándulas sexuales accesorias.* Las principales glándulas accesorias en el macho son la ampolla (de ductos deferentes), las glándulas vesiculares, la próstata y las

glándulas de Cooper (también denominadas glándulas bulbouretrales). Todas ellas producen secreciones que combinadas forman la mayor parte del eyaculado. También existen otras glándulas uretrales (glándulas de Littre) y glándulas prepuciales, pero se sabe muy poco de su función o de la composición de sus secreciones.

La ampolla es una dilatación del extremo uretral del canal deferente. Está particularmente bien desarrollada en el garañón, pero falta en el verraco.

Las glándulas vesiculares están situadas a cada lado del cuello de la vejiga. En el toro y el verraco son muy grandes y contribuyen a una gran fracción del eyaculado.

La próstata está situada caudalmente, con respecto a las glándulas vesiculares, cerca de la unión de la vejiga con la uretra. En los rumiantes domésticos, la próstata es poco visible, está diseminada y no penetra en la cubierta muscular de la uretra.

Las glándulas bulbouretrales o de Cooper están asociadas con la porción caudal de la uretra y desembocan en la uretra pélvica, en su región bulbar. En los rumiantes se caracterizan por ser pequeñas (Cole y Cupps, 1996).

*Prepucio.* El prepucio está formado por una capa externa de piel, recubierta por pelos y una capa interna que envuelve la parte libre del pene. Esta última es un

tejido blando, doblado, que debe permanecer por dentro hasta la extensión del pene. Las glándulas prepuciales secretan hacia la superficie y mantienen esa área lubricada. La presencia de los músculos prepuciales: craneal y caudal, permiten al prepucio un cierto movimiento. Por lo general, este y la porción libre del pene están adheridos en el neonato, pero con el continuo crecimiento del mismo y la proliferación de células en esa área, se separan gradualmente. El prepucio se convierte en una cubierta para una parte del cuerpo del pene después de la erección y extensión, lo que protege a este último durante el coito (Sorensen, 1982).

*Pene.* La observación del pene se facilita durante el estímulo con el electroeyaculador. Si no se está evaluando el semen, entonces el pene puede exponerse jalando el prepucio hacia atrás y sujetando el pene a través de la piel. Una vez que aparece el glande del pene éste se envuelve en una tira de gasa con lo cual queda firmemente sujetado. El pene sujetado se jala hacia adelante hasta lograr un desenvaine total, lo que permite observar el órgano completo. El pene deberá estar libre de laceraciones o sobre crecimientos. Se deberá examinar, además, para asegurarse de que tenga las dimensiones y el tamaño característico de la especie (Mellado, 1991).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Localización del área de estudio**

El presente estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", ubicada en Buenavista, Saltillo Coahuila. El sitio de estudio se ubica en la latitud  $25^{\circ} 22' N$  y longitud de  $101^{\circ} 00' W$ , a una altura de 1742 metros sobre el nivel del mar. La temperatura media anual es de  $19.8^{\circ} C$  y la precipitación media anual es de 298.5 mm. El clima es seco, semicálido, con invierno fresco y extremoso (Mendoza, 1983).

### **Iniciación y duración del estudio**

La fecha de inicio de este estudio fue el 15 de junio de 1997 y finalizó el día 30 de septiembre del mismo año, con una duración aproximada a los tres meses y medio.

## **Definición y caracterización de la población**

Se utilizaron 25 eyaculados de ocho toros Charoláis y tres Hereford de 24 a 36 meses de edad. De la misma forma, se colectaron 25 eyaculados de dos machos cabríos Murciano-Granadinos y tres Anglo-Nubios adultos.

Los sementales bovinos al igual que los caprinos fueron estabulados y sometidos a un examen de salud y una vez aprobados, iniciaron con un nuevo programa de alimentación que consistió en el uso de heno de alfalfa, concentrado comercial y minerales, de acuerdo a las necesidades nutricionales indicadas por NRC (1981).

## **Preparación del patrón de fotografías de eyaculados**

A cada eyaculado obtenido mediante el uso del electroeyaculador, se le midió la concentración de espermatozoides con el hemocitómetro, procediéndose luego a tomar una fotografía del tubo de ensayo conteniendo el semen. Las fotografías fueron tomadas con película ISO 400/27° a color, sin flash, fotografiándose los tubos de ensayo en forma individual y sobre un fondo oscuro. De las fotografías tomadas se seleccionaron 10 para cada especie, las cuales fueron recortadas dejando solo una banda con la imagen de los tubos de ensayo conteniendo el semen. Enseguida, se pegaron las fotografías recortadas sobre una cartulina, ordenando éstas de menor a mayor concentración (rango de 500 x

$10^6$  a  $1,300 \times 10^6$  para los toros; y de  $1,900 \times 10^6$  a  $3,500 \times 10^6$  para los machos cabrios (Figura 3.1).

### **Estimación de la concentración de espermatozoides para evaluaciones objetivas del semen con el patrón de fotografías**

Se obtuvieron con electroeyaculador, 25 eyaculados de tres toros Hereford y ocho Charoláis de 24 a 36 meses de edad (eyaculados distintos a los utilizados para el patrón de fotografías). Así mismo, se obtuvieron, también con electroeyaculador, 25 eyaculados de cinco machos cabrios adultos: dos Murciano-Granadinos, dos Alpinos y un Criollo.

Para cada eyaculado, inmediatamente después de la colección, se midió la concentración de espermatozoides con dos técnicas: hemocitómetro y la comparación directa del semen con el patrón de fotografías de eyaculados previamente elaborados. Todos los eyaculados se obtuvieron en el transcurso de una semana.

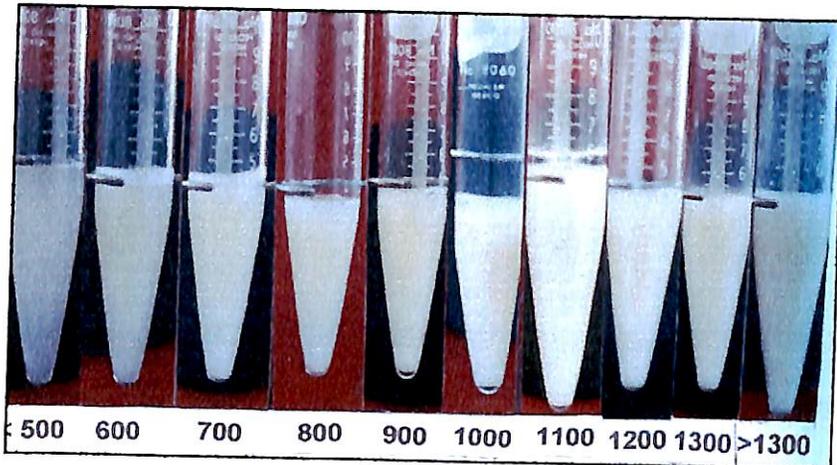


Figura 3.1. Esquema del patrón de fotografías de eyaculados de toros, utilizado para estimar, por comparación, la concentración de espermatozoides. Cifras en la base del tubo indican millones de espermatozoides  $\text{ml}^{-1}$ .

### **Estimación de la motilidad con el nado ascendente de espermatozoides**

Además de la concentración de espermatozoides en cada eyaculado (25 de toros y 25 de machos cabríos) se midió el volumen usando tubos graduados. Inmediatamente después de la colección de semen, los tubos que lo contenían fueron colocados en un baño María a  $36^{\circ}\text{C}$ , donde permanecieron mientras se evaluaban motilidad y morfología.

Para estimar la motilidad masal, se colocó una gota de semen sin diluir en un portaobjetos calentado a  $36^{\circ}\text{C}$  y manteniendo a esa temperatura durante la evaluación. Esta estimación se registró en una escala de cinco puntos en la cual cinco indicaban la máxima motilidad y uno, inactividad total. Para medir el porcentaje de motilidad de los espermatozoides se colocó una gota de semen mezclado con una gota de solución tampón fosfatada (STF) en un porta-objetos

mantenido a 36° C. Se procedió luego a observar con el microscopio (450 aumentos), por lo menos en cinco campos el porcentaje de células con movimiento progresivo.

Para evaluar la morfología de los espermatozoides se formó una película sobre el portaobjetos de una mezcla de semen y eosina-nigrosina. Se observaron 200 células espermáticas por muestra y se registraron las anomalías primarias y secundarias.

Mientras se analizaban las evaluaciones descritas, en el fondo de tubos de sedimentación de sangre conteniendo 0.35 ml de STF, se colocaron 0.05 ml de semen. Los tubos se mantenían en baño María a 36 °C. Cada 20 minutos y por espacio de una hora y 40 minutos se midió la longitud de la columna de semen desprendida del eyaculado depositado en el fondo del tubo. Se calcularon las correlaciones (SAS, 1985) entre la distancia recorrida por los espermatozoides en las pruebas de nado ascendente y los valores de motilidad obtenidos con el microscopio. Se calcularon también los coeficientes de correlación y se ajustaron modelos de regresión para la concentración de los espermatozoides estimada con el espectro de fotografías (x) y el hemocitómetro (y) (Figura 3.2).

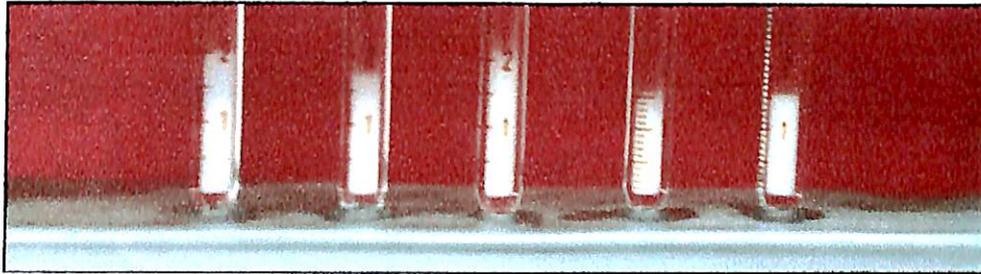
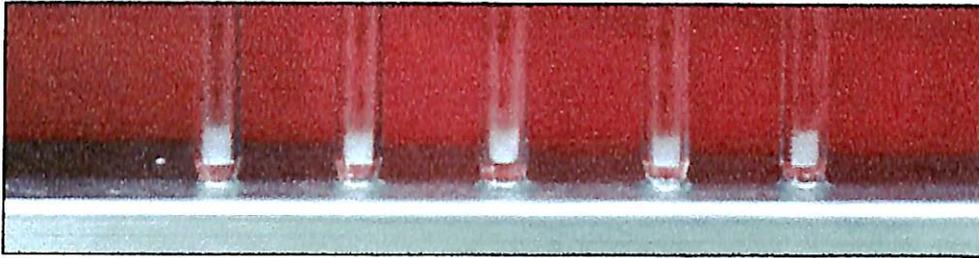


Figura 3.2. Medición de la motilidad de las células espermáticas del toro y el macho cabrío, medidas con pruebas de nado ascendente, utilizando tubos de sedimentación de sangre, con una solución tampón fosfatada.

## RESULTADOS

La asociación entre el número de células espermáticas en los eyaculados de toros y machos cabríos, estimada con el hemocitómetro o el patrón de fotografías de eyaculados se presenta en las Figuras 4.1. y 4.2. Para ambas especies los resultados mostraron una relación lineal estrecha entre los valores calculados con los dos métodos (coeficiente de correlación para toros igual a 0.93 y para machos cabríos 0.95;  $p < 0.01$ ). En los Cuadro 4.1 y 4.2 se presentan las correlaciones entre distintas variables del semen y las pruebas de nado ascendente.

En el caso de los toros, el desplazamiento ascendente del semen en un medio de STF a 20, 40, 60, 80 y 100 minutos, prácticamente no modificó el coeficiente de correlación entre estas variables y la motilidad masal e individual de los espermatozoides.

La asociación entre el nado ascendente de los espermatozoides y la concentración del semen no fue significativa ( $p > 0.05$ ) y el porcentaje de espermatozoides normales presentó correlaciones bajas (0.11 o menos con las pruebas de nado ascendente del semen).

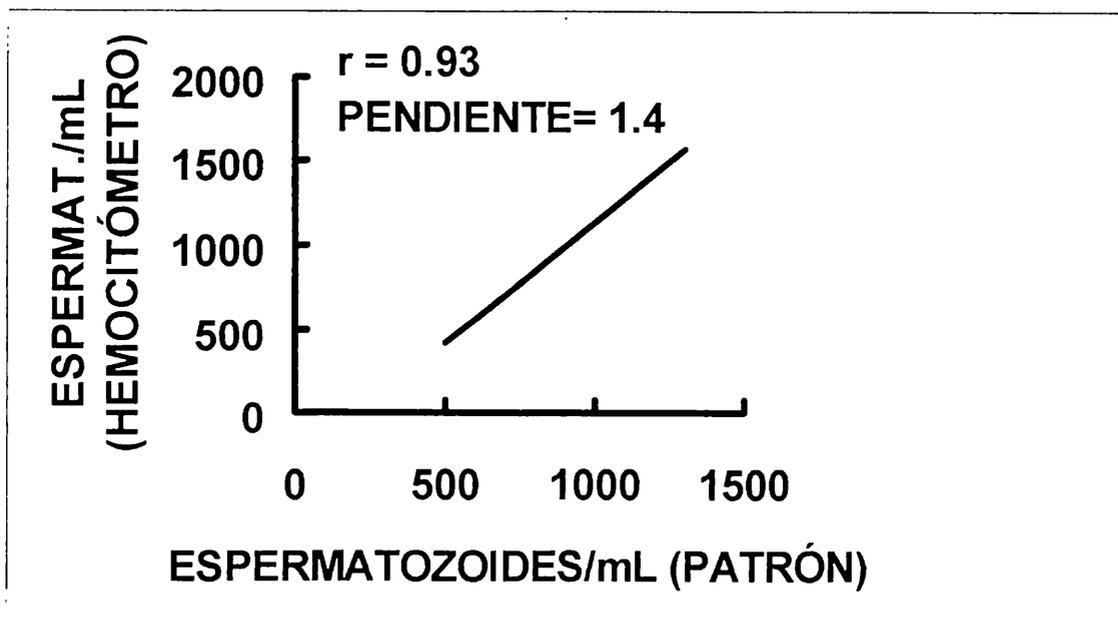


Figura 4.1 Correlación entre la concentración de espermatozoides de toros Charolais y Hereford, medida con hemocitómetro o a través de la comparación del semen con un patrón de fotografías de eyaculados de concentración conocida.

Al igual que en los toros, en los machos cabríos las correlaciones más altas se presentaron entre la motilidad masal e individual y el nado ascendente de los espermatozoides. Sin embargo, a diferencia de los toros, en los machos cabríos la asociación entre el desplazamiento de los espermatozoides a los 60, 80 y 100 minutos no fue significativa.

Tanto en los toros, como en los machos cabríos, las correlaciones entre el porcentaje de células normales y la concentración del eyaculado, con el desplazamiento ascendente de los espermatozoides en diferentes tiempos, no fueron significativas.

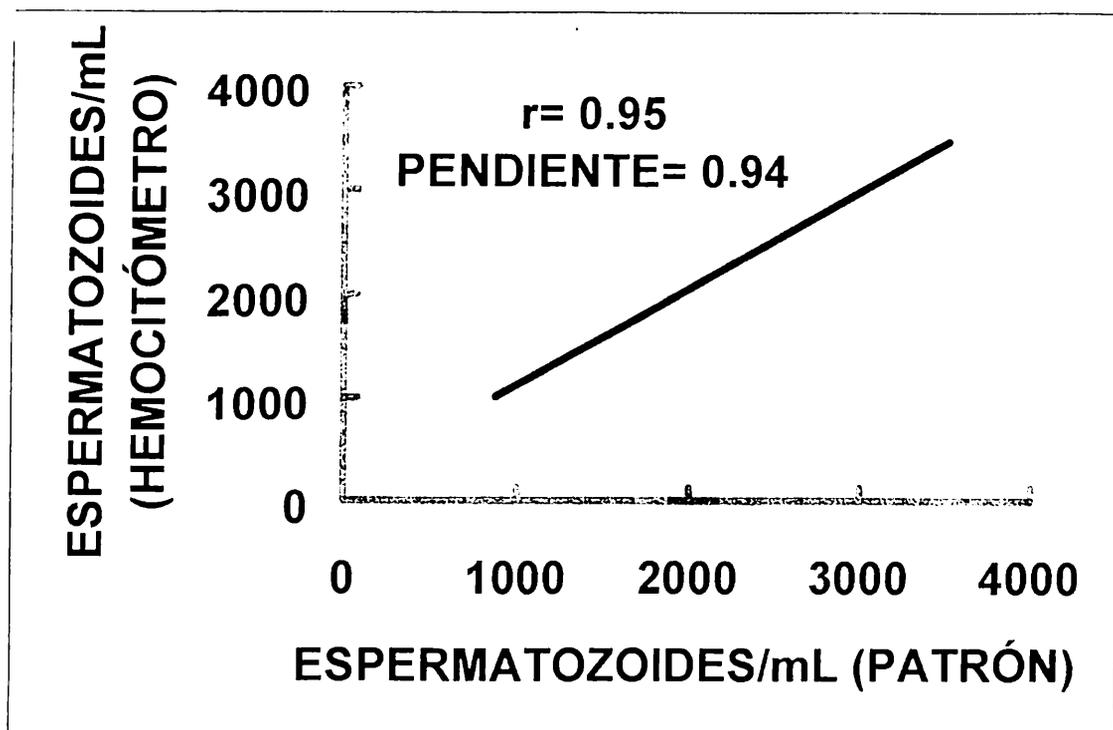


Figura 4.2 Correlación entre la concentración de espermatozoides de machos cabríos, medida con hemocitómetro o a través de la comparación del semen con un patrón de fotografías de eyaculados de concentración conocida.

El nivel de avance que por medio del nado ascendente realizaron los espermatozoides del toro, a los primeros 20 minutos, fue de 0.83 cm (Cuadro 4.3), cuando la motilidad individual observada al microscopio fue del 80 por ciento y dicho avance mejoró, respectivamente un 20.5, 44.6, 56.6 por ciento a los 40, 60 y 80 minutos siguientes, para mostrar finalmente un avance poco importante a los 100 minutos.

Mientras que para motilidades del 40 por ciento se reflejó a los primeros 20 minutos un nivel de avance de 0.54 cm y presentó mejoras del 5.5, 10.5 y 12.3 por

ciento a los 40, 60 y 80 minutos, respectivamente, para decrecer 1.8 a los 100 minutos.

Cuadro 4.1 Coeficientes de correlación entre algunas variables del semen de toros y el nado ascendente de los espermatozoides.

	Nado ascendente (minutos)				
	20	40	60	80	100
<b>Toros</b>					
Motilidad masal	0.65*	0.67*	0.67*	0.64*	0.63*
Motilidad individual	0.59*	0.62*	0.57*	0.57*	0.57*
Porcentaje células normales	0.05	0.11	0.06	0.06	0.06
Concentración	0.38	0.44	0.43	0.33	0.30

\*P<0.01

El valor medio de avance que a través del nado ascendente realizaron los espermatozoides del macho cabrío a los primeros 20 minutos, fue de 1.00 cm (Cuadro 4.4), cuando la motilidad observada al microscopio era del 80 por ciento, superando con ello al toro en un 17 por ciento y el avance mejoró respectivamente un 20, 30 y 40 por ciento a los 40, 60 y 80 minutos siguientes.

Cuadro 4.2 Coeficientes de correlación entre algunas variables del semen de machos cabríos y el nado ascendente de los espermatozoides.

	Nado ascendente (minutos)				
	20	40	60	80	100
Machos cabríos					
Motilidad masal	0.52*	0.47*	0.34	0.38	0.34
motilidad individual	0.59*	0.51*	0.36	0.40	0.33
Porcentaje células normales	0.20	0.29	0.25	0.27	0.21
Concentración	0.24	0.14	0.11	0.13	0.16

\*P<0.01

Mientras que para motilidades del 40 por ciento se refleja a los primeros 20 minutos un nivel de avance de 0.51 cm y presenta mejoras del 6.0 por ciento a los 40 minutos, para mantenerse durante los 60 y 80 minutos y decrecer el 1.0 por ciento a los 100 minutos.

El blanco grisáceo fue el color que con mayor frecuencia 72 por ciento se encontró en el eyaculado del toro, mientras que para el macho cabrío fue 62.5 por ciento el blanco amarillento (Cuadro 4.5).

Cuadro 4.3 Velocidad y nivel de avance ascendente (cm) de los espermatozoides del toro, en tubo conteniendo una solución tampón fosfatada (STF).

	Nado ascendente (minutos)				
	20	40	60	80	100
Motilidad 80 por ciento	0.83	1.00	1.20	1.30	1.32
Motilidad 70 por ciento	0.74	0.87	0.99	1.00	1.13
Motilidad 60 por ciento	0.56	0.67	0.71	0.71	0.73
Motilidad 40 por ciento	0.54	0.57	0.60	0.61	0.60

En los Cuadros 4.6 y 4.7 se presentan algunas características del eyaculado de los toros y machos cabríos, además de algunas mediciones corporales de estas especies. Las variables macroscópicas y microscópicas del semen, tanto en el toro como en el macho cabrío, presentan ligeras diferencias, exceptuando la concentración de espermatozoides promedio por mililitro y el volumen de eyaculado obtenido por medio del electroeyaculador. Destaca una evaluación general con mejor calidad para el macho cabrío una vez que esta se compara con la evaluación general del toro.

Cuadro 4.4 Velocidad y nivel de avance promedio (cm) de los espermatozoides del macho cabrío, en tubo conteniendo una solución tampón fosfatada (STF).

	Nado ascendente (minutos)				
	20	40	60	80	100
Motilidad 80 por ciento	1.00	1.20	1.30	1.40	1.40
Motilidad 70 por ciento	0.86	1.00	1.10	1.20	1.20
Motilidad 60 por ciento	0.70	0.76	0.81	0.84	0.84
Motilidad 50 por ciento	0.64	0.70	0.75	0.77	0.84
Motilidad 40 por ciento	0.51	0.57	0.57	0.57	0.56

Cuadro 4.5 Los colores del semen en el toro y el macho cabrío y su frecuencia de casos medidos en porcentajes.

COLOR DEL SEMEN	ESPECIES EN ESTUDIO	
	Toros (porcentaje)	Machos cabríos (porcentaje)
Blanco grisáceo	72.0	33.3
Blanco amarillento	16.0	62.5
Blanco pardo	4.0	-
Verde amarillento	-	4.2
Blanco verdoso	4.0	-

Cuadro 4.6 Los valores promedio de las variables del semen en el toro y el macho cabrío.

VARIABLES	ESPECIES EN ESTUDIO	
	Toros	Machos cabríos
pH	6.77	6.83
Volumen eyaculado (ml)	4.78	2.25
Concentración (millones/ml)	849.60	2961.00
Motilidad individual (porcentaje)	70.80	75.40
Células normales (porcentaje)	89.76	89.00

Cuadro 4.7 Variables importantes de la aptitud reproductiva del toro y al macho cabrío.

VARIABLES	ESPECIES EN ESTUDIO	
	Toros	Machos cabríos
Temperatura corporal (°C)	38.50	39.20
Circunferencia escrotal (cm)	34.50	28.20
Condición corporal (escala 1-9)	5.00	3.00
Evaluación general (base 100)	75.28	83.50

## **DISCUSIÓN**

### **Concentración de espermatozoides**

Las altas correlaciones entre los valores de concentración de semen obtenidos con hemocitómetro y con el espectro de fotografías de eyaculados, indican que el número de células espermáticas del semen puede ser estimado, con un grado de precisión aceptable, mediante el patrón de fotografías desarrollado en este estudio. Este método presenta ventajas en relación con los tradicionales, pues es simple, rápido y no requiere instrumentos. Dada la subjetividad de este método, no es apropiado en situaciones experimentales donde se requiere precisión extrema en la cuantificación de células espermáticas del eyaculado; pero parece adecuado en exámenes de rutina de aptitud reproductiva de machos cabríos y toros.

### **Motilidad de los espermatozoides**

Los coeficientes de correlación entre la motilidad del semen y el nado ascendente de los espermatozoides no rebasaron 0.67 en el caso de los toros y 0.59 en los machos cabríos. La subjetividad de la evaluación no permite esperar

valores mayores. Al comparar la motilidad de los espermatozoides medida con métodos objetivos (análisis asistido por computadoras; CASA) y el método subjetivo tradicional, se encontraron grandes variaciones (de 52 a 82 por ciento para CASA y 62 a 69 por ciento para mediciones con el microscopio; Farrell *et al.*, 1988). Además, con el microscopio se visualiza sólo la motilidad progresiva, pero no la velocidad de los espermatozoides y en las pruebas de nado ascendente la velocidad de los espermatozoides tiene influencia sobre su desplazamiento. Pruebas de penetración del moco cervical por los espermatozoides, basadas en el mismo principio que el método de nado ascendente descrito en el presente estudio, han mostrado correlaciones positivas y significativas entre la distancia de penetración y la motilidad masal e individual de los espermatozoides (Prasad *et al.*, 1999). Por otra parte, los valores del movimiento de los espermatozoides medidos con la técnica de la transmigración (se mide el porcentaje de espermatozoides que se mueven consistentemente hacia delante en un medio de STF), han mostrado una asociación débil con la motilidad estimada a través de la observación directa del semen con el microscopio (Schafer y Holzmann, 2000).

Pruebas de nado ascendente para evaluar la motilidad del semen se han hecho en borregos (Suttiyotin y Thwaites, 1992), machos cabríos (Majunder y Chakrabarti, 1984), toros (Deana *et al.*, 1986) y humanos (Sokoloski *et al.*, 1977). En ellas se utilizaron métodos espectrofotométricos para medir la turbidez de la columna de semen desprendida durante el ascenso de los espermatozoides. Los resultados de estas pruebas (protocolos distintos en cada caso) muestran correlaciones entre la turbidez de los espermatozoides suspendidos en la solución

fisiológica y la motilidad de éstos, cercanas o superiores (0.63 a 0.91) a las observadas en el presente estudio. En este trabajo se optó por medir la longitud de la columna de espermatozoides desprendida de la fracción de semen depositada en el fondo del tubo en el lugar de la turbidez. Con lo anterior se simplifica la estimación de la motilidad pues no se requiere un espectrofotómetro, como en los protocolos de estudios previos.

Para los toros y los machos cabríos las correlaciones entre la motilidad masal e individual y el nado ascendente de los espermatozoides a diferentes tiempos fueron en general moderadas, pero significativas. Considerando que con más de 60 minutos de desplazamiento del semen no se incrementaron de forma importante los coeficientes de la correlación entre estas dos variables, o incluso se redujeron en el caso de semen de caprinos, parece pertinente que las pruebas de nado ascendente del semen en STF, como indicativo de la motilidad de los espermatozoides, se limiten a los primeros 60 minutos. Conforme el eyaculado envejece produce ácido láctico, como resultado de la glucólisis y la acumulación del ácido disminuye el pH, lo que a la vez reduce la motilidad de los espermatozoides (Nutti, 1990). Dicha acidez degenera los procesos enzimáticos intracelulares y si a ello se agrega la alta concentración espermática del eyaculado en el macho cabrío, se incrementará la proporción potasio-sodio en el semen y el potasio es un inhibidor metabólico natural (Cheville, 1980; Bearden y Fuquay, 1995).

La concentración y el porcentaje de espermatozoides normales presentaron correlaciones de moderadas a bajas con el nado ascendente de los espermatozoides. Lo anterior concuerda con resultados de Schafer *et al.*, (1997) quienes no encontraron asociaciones significativas entre la tasa de transmigración y el número y porcentaje de células espermáticas anormales en semen de caninos.

En el semen normal los espermatozoides tienen cargas eléctricas negativas, con lo que se repelen entre sí (Evans y Maxwell, 1990). Es por tanto conveniente señalar cuando el eyaculado contiene buena motilidad y alta concentración, al provenir de machos descansados la aglomeración genera una fuerza de empuje hacia arriba durante los 20 y 40 minutos,

La fertilidad está altamente correlacionada con el número de espermatozoides móviles inseminados y el porcentaje de motilidad de un eyaculado puede variar de 0 a 80 por ciento (Bonadonna, 1989) y se sabe que en toros la velocidad de movimiento hacia delante de un espermatozoide, suspendido en plasma seminal, es de 4.5-5.0 mm por minuto bajo un campo microscópico. Mientras que en el macho cabrío es de 5-15 mm por minuto, con promedio de 7 mm por minuto (Evans y Maxwell, 1990). Los valores medios encontrados, coinciden con una mayor motilidad para los eyaculados del macho cabrío 75.4 por ciento comparado con 70.8 por ciento del toro.

Se considera que para el toro el pH fluctúa entre el 6.3 -6.9 y para el caprino fluctúa entre 6.5-7.4 (Nutti, 1990; Salisbury *et al.*, 1978). Los valores encontrados coinciden con estudios anteriores, ya que múltiples valores de la literatura indican que para el toro es 6.77 y 6.83 para el macho cabrío.

La fertilidad en el toro no se ve afectada hasta que el número de espermatozoides anormales es mayor de 20 a 25 por ciento, mientras que el semen del macho cabrío se considera como útil para su uso, cuando el porcentaje de anomalías morfológicas (primarias y secundarias) no exceda del 15 por ciento (Bearden y Fuquay, 1995; Nutti, 1990). Los valores que se desprenden de ésta investigación, coinciden con lo anterior ya que señalan un 10.2 por ciento de anomalías para el toro y un 11 por ciento para el macho cabrío.

Existen tres clasificaciones de la aptitud reproductiva de los toros: satisfactorio, dudoso e insatisfactorio. Estas se basan en la medida de la circunferencia escrotal, el porcentaje de células normales y la motilidad. La clasificación de la circunferencia escrotal en toros es considerada de calidad regular cuando mide de 33 a 40 cm en aquellos toros con edad superior a los 30 meses de edad (Sorensen, 1982), mientras que en caprinos, la circunferencia escrotal de 23-26 cm, 19-22 cm y < de 19 cm corresponden a satisfactorio, cuestionable y no satisfactorio, respectivamente (Mellado, 1991). Los valores encontrados para el toro y el macho cabrío corresponden a 34.5 y 28.2 cm, respectivamente.

## CONCLUSIONES

La comparación de eyaculados de toros y machos cabríos con patrones de fotografías de eyaculados de diferentes concentraciones de estas especies, permite estimar, en forma rápida y con relativa confiabilidad, la concentración de células espermáticas. Por otro lado, el nado ascendente de los espermatozoides, medido como el desplazamiento durante 20 y 40 minutos de las células espermáticas del fondo de un tubo de sedimentación de sangre conteniendo STF, permite estimar con muy buena precisión la motilidad de los espermatozoides.

## RESUMEN

Veinticinco eyaculados de cinco toros Charoláis y tres Hereford de 24 a 36 meses de edad y 25 eyaculados de dos machos cabríos granadinos y tres Nubios adultos, se usaron para estimar la concentración de células espermáticas y compararlos con un patrón de fotografías de eyaculados de concentración conocida. De estos eyaculados se tomaron 0.05 ml de semen, los cuales se colocaron en el fondo de un tubo de sedimentación de sangre, el cual contenía 0.35 ml de solución tampón fosfatada (STF). Estos tubos se mantuvieron a 36° C en un baño María y la columna de espermatozoides desprendida se midió a los 20, 40, 60, 80 y 100 minutos. Se encontraron correlaciones altas ( $p < 0.01$ ) entre los valores de concentración de espermatozoides determinados por el patrón de fotografías y el hemocitómetro ( $r = 0.93$  para toros;  $r = 0.96$  para machos cabríos). Correlaciones más bajas, pero significativas ( $p < 0.01$ ), se observaron entre valores de motilidad individual determinados por las pruebas de nado ascendente durante 20 y 40 minutos y las observaciones con el microscopio ( $r = 0.59$  para toros y machos cabríos). Se concluyó que la concentración de los espermatozoides puede ser estimada fácilmente y con una precisión razonable, comparando los eyaculados de toros y machos cabríos con un patrón de fotografías de eyaculados

de concentración conocida. También, la distancia recorrida por los espermatozoides en pruebas de nado ascendente en una solución tampón fosfatada y con duración de 20 y 40 minutos, es indicativa, con muy buena precisión, de la motilidad de los espermatozoides.

## LITERATURA CITADA

- Ahmad, N. and D. E. Noakes. 1993. Seasonal variations in the semen quality, libido and testicular size the British goats. *J. Reprod. Fertil.* 11:63-69.
- Anderson, J. 1945. *The semen of animals and its use for artificial insemination.* Imper. Bureau Animal Breeding, Genetics.
- Arbiza, A. S. I. 1978. Bases de la cría de cabras, Fascículo V., U.N.A.M. Cuautitlán Depto. Veterinaria, México D.F.
- Bearden, C. D. and R. E. Fuquay. 1995. *Reproducción Animal Aplicada. El Manual Moderno,* México. p. 358.
- Bloom, E., 1950. A one minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertil. Steril.* 1: 176-179.
- Bonadonna, T. 1989. *Reproducción Animal e Inseminación Artificial.* Edit. Hemisferio Sur, S. A. Argentina. p. 608.
- Burbank, R. C. 1935. The quantitative standarization of sperm suspensions by means of opacity. *Quart. J. Exp. Physiol.* 25:393-400.
- Cheville, F. Norman. 1980. *Patología Celular,* Ed. Acribia. España. p. 214.
- Coffin, D. F. 1986. *Manual of veterinary clinical pathology.* Ed. Com. Stock Publ. Co. Ithaca, N.Y.
- Cole H. H. y P. T. Cupps. 1996. *Reproducción de los animales domésticos,* Edit. Acribia, España. p. 550.
- Deana, R., C. Foresta, G. Bonaga and F. Rigoni. 1986. A simple nephelometric method for mesuring the progressive motility and collecting motile spermatozoa. *Andrology* 18: 37-41.

- Derivaux, J. 1982. Reproducción de los animales domésticos. Acribia, España.
- Drayson, J.E. 1982. How to determine herd bull fertility. A manual for purebred cattleman, commercial cattleman, veterinarians, professors and students of agriculture, anybody involved in the cattle industry. Falcon Press Publishing. Montana, USA.
- Evans, G., and W.M.C. Maxwell. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Acribia, España.
- Embert, D. E. 1978. Patología clínica veterinaria. Uthea, España. p. 350.
- Farin, J.E., P.J. Chenoweth, D.F. Tomky, L. Ball, J. E. Pexton. 1989. Breeding soundness, libido and performance of bulls mated to estrus synchronized females. *Theriogenology* 32:717-725.
- Farin, P.W., P.J. Chenoweth, E.R. Mateos, J.E. Pexton. 1982. Beef bulls mated to estrus synchronized heifers: single vs. multisire breeding groups. *Theriogenology* 17:363-372.
- Farrell, P. B., G. A. Presicce, C.C. Brockett, and R.H. Foote. 1988. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 49:871-879.
- Gipson, T.A., D.W. Vogt, J.W. Massey, M.R. Eilersieck. 1987. Association of scrotal circumference with semen traits in young beef bulls. *Theriogenology* 24:217-225.
- Gutiérrez, J.P. y O.R. Rivera. 1988. Modificación al método de determinación de la concentración de espermatozoides en el semen ovino. *Tec. Pec. Méx.* 26:59-65.
- Johnson, S., G. Deutschcer and A. Parkhurst. 1988. Relationship of pelvic structure, body measurements, pelvic area, and calving difficulty. *J. Anim. Sci.* 66:1081-1088.
- Hafes, E.S.E. 1985. Reproducción e inseminación artificial en animales. Ed. Interamericana. P. 506.
- Jaakma, U., B.R. Zhang, B. Larsson, K. Niwa, H. Rodríguez-Martinez. 1997. Effects of sperm treatments on the in vitro development of bovine oocytes in semidefined and defined media. *Theriogenology* 48: 711-720.
- Knights, S.A., R.L. Baker, D. Gianola and J. B. Gibb. 1984. Estimates of heritabilities and genetic and phenotypic correlations among growth and reproductive traits in yearling Angus bull. *J. Anim. Sci.* 58:887-893.

- Lunstra, D.D., J.J. Ford and S.E. Echternkamp. 1978. Puberty in beef bull: Hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production, and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. *J. Anim. Sci.* 46:1054-1062.
- Machado R., A. A. Simplicio y D. O. Santos. 1992. Freezing of goat semen: Selection of donor males. *Anim. Breed. Abstr.* 44:138-143.
- Majumder, G.C., and C. K. Chakrabarti. 1984. A simple spectrofotometric method of assay of forward motility of goat spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 70: 235-241.
- Mellado, M. 1991. Producción de caprinos en pastoreo. Ed. UAAAN, Buenavista Saltillo, Coahuila. 416 p.
- Mendoza, H. J. M. 1983. Diagnóstico climatológico para la zona de influencia inmediata de la U.A.A.A.N. México, D. F. pp. 2-3.
- Muhuyi, W., E. Z. Drobnis, E. A. Nelson and T. N. Lin. 1982. Seasonal breed and age influence on production and freezability of dairy goat semen. In: *Proceedings of the Third Internacional Conference on Goat Droduction and disease*. P. 282. University of Arizona, Tucson.
- National Academy of Science. 1981. Nutriment requirements of goat: angora, dairy, and meat goat in temperate and tropical countries. National Academic Press, Washington.
- National Research Council (NRC). 1981. Nutrient requirements of domestic animals. Nutrient requirements of goats, Vol. 15. National Academy of Sciences, Washington, D.C.
- Neely, J.D., B.H. Johnson, E.U. Dillard and O. W. Robinson. 1982. Genetic parameters for testes size and sperm number in Hereford bulls. *J. Anim. Sci.* 63:409-417.
- Neville, W.E., J.B. Smith and W.C. MaCormick. 1979. Reproductive performance of two and three year old bull assigned twenty-five or forty cows during the breeding period. *J. Anim. Sci.* 48:1020:1025.
- Neville, W.E., K.L. Richardson and P.R. Utley. 1988. Breeding performance of bulls assigned to 40 or 50 cows per bull during the breeding period. *J. Anim. Sci.* 66:613-617.
- Nuti, L. C. 1990. Semen collection and processing manual. Coperative Agricultural Research Center. Prairie View A&M University, Prairie view, Texas.

- Ortavant, B. 1959. Spermatogenesis and morphology of the spermatozoa. In *Reproduction in Domestic Animals*, Edited by H. H. Cole and P. T. Cups, Vol. 11, p. 1 Academic Press, New York.
- Palasz, A. T., W. F. Cates, A. D. Barth and R. J. Mapletoft. 1994. The relationship between scrotal circumference and quantitative testicular traits in yearling beef bulls. *Theriogenology* 42:715-726.
- Palomo, M.J., D. Izquierdo, T. Mogas, M.T. Paramio. 1999. Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 51:927-940.
- Pérez, R. J.I. Martí, A. Tejedor, T. Muino-Blanco, J.A. Cebrian-Pérez. 1999. Sperm-lectin agglutination combined with swim-up leads to an efficient selection of highly motile, viable and heterogeneous ram spermatozoa. *Theriogenology* 51: 623-636.
- Peters, A.R. y P.J.H. Ball. 1991. Reproducción en la hembra. Ed. Acribia. España. p. 222.
- Prasad, J. K., S. Kumar, G. Mohan, S. K. Agarwal, and U. Shankar. 1999. Simple modified method for cervical mucus penetration test for quality assessment of bull semen. *Indian J. Anim. Sci.* 69:103-105.
- Quiroga, V. E. J. 1978. Extracción, evaluación, dilución y conservación del semen caprino utilizando dos diluyentes y un método de congelación durante la primavera y el verano. Tesis licenciatura ITESM, Nuevo León.
- Ramírez G. J. A., y G. B. Miller. 1995. Adelantos biotécnicos en reproducción animal aplicada a bovinos de carne. Teseachic. pp. 60.
- Roca, J. E. Martínez, M. A. Sánchez-Velarde, S. Ruiz and J.M. Vásquez. 1992. Seasonal variations of sperm of sperm abnormalities. *Theriogenology* 38:115-122.
- Rodríguez, R.O.L. y D. R. Ruiz. 1985. Calibración de un espectrofotómetro y fotocolorímetro para la estimación rápida de la concentración de espermatozoides en el semen de bovinos. *Tec. Pec. Méx.* 48:116-122.
- Salisbury, G. W., N. L. VanDermak y J.R. Lodge. 1978. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. Acribia. Zaragoza, España.
- SAS. 1985. User's Guide: Statistics. SAS institute Inc., Cary NC.

- Schafer, S., and A. Holzmann. 2000. The use of transmigration and spermac<sup>TM</sup> stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 59: 201-211.
- Schafer, S., A. Holzmann, and K. Arbeiter. 1997. Investigation into the transmigration rate of short-term conserved canine sperm. *Repr. Dom. Anim.* 32: 285-289.
- Sorensen, A. M. 1982. *Reproducción animal: Principios y Prácticas*. McGraw-Hill, México.
- Sokoloski, J. E., L. Blasco, B T. Storey and D. P. Wolf. 1977. Turbidimetric analysis of human sperm motility. *Fertility and Sterility* 28: 1337-1341.
- Suttiyotin, S., and C. J. Thwaites. 1992. Comparison of a swim-up technique with the Hamilton Thorn motility analyzer for measurement of sperm velocity and motility. *Repr. Fert. Dev.* 4: 153-160.
- Suttiyotin, S., and C. J. Thwaites. 1993. Evaluation of ram semen motility by a swim-up technique. *J. Repr. Fert.* 97: 339-345.
- Thompson, J.A. and W. H. Johnson. 1995. Scrotal size of yearling sires and early calving in beef herds: epidemiological investigation of possible causal pathways. *Theriogenology* 43: 1279:1287.
- Trejo, G. A. A. 1984. Manejo del semental caprino. *Ganadero* 9:64-72.
- Watson, P. F., 1979. *Oxford Reviews of Reproductive Biology* 1: 283-289..
- Zerfas, H. P. and J. Steinbach. 1982. Comparative studies on the quality and freezability of Alpine on the quality and freezability of Alpine and Boer goat semen. In: *Proceeding of the Third International Conference on Goat Production and Disease*. p. 285. The University of Arizona, Tucson. AR, USA.