

## Morfometría y subpoblaciones de espermatozoides de llama (*Lama glama*) usando el sistema ISAS® CASA-Morph

### Morphometry and subpopulation of llama (*Lama glama*) sperm using the ISAS® CASA-Morph system

Hernán Cucho<sup>1,3</sup>, Mitzi Gallegos<sup>1</sup>, Rufina Ccoiso<sup>1</sup>, Aydee Meza<sup>1</sup>, Enrique Ampuero<sup>1</sup>, César Ordóñez<sup>1</sup>, Anthony Valverde<sup>2</sup>

#### RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la existencia de subpoblaciones espermáticas según la morfometría de los espermatozoides de llama, utilizando un sistema CASA-Morph. Se colectó semen de cuatro llamas Q'ara de 4-6 años mediante el método de electroeyaculación en cuatro oportunidades por animal, con intervalos de una semana. Se determinó el volumen, movilidad total, concentración de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides vivos y porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal. Los parámetros morfométricos de los espermatozoides se evaluaron utilizando el sistema CASA-Morph, Integrated Semen Analysis System (ISAS®v1). Se determinó la longitud, anchura, área, perímetro, elipticidad, elongación, regularidad y rugosidad de la cabeza del espermatozoide de llama, así como la anchura, área, distancia y ángulo de inserción de la pieza intermedia del espermatozoide. Las variables morfométricas se distribuyeron en cinco componentes principales (PCA) denominados elongación, longitud, circularidad, anchura de la pieza intermedia e inserción de la pieza intermedia, que explicaron un 81.6% de la varianza total. El análisis de clústeres determinó cuatro subpoblaciones (SP): SP1 agrupó células pequeñas con baja elongación y elipticidad (36.8%); SP2 de espermatozoides de tamaño intermedio, tanto en la longitud y anchura de la cabeza (9.9%); SP3 de células alargadas con valores bajos de anchura de la cabeza y pieza intermedia (33.0%); y SP4 de espermatozoides con una anchura de la pieza intermedia alta (20.2%). Se hallaron diferencias significativas de subpoblaciones intra e inter animal.

**Palabras clave:** llama, análisis de semen, CASA-Morph, morfometría del espermatozoide, subpoblaciones

<sup>1</sup> Escuela Profesional de Zootecnia, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Perú

<sup>2</sup> Escuela de Agronomía, Campus Tecnológico Local San Carlos, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica

<sup>3</sup> E-mail: hernan.cucho@unsaac.edu.pe

Recibido: 18 de mayo de 2020

Aceptado para publicación: 20 de noviembre de 2020

Publicado: 23 de febrero de 2021

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the existence of sperm subpopulations according to the morphometry of llama sperm, using a CASA-Morph system. Semen was collected from four 4-6-year-old Q'ara llamas by electroejaculation four times per animal, at one week intervals. The volume, total motility, sperm concentration, percentage of live sperm and percentage of sperm with acrosomal reaction were determined. The morphometric parameters of the sperm were evaluated using the CASA-Morph, Integrated Semen Analysis System (ISAS®v1). The length, width, area, perimeter, ellipticity, elongation, regularity and rugosity of the llama sperm head were determined, as well as the width, area, and distance and angle of insertion of the midpiece of the spermatozoa. The morphometric variables were distributed in five main components (PCA) called elongation, length, circularity, width of the midpiece and insertion of the midpiece, which explained 81.6% of the total variance. The cluster analysis determined four subpopulations (SP): SP1 grouped small cells with low elongation and ellipticity (36.8%); SP2, spermatozoa of intermediate size, both in length and width of the head (9.9%); SP3 of elongated cells with low head and midpiece width values (33.0%); and SP4 of sperm with a high midpiece width (20.2%). Significant differences were found for intra- and inter-animal subpopulations.

**Key words:** llama, semen analysis, CASA-Morph, sperm morphometry, subpopulation

## INTRODUCCIÓN

Entre los aspectos limitantes de la crianza de llamas se encuentran los bajos índices de fertilidad (Díaz *et al.*, 2011), en parte por la baja calidad del semen (Giuliano *et al.*, 2008). La evaluación del semen es de extrema importancia para dilucidar la posible fertilidad de los machos. El espermiograma usualmente incluye la evaluación de la movilidad, concentración y morfología de los espermatozoides, teniendo este último una asociación con aspectos genéticos (Landry *et al.*, 2003; Kosova *et al.*, 2014; Ray *et al.*, 2017). La variabilidad de la morfología del espermatozoide dificulta la evaluación subjetiva del operador, de allí las grandes variaciones intra e inter observador, reduciendo la fiabilidad de los resultados (Yeung *et al.*, 1997).

La tecnología CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*) ha sido usada en el estudio de la evaluación seminal de diversas especies, incluyendo a los camélidos (Soler

*et al.*, 2014a,b; Meza *et al.*, 2018, Cucho *et al.*, 2019). Así, la tecnología CASA-Morph permite realizar una evaluación objetiva de la morfología espermática (Soler *et al.*, 2005a, Yániz *et al.*, 2015; Maroto-Morales *et al.*, 2016), eliminando de esta manera las evaluaciones subjetivas de los técnicos de laboratorio (Soler *et al.*, 2016).

Usualmente, en las evaluaciones de la morfología espermática se considera a la muestra como una población homogénea, con una distribución normal, lo cual puede llevar a errores de interpretación, toda vez que existen subpoblaciones espermáticas (Valle *et al.*, 2012, Valverde y Madrigal-Valverde, 2018), determinadas a partir del análisis multivariado de los parámetros morfométricos (Hirai *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2016). Subpoblaciones espermáticas han sido reportadas en bovinos y ovinos (Rubio-Guillen *et al.*, 2007; Martí *et al.*, 2011; Maroto-Morales *et al.*, 2012), así como en especies silvestres tales como ciervos rojos o pumas (Esteso *et al.*, 2009; Cucho *et al.*, 2016). El objetivo del presente es-

tudio fue determinar la existencia de subpoblaciones espermáticas según la morfometría de los espermatozoides de llama, empleando el Integrated Semen Analysis System (ISAS®v1).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar del Estudio y Animales

El estudio fue realizado entre enero y julio de 2018 en el Centro de Investigaciones en Camélidos Sudamericanos (CICAS) La Raya, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. El Centro se encuentra en el distrito de Maranganí, Región Cusco, Perú, a una altitud de 4130 msnm. El área pertenece a la zona de vida de páramo húmedo-subalpino subtropical (Holdridge, 1967).

Se seleccionaron cuatro llamas Q'ara, de 4-6 años, sin problemas reproductivos y pertenecientes al plantel de reproductores del CICAS La Raya. El peso promedio fue de  $121.2 \pm 12.2$  kg. El tamaño del testículo izquierdo fue de  $4.38 \pm 0.94 \times 3.08 \pm 0.34$  cm, y el derecho fue de  $4.35 \pm 1.36 \times 3.03 \pm 0.28$  cm. La alimentación de los animales era en base a pradera natural, siendo *Stipa obtusa*, *Festuca* sp, *Calamagrostis amoena* y *Scirpus rigidus* las especies predominantes.

### Colección de Semen

La colección de semen se realizó mediante electroeyaculación, siguiendo el procedimiento propuesto por Director *et al.* (2007). Para esto, los machos fueron pesados y la distancia ano-próstata fue determinada con un ecógrafo Agrosan® L (Angoulême, Francia). Las colectas de semen se realizaron entre las 07:00 y 08:00 h, previo estímulo urinario. Las llamas estuvieron en ayuno desde las 17:00 h del día anterior. Se aplicó 0.3 ml de xylacina y 2.8 ml de ketamina por 100 kg de peso corporal (Rodríguez, 2013), se limpió la zona peniana

con 10 ml de agua destilada a 37 °C, y se extrajeron las heces del recto. La sonda del electroeyaculador (Minitube®, Tiefenbach, Alemania), lubricada con gel de ecografía, fue introducida vía rectal y posada sobre la próstata. Se inició la estimulación eléctrica con 3 voltios (V), con tres descargas de 1 s y 2 s de descanso, tras lo cual se incrementaba el voltaje en 1 V. El procedimiento tuvo una duración de  $15.5 \pm 1.3$  minutos, alcanzando un voltaje máximo de 17 V. La erección del pene se logró a los  $11.8 \pm 1.0$  V, y la eyaculación a los  $15.3 \pm 1.0$  V. El intervalo entre las colecciones de semen fue de una semana.

Se obtuvieron cuatro colectas por llama, con cuatro repeticiones ( $n=4$ ,  $r=4$ ). Las muestras de semen se recuperaron en tubos Falcon graduados de 50 ml. Se desechó el semen contaminado con orina o con bajas concentraciones.

### Análisis del Semen

- Se midió el volumen (ml) del semen así como se determinaron las características macroscópicas.
- La movilidad de los espermatozoides se evaluó utilizando un sistema CASA Mot (ISAS®v1, Proiser R + D, Paterna, España), los archivos de video se analizaron a 25 cuadros por segundo (fps) durante un segundo.
- La movilidad total (MT; %) se definió como el porcentaje de células móviles dentro de la muestra.
- La concentración de espermatozoides (millones de espermatozoides por ml), se evaluó con un Spermtrack® (Proiser R+D, SL, España), empleando 3 µl de semen (100x).
- El porcentaje de espermatozoides vivos se valoró empleando eosina y nigrosina (Minitube®, Alemania), usando 5 µl de semen y el porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado se evaluó con azul de Coomassie (Sigma-Aldrich®), según lo descrito por Fumuso *et al.* (2014). Espermatozoides con acrosoma intacto mostraban una coloración azul. Para esto,

se empleó un microscopio de contraste de fase (UOP; Proiser R+D) del sistema ISAS® v1, contando no menos de 200 espermatozoides por muestra a 400x.

### Análisis Morfométrico

El análisis de morfometría espermática se realizó usando el sistema ISAS® v1 CASA-Morph (Proiser R+D, España). Las células espermáticas fueron capturadas empleando un microscopio de contraste de fase (UOP; Proiser R+D) equipado con un objetivo de 100x de campo claro (AN 0.17) y una cámara digital de video (Proiser 782M). El tamaño de las cuadrículas de captura de video fue de 768x576x8 bits con 256 niveles de grises. La resolución de las imágenes fue de 0.084  $\mu\text{m}$ /pixel en ambos ejes.

Se realizaron frotis empleando 5  $\mu\text{l}$  de semen. Luego de 20 minutos de secado se tiñeron con Hemacolor® (Merck, Alemania), según protocolo del producto. Las imágenes en promedio de 270 espermatozoides de cada colecta de semen fueron capturadas y analizadas. Se analizaron los siguientes parámetros morfométricos: longitud (L,  $\mu\text{m}$ ), anchura (W,  $\mu\text{m}$ ), área (A,  $\mu\text{m}^2$ ), perímetro (P,  $\mu\text{m}$ ), elipticidad (L/W), elongación ( $[(L-W)/(L+W)]$ ), regularidad ( $\pi LW/4A$ ) y rugosidad ( $4\pi A/P^2$ ) de la cabeza del espermatozoide. Así mismo, la anchura ( $\mu\text{m}$ ), área ( $\mu\text{m}^2$ ), distancia de inserción (distancia entre la cabeza y el eje de la pieza intermedia,  $\mu\text{m}$ ) y ángulo de inserción ( $^\circ$ ) de la pieza intermedia del espermatozoide. La evaluación de la morfometría de un espermatozoide permite detectar alteraciones en la espermiogénesis y en la maduración epididimaria (Hidalgo *et al.*, 2006).

### Análisis Estadístico

Se usó la estadística descriptiva para el volumen, movilidad total, concentración, espermatozoides vivos y reacción acrosomal. En el caso de las variables de morfometría, se determinaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante las pruebas de

Shapiro-Wilks y Levene para los datos obtenidos del análisis CASA-Morph de todas las células analizadas. Se realizaron procedimientos de agrupamiento para identificar subpoblaciones espermáticas del conjunto de datos de morfometría. Todos los valores para las variables morfométricas se estandarizaron para evitar cualquier efecto de escala.

El primer proceso consistió en realizar un análisis de componentes principales (PCA) o análisis factorial de todos los datos para obtener un menor número de combinaciones lineales (PC) que aún conservaran la mayor cantidad de información posible de las variables originales. El número de componentes principales (PC) utilizados en el siguiente proceso del análisis se determinó a partir del criterio de Kaiser; es decir, seleccionando solo aquellos con un valor propio (eigenvalue; varianza extraída de cada PC  $>1$ ). Además, se realizó la prueba de esfericidad de Bartlett y la prueba KMO (Kaiser-Meyer-Olkin) (Spencer, 2013). Como método de rotación, se utilizó el método varimax con la normalización de Kaiser (Kaiser, 1958).

El segundo proceso consistió en realizar un análisis no jerárquico con el modelo de k-medias (k-means) que utiliza distancias euclidianas de las variables cuantitativas después de la estandarización de los datos, por lo que los centros de agrupación fueron las medias de las observaciones asignadas a cada agrupación (Kaufman y Rousseeuw, 2005). El análisis multivariado de grupos de k-medias se realizó para clasificar los espermatozoides en un número reducido de subpoblaciones (clusters o grupos) de acuerdo con sus variables morfométricas. En el proceso final, para determinar el número óptimo de grupos, los centroides finales se agruparon jerárquicamente utilizando el método Ward (Murtagh y Legendre, 2014). El procedimiento de agrupamiento permite la identificación de subpoblaciones de espermatozoides ya que cada grupo contribuyó a un grupo final formado por los espermatozoides unidos a los centroides.

Se realizó un análisis de la varianza para determinar las diferencias estadísticas en las distribuciones de observaciones dentro de las subpoblaciones de espermatozoides para cada variable morfométrica. Las diferencias entre medias se analizaron mediante la prueba de Bonferroni. Los resultados se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). La significación estadística se consideró en  $p < 0.05$ . Todos los datos se analizaron utilizando el paquete IBM SPSS v 23.0 para Windows (SPSS Inc., EEUU).

## RESULTADOS

### Colección y Evaluación del Semen

La eficiencia de las colecciones de semen con el método de electroeyaculación fue de 84%. El 16% restante presentó baja concentración de espermatozoides ( $< 50 \times 10^6/\text{ml}$ ), presencia de orina, o eran eyaculados parciales, lo cual determinó su exclusión del estudio. En total, se analizaron 16 muestras de semen, cuatro de cada animal. La duración promedio de las colectas fue de  $15.5 \pm 1.3$  minutos. Las características seminales por macho se muestran en el Cuadro 1.

### Morfometría Espermática

Se encontró un efecto animal ( $p < 0.05$ ) en las variables morfométricas de cabeza y pieza intermedia de los espermatozoides. Las variables morfométricas que indicaron la mayor variabilidad correspondieron a la pieza intermedia, y fueron la distancia, el ángulo de inserción y área, con coeficientes de variación de 78.0, 82.1 y 29.1%, respectivamente. Hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre animales para las variables de morfometría, especialmente las variables de cabeza del espermatozoide: longitud, ancho y área (Cuadro 2).

### Componentes Principales (PCs) y Estructura Subpoblacional

El análisis de componentes principales indicó cinco PCs:

- Elongación (PC1), representada por la elipticidad, la elongación y la anchura de la cabeza del espermatozoide. El efecto del valor propio de las dos primeras variables fue el mismo, mientras que para la anchura de la cabeza fue de  $-0.710$  indicando que en este grupo se encontraban aquellas células con menor anchura de la cabeza.
- PC2 se refería a anchura, longitud y área de la cabeza, llamado longitud con un mayor efecto por anchura de la cabeza.
- PC3, representado por el perímetro y la rugosidad, denominada circularidad dada principalmente por rugosidad ( $-0.860$ ).
- PC4, representado por anchura de la pieza intermedia ( $0.867$ ) y área de la pieza intermedia, denominado anchura de la pieza intermedia.
- PC5, representado por la distancia y el ángulo de inserción de la pieza intermedia, llamado inserción de la pieza intermedia y con una variación total explicada de 81.60%.

Los resultados indicaron que la forma y el tamaño del espermatozoide tiene un efecto relativamente mayor sobre la varianza total que las otras variables (Cuadro 3).

Los datos del análisis de conglomerados mostraron cuatro subpoblaciones (SP). Los valores morfométricos correspondientes a cada subpoblación se caracterizaron por: (a) células pequeñas con baja elongación y elipticidad (SP1), que mostró la longitud de la cabeza ( $5.03 \pm 0.01 \mu\text{m}$ ) y elipticidad ( $1.57 \pm 0.003$ ) más baja; y comprendía el 36.8% del total de células; (b) células de tamaño intermedio (SP2), tanto en la cabeza como en la pieza intermedia, exhibiendo longitudes de

Cuadro 1. Características seminales de cuatro llamas machos reproductores (promedio, desviación estándar [D.E.] y coeficiente de variabilidad [C.V.] colectados por electroeyaculación (n = 4 muestras por macho)

Variable	Promedio	D.E.	C.V.
Volumen (ml)	3.63	1.64	45.18
Movilidad total (%)	44.68	18.93	42.36
Concentración (x10 <sup>6</sup> /ml)	101.71	38.52	38.86
Espermatozoides vivos (%)	64.56	13.54	20.97
Reacción acrosomal (%)	59.33	7.16	12.06

Cuadro 2. Variables morfométricas de la cabeza y pieza intermedia (medias ± SEM) del espermatozoide de llama (*Lama glama*)

Variable	Macho			
	1	2	3	4
Longitud cabeza (µm)	5.21±0.01 <sup>a</sup>	5.15±0.01 <sup>b</sup>	5.32±0.01 <sup>c</sup>	5.26±0.01 <sup>d</sup>
Anchura cabeza (µm)	3.06±0.01 <sup>a</sup>	3.01±0.01 <sup>b</sup>	3.24±0.01 <sup>c</sup>	3.14±0.01 <sup>d</sup>
Área cabeza (µm <sup>2</sup> )	13.31±0.04 <sup>a</sup>	13.10±0.04 <sup>b</sup>	14.13±0.05 <sup>c</sup>	13.83±0.05 <sup>d</sup>
Perímetro cabeza (µm)	16.77±0.04 <sup>a</sup>	15.93±0.04 <sup>b</sup>	17.28±0.04 <sup>c</sup>	16.64±0.04 <sup>a</sup>
Elipticidad	1.71±0.005 <sup>a</sup>	1.72±0.004 <sup>a</sup>	1.65±0.005 <sup>b</sup>	1.68±0.01 <sup>c</sup>
Rugosidad	0.60±0.002 <sup>a</sup>	0.65±0.002 <sup>b</sup>	0.60±0.002 <sup>a</sup>	0.63±0.002 <sup>c</sup>
Elongación	0.26±0.001 <sup>a</sup>	0.26±0.001 <sup>a</sup>	0.24±0.001 <sup>b</sup>	0.25±0.001 <sup>c</sup>
Regularidad	0.94±0.001 <sup>a</sup>	0.93±0.001 <sup>b</sup>	0.96±0.001 <sup>c</sup>	0.94±0.001 <sup>a</sup>
Anchura PI (µm)	1.33±0.01 <sup>a</sup>	1.47±0.011 <sup>b</sup>	1.28±0.01 <sup>a</sup>	1.43±0.01 <sup>c</sup>
Área PI (µm <sup>2</sup> )	2.80±0.02 <sup>a</sup>	2.98±0.02 <sup>b</sup>	2.81±0.03 <sup>a</sup>	2.92±0.03 <sup>b</sup>
Ángulo inserción PI (°)	11.04±0.308 <sup>a</sup>	11.25±0.30 <sup>a</sup>	9.32±0.34 <sup>b</sup>	10.07±0.32 <sup>ab</sup>
Distancia inserción PI (µm)	0.23±0.005 <sup>a</sup>	0.19±0.005 <sup>b</sup>	0.25±0.01 <sup>ac</sup>	0.25±0.005 <sup>c</sup>

Número total de células por macho: 1 = 1147; 2 = 1229; 3 = 915; 4 = 1056

PI: pieza intermedia; SEM: error estándar de la media

<sup>a-d</sup> Superíndices distintos dentro de fila indican diferencias significativas entre machos (p<0.05)

Cuadro 3. Valores propios de componentes principales (PCs) para variables morfométricas en espermatozoides de llama (*Lama glama*)

Variable	Componentes principales				
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Elongación	0.992				
Elipticidad	0.992				
Anchura de cabeza	-0.710	0.690			
Longitud de cabeza		0.859			
Área de cabeza		0.812			
Regularidad					
Rugosidad			-0.860		
Perímetro de cabeza			0.839		
Anchura PI				0.867	
Área PI				0.816	
Distancia inserción PI					0.737
Ángulo inserción PI					0.697
Varianza explicada (%)	26.22	22.81	14.17	9.84	8.56

Varianza total explicada = 81.60%

Cuadro 4. Subpoblaciones espermáticas para variables morfométricas (medias  $\pm$  SEM) en llamas (*Lama glama*)

	Subpoblación			
	SP1	SP2	SP3	SP4
N.º de células (%)	1600 (36.8)	432 (9.9)	1435 (33.0)	880 (20.2)
Longitud cabeza	5.03 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	5.20 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	5.43 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	5.27 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
Anchura cabeza	3.22 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	3.15 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	3.00 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	3.0411 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
Área cabeza	13.63 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	13.40 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	13.50 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	13.57 $\pm$ 0.0573 <sup>ab</sup>
Perímetro cabeza	16.60 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	16.70 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	16.86 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	16.17 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>
Elipticidad	1.57 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	1.66 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.82 $\pm$ 0.003 <sup>c</sup>	1.74 $\pm$ 0.004 <sup>d</sup>
Rugosidad	0.63 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	0.61 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	0.60 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	0.65 $\pm$ 0.002 <sup>c</sup>
Elongación	0.22 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.24 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>	0.29 $\pm$ 0.001 <sup>c</sup>	0.27 $\pm$ 0.001 <sup>d</sup>
Regularidad	0.94 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.96 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	0.95 $\pm$ 0.001 <sup>c</sup>	0.93 $\pm$ 0.001 <sup>d</sup>
Anchura PI	1.32 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.43 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.17 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	1.83 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
Área PI	2.62 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	3.01 $\pm$ 0.033 <sup>b</sup>	2.58 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	3.80 $\pm$ 0.023 <sup>c</sup>
Ángulo inserción PI	8.18 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	25.79 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>	9.26 $\pm$ 0.24 <sup>c</sup>	9.25 $\pm$ 0.31 <sup>c</sup>
Distancia inserción PI	0.20 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	0.52 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.20 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.005 <sup>c</sup>

SP: subpoblación; PI: pieza intermedia

<sup>a-d</sup> Superíndices distintos dentro de fila indican diferencias significativas entre subpoblaciones espermáticas ( $p < 0.05$ )

Cuadro 5. Porcentaje de células espermáticas en cada subpoblación caracterizada en semen de cuatro llamas (*Lama glama*)

Macho	Subpoblaciones (% espermatozoides)			
	SP1 <sup>a</sup>	SP2 <sup>b</sup>	SP3 <sup>c</sup>	SP4 <sup>d</sup>
1 <sup>α</sup>	34.00	11.24	40.98	13.78
2 <sup>β</sup>	31.49	6.75	27.91	33.85
3 <sup>γ</sup>	45.25	11.80	35.08	7.87
4 <sup>ε</sup>	36.81	9.94	33.01	20.24

Cada fila indica el porcentaje de espermatozoides en cada subpoblación

Conglomerado; suma de porcentajes de cada animal = 100

Número total de células por macho: 1 = 1147, 2 = 1229, 3 = 915, 4 = 1056

<sup>a,b,c,d</sup> Superíndices distintos indican diferencias dentro de fila respecto a las subpoblaciones espermáticas

<sup>α,β,γ,ε</sup> Superíndices distintos indican diferencias dentro de columna para cada animal

Chi cuadrado,  $p < 0.05$

cabeza ( $5.20 \pm 0.02 \mu\text{m}$ ) y anchura ( $3.15 \pm 0.01 \mu\text{m}$ ) intermedias; (c) células alargadas y con valores bajos de anchura de cabeza (SP3  $3.00 \pm 0.01 \mu\text{m}$ ) y pieza intermedia ( $1.17 \pm 0.01 \mu\text{m}$ ). Además, esta subpoblación presentó células con valores mayores de elipticidad ( $1.82 \pm 0.003$ ) y elongación ( $0.29 \pm 0.001$ ), y representó el 33.0% del total de células; y (d) células de pieza intermedia grande (SP4), que se caracterizó por la anchura de la pieza intermedia más alta ( $1.83 \pm 0.01 \mu\text{m}$ ). La subpoblación SP2 mostró la menor proporción de células (9.9%), seguida de SP4 con 20.2% del total de células espermáticas (Cuadro 4).

Los análisis de la proporción de espermatozoides en cada subpoblación para los cuatro machos revelaron diferencias entre machos y subpoblaciones de cada macho. Las subpoblaciones de esperma se distribuyeron de manera desigual para cada macho. Las subpoblaciones de espermatozoides con el mayor número de células se asociaron con un macho específico, [macho

1: SP3 (40.98%); macho 2: SP4 (33.85%); macho 3: SP1 (45.25); macho 4: SP1 (36.81%)]; sin embargo, las subpoblaciones con porcentajes más bajos de células en los machos 2 y 4 se asociaron en SP2 (Cuadro 5).

## DISCUSIÓN

### Colección y Evaluación del Semen

El tiempo de colecta ( $15.5 \pm 1.3$  minutos) fue mayor al reportado por Giuliano *et al.*, (2008) de 6-12 minutos en Argentina. El volumen de  $3.63 \pm 1.64$  ml fue inferior a los valores de 3.82-4.90 ml descritos por Carretero *et al.*, (2016), Casaretto *et al.*, (2012) y Fumuso *et al.*, (2018), pero mayor a los valores de 2.1-2.8 obtenidos por Giuliano *et al.* (2008) y Carretero *et al.* (2015), siendo el semen colectado por electroeyaculación en todos los casos. Esta variable es dependiente de la libido del macho y de la estación reproductiva (Giuliano *et al.*, 2008).



La movilidad espermática total ( $44.68 \pm 18.93\%$ ) fue superior a las movilidades de 26.1 a 35.4% reportadas por otros autores (Giuliano *et al.*, 2008; Casaretto *et al.*, 2012; Carretero *et al.*, 2015; Fumuso *et al.*, 2018), quienes hicieron las evaluaciones de forma subjetiva. De otra parte, la concentración espermática obtenida en el presente estudio (Cuadro 1), fue similar a la reportada por Fumuso *et al.* (2018), pero mayor a los valores de  $50.4-78.3 \times 10^6/\text{ml}$  reportada por Giuliano *et al.* (2008), Casaretto *et al.* (2012) y Carretero *et al.* (2015), posiblemente debido a la libido de los animales, y al instrumento de medición (cámara hemocitométrica), ya que en este estudio se empleó un Spermtrack®, que muestra una mejor performance que las cámaras de Neubauer para estas evaluaciones (Soler *et al.*, 2012; Crespilho *et al.*, 2017).

El 64.56% de espermatozoides vivos encontrado en el presente estudio se encuentra dentro del rango de 52.2 y 65.2% reportado en la literatura (Giuliano *et al.*, 2008; Casaretto *et al.*, 2012; Carretero *et al.*, 2015; Fumuso *et al.* 2018). El 59.33% de reacción acrosomal del estudio fue inferior a los valores reportados por Fumuso *et al.* (2018) y Carretero *et al.* (2015) en semen de llama colectado por electroeyaculación. En llamas, esta variable es importante, ya que permite evaluar los efectos de las biotecnologías reproductivas empleadas en esta especie (Giuliano, 2012).

### Morfometría Espermática

En la actualidad, el análisis de la morfometría espermática con los sistemas de análisis computarizado de semen (CASA-Morph), dan información precisa y objetiva de las variables morfométricas de una muestra de semen (Martí *et al.*, 2012). En este estudio, la morfometría de 4347 espermatozoides de llama permitió encontrar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre machos en todas las variables evaluadas, al igual que en otros estudios (Casaretto *et al.*, 2012; Soler *et al.*, 2014a).

En el análisis de la morfometría de la cabeza del espermatozoide de llama, los valores de longitud, anchura, área, perímetro, elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad, son similares a los reportados por Soler *et al.* (2014a,b), empleando el mismo sistema de análisis computarizado (ISAS®, Proiser R+D, S.L.) y la tinción Hemacolor®. No obstante, Casaretto *et al.* (2012) reportaron valores mayores para la longitud, anchura, área, perímetro, rugosidad y elongación de la cabeza del espermatozoide, posiblemente debido al software generalista que usaron para dichos análisis (QWin Plus, Leica Microsystems, Alemania) y la Tinción 15® (Biopur, Argentina), ya que diferentes técnicas de tinción proporcionan diferentes valores de morfometría (Soler *et al.*, 2005b; Cucho *et al.*, 2019).

Los valores del presente estudio para anchura, área, distancia y ángulo de inserción de la pieza intermedia del espermatozoide de llama (Cuadro 2), muestran diferencias significativas entre animales, así como elevados coeficientes de variación. La anchura, área y distancia de inserción de la pieza intermedia fueron similares a los reportados, en tanto que el ángulo de inserción de la pieza intermedia fue menor al hallado en alpacas (Cucho *et al.*, 2019).

### Subpoblaciones Espermáticas

Existen dos tipos de espermatozoides en función de la morfología espermática, los homomorfos y los heteromorfos. Los primeros tienen una morfología constante entre individuos, así como dentro del animal (Soler *et al.*, 2014a). Los camélidos sudamericanos pertenecen al grupo de los heteromorfos (Buendía *et al.*, 2002; Casaretto *et al.*, 2012; Soler *et al.*, 2014a; Cucho *et al.*, 2019); es decir, estas especies muestran gran variabilidad de su morfometría intra e inter animal. En los últimos años la información proporcionada por los sistemas CASA combinada con la estadística multivariada, ha mostrado la verdadera estructura de la población esper-

mática, la cual está compuesta por diferentes subpoblaciones (Soler *et al.*, 2017).

Este es el primer estudio que ofrece información de la estructura de subpoblaciones espermáticas de llamas y de camélidos en función de la morfometría de dicha célula, en la cual se identificaron cuatro subpoblaciones espermáticas, como las halladas por Gutiérrez-Reinoso y García-Herreros (2016) en gatos, mientras que se han reportado tres SP en pumas (Cucho *et al.*, 2016) y cinco SP en gallinas de guinea (García-Herreros, 2016). La evidencia que los espermatozoides se agrupan en subpoblaciones bien definidas de acuerdo con sus características cinéticas y/o morfométricas, permite dar una visión más amplia del comportamiento espermático; además, se ha visto que la distribución subpoblacional varía entre individuos, lo cual indicaría diferentes estrategias de competencia entre eyaculados (Valverde *et al.*, 2019). La información hallada en este estudio proporciona nuevos conocimientos que podrían usarse en futuros estudios que emplean la morfometría del espermatozoide de llama como un indicador del estado reproductivo de esta especie.

## CONCLUSIONES

El empleo de un sistema CASA-Morph apoyado con la estadística multivariada basada en el análisis de componentes principales permitió identificar cuatro subpoblaciones espermáticas con características diferentes de su morfometría en los eyaculados de llamas, hallándose diferencias significativas de subpoblaciones intra e inter animal.

## Agradecimiento

Al Proyecto de Investigación «Fisiología del espermatozoide de llama y su aplicación en la inseminación artificial con semen criopreservado» de la UNSAAC, Perú, por el financiamiento de la investigación.

## LITERATURA CITADA

1. **Buendía P, Soler C, Paollichi F, Gago C, Urquieta B, Pérez-Sánchez F, Bustos-Obregón E, 2002.** Morphometric characterization and classification of alpaca sperm head using the Sperm-Class Analyzer computer-assisted system. *Theriogenology* 57: 1207-1218. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00724-5
2. **Carretero MI, Fumuso FG, Neild DM, Giuliano SM, Cetica P, Miragaya MH. 2015.** Evaluation of the acrosomal status in *Lama glama* sperm incubated with acrosome reaction inducers. *Anim Repro Sci* 160: 1-11. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.06.014
3. **Carretero MI, Giuliano SM, Arraztoa CC, Santa Cruz RC, Fumuso FG, Neild DM. 2016.** Comparison of two cooling protocols for llama semen: with and without collagenase and seminal plasma in the medium. *Andrologia* 49: e12691. doi: 10.1111/and.12691
4. **Casaretto C, Lombardo D, Giuliano S, Gambarotta M, Carretero M, Miragaya M. 2012.** Morphometric analysis of llama (*Lama glama*) sperm head. *Andrologia* 44: 424-430. doi: 10.1111/j.1439-0272.2011.01200.x
5. **Crespilho AM, Chiaradia L, Cortez A, Dinelli M, Papa FO, Gomes GM, Peixoto Junior KC. 2017.** Sensitivity evaluation of the computer-assisted sperm analysis (CASA) in the determination of frozen-thawed bull semen concentration. *Braz J Vet Res Anim Sci* 54: 247-252.
6. **Cucho H, Alarcón V, Ordóñez C, Ampuero E, Meza A, Soler C. 2016.** Puma (*Puma concolor*) epididymal sperm morphometry. *Asian J Androl* 18: 879- 881. doi: 10.4103/1008-682X-187584
7. **Cucho H, López Y, Caldeira C, Valverde A, Ordóñez C, Soler C. 2019** Comparison of three different staining methods for the morphometric charac-

- terization of alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using ISAS® CASA-Morph system. *Nova Biol Reperta* 6: 284-291. doi: 10.29252/nbr.6.3.284
8. **Díaz A, Huamán H, Camacho J, Ampuero A, Quispe D, Huanca W. 2011.** Nivel sérico de estradiol a la monta y su efecto sobre la tasa de concepción en alpacas. *Rev Inv Vet Perú* 22: 312-317.
  9. **Director A, Giuliano S, Carretero M, Pinto M, Trasorras V, Miragaya M. 2007.** Electroejaculation and seminal characteristics in llama (*Lama glama*). *J Camel Pract Res* 14: 203-206.
  10. **Esteso MC, Fernández-Santos MR, Soler AJ, Montoro V, Martínez-Pastor F, Garde JJ. 2009.** Identification of sperm-head morphometric subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm samples. *Reprod Domest Anim* 44: 206-211. doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.01029.x
  11. **Fumuso FG, Giménez ML, Neild DM, Giuliano SM, Chavez MG, Carretero MI. 2014.** Comparación de métodos de lavado y tiempos de conservación de los frotis para evaluar el acrosoma en espermatozoides de llama mediante la tinción de Coomassie Blue. *Spermova* 4: 50-53.
  12. **Fumuso FG, Giuliano SM, Chaves MG, Neild DM, Miragaya MH, Gambarotta MC, Carretero MI. 2018.** Seminal plasma affects the survival rate and motility pattern of raw llama spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 192: 99-106. doi: 10.1016/j.anireprosci.-2018.02.019
  13. **García-Herreros M. 2016.** Sperm subpopulations in avian species: a comparative study between the rooster (*Gallus domesticus*) and guinea fowl (*Numida meleagris*). *Asian J Androl* 18: 889-894. doi: 10.4103/1008-682X.188448
  14. **Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. 2008.** Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim Reprod Sci* 104: 359-369. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.02.016
  15. **Giuliano SM. 2012.** Extracción y evaluación del semen de camélidos sudamericanos. *Spermova* 2: 6-9.
  16. **Gutiérrez-Reinoso M, García-Herreros M. 2016.** Nor-mozoospermic vs teratozoospermic domestic cats: differential testicular volume, sperm morphology and subpopulation structure during epididymal maturation. *Asian J Androl* 18: 871-878. doi: 10.4103/1008-682X.187583
  17. **Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado J, Soler C. 2006.** Morphometric classification of Spanish Thoroughbred stallion semen according to sperm head size measurements. *Anim Reprod Sci* 94: 26-28. doi: 10.1016/j.anireprosci.-2006.03.038
  18. **Hirai M, Boersma A, Hoeflich A, Wolf E, Föll J, Aumüller R, Braun J. 2001.** Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *J Androl* 22: 104-110
  19. **Holdridge LR. 1967.** Life zone ecology. San José, Costa Rica. Tropical Science Center. 149 p.
  20. **Kaiser HF. 1958.** The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. *Psychometrika* 23: 187-200.
  21. **Kaufman L, Rousseeuw PJ. 2005.** Finding groups in data: an introduction to cluster analysis. Wiley. 342 p.
  22. **Kosova G, Hotaling JM, Ohlander S, Niederberger C, Prins GS, Ober C. 2014.** Variants in DPF3 and DSCAML1 are associated with sperm morphology. *Genetics* 31: 131-137. doi: 10.1007/s10815-013-0140-9
  23. **Landry C, Geyer LB, Arakaki Y, Uehara T, Palumbi SR. 2003.** Recent speciation in the Indo-West Pacific: rapid evolution of gamete recognition and sperm morphology in cryptic species of sea urchin. *P R Soc B* 270: 1839-1847. doi: 10.1098/rspb.2003.2395

24. **Maroto-Morales A, Ramón M, García-Álvarez O, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Roldan ER, Gomendio M, et al. 2012.** Morphometrically distinct sperm subpopulations defined by a multistep statistical procedure in ram ejaculates: intra-and inter individual variation. *Theriogenology* 77: 1529-1539. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.11.020
25. **Maroto-Morales A, García-Álvarez O, Ramón M, Martínez-Pastor F, Fernández-Santos M, Soler A, Garde. 2016.** Current status and potential of morphometric sperm analysis. *Asian J Androl* 18: 863-870. doi: 10.4103/1008-682X.187581
26. **Martí JI, Aparicio IM, García-Herberos M. 2011.** Sperm morphometric subpopulations are differentially distributed in rams with different maturity age in cryopreserved ejaculates. *Theriogenology* 76: 97-109. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.01.022
27. **Martí JI, Aparicio IM, Leal CLV, García-Herberos M. 2012.** Seasonal dynamics of sperm morphometric subpopulations and its association with sperm quality parameters in ram ejaculates. *Theriogenology* 78: 528-541. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.-02.035
28. **Meza A, Caldeira C, Valverde A, Ordoñez C, Ampuero E, Cucho H, Soler C. 2018.** Sperm kinematic characterization of alpaca (*Vicugna pacos*) during the reproductive season. *Reprod Domest Anim* 53: 1415-1423. doi: 10.1111/rda.13284
29. **Murtagh F, Legendre P. 2014.** Ward's hierarchical agglomerative clustering method: which algorithms implement ward's criterion? *J Classif* 31: 274-295. doi: 10.1007/s00357-014-9161-z
30. **Rodríguez M. 2013.** Índice de fragmentación del ADN espermático y test de HOS en semen de llamas (*Lama glama*) utilizando el Integrated Semen Analysis System (ISAS). Tesis de Ingeniero Zootecnista. Cusco, Perú: Univ. San Antonio Abad del Cusco. 121 p.
31. **Ray PF, Metzler-Guillemain C, Mitchell MJ, Arnoult C, Coutton C. 2017.** Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function. *Clin Genet* 91: 217-232. doi: 10.1111/cge.12905
32. **Rubio-Guillén J, Gonzáles D, Garde JJ, Estes MC, Fernández-Santos MR, Rodríguez-Gil JE, et al. 2007.** Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod Domest Anim* 42: 354-357. doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00788.x
33. **Soler C, Gaâner P, Nieschlag E, de Montserrat JJ, Gutiérrez R, Sancho M, Buendía P, et al. 2005a.** Utilización del Integrated Semen Analysis System (ISAS®) para el análisis morfométrico espermático humano y su significado en las técnicas de reproducción asistida. *Rev Int Androl* 3: 112.119. doi: 10.1016/S1698-031X(05)73257-X
34. **Soler C, Gadea B, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Estes MC, Núñez J, Moreira PN, et al. 2005b.** Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS®. *Theriogenology* 64: 1236-1243. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.02.018
35. **Soler C, Fuentes MC, Sancho M, García A, Núñez de Murga M, Núñez de Murga J. 2012.** Effect of counting chamber on seminal parameters, analyzing with ISASv1®. *Rev Int Androl* 10: 132-138
36. **Soler C, Sancho M, García-Molina A, Núñez J, Parráquez VH, Contell J, Bustos-Obregón E. 2014a.** Llama and alpaca comparative sperm head morphometric analysis. *J Camelid Sci* 7: 48-58.
37. **Soler C, Sancho M, García A, Fuentes MC, Núñez J, Cucho H. 2014b.** Ejaculate fractioning effect on llama sperm head morphometry as assessed by the ISAS® CASA system. *Reprod Domest Anim* 49: 71-78. doi: 10.1111/rda.12226

38. **Soler C, Cooper TG, Valverde A, Yániz JL. 2016.** Afterword to sperm morphometrics today and tomorrow. *Asian J Androl* 18: 895-897. doi: 10.4103/1008-682X.188451
39. **Soler C, Contell J, Bori L, Sancho M, García-Molina A, Valverde A, Sagarvall J. 2017.** Sperm kinematic, head morphometric and kinetic - morphometric subpopulations in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Asian J Androl* 19: 154-159. doi: 10.4103/1008-682X.188445
40. **Spencer NH. 2013.** Essentials of multivariate data analysis. Boca Raton, FL, USA: Taylor and Francis Group, CRC Press. 186 p.
41. **Valle RR, Nayudu PL, Leal CL, García-Herreros M. 2012.** Sperm head morphometry in ejaculates of adult marmosets (*Callithrix jacchus*): a model for studying sperm subpopulations and among-donor variations. *Theriogenology* 78: 1152-1165. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.05.017
42. **Valverde A, Arenán H, Sancho M, Contell J, Yániz J, Fernández A, Soler C. 2016.** Morphometry and subpopulation structure of Holstein bull spermatozoa: variations in ejaculates and cryopreservation straws. *Asian J Androl* 18: 1-7. doi: 10.4103/1008-682X.187579
43. **Valverde A, Madrigal-Valverde M. 2018.** Sistemas de análisis computarizado de semen en la reproducción animal. *Agron Mesoam* 29: 469- 484. doi: 10.15517/ma.v29i2.29852
44. **Valverde A, Castro- Morales O, Madrigal- Valverde M, Soler C. 2019.** Sperm kinematics and morphometric subpopulations analysis with CASA system: a review. *Rev Biol Trop* 67: 1473-1487. doi: 10.15517/rbt.v67i6.35151
45. **Yániz JL, Soler C, Santolaria P. 2015.** Computer assisted sperm morphometry in mammals: a review. *Anim Reprod Sci* 156: 1-12. doi: 10.1016/j.anireprosci.-2015.03.002
46. **Yeung CH, Pérez-Sánchez F, Soler C, Poser D, Kliesch S, Cooper TG 1997.** Maturation of human epididymal spermatozoa (from selected epididymides of prostatic carcinoma patients) with respect to their morphology and ability to undergo the acrosome reaction. *Hum Reprod Update* 3: 205-213. doi: 10.1093/humupd/3.3.205