

REVISTA DE MEDICINA VETERINARIA

ORGANO OFICIAL

DE LA

SOCIEDAD DE MEDICINA VETERINARIA DEL URUGUAY

(Avda. Agraciada, 1464, Piso 13)

Subcomisión de Revista:

Dres. Manuel Bodner, Aníbal Durán Del Campo y Ernesto Giambruno
Contratista Publicitario: David Colombo

La Dirección de la Revista no se responsabiliza por los conceptos vertidos
por los distintos autores en los trabajos publicados en la misma

Tomo XI. Año XXXVII

Montevideo, abril de 1962

Nº 58

EL TEST DE REDUCCION DE AZUL DE METILENO APLICADO AL SEMEN DE CARNERO *

ANÍBAL DURÁN DEL CAMPO **
y CARLOS DE BONI

INTRODUCCION

Uno de los problemas más arduos, a diario planteados en los Centros de Inseminación Artificial o en la Clínica de las afecciones de la reproducción en el macho, es la determinación del grado de fertilidad de un semen. Hasta ahora, ninguna prueba por sí sola ha podido ser considerada totalmente eficaz en cuanto a la posibilidad de predecir exactamente ese grado de fertilidad y aunque esa perspectiva puede mejorarse bastante utilizando como test la combinación de varias de ellas, el diagnóstico final puede aún quedar sujeto a considerable margen de error.

Las diversas pruebas que —consideradas en conjunto— parecerían ofrecer mayor seguridad en cuanto a la posibilidad de predecir la fertilidad, serían: concentración, porcentaje de espermatozoides muertos, movilidad inicial, determinación de la motilidad mediante métodos eléctricos —impedance change frequency— y tiempo de reducción del azul de metileno.

* Este trabajo fue realizado en el Instituto de Parasitología del Laboratorio de Biología Animal "Dr. Miguel C. Rubino".

** Técnico Veterinario perteneciente a la División Fomento de la Producción de la Dirección de Ganadería.



Esta última prueba al igual que la determinación del coeficiente respiratorio o el índice de fructólisis, constituyen los principales test biológicos destinados a indicar una medida de la actividad metabólica de los nemaespermias o más precisamente, de la de todas las células vivas contenidas en el semen.

Su reacción está fundada en la actividad catalizadora desempeñada por ciertas enzimas-deshidrogenasas contenidas en el citoplasma de la mayoría de las células vivas, las que en determinado momento y en medio de las intensas reacciones químicas llevadas a cabo entre los espermatozoides y los componentes del plasma seminal, producirían o provocarían liberación de hidrógeno.

La cantidad liberada de este gas puede, en consecuencia, considerarse como índice de la actividad deshidrogenante celular, la que, lógicamente variará proporcionalmente a la cantidad y actividad celular. Claro que de ninguna manera puede asegurarse que, un alto índice de acción deshidrogenante, equivale a un alto índice de fertilidad, pero su comprobación de cualquier manera es siempre un signo alentador.

Una idea aproximada de la cantidad de hidrógeno liberado o índice deshidrogenante celular, puede obtenerse mediante el agregado al semen de azul de metileno, sustancia colorante azul de gran afinidad por el hidrógeno que al aceptar dos moléculas de éste se transforma en leuco-azul de metileno, reducción ésta que se hace aparente debido a la transformación de su primitivo color azul en sustancia incolora. En consecuencia, el tiempo transcurrido para la decoloración del azul de metileno, puede bien considerarse en función de la cantidad y actividad desplegadas por las células vivas incluidas en el material seminal investigado.

HISTORIA DE LA PRUEBA DE AZUL DE METILENO

Sorensen, en 1941 —citado por varios autores—, fue el primero en valerse de esta propiedad del azul de metileno, utilizando a efectos de llevar a cabo la reacción, una probeta especial —modificación de la probeta de Thunberg— que permitía realizar toda la operación en ausencia total de aire. Esta condición es imprescindible ya que el leuco-azul de metileno en contacto con aquél se oxida retomando el color nuevamente.

El diluyente recomendado por este investigador es el siguiente:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1,70 gramos
KH_2PO_4	0,07 "
Na_2SO_4	0,08 "
Glucosa	2,85 "
Gelatina	5,00 "
Agua destilada	100.00 c. c.

El semen — $\frac{1}{2}$ c.c. de bovino o $\frac{1}{4}$ c.c. de ovino— es llevado a la probeta especial, agregándosele entonces el diluyente gelatinado descripto al que se le ha incorporado previamente $\frac{1}{10}$ de una solución al 5 % de azul de metileno; luego de agitada la probeta, la misma es llevada a una temperatura de 40° anotándose el tiempo transcurrido para que se realice la decoloración.

Esta técnica fue posteriormente modificada por los investigadores americanos G. H. Beck y G. W. Salisbury (1943) y Salisbury, Beck, Elliot y Willett (1943) quienes realizan la reacción en un tubo Pirex simple de 10 mm. de diámetro, utilizando como diluyente el citrato de sodio —4,76 grs. disueltos en 100 c.c. de agua— al que se agregan 50 mlgs. de azul de metileno.

El semen —0,2 ml.— es pipetado dentro del tubo Pirex, agregándose a continuación 0,8 ml. del diluyente citrato de sodio M/15 y yema de huevo y finalmente 0,1 ml. de la solución descripta de azul de metileno. Luego de agitarse el tubo a efectos de homogeneizar su contenido —el color de la solución es ahora verdoso— se cubre la superficie del mismo con 1 ó 2 cms. de aceite mineral, transportándose inmediatamente el tubo al baño María a 46,5 —los espermatozoides mueren aproximadamente 47,1—. La reacción se da por finalizada, cuando el color verdoso de la misma, se trueca por el amarillento de la yema de huevo; procediendo de acuerdo a esa técnica, puede considerarse como muy bueno a bueno un semen de bovino que decolore el azul de metileno de 3,5 a 6 minutos, siendo en cambio conveniente descartar aquellas muestras que necesiten más de 9 minutos para realizar igual reacción.

En los ovinos, A. Fillat (1950) teniendo en cuenta la mayor concentración de semen del carnero y su escaso volumen, lleva a cabo la misma reacción utilizando solamente 0,1 de semen; según criterio de este autor, sémenes de buena calidad decolorarán en azul en más o menos 2 $\frac{1}{2}$ minutos, debiéndose considerar de poca eficacia aquellos que necesiten más de 5 minutos.

Milovanov y Smirnov-Ongridumov —citados por A. Mies Filho y J. Ferreira Barreto— presentan una modificación a esta prueba, realizando la reducción del azul de metileno en tubo capilar. La técnica es sumamente sencilla, consistiendo la misma en mezclar volúmenes iguales de semen y de la solución de azul de metileno y aspirando la mezcla de modo que se establezca en el tubo capilar una columna de unos 3 cms.; este tubo es luego colocado en forma horizontal a 20° produciéndose la decoloración del material en la porción central de la columna, mientras los extremos al contacto del aire permanecen del color original y quedan entonces como testigos.

Según estos investigadores rusos, la decoloración del azul de metileno por el semen de toro y de carnero en un tiempo inferior a los 10 y 7 minutos respectivamente, significaría estar en presencia de un semen óptimo, 12-25 minutos para el toro y 8-12 para el carnero, de

un semen bueno, debiéndose rechazar muestras que decoloren el reactivo en más de 30 minutos para el toro y 15 minutos para el carnero.

Finalmente, M. Brochart (1948), modifica ligeramente la técnica de los investigadores rusos, estableciendo algunas normas sobre su técnica, la que, por otra parte, es conducida a 40° C. A esta temperatura, según Brochart, un tiempo de decoloración de 3 minutos correspondería —para el semen de toro— a la actividad desarrollada por más o menos 1.000.000 de espermatozoides, 3 a 5 minutos a 500.000-700.000 y 7 a 10 minutos a 200.000-300.000 espermatozoides.

En nuestra práctica profesional y especialmente como control del semen utilizado durante trabajos de inseminación artificial hemos adoptado la técnica de reducción del azul de metileno en tubo capilar, la cual tiene la ventaja de no necesitar diluyente alguno y consumir además muy poca cantidad de semen. A los efectos de trabajar a una temperatura constante cercana a los 40° C. habíamos ideado una pequeña estufa —Durán (1956)— en la que la fuente de calor estaba construída por una lamparilla eléctrica introducida dentro de un pequeño cajoncito de madera cerrado anteriormente por un vidrio corredizo que permitía regular la temperatura interior. A través de dos orificios laterales se introducían en la estufa el termómetro y el tubo capilar con el semen a analizar, siguiéndose la reacción a través del vidrio corredizo. En algunas oportunidades, sin embargo, este método nos ha sido de imposible aplicación, debido a la circunstancia de tener que actuar en medios carentes de energía eléctrica.

Hasta aquí la descripción de las diferentes técnicas seguidas para valorar el índice metabólico de los espermatozoides mediante el test de reducción del azul de metileno; conviene además agregar que R. E. Erb y M. H. Ehlers (1950) realizan idéntica prueba, sustituyendo el azul de metileno por resazurín, colorante azul que es transformado por efecto de las hidrogenasas en resorufin de color rosado y posteriormente en hidroresorufin de aspecto incoloro, obteniéndose en general resultados muy similares a los logrados con el primer colorante.

CRITICAS A LA PRUEBA

Dos objeciones principales surgen a la consideración de esta prueba: la primera, relacionada con la veracidad de la información por ella suministrada, ya que siendo provocada dicha reacción por enzimas-deshidrogenasas-contenidas en células vivas —no necesariamente espermatozoides— se argumenta que otras células vivas existentes en el semen pueden asimismo tomar parte y acelerar en consecuencia dicha reacción.

La segunda objeción tiene atinencia con la efectiva relación que pudiese existir entre el tiempo de reducción del azul de metileno y el índice de fertilidad de un semen.

J. Hammond, J. Edwards, L. E. A. Rowson y A. Walton (1947), hacen notar que este test sólo es capaz de medir la actividad reductora del semen, no pudiéndose distinguir —a menos que se haga una estimación de la concentración— entre muestras que contengan un pequeño número de espermatozoides muy activos y aquellas otras que posean una gran cantidad de elementos poco activos, a lo que cabría agregar además, la posibilidad de que otras células vivas —gérmenes, leucocitos, etc.— pudiesen participar activamente en la reacción apresurando la misma y falseando en los hechos el resultado de la prueba.

La teoría de que el semen pueda estar constituido por cantidades variables de espermatozoides muy activos y poco activos, parecería razonable; C. Terner (1953) estima que cada muestra de semen puede contener espermatozoides de calidad mezclada, de modo tal que en muestras de sémenes pobres podrá haber preponderancia de espermatozoides de escasa vitalidad entre una pequeña proporción de elementos de gran movilidad.

La influencia de la cantidad de los nemaespermas vivos en el tiempo de reducción del azul de metileno, ha impulsado a algunos investigadores a modificar ligeramente la prueba refiriéndolas a tales efectos a una concentración dada de semen y no al volumen. R. E. Erb, M. H. Ehlers y F. H. Flerchinger (1952), recomiendan al efecto utilizar una concentración constante de 750.000 espermatozoides por milímetro cúbico. P. G. Millar y N. P. Ras (1952) describen y aconsejan esta modificación; la muestra de semen, previo contaje, se diluye de modo que cada milímetro cúbico contenga 200.000 espermatozoides por milímetro cúbico.

C. E. James, T. E. Patrick y M. H. Newson, comparan los resultados obtenidos con la prueba de azul de metileno clásica y aquélla en que el volumen del semen a analizar, es modificado de modo que el mismo contenga 240 ó 300.000.000 de espermatozoides. Las experiencias de estos autores permitió determinar la positiva y alta correlación existente entre el tiempo de reducción del azul de metileno y la concentración y motilidad inicial del semen, y especialmente con la primera de las características nombradas, demostrando así la razón en efectuar la reducción del azul de metileno utilizando preferentemente concentraciones determinadas de espermatozoides, más bien que volúmenes constantes de semen. La determinación de la concentración no agrega mayor dificultad a la prueba ya que este test por su gran importancia es una de las pruebas que habitualmente deben realizarse en el laboratorio. El tiempo de reducción del azul de metileno, tomando como base 300.000.000 de espermatozoides es altamente correlacionado con la motilidad inicial, motilidad luego del shock frío y luego de tres días de conservación; esta correlación disminuyó cuando fueron utilizadas cantidades de 240.000.000 de espermatozoides. Estos autores concluyen que 300.000.000 de espermatozoides de toro deberán decolorar el azul de metileno en menos de 9 minutos y preferiblemente en 7 minutos.

En cuanto a la influencia ejercida por la acción de otras células vivas cuyo poder de deshidrogenación ya ha sido mencionado, que Gonsalus, Campbell, Beck y Salisbury (1944) lograron demostrar que la cantidad normal de células y gérmenes provenientes del tracto genital, de la vagina artificial, de la yema de huevo y del medio ambiente que puedan encontrarse en una muestra de semen fresco, no son suficientes para hacer variar fundamentalmente el tiempo de reducción del azul de metileno. Por otra parte, el hecho de que sémenes de alta concentración y actividad no decoloren más el reactivo luego de extraídos los nemaespermias mediante centrifugación, es prueba evidente de que el plasma seminal no interviene en la reacción.

En lo que respecta a la segunda gran objeción que mencionáramos al comenzar el estudio de las críticas a esta prueba, es decir, la relación entre el tiempo de reducción del azul de metileno y el índice de fertilidad, diversos autores se han expedido sobre ella en términos no siempre totalmente coincidentes. N. L. Van Demar, E. Mercier y G. W. Salisbury (1945), encontraron una correlación estadísticamente alta y significativa entre el tiempo de reducción del azul de metileno, el volumen del eyaculado, cantidad de espermatozoides, motilidad inicial, pH inicial y nivel inicial de ácido láctico en semen fresco de toro. Igual significativa correlación fue encontrada entre el tiempo de reducción en semen fresco y la movilidad espermática luego de 1 hora de incubación a $46\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$. No fue posible, sin embargo, encontrar correlación positiva con la proporción de espermatozoides morfológicamente anormales, lo que sugiere a dichos autores la posibilidad de que esas formas anormales también utilicen nutrientes con intensidad similar a los normales; esto también ha sido confirmado por Comstock y col. —citados por Van Demarck y col. (1945)— para el semen de carnero. Se desprendería en consecuencia, que, junto a la prueba de la reducción del azul de metileno, debería también estudiarse la morfolo-gía espermática. Otra forma de poder llegar a descubrir esta anomalía sería la realización de la prueba del azul de metileno con semen incubado a 46°C ., pues se ha comprobado que en estos casos las formas anormales resisten mucho menos que las normales, extendiéndose entonces considerablemente el tiempo de reducción. A. Fillat (1950) relata la historia de un carnero cuyo semen fresco reducía el azul de metileno en sólo 3 minutos, mientras que el incubado necesitaba 10 minutos, obteniendo con ese semen sólo 30 % de preñez; es posible que esa diferencia en el tiempo de reducción y ese bajo porcentaje de fertilidad fuera debido a la presencia de gran cantidad de formas anormales.

P. J. Buckner, E. L. Willett y N. Bayley (1954) que estudiaron la correlación entre la fertilidad y varios de los tests corrientemente usados a ese fin, encontraron que el tiempo de reducción, en combinación con la disminución de la motilidad progresiva después de 120 minutos de una muestra de semen diluída al 3 % en una solución de

anilina azul, la motilidad inicial en semen diluída en citrato-yema de huevo y motilidad luego de incubación en yema-citrato más antibióticos, mantiene una correlación con la fertilidad del semen.

Bishop, R. C. Campbell y J. L. Hanckok (1953) encontraron que el grado de actividad de las hidrogenasas estaba estrechamente relacionado con el número de espermatozoides vivos presentes, concluyendo que los datos aportados evidencian una clara relación entre las características físicas del semen y su fertilidad. Esta característica física es determinada por el número de espermatozoides vivos y su grado de actividad, y pueden ser medidas mediante las siguientes pruebas: a) concentración; b) porcentaje de espermatozoides vivos; y c) medida de la motilidad mediante método eléctrico —impedance change frequency—. La reacción del azul de metileno agregaría poca información a la obtenida por las tres pruebas arriba mencionadas.

Telesforo Bonadonna (1953), si bien no encuentra en su vasta experiencia una definida relación entre tiempo de reducción y fertilidad, halla en cambio que dicha prueba puede constituir un método complementario práctico de indudable valor.

V. K. Milovanov e I. I. Sokolovskaya consideran que el semen de carnero y de toro puede ser analizado mismo sin la ayuda del microscopio, realizando la reacción de reducción del azul de metileno según el método del tubo capilar.

T. Mann (1954), opina que, aunque útil, la prueba del azul de metileno es de limitada finalidad, sobre todo teniendo en cuenta el hallazgo de Lardy y Phillips quienes demostraron que la reducción del azul de metileno puede ser marcadamente demorada por una variedad de sustancia incluyendo glucosa, lactosa y citrato.

Finalmente, A. Mies Filho (1956) asegura que la prueba de reducción representa un precioso auxiliar para verificar las cualidades generales de un semen, especialmente cuando se trabaja en el campo y no se dispone de microscopio u otros elementos de examen. En el caso de los ovinos, continúa trabajándose con semen fresco, el que, ya macroscópicamente aporta elementos indicativos de su cualidad, la prueba de reducción debe ser empleada y considerada como elemento de mucho valor. Utilizando más de 1.000 muestras de sémenes provenientes de 135 carneros, dicho autor pudo verificar que el tiempo de reducción de 30 minutos corresponde a sémenes de 2.560.000 espermatozoides por milímetro, mientras que tiempo de decoloración de 3'40 puede corresponder a concentraciones 1.050.000 espermatozoides.

NUESTRA TECNICA

Ligera modificación a la técnica de Milovanov y Smirnov-Ongri-dumov.

Debido a que como ya expresáramos, en algunas oportunidades, especialmente actuando en el medio rural, el test de azul de metileno

nos fue de difícil o imposible aplicación por carencia de energía eléctrica, buscamos sustituir el calor seco generado por ésta por el calor del agua a 40-45°. El procedimiento ensayado es el siguiente: en la concavidad de un portaobjeto se deposita una gota de la solución de azul de metileno, sobre la que, utilizando la misma pipeta previamente enjuagada con suero fisiológico —u otra pipeta de diámetro similar— se hecha una gota de semen; ambas gotas se mezclan a continuación con la ayuda de una pipeta ciega o con el ángulo de un portaobjeto y rápidamente entonces se aspira con otra pipeta capilar un volumen de la mezcla de modo de formar en el tubo una columna líquida azul de unos 2 a 3 cms.

A efectos de impedir la salida de la columna líquida, la extremidad del tubo capilar es entonces introducida en el pequeño orificio ciego realizado en un tapón de corcho o goma y el todo entonces es introducido en un vaso transparente conteniendo agua a una temperatura lo más aproximada posible a los 40° C. A través de las paredes del vaso puede seguirse perfectamente la reacción sin necesidad de tener que sacar el tubo capilar del mismo. La terminación del test está dado por la aparición del color blanco en un 50 % del largo de la columna líquida azul.

INFLUENCIA DE FACTORES VARIOS EN EL RESULTADO DEL TEST

A efectos de estandarizar la prueba se creyó necesario realizar una serie de experiencias destinadas a averiguar la posible influencia de factores varios en el resultado final de la misma. A esos efectos contamos como dadores de semen con 2 carneros Corriedale adultos; la extracción se realizó por medio del electroeyaculador a electrodo bipolar según la modificación de A. Blackshaw.

Las características del semen producido por ambos carneros difería bastante; pudiéndose clasificar uno de ellos como sobresaliente —extraordinaria movilidad, gran concentración, óptima morfología y escasa cantidad de espermatozoides muertos— mientras que en la otra muestra, si bien la concentración era excelente, el grado de movilidad como consecuencia tal vez de un relativamente alto porcentaje de espermatozoides muertos, era muy inferior al presentado por la muestra anterior.

El material, una vez recogido, era conducido al laboratorio y dejado a temperatura ambiente 20° aproximadamente —durante todo el tiempo que duraran las experiencias— unas 3 horas cada día. En total se trabajó con 15 eyaculados.

Los siguientes factores, los cuales se pensó pudieran gravitar sobre el tiempo de reducción del azul de metileno, fueron estudiados: a) calibre o diámetro del tubo capilar; b) volúmenes de semen y de azul de metileno; c) temperatura a la que se efectúa la reacción;

d) tiempo transcurrido entre el momento de la extracción y el comienzo de la reacción; e) influencia de la incubación del semen; f) diluyente utilizado para la preparación del azul de metileno.

a) *Influencia del diámetro del tubo capilar.*—Fueron utilizados al efecto dos tubos capilares cuyos diámetros internos eran respectivamente 1 y 2 milímetros; una vez que la mezcla semen-reactivo era aspirada en las dos pipetas, las mismas se introducían simultáneamente en el mismo vaso conteniendo agua a 40° C. Si bien la columna líquida en el capilar más grueso, aparentaba tener un color azul más pronunciado —posible efecto óptico al aumentar considerablemente el espesor de la columna—, el tiempo de decoloración no pareció ser afectado. Brochart (1948) anotaba que el empleo de tubos de hasta 3 mm. de diámetro no traía aparejado modificaciones apreciables en el tiempo de reducción. El uso, sin embargo, de tubos capilares de 1 mm. de diámetro parecería sin embargo más aconsejable, en virtud del menor volumen necesario para la realización de la prueba. El tiempo de reducción, por otra parte, no es modificado por la cantidad de mezcla aspirada.

b) *Influencia de los volúmenes de semen y azul de metileno.*—Teniendo en cuenta que el fundamento de la reacción, es la liberación de hidrógeno producido en base a la cantidad de deshidrogenasa aportada por los espermatozoides —dejemos momentáneamente de lado la que pudiesen aportar otro tipo de bacterias— es lógico que a mayor cantidad de nemaespermas, menor sea el tiempo de decoloración del azul de metileno. La concentración, pues, e indirectamente el volumen debe por consiguiente tener importancia fundamental.

A efectos de tener una idea aproximada sobre el grado de esa influencia, fue comparado bajo condiciones de experimentación rigurosamente similares, el tiempo de reducción de 0,1 de azul de metileno cuando era mezclado a 0,1 y 0,2 respectivamente de la misma muestra de semen y viceversa, el tiempo empleado por 0,1 del mismo semen para reducir 0,1 y 0,2 respectivamente de azul de metileno. En cualquiera de los casos la diferencia encontrada fue notable, de donde se deduce que uno de los detalles más importantes a cuidar es precisamente el que los volúmenes de semen y solución de azul de metileno sean iguales. En la práctica, este detalle puede lograrse utilizando tanto para el semen como para el reactivo pipetas de igual calibre, las que aportarán en consecuencia gotas de un volumen similar.

c) *Influencia de la temperatura a que se efectúa la reacción.*—El aumento de la temperatura —dentro de cierto límite por supuesto— trae como consecuencia un aumento de la actividad metabólica del nemaesperma; objetivamente esto puede ser comprobado mirando a través del lente del microscopio la creciente movilidad de los espermatozoides luego de calentada una muestra de cualquier semen.

La reducción del azul de metileno es enormemente influenciada por la temperatura a que ella se efectúa. Así por ejemplo, el tiempo

de reducción del azul de metileno de una misma muestra de semen tratada en idénticas condiciones fue de 5 minutos 30 segundos, cuando fue realizada a 20°, 3 minutos 40 segundos cuando la temperatura fue de 30°, 1 minuto 40 segundos a 40° C. y 1 minuto 35 segundos a 44° C. Si bien no puede lógicamente obtenerse una relación determinada entre tiempo de decoloración y temperatura, debido a que la misma variará siempre para cada muestra de semen, es evidente que dicha relación ciertamente existe y es posiblemente junto con los volúmenes, el detalle más importante a tener en cuenta. Por consiguiente, considerando que la muerte del espermatozoide se produce a los 47°1, es conveniente realizar la reacción a una temperatura algo inferior; a efectos, pues, de estandarizar la prueba, creemos conveniente realizar la misma entre 40 y 45°.

d) *Tiempo transcurrido entre el momento de la extracción y el comienzo de la reacción.*—Debido a que no siempre es posible efectuar el examen del semen inmediatamente a su extracción, se creyó necesario averiguar la posible influencia ejercida por el intervalo transcurrido entre el momento de la extracción y el comienzo de la reacción. Utilizamos a esos efectos el semen producido por los 2 carneros, los que como ya se expresara podían ser clasificados en base a sus diferentes características como excelente uno y discreto el otro.

La reacción con el semen excelente, se llevó a cabo a temperatura oscilante entre 38 y 40° C., iniciándose 15 minutos luego de extraído, prosiguiendo luego con una segunda reacción a la ½ hora, y posteriormente otras a 1 hora, 1 ½ hora, 2 horas y 2 ½ horas de extraído. Mientras la muestra de semen a 15 minutos, 30 minutos y 1 hora de extraído decoloró el azul de metileno entre 2 minutos y 2 minutos 15 segundos, aquella realizada a las 2 ½ horas necesitó 2 minutos 50 segundos y aún a las 7 horas decoloró en 4 minutos (durante todo este tiempo, el semen se mantuvo guardado en un tubo a temperatura ambiente). Cuando idéntico procedimiento se llevó a cabo con el semen discreto, la decoloración del azul de metileno realizada 15 minutos después de extraído aquél, se llevó a cabo en 3 minutos, necesitándose 5 minutos 15 cuando la misma se efectuó a la ½ hora, 6 minutos a los 45 minutos y 11 minutos a la 1 hora y 45 minutos.

Parecería deducirse de esta experiencia que en presencia de un semen de alta calidad, poco importa que la prueba de decoloración del azul de metileno se haga inmediatamente a su extracción o dentro de la primer hora siguiente, mientras que en presencia de sémenes de baja calidad, el factor tiempo sería muy importante.

Es posible —necesitaríamos mayor experiencia para afirmarlo— que el mejor momento para realizar esta reacción, fuera precisamente a la hora de extraído el semen ya que su resultado podría indicarnos con mucho más exactitud si estamos en presencia de un semen de alta o baja calidad. En realidad esta conclusión no puede sorpren-

ernos ya que es precisamente el fundamento de la prueba de azul de metileno con semen incubado durante 1 hora a 46°5.

e) *Decoloración del azul de metileno con semen incubado.*—Esta prueba se realizó también con muestras de semen provenientes de los 2 carneros en cuestión, incubándose el semen en agua caliente entre 40 y 45° C. durante 1 hora, habiendo comenzado la incubación a aproximadamente 30' de extraído el semen.

Mientras el semen excelente que había reducido el azul de metileno en 2', luego de sometido a un período de incubación de 1 hora, redujo el azul en 1'55, muestras del semen discreto que fresco había empleado 3' para efectuar idéntica reacción, necesitó 9'30" para reducir el azul de metileno luego de sometido a una incubación de 1 hora.

Como puede notarse, esta prueba del semen incubado no es más que la misma —ligeramente más exigente por efecto de la temperatura a que se lleva a cabo— en que la reacción se realiza 1 hora después de extraído éste, coincidiendo por otra parte bastante sus resultados.

f) *Preparación del azul de metileno.*—Teniendo en cuenta que la literatura respectiva cita como diluyentes para el azul de metileno, el citrato de sodio o también el suero fisiológico, se prepararon soluciones de 50 mlgs. de azul de metileno en 100 c.c. de citrato de sodio —4,76 en 100 c.c. de agua destilada— y en 100 c.c. de suero fisiológico. Si bien Brochart afirma que el diluyente a base de citrato de sodio puede acelerar la reacción, no pudimos verificar en varias pruebas realizadas la exactitud de esta afirmación; en consecuencia, creemos que cualquiera de los dos diluyentes puede utilizarse indistintamente aunque a efectos de estandarizar al máximo la reacción sería aconsejable utilizar siempre el mismo diluyente. En cambio nos parece muy importante, lo cual confirma Brochart, verificar de vez en cuando la integridad del reactivo, el que por efecto del tiempo puede sufrir modificaciones químicas capaces de modificar totalmente el verdadero tiempo de reducción de una muestra de semen. Para evitar esto, quizás sea lo mejor guardar el reactivo en pequeñas ampollas cerradas a la lámpara, las que una vez abiertas deberán ser utilizadas y desestimado el sobrante.

DISCUSION

El hecho de que la decoloración del azul de metileno se realice a expensas de dehidrogenasas contenidas en toda célula viva —no necesariamente espermatozoides— no le resta valor a la prueba, desde que Gonsalus y col. (1944) ya demostraron que la influencia de los gérmenes, células, etc., cuando se encuentran en cantidades normales en el semen, diluyente, vagina artificial, etc., es prácticamente nula.

Por otra parte, la presencia en cantidades anormales de células otras que espermatozoides que podrían acelerar el tiempo de reducción, son fácilmente perceptibles por otros métodos: color del semen, movilidad, investigación de catalasas, frotis, etc.

La presencia en un semen de escasa cantidad de espermatozoides muy activos, o viceversa, una gran concentración de elementos poco activos —objeción de Hammond y col.— podrá no ser determinada mediante esta reacción, pero una simple observación al microscopio o si se quiere, la determinación de la concentración, permitirá obtener un panorama bastante exacto de la muestra de semen que analizamos.

Finalmente, en lo que tiene atinencia con la verdadera relación que pudiese existir entre tiempo de reducción del azul de metileno e índice de fertilidad, tema este que ha sido tan discutido por los investigadores, podemos afirmar —aún sin creer que tengamos vasta experiencia— que en nuestra actividad profesional no hemos aún encontrado muestras de semen que decoloren el azul de metileno rápidamente y sean a la vez de baja fertilidad y mucho menos aún lo inverso, es decir, semen que requieran más tiempo del normal para efectuar la decoloración pero que mantengan un índice normal de fertilidad.

CONCLUSION

A pesar de todas las críticas, estimamos que al menos para el carnero, el test de la reducción de azul de metileno, representa un aporte valioso para la evaluación correcta de la fertilidad. Por otra parte, nuestra modificación a la técnica de Milovanov lo convierten en un test sumamente sencillo y práctico que puede incluso realizarse sin instrumentación especial alguna a excepción de dos o tres tubos capilares iguales. Además, como el resultado del mismo se da en cifras, ofrece un valor mucho más concreto que lo pueden significar valores relativos como la movilidad, apariencia, color, etc.

SUMARIO

Se detalla una modificación al test de reducción de azul de metileno de Milovanov, que permite efectuarlo en una forma mucho más sencilla y exacta. Al efecto, iguales gotas de semen y azul de metileno se mezclan en un portaobjeto aspirándose la mezcla inmediatamente con ayuda de un tubo capilar, uno de cuyos extremos se obtura introduciéndolo en el fondo ciego de un tapón de corcho o goma el que inmediatamente se sumerge en un recipiente conteniendo agua a temperatura de 40 a 45° C. La prueba se da por terminada cuando por lo menos el 50 % de la columna se ha decolorado totalmente.

Se estudiaron las influencias en el tiempo de reducción de diversos factores comprobándose que son extremadamente importantes y decisivas las correspondientes al volumen de semen y azul de metileno que deben mezclarse y la temperatura del agua en que se produce la reacción. El lapso de tiempo transcurrido entre la obtención del semen y la realización de la reacción parecería afectar solamente—cuando se hace dentro de la primer hora de extraído— al semen de baja calidad, de donde se sugiere la realización de esta prueba como método diagnóstico complementario. El diámetro, en cambio, del tubo capilar parecería no tener importancia.

SUMMARY

A slight modification of the methylene blue reduction test devised by Milovanov and Smirnov-Onerioumov, is described. Two equal parts of semen and the solution of methylene blue are mixed and then absorbed into a capilar tube. In order to avoid the exit of the fluid, one of the ends of the tube is introduced into a blind hole worked in a cork and then introduced into a glass containing water at 40-45° C. The test is over when at least 50 % of the fluid column, loses the blue colour and turns whitish.

It was found that the volume of semen and methylene blue, and the temperature of the water where the reaction takes place, influences extremely the duration of the decoloration. When the reaction is done during the first hour of the obtention of the semen the time elapsed between the obtention and the realization of the test would only modify substantially the duration of the reaction when the semen is of poor quality.

BIBLIOGRAFIA

- BECK, G. H. and SALISBURY, G. W. (1943).—Rapid methods for estimating the quality of bull semen. *J. of D. Sc.*, 26, 483.
- BISHOP, M. W. R. and col. Citado por Emmens, C. W. y Blackshaw, A. W. (1956).—Artificial insemination. *Physiological Rev.*, 36, 277.
- BISHOP, M. W. R.; CAMPBELL, R. C. and HANCKOK, J. L.—Semen characteristics and fertility in the bull. *Mammalian Germ.*
- BONADONA, Telesforo.—Problemi biologici e tecnologici della fecondazione artificiale.
- BROCHART, M. (1948).—Control de los espermatozoides de toro por el test de azul de metileno siguiendo la técnica del tubo capilar. *Rec. de Med. Vet.*, 124, 64.
- BUCKNER, P. J.; WILLETT, E. and BAYLEY, N. (1954).—Laboratory tests, singly and in combination for evaluating fertility of bull semen. *J. of D. Sc.*, 37, 1050.

- DURAN, A. (1956).—Representación gráfica de los principales tiempos de la I. A. fecundación y desarrollo del feto en el ovino. *La Propaganda Rural*, noviembre.
- ERB, R. E. and EHLERS, M. H. (1950).—Resazurin reducing time as an indicator of bovine semen fertilizing capacity. *J. of D. Sc.*, 33, 853.
- ERB, R. E.; EHLERS, M. H. and FLERCHINGER, F. H. (1952).—Modified resazurin reduction test for estimating fertilizing capacity of bull semen. *J. of D. Sc.*, 35, 881.
- FILLAT, A. (1950).—I. A. en ovinos. *A. I. A.*, N° 90.
- GONSALUS, I. C.; CAMPBELL, J. R.; BECK, G. H. and SALISBURY, G. W. (1944).—The bacteriology of bull semen. The effect of bacteria upon rapid tests of semen quality. *J. of D. Sc.*, 27, 357.
- HAMMOND, J.; EDWARDS, J.; ROWSON, L. E. A. and WALTON, A.—*The A. I. of cattle.*
- JAMES, C. E.; PATRICK, T. E. and NEWSOM, M. H. (1951).—The relationship between certain semen quality tests and fertility and the interrelationship of these tests. *J. of D. Sc.*, 34, 310.
- MANN, T.—*The biochemistry of semen.*
- MIES FILHO, A. (1956).—Reproducao e inseminacao artificial em ovinos.
- MIES FILHO, A. y FERREIRA BARRETO, J.—Nociones sobre reproducción de los animales e inseminación artificial.
- MILOVANOV, V. K. y SMIRNOV-ONGRIDUMOV.—Citado por Mies Filho y Ferreira Barreto: Nociones sobre reproducción de los animales e inseminación artificial.
- MILOVANOV, V. K. and SOKOLOVSKAYA, I. I.—*Stockbreeding and the artificial insemination of livestock.*
- MILLAR, P. G. and RAS, N. P.—*Manual of infertility and artificial insemination in cattle.*
- SALISBURY, G. W.; BECK, G. H.; ELLIOT, I. and WILLETT, E. L. (1943).—Rapid methods for estimating the number of spermatozoa in bull semen. *J. of D. Sc.*, 26, 69.
- TERNER, C. (1953).—*Aerobic metabolism and semen quality. Mammalian Germ Cells.*
- Van DEMARK, N. L.; MERCIER, E. and SALISBURY, G. W. (1945).—The Methylene blue reduction test and its relation to other measures of quality in bull semen. *J. of D. Sc.*, 28, 121.