

Relación entre la prueba de reducción del azul de metileno con la actividad metabólica y los parámetros macro y microscópicos del semen fresco de bovino

Cristian Geovanni Carvajal Córdova

ZAMORANO

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Noviembre, 2006

Relación entre la prueba de reducción del azul de metileno con la actividad metabólica y los parámetros macro y microscópicos del semen fresco de bovino

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el grado
Académico de Licenciatura

presentado por

Cristian Geovanni Carvajal Córdova

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2006

El autor concede a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos del
autor

Cristian Geovanni Carvajal Córdova

Honduras
Noviembre, 2006

Relación entre la prueba de reducción del azul de metileno con la actividad metabólica y los parámetros macro y microscópicos del semen fresco de bovino

presentado por
Cristian Geovanni Carvajal Córdova

Aprobada:

John J. Hincapié, Ph.D.
Asesor Principal

John J. Hincapié, Ph.D.
Coordinador Área
Temática Zootecnia

Isidro Matamoros, Ph.D.
Asesor

Abelino Pitty, Ph.D.
Director Interino Carrera de
Ciencia y Producción
Agropecuaria

Rogel Castillo, M.Sc
Asesor

George Pilz, Ph.D.
Decano Académico

Kenneth L. Hoadley, D.B.A
Rector

DEDICATORIA

A mis padres Javier Rodrigo Carvajal y Rosa Lucila Córdova por sus consejos, confianza y apoyo incondicional toda la vida.

A mi hermana Verónica y mi hermano Rodrigo por su comprensión y apoyo en todo momento.

A mi abuelo Tarquino Córdova (Q.E.P.D.) por sus consejos, enseñanzas, apoyo, confianza y por ser un ejemplo para todos nosotros.

A mis tíos José Córdova, Gustavo Córdova, Ernesto Córdova (Q.E.P.D.) y Eduardo Carvajal por su apoyo y confianza.

A mi primo Joffre Córdova por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mi padre Rodrigo por su confianza, apoyo y su ejemplo de trabajo.

A mi madre Rosita por sus consejos, lágrimas, y sacrificios que siempre realiza para el bien de sus hijos.

A mi hermana Verónica y mi hermano Rodrigo por ser uno de los principales motivos para culminar mi carrera.

A Gabriela Montero por su amor, confianza y apoyo incondicional.

Al Dr. John Jairo Hincapié y al Ing. Rogel Castillo por la ayuda, consejos y amistad.

A Ángel Alban por su apoyo y confianza.

A Paúl Castellanos, David Córdova, David Pazmiño y Marco Lara por la hermandad, apoyo y sinceridad que me demostraron en estos años.

A Verónica Pozo, Sofía Guardado, Diana Guevara, Diana Jaramillo y Gabriela Galarza por brindarme su amistad, consejos, apoyo y confianza a lo largo de esta etapa.

A Zamorano por formarme como profesional y como persona.

RESUMEN

Carvajal, C. 2006. Relación entre la prueba de reducción del azul de metileno con la actividad metabólica y los parámetros macro y microscópicos del semen fresco de bovino. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 19 p.

El objetivo del estudio fue determinar la relación entre la prueba de reducción del azul de metileno con la actividad metabólica y los parámetros macro y microscópicos del semen fresco de bovino; los objetivos específicos fueron determinar el Tiempo de Reducción de Azul de Metileno en toros en trabajo y descanso, y determinar las correlación ente el Tiempo de Reducción de Azul de Metileno con la condición corporal, circunferencia escrotal, volumen, concentración, pH y motilidad en masa e individual. El estudio se llevó a cabo en la Hacienda Santo Domingo en el municipio de Patuca e instalaciones del Laboratorio de Reproducción Animal del Fondo Ganadero de Honduras ubicado en Comayagua y el Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Agrícola Panamericana. Las variables analizadas fueron tiempo de reducción del azul de metileno, condición corporal, circunferencia escrotal, volumen, concentración, pH, motilidad en masa e individual. Se realizó análisis de Correlación de Pearson entre el tiempo de reducción del azul de metileno y las demás variables analizadas. El programa estadístico utilizado fue el Statistical Analysis Systems (SAS 2002) con un nivel de significancia exigido de 0.05. La correlación entre el tiempo de reducción de azul de metileno y la condición corporal, circunferencia escrotal, volumen, concentración y pH no fue significativa, a diferencia de la correlación obtenida para las variables motilidad en masa e individual que se obtuvo una correlación negativa significativa ($P = 0.0001$). El Tiempo de Reducción de Azul de Metileno es menor a medida que aumenta la motilidad en masa e individual (actividad metabólica).

Palabras clave: Espermatozoides, Motilidad en Masa (MM), Motilidad Individual (MI).

CONTENIDO

	Portadilla.....	i
	Auditoría.....	ii
	Página de firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos.....	v
	Resumen.....	vi
	Contenido.....	vii
	Índice de Cuadros.....	viii
	Índice de Anexos.....	x
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
2.1.	LOCALIZACIÓN.....	4
2.2.	ANIMALES.....	4
2.3.	METODOLOGÍA.....	4
2.3.1	Evaluación de la condición corporal.....	4
2.3.2	Medición de testículos.....	4
2.3.3	Evaluación de la circunferencia escrotal.....	5
2.3.4	Recolección del semen.....	5
2.3.5	Examen macroscópico.....	5
2.3.6	Examen microscópico.....	6
2.3.7	Tiempo de Reducción de Azul de Metileno (TRAM).....	7
2.4.	VARIABLES ANALIZADAS.....	7
2.5.	DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	7
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
3.1.	CONDICIÓN CORPORAL (CC).....	8
3.2.	CIRCUNFERENCIA ESCROTAL (CE).....	9
3.3.	VOLUMEN.....	10
3.4.	pH.....	11
3.5.	CONCENTRACIÓN.....	12
3.6.	MOTILIDAD EN MASA (MM).....	13
3.7.	MOTILIDAD INDIVIDUAL (MI).....	14
4.	CONCLUSIONES.....	15
5.	RECOMENDACIONES.....	16
6.	LITERATURA CITADA.....	17
7.	ANEXOS.....	19

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros

1. Concentración de espermatozoides (en millones por mililitro) y la intensidad del movimiento masivo en relación con el Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM). 3
2. Clasificación de la motilidad en masa de los espermatozoides. 6
3. Distribución de frecuencias de la Condición Corporal y del Tiempo de Reducción de Azul de Metileno (TRAM). 8
4. Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM) de acuerdo a la categoría (trabajo/descanso) y la Condición Corporal (CC). 9
5. Distribución de frecuencias de la circunferencia Escrotal y del Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM). 9
6. Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM) de acuerdo a la categoría (trabajo/descanso) y la Circunferencia Escrotal (CE). 10
7. Distribución de frecuencias para la variable Volumen y media del Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM). 10
8. Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM) de acuerdo a la categoría (trabajo/descanso) y el Volumen. 11
9. Distribución de frecuencias para la variable pH y media del Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM). 11
10. Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM) de acuerdo a la categoría (trabajo/descanso) y el pH. 12
11. Distribución de frecuencias de la Concentración y del Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM). 12
12. Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM) de acuerdo a la categoría (trabajo/descanso) y la Concentración. 13
13. Distribución de frecuencias para la variable Motilidad en Masa y media del Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM). 13

14. Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM) de acuerdo a la categoría (trabajo/descanso) y la Motilidad en Masa (MM). 13
15. Distribución de frecuencias para la variable Motilidad Individual y media del Tiempo de Reducción de Azul de Metileno (TRAM). 14
16. Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM) de acuerdo a la categoría (trabajo/descanso) y la Motilidad Individual (MI). 14

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

1. Tabla para leer la densidad del eyaculado de toro 10^6 espermatozoides/mL. 19

1. INTRODUCCIÓN

No hay duda que uno de los pilares principales de la producción pecuaria y la fuente fundamental de proteínas de origen animal para la alimentación del pueblo es el ganado bovino; el desarrollo de esta especie animal, la mejora de sus características productivas, y el aseguramiento de su salud, son algunas de las tareas más importantes de la ganadería y la medicina veterinaria (Holý 1987).

El desafío de los ganaderos es optimizar la fertilidad de los toros ya que es uno de los principales factores para mejorar el retorno económico y obtener altos índices de preñez en períodos cortos de tiempo; por dicha razón, el evaluar los toros es una de las prácticas para producir eficientemente.

Tradicionalmente se ha puesto un mayor énfasis en la importancia de tener hembras fértiles y menos en la importancia de tener toros fértiles. Esto debido a que se asume incorrectamente que todos o la gran mayoría de los toros tienen buena fertilidad. Sin embargo, en la población general de toros, incluso de la misma raza y edad se observan grandes diferencias en la capacidad reproductiva desde estériles y subfértiles hasta toros altamente fértiles (Duchens 1999).

Según Agrobot (2005) en poblaciones no controladas de toros, uno de cada cinco es subfértil o con poca habilidad de monta o de pobre calidad seminal. Esto se traduce en bajas tasas de preñez o períodos largos de servicio. Cualquiera de estas dos consecuencias representa una disminución en la productividad para el ganadero.

La evaluación de la fertilidad potencial de los toros es una manera eficiente y confiable de identificar toros que tienen bajo potencial reproductivo. La evaluación es también importante para identificar a los toros con potencial reproductivo satisfactorio a excelente, los que pueden utilizarse en la monta con un mayor número de hembras. Lo anterior mejoraría la eficiencia reproductiva y permitiría un mayor progreso genético (Duchens 1999).

Para elegir los reproductores a utilizarse en monta natural o en programas de inseminación artificial, se debe tener como objetivo principal animales con fertilidad comprobada o con potencialidad para alcanzar mayores niveles de productividad (Bury 2001).

Una evaluación de rendimiento reproductivo es una predicción de la capacidad reproductiva potencial de un toro, esto incluye una determinación lo más objetiva posible del líbido y la capacidad física para montar una hembra, el tamaño testicular medido como circunferencia escrotal, y la calidad y cantidad de semen (Duchens 1999). Al evaluar los reproductores se deberán incluir los siguientes aspectos:

1. Examen físico, para detectar anomalías que podrían interferir con el deseo o la capacidad del toro para cubrir a una hembra.
2. Prueba de libido o capacidad de servicio. De nada servirían toros con gran capacidad de producción de semen y buena calidad seminal si no fueran capaces de depositarlo en el tracto genital de las vacas.
3. Examen de los órganos genitales, incluyendo el pene, medición de la circunferencia escrotal, palpación escrotal y testicular y examen rectal para palpar los órganos genitales internos.
4. Examen del semen, la fertilidad de una muestra de semen depende de dos factores: de la calidad del semen y el número de espermatozoides normales (Saacke *et al.* 1988).

De acuerdo a Holý (1987) todos los métodos conocidos para comprobar la calidad y fertilidad del esperma valoran únicamente síntomas de los procesos vitales de los espermatozoides, sus características morfológicas y composición bioquímica.

Una de las pruebas que se aprovecha para medir la calidad del semen es la prueba de azul de metileno la cual fue desarrollada por Sørensen en 1942. En los procesos de fructólisis y respiración del espermatozoide, se libera hidrógeno por la presencia de los sistemas enzimáticos (deshidrogenasas) y este puede reducir a su aceptor, representado en este caso por el azul de metileno, a una leucobase sin color. La decoloración del azul de metileno se realiza en condiciones anaerobias, y en presencia del oxígeno se oxida la leucobase sin color (Holý 1987).

La decoloración depende de la intensidad del metabolismo y densidad del semen y también se encuentra influido por varios factores internos y ambientales, entre estos últimos: la temperatura, pH, situación osmótica y concentración del azul de metileno. Según el tiempo de la decoloración del azul de metileno, en condiciones ambientales constantes y tomando en cuenta que el metabolismo de los espermatozoides es más o menos constante, se puede evaluar no solo la actividad metabólica sino también la densidad de los espermatozoides vivos y la fertilidad (Holý 1987).

En un estudio realizado por Gamčík y Sakala (1966 citado por Holý 1987) se midió la concentración de espermatozoides (en millones por mililitro) y la intensidad del movimiento masivo en relación con el tiempo de reducción del azul de metileno, encontrando una relación entre los tres parámetros (Cuadro 1).

Considerando la importancia que tiene evaluar la fertilidad del toro, se decidió realizar el siguiente estudio, el cual tuvo como objetivo general determinar la relación entre la prueba de reducción del azul de metileno con la actividad metabólica y los parámetros macro y microscópicos del semen fresco de bovino; y como objetivos específicos determinar el tiempo de reducción del azul de metileno en toros en periodo de trabajo y descanso y la correlación con la condición corporal, circunferencia escrotal, volumen, pH, concentración espermática, motilidad en masa e individual de animales en trabajo y descanso.

Cuadro 1. Concentración de espermatozoides (en millones por mililitro) y la intensidad del movimiento masivo en relación con el Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM).

Tiempo de reducción (minutos)	Concentración de espermatozoides por mililitro e intensidad del movimiento masivo (+)		
	+++++	++++	+++
3	1250	1310	1380
4	1100	1200	1280
5	950	1250	1160
6	765	850	950
7	590	774	873
8		692	800
10		490	720
12		340	565
12 y más	Menos de 345		565

Fuente: Holý (1987)

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LOCALIZACIÓN

El estudio se llevó a cabo de mayo a agosto 2006 en las instalaciones de la Hacienda Santo Domingo en el municipio de Patuca; en el Laboratorio de Reproducción Animal del Fondo Ganadero de Honduras en Comayagua y en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Agrícola Panamericana, Honduras

2.2. ANIMALES

Se analizaron 62 eyaculados provenientes de 62 toros de las razas: Brahman, Brangus, Angus Negro, Holstein, Pardo Suizo, Charolais, Romagnola y sus diferentes encastes, con edades comprendidas entre los 2 y 8 años. Todos los toros fueron sometidos a una revisión veterinaria, desparasitación con ivermectina al 3.5%, choque vitamínico a base de Vitaminas ADE, Complejo B y Fósforo alrededor de 30 días antes de iniciar el estudio. Todos los sementales tenían vigentes las vacunas contra carbón sintomático, además de serologías negativas a brucelosis y leptospirosis. Debido al sistema de manejo de las haciendas, un grupo de toros se encontraba en descanso mientras el otro en monta, razón por la cual fueron divididos en dos grupos de acuerdo a su situación reproductiva.

2.3. METODOLOGÍA

2.3.1 Evaluación de la condición corporal

Se realizó una evaluación subjetiva mediante observación visual por la misma persona utilizando la escala de 1 a 9 para medir la cantidad relativa de grasa subcutánea.

2.3.2 Medición de testículos

El tamaño promedio (longitud) de los testículos es de 12-16 cm. y de un diámetro de 8-10 cm. El tamaño de los testículos se establece a través de la testimetría con la determinación de tres diámetros: próximo/distal (longitud), que excluye las dimensiones de la cabeza y las colas de los epidídimos, medio/lateral (ancho) y

dorso/caudal (grosor o profundidad). El procesamiento de cientos de datos obtenidos en diferentes patrones raciales durante varios años de trabajo no evidenció diferencias en el tamaño entre ambos testículos y para simplificar el trabajo con los datos, es común multiplicar los 3 diámetros, promediado entre ambos testículos para determinar un índice de volumen testicular (Álvarez 1999). Los valores estimados del índice testicular son: para el testículo izquierdo (480 – 1624) y para el testículo derecho (560 a 1750) (Holý 1987).

2.3.3 Evaluación de la circunferencia escrotal

Se midió la circunferencia escrotal la cual tiene relación con el tamaño testicular y la producción de espermatozoides; se ha señalado que las hijas de toros con circunferencia escrotal grande alcanzan la pubertad a más temprana edad. Las medidas promedios están entre los 30 cm a los 15 meses y 34 cm a los 24 y más meses en ganado lechero; cuando se trata de ganado doble propósito el promedio es de 30 cm a los 24 meses y no menos de 32 cm a los 36 y más meses (Bury 2001).

2.3.4 Recolección del semen

Se utilizó un equipo de electroeyaculación marca Electroyac® Ideal Instruments, el cual funciona emitiendo 32 ciclos cada uno de 32 voltios, los cuales se incrementan aditivamente de acuerdo al estímulo cada vez en 32 voltios, así el primer ciclo es de 32 voltios, el segundo de 64, el tercero de 96 y así sucesivamente hasta lograr la eyaculación.

2.3.5 Examen macroscópico

Volumen del eyaculado. El volumen se encuentra estrechamente relacionado con la raza, edad y tamaño de los testículos principalmente (Zemjanis 1981). Se midió el volumen en un tubo de centrífuga graduado.

Color. El color del semen de buena calidad debe ser blanco lechoso, blanco amarillento o amarillo cremoso, cualquier otro color se consideró anormal ya que indican la presencia de sangre o pus (Wenkoff y Zavaleta 1997).

Olor. El semen en buenas condiciones presenta un olor típico, producido por la espermina (Holý 1987). El olor a orina indica que el semen está contaminado con ésta. Cuando el olor es muy desagradable, se sospecha alguna enfermedad en los testículos o en otra parte del aparato reproductivo (Olivares y Urdaneta 1985).

pH. Es uno de los indicadores de la calidad del semen, a mayor concentración espermática mayor acidez ya que estos metabolizan o utilizan los azúcares (fructosa) y los convierten en ácido láctico. El semen del toro normalmente es un poco ácido y oscila entre 6.2 – 6.8 (Wenkoff y Zavaleta 1997). Sin embargo, otros autores como Bearden y Fuquay (1982) reportan valores entre 6.5 y 7.

2.3.6 Examen microscópico

Concentración. La concentración mide el número de espermatozoides por unidad de volumen y se correlaciona positivamente con la fertilidad de los toros. Se midió la concentración se llevó acabo con el espectrofotómetro Spermacue®, se tomó como valores normales los propuestos por Holý (1987) de 0.2×10^6 a 3.2×10^6 de células espermáticas/mm³.

Motilidad en Masa. Se observó la presencia de ondas y remolinos en una gota de semen fresco a 37°C sin diluir con un aumento de 10X y 20X; éste se puede clasificar atendiendo a las características de las ondas; para lo cual se utilizó la escala indicada en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Clasificación de la motilidad en masa de los espermatozoides.

Motilidad masiva	Escala porcentual (%)	Aspecto del modelo
MM 0	≤ 10	No hay remolinos. Los espermatozoides están sin movimiento o éste es muy débil.
MM +	10 - 40	Remolinos muy lentos y suaves y confirman que la vitalidad esta muy disminuida o que hay gran cantidad de espermatozoides muertos.
MM ++	40 - 60	Movimientos masivo bien definido. Formación rápida de remolinos.
MM +++	≥ 60	Movimientos masivos muy intensos con formación y desaparición rápida de remolinos.

Fuente: Holý (1987)

Motilidad Individual. Se utilizó el método de gota diluida en la proporción de 190 µL de solución salina fisiológica 0.9% y 10 µL de semen. Se observó el movimiento de los espermatozoides en el microscopio con platina térmica a 37°C. Estos movimientos se clasifican en:

1. Movimiento progresivo o rectilíneo.
2. Movimiento oscilante (el espermatozoide se mueve sin poder cambiar de lugar).
3. Movimiento circular.
4. Movimiento retroactivo (el espermatozoide se mueve en círculos hacia atrás).
5. Sin movimiento.

El movimiento rectilíneo representa la característica de los espermatozoides y tiene una estrecha relación con la fertilidad. Sin embargo, la motilidad progresiva no significa lo mismo que la fertilidad, ya que la fertilidad desaparece mucho más rápido que la motilidad rectilínea (Holý 1987).

Se usó la clasificación de motilidad individual según Zemjanis (1981) y Wenkoff y Zavaleta (1997):

- Pobre: Muy despacio con frecuencia errática (20-40%)
- Regular: Lineal despacio errático (40-60%)
- Bueno: Lineal, moderadamente rápido (60-80%)
- Muy bueno: Lineal rápido (80-100%)

2.3.7 Tiempo de Reducción de Azul de Metileno (TRAM)

Se depositaron 200 μ L de semen en un tubo Eppendorf y 200 μ L de una solución de azul de metileno al 0.1% en solución salina 0.9%, se mezcló y se llenó 4 tubos capilares, se sellaron en ambos extremos con plastilina para luego colocarlos en baño maría a 40°C e inmediatamente iniciar la toma del tiempo que se tardó la decoloración del azul de metileno hasta volver al color blanquecino original.

2.4. VARIABLES ANALIZADAS

Las variables analizadas en los grupos de toros, en descanso y trabajando, fueron:

- Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (minutos).
- Condición Corporal (escala de 1 a 9).
- Circunferencia Escrotal (cm).
- Volumen (mL).
- pH (escala de 1 a 14).
- Concentración (millones/mL).
- Motilidad en Masa (%)
- Motilidad Individual (%).

Los Toros evaluados por cada variable fueron diferente puesto que algunos animales no se pudo medir todas la variables.

2.5. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA). Se realizaron análisis de Correlación de Pearson entre el tiempo de reducción del azul de metileno y condición corporal, circunferencia escrotal, volumen, concentración, pH, motilidad en masa e individual; se aplicaron procedimientos de Distribución de Frecuencias para cada una de las variables analizadas. El programa estadístico utilizado fue el Statistical Analysis Systems (SAS 2002) con un nivel de significancia exigido de 0.05.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CONDICIÓN CORPORAL (CC)

El 51.1% de los toros tiene una CC entre 5 y 6, mientras el 13.9% se encuentra por debajo de 5 y el 35% de los toros sobre 6. No se encontró correlación ($P = 0.401$) entre el TRAM y la CC. El valor medio de la CC y del TRAM fueron de 5.72 y 13.65 respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Distribución de frecuencias de la Condición Corporal y del Tiempo de Reducción de Azul de Metileno (TRAM).

Toros evaluados	Condición corporal	TRAM (minutos)
1	3	7.70
1	3.25	4.17
3	3.75	20.51
1	4	26.68
5	5	11.28
5	5.25	5.45
7	5.75	8.94
5	6	20.77
3	6.25	5.30
3	6.75	3.86
5	7	22.87
4	7.25	23.72

Al analizar la correlación de la CC y el TRAM en forma categorizada de acuerdo a trabajo y descanso en la hacienda Santo Domingo (Cuadro 4), tampoco se encontró correlaciones ($P = 0.132$ y $P = 0.622$ respectivamente). Sin embargo, se aprecia un incremento en el TRAM para los toros en descanso con CC menor de 5, posiblemente debido al incremento en el llamado desecho fisiológico, el cual según Holý (1987) oscila entre 5 y 15% de espermias anormales y/o muertos y puede incrementarse aun más en los toros sometidos a largos periodos de descanso.

Cuadro 4. Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM) de acuerdo a la categoría (trabajo/descanso) y la Condición Corporal.

Categoría	Toros evaluados	TRAM (minutos)	Condición Corporal		
			< 5	5 - 6	> 6
			Número de toros / TRAM		
Trabajo	13	6.31	0	6 / 5.17	7 / 7.28
Descanso	16	10.93	6 / 16.68	8 / 7.94	2 / 5.68

3.2. CIRCUNFERENCIA ESCROTAL (CE)

El valor medio para la CE y el TRAM obtenido fue de 38 cm y 12.33 minutos respectivamente (Cuadro 5). No se encontró correlación ($P = 0.855$) entre el TRAM y la CE.

Cuadro 5. Distribución de frecuencias de la circunferencia Escrotal y del Timpo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM).

Toros evaluados	Circunferencia Escrotal (cm)	TRAM (minutos)
1	29	4.23
1	31	3.13
1	32	7.78
1	33	3.88
2	33.5	5.96
1	34	2.78
1	34.5	4.37
4	35	19.45
2	35.5	6.13
2	36	18.65
1	37	3.35
6	38	17.75
1	38.5	20.27
4	39	15.02
8	40	12.43
1	40.5	7.53
2	41	10.97
1	41.5	1.92
2	42	5.53
1	42.5	3.62
2	43	15.49
1	48.5	35.23

Bury (2001) concluyen que en ganado doble propósito el promedio de la CE debe ser de 30 cm en animales de 24 meses de edad y no menos de 32 cm a los 36 meses de edad. Solo un toro de la presente investigación no cumple con el rango propuesto por este autor. De igual manera se observa que el 58.7% de los toros tienen una CE entre 35 - 40 cm (Cuadro 5).

Al analizar por categorías de trabajo y descanso en la hacienda Santo Domingo (Cuadro 6), la correlación en los animales en trabajo no fue significativa ($P = 0.722$), mientras que en los toros en descanso donde la correlación fue negativa ($P = 0.012$), lo que indica que a medida que se incrementa la CE el TRAM tiende a ser menor.

Cuadro 6. Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM) de acuerdo a la categoría (trabajo/descanso) y la Circunferencia Escrotal (CE).

Categoría	Toros evaluados	TRAM (minutos)	CE		
			< 30	30 - 40	> 40
			Número de toros / TRAM		
Trabajo	13	6.31	1 / 4.23	12 / 6.48	0
Descanso	16	10.93	0	10 / 13.02	6 / 7.47

3.3. VOLUMEN

El valor medio del Volumen y del TRAM obtenidos fue de 10.22 mL y 13.35 minutos, respectivamente (Cuadro 7). La correlación entre el TRAM y el volumen no fue significativa ($P = 0.496$)

Cuadro 7. Distribución de frecuencias para la variable volumen y media del Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM).

Toros evaluados	Volumen del eyaculado (mL)	TRAM (minutos)
1	4	7.67
1	5	3.82
3	5.5	5.30
4	6	6
2	6.5	7.30
5	7	7.29
1	7.5	53.70
6	8	12.87
3	8.5	22.32
4	9	13.86
1	10	8.37
1	11	28.05
1	12	3.62
2	13	17.89
2	14	26.73
4	15	12.14
1	15.5	7.07
1	17	9.05
1	19	3.13
1	20.5	4.47
1	23	6.12
1	24	3.35

Zemjanis (1981) afirma que la fertilidad óptima de los eyaculados se encuentra entre los volúmenes de 4 mL – 12 mL. El 70.2% de los toros de esta investigación están dentro de este rango.

Las correlaciones por categoría de trabajo y descanso en la hacienda Santo Domingo, tampoco fueron significativas ($P = 0.718$ y $P = 0.237$ respectivamente)(Cuadro 8).

Cuadro 8. Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM) de acuerdo a la categoría (trabajo/descanso) y el Volumen.

Categoría	Toros evaluados	TRAM (minutos)	Volumen (mL)	
			4 - 12	> 12
			Número de toros / TRAM	
Trabajo	13	6.31	11 / 6.42	2 / 5.65
Descanso	16	10.93	11 / 13.76	5 / 4.70

3.4. pH

La correlación entre el TRAM y el pH no fue significativa ($P = 0.461$). El valor medio del pH y del TRAM obtenidos fueron de 6.87 y 13.35 minutos respectivamente (Cuadro 9). Se observa que los valores mínimo y máximo de pH (6 y 7.6 respectivamente) obtuvieron los mayores TRAM, lo cual se atribuye que a estos valores de pH la actividad metabólica de los espermatozoides disminuye drásticamente y con ello aumenta el TRAM. El 44.68% de los toros tiene un pH entre 6.2 y 6.8, siendo este el rango que indica Holý (1987), recordando que este valor es afectado por la concentración espermática.

Cuadro 9. Distribución de frecuencias para la variable pH y media del Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM).

Toros evaluados	pH	TRAM (minutos)
3	6	18.62
13	6.4	17.63
8	6.8	13.64
9	7	5.91
5	7.2	3.54
9	7.6	18.05

Al analizar la correlación por categoría trabajo y descanso en la hacienda Santo Domingo, no se encontró ninguna correlación entre el TRAM y el pH ($P = 0.598$ y $P = 0.175$, respectivamente)(Cuadro 10).

Cuadro 10. Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM) de acuerdo a la categoría (trabajo/descanso) y el pH.

Categoría	Toros evaluados	TRAM (minutos)	pH	
			6.2 - 6.8	> 6.8
Número de toros / TRAM				
Trabajo	13	6.31	1 / 10	12 / 6
Descanso	16	10.93	6 / 12.27	10 / 10.12

3.5. CONCENTRACIÓN

El valor medio para la concentración y el TRAM obtenidos fue de 361.9×10^6 espermatozoides/mL y 10.57 minutos respectivamente (Cuadro 11). No se encontró correlación significativa ($P = 0.539$) entre el TRAM y la concentración. Sin embargo se observa que a medida que aumenta la concentración de espermatozoides el TRAM disminuye.

Cuadro 11. Distribución de frecuencias de la Concentración y del Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM).

Concentración (millones/mL)	Toros evaluados	TRAM (minutos)
< 100	3	44.48
100 - 200	6	14.69
200 - 300	3	7.54
300 - 400	7	3.61
400 - 500	3	5.04
500 - 600	4	4.37
600 - 700	0	
700 - 800	2	3.75
> 800	2	3.69

Un buen eyaculado debe tener por lo menos de 800-1000 millones de espermatozoides/mL, sólo el 6.67% de los animales estudiados están en este rango (Salisbury *et al.* 1978); al igual Salisbury *et al.* (1978) y Lamothe (1997) afirman que sementales con una concentración menor de 500 millones de espermatozoides/mL tienen una fertilidad baja y deben eliminarse como reproductores, encontrándose dentro de este rango el 73.3% de los animales (Cuadro 11).

Al analizar la correlación en forma categorizada de acuerdo a trabajo y descanso en la hacienda Santo Domingo, se obtuvo una correlación negativa significativa ($P = 0.004$ y $P = 0.002$ respectivamente) (Cuadro 12).

Cuadro 12. Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM) de acuerdo a la categoría (trabajo/descanso) y la Concentración.

Categoría	Toros evaluados	TRAM (minutos)	Concentración (millones/ mL)		
			< 100	100 - 500	>500
Número de toros / TRAM					
Trabajo	13	6.31	1 / 19.75	6 / 6.76	6 / 3.61
Descanso	16	10.93	1 / 53.7	13 / 8.5	2 / 5.34

3.6. MOTILIDAD EN MASA (MM)

El 4.83% de los toros la MM es menor a 40, un 4.83% de 40 a 60 y un 90.34% es mayor a 60; estos datos concuerdan con investigaciones realizadas por Holý (1987) quien concluye que una buena calidad de semen debe tener una Motilidad en Masa mayor a 40, encontrándose dentro de este rango el 89.13% de los animales (Cuadro 13).

Se obtuvo una correlación negativa ($P = 0.0001$) entre el Tiempo de Reducción del Azul de Metileno y la MM; a medida que aumenta la MM el Tiempo de Reducción del Azul de Metileno es menor (Cuadro 13).

Cuadro 13. Distribución de frecuencias para la variable Motilidad en Masa y media del Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM):

Toros evaluados	Motilidad en Masa (%)	TRAM (minutos)
2	20	40.19
1	30	19.75
2	40	18.96
1	60	8.05
2	70	7.08
8	80	13.67
2	85	6.95
5	90	4.60
23	95	10.14

Al analizar la correlación por las categorías trabajo y descanso en la hacienda Santo Domingo (Cuadro 14), se encontró una correlación negativa significativa ($P = 0.0001$), entre la MM y el TRAM.

Cuadro 14. Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM) de acuerdo a la categoría (trabajo/descanso) y la Motilidad en Masa (MM).

Categoría	Toros evaluados	TRAM (minutos)	MM (%)		
			< 40	40 - 60	> 60
Número de toros / TRAM					
Trabajo	13	6.31	1 / 19.75	1 / 8.05	11 / 4.92
Descanso	16	10.93	2 / 40.19	2 / 18.9	12 / 4.72

3.7. MOTILIDAD INDIVIDUAL (MI)

El 89.1% de los toros la MI es mayor a 65%. Holý (1987) indicó que el semen para ser utilizado en inseminación artificial debe tener por lo menos un 65% de MI; puesto que, los niveles bajos del mismo influyen negativamente a la fertilidad.

La correlación entre el TRAM y la MI fue negativa ($P = 0.0001$), a medida que aumenta la MI el TRAM disminuye (Cuadro 15).

Cuadro 15. Distribución de frecuencias para la variable Motilidad Individual y media del Tiempo de Reducción de Azul de Metileno (TRAM).

Toros evaluados	Motilidad Individual (%)	TRAM (minutos)
2	20	40.19
1	30	33.62
1	35	4.30
1	40	19.75
6	70	13.74
7	75	12.60
7	80	21.95
1	85	4.17
9	90	5.94
11	95	4.31

Al analizar la correlación en forma categorizada de acuerdo a trabajo y descanso en la hacienda Santo Domingo, se obtuvo una correlación negativa entre la MI y el TRAM ($P = 0.0001$), a medida que aumenta la MI el TRAM disminuye (Cuadro 16).

Cuadro 16. Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM) de acuerdo a la categoría (trabajo/descanso) y la Motilidad Individual (MI).

Categoría	Toros evaluados	TRAM (minutos)	MI (%)	
			< 65	> 65
Número de toros / TRAM				
Trabajo	13	6.31	1 / 19.75	12 / 5.18
Descanso	16	10.93	4 / 29.57	12 / 4.72

Lo anterior permite concluir que al evaluar semen bovino *in vitro* por medio de la prueba de Reducción de Azul de Metileno resultados menores a cinco minutos indican que es un semen que presenta una concentración mayor a 500 millones de espermatozoides/mL, una MM mayor al 60% y una MI mayor a 65%.

4. CONCLUSIONES

El Tiempo de Reducción del Azul de Metileno no fue afectado por la condición trabajo o descanso de los toros.

El Tiempo de Reducción del Azul de Metileno disminuye a medida que aumenta la Motilidad en Masa e Individual (actividad metabólica), tanto en forma general como en la condición de trabajo o descanso de los toros.

El Tiempo de Reducción del Azul de Metileno no es afectado por la condición corporal y la circunferencia escrotal.

Bajo las condiciones de este estudio el pH y el volumen no afectaron el Tiempo de Reducción del Azul de Metileno, pero la concentración sí lo afectaron dependiendo de la condición de trabajo o descanso de los toros.

5. RECOMENDACIONES

Utilizar la prueba del Tiempo de Reducción del Azul de Metileno como indicador de la actividad metabólica del semen bovino.

Realizar investigaciones correlacionando la prueba de Reducción del Azul de Metileno con las pruebas de vitalidad: eosina/nigrosina.

6. LITERATURA CITADA

Agrobit. 2005. Evaluación reproductiva de toros (en línea). Consultado 9 jun. 2006. Disponible en www.agrobit.com

Álvarez, J. 1999. Exámen clínico andrológico -bovinos-. Grupo de reproducción CENSA. La Habana, Cuba. 37-41 p.

Bury, N. 2001. Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. GIRARZ 2060. Madrid, España. 263 – 281 p.

Bearden, H.; Fuquay, J. 1982. Reproducción animal aplicada. Ed. El Manual Moderno. México, México. 45 p.

Curso de “Actualización en Reproducción Animal”(6,1997, Tabasco, ES). 1997. Características del Eyaculado. Memoria. C Lamothe. Villa Hermosa, Tabasco, ES. 67 p.

Duchens, M. 1999. Examen de fertilidad para selección en toros de carne (en línea). Consultado 12 jun. 2006. Disponible en http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9752%2526ISID%253D460,00.html

Holý, L. 1987. Biología de la reproducción bovina: Introducción al proceso del examen de fertilidad de la hembra y el macho. Ed. Científico-Técnica. La Habana, Cuba. 333 p.

Olivares, R ; Urdaneta, R. 1985. Colección, Evolución y procesamiento del semen de toros (en línea). Consultado 20 jul. 2006. Disponible en <http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd17/texto/coleccion.htm>

Saacke, R. G. ; Nebel, R. L.; Karabinus, D. S.;Bame, J.H.; Mullins, J. 1988. Sperm transport and accessory sperm evaluation. Proceedings of the Twelfth Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction. 7 – 14 pp.

Salisbury, G. W.; Vandermark V. L. and. Lodge J. R. 1978. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of cattle, 2da Ed., W. H. Freeman and co., San Francisco.

SAS. 2002. SAS Users Guide Statistical Analysis Institute Inc, Cary NC.

Wenkoff, A.; Zavaleta, C. 1997. Actualización en reproducción animal: Evaluación de la capacidad reproductiva de los toros, características del eyaculado. Instituto Nacional de Invesigaciones Forestales y Agropecuarias. Tabasco, México. 1-24 p.

Zemjanis, R. 1981. Reproducción animal: diagnóstico y técnicas terapéuticas. México D.F., México. Ed. LIMUSA. 253 p.

7. ANEXOS

Anexo 1. Tabla para leer la densidad del eyaculado de toro 10^6 espermatozoides/mL.

Valor	Factor de Dilución									
	0.1/10	0.2/10	0.3/10	0.4/10	0.5/10	0.6/10	0.7/10	0.8/10	0.9/10	1.0/10
95	1,35	675	450	337	270	225	193	168	159	135
90	1,5	750	500	375	300	250	214	187	167	150
85	1,65	825	550	412	330	275	235	206	183	165
80	1,8	900	600	450	360	300	257	225	200	180
75	1,95	975	650	487	390	325	278	243	216	195
70	2,1	1,05	700	525	420	350	300	262	233	210
65	2,25	1,125	750	562	450	375	321	281	250	225
60	2,45	1,225	816	612	490	408	350	306	272	245
55	2,65	1,325	883	662	530	441	378	331	294	265
50	2,95	1,475	893	737	590	491	421	369	328	295
45	3,35	1,675	1,116	837	670	558	478	418	372	335
40	3,75	1,875	1,25	937	750	625	536	469	416	375
35	4,25	2,125	1,416	1,062	850	708	607	531	472	425
30	4,85	2,425	1,616	1,212	970	808	693	606	539	485
25	5,55	2,775	1,85	1,387	1,11	925	793	694	617	555
20	6,35	3,175	2,116	1,587	1,27	1,058	907	794	705	635