

## MORFOMETRÍA DEL NÚCLEO Y DE LA CABEZA DE ESPERMATOZOIDES DE LLAMAS

Morphometric analysis of head and nuclei of llama spermatozoa

S.M. Giuliano<sup>1,2</sup>, M.R. Ferrari<sup>1,2</sup>

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.25>

<sup>1</sup> *Catedra de Física Biológica e*

<sup>2</sup> *Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.*

E-mail: [smgiulia@gmail.com](mailto:smgiulia@gmail.com)

### RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar y comparar valores morfométricos de la cabeza y del núcleo espermáticos en individuos de la especie *Lama glama*. El estudio se realizó con muestras de semen fresco de tres machos adultos. En alícuotas de un mismo eyaculado de cada animal se analizaron núcleos espermáticos coloreados con la Reacción de Feulgen y cabezas coloreadas con Tinción 15® y Eosina. Los parámetros estudiados fueron: cuatro de medición directa, Área (A), Perímetro (P), Diámetro máximo (D<sub>máx</sub>) y Diámetro mínimo (D<sub>mín</sub>) los valores de estos parámetros fueron menores en el núcleo que en la cabeza y dos indirectos y adimensionales: Elipticidad (D<sub>máx</sub>/D<sub>mín</sub>) que fue mayor en el núcleo y Forma ( $4 \pi \text{ área/perímetro}^2$ ) que fue mayor en la cabeza. La relación área nuclear/área de la cabeza mostró diferencias entre los machos. Las determinaciones morfométricas de cabezas espermáticas de llamas coloreadas con Tinción 15® y Eosina sugieren que las técnicas de coloración cambiarían las dimensiones y formas de la cabeza espermática.

**Palabras clave:** *llama, morfometría de la cabeza espermática, morfometría del núcleo espermático.*

### ABSTRACT

The aim of this study was to determine and to compare morphometric values of the sperm head and nuclei in some *Lama glama* males. The present study was performed with fresh semen from three male adults. Each ejaculate was divided into three aliquots and sperm nuclei stained with the Feulgen Reaction, heads stained with Tinción 15® and head stained with Eosine were analysed. The parameters studied were the following: four were direct measurement, Área (A), Perimeter (P), Maximum Diameter (D<sub>max</sub>) and Minimum Diameter (D<sub>min</sub>), the values of these parameters were lower in the nucleus than in the head

and two indirect measurement, Ellipticity (D<sub>max</sub> / D<sub>min</sub>) which is higher in the nuclei and Form ( $4 \pi \text{ / perimeter}^2$ ) which is greater in the heads. The relation between the nuclear and head Area value showed differences between males. This would indicate different cytoplasmic retention during sperm maturation. Morphometric measurements of llama sperm heads stained with Tinción 15® and Eosine suggest that stain techniques change the size and shape of sperm heard.

**Keywords:** *llama, sperm head morphometry, sperm nucleous morphometry.*

## INTRODUCCIÓN

Tanto la forma como el tamaño de la cabeza y del núcleo espermático están relacionados con el contenido de ADN y la organización de la cromatina (Ferrari *et al.*, 1998). El núcleo ocupa la mayor parte de la cabeza ya que durante la maduración del espermatozoide se pierde casi todo el citoplasma. Las anomalías del núcleo están frecuentemente asociadas con una reducción en la fertilidad, de aquí la importancia de su análisis en la evaluación de las muestras de semen (Carretero *et al.*, 2012; Carretero *et al.*, 2014). La determinación computarizada de variables morfométricas de la cabeza y núcleo espermáticos permite eliminar la subjetividad y asegura resultados precisos y repetibles. Se ha observado que estas determinaciones pueden depender de la preparación de las muestras (fijación, tipo de colorante). La Reacción de Feulgen es específica y estequiométrica para el ADN lo que la hace especialmente adecuada para la evaluación del núcleo (Ferrari *et al.*, 1998). Los trabajos que presentan evaluaciones morfométricas de espermatozoides de Camélidos Sudamericanos son escasos. Buendía *et al.* (2002), Ordóñez *et al.* (2012) y Evangelista *et al.* (2015) estudiaron cabezas espermáticas de alpaca coloreadas con Hemacolor, Diff Quick® y tinción de Papanicolau respectivamente, y Casaretto *et al.* (2012) y Soler *et al.* (2014) estudiaron cabezas de llamas coloreadas con Tinción 15® y Hemacolor respectivamente. Como se puede observar a pesar de usar metodologías objetivas para realizar las mediciones, en la mayoría de los casos, en cada laboratorio se ha utilizado una coloración diferente para realizar las mediciones morfométricas.

Los objetivos del presente estudio fueron analizar objetivamente la morfología de los espermatozoides de llama coloreados con una tinción nuclear (reacción de Feulgen) y dos tinciones de cabeza (Eosina y Tinción 15á) y comparar los parámetros obtenidos entre las tres metodologías.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en eyaculados de tres llamas de 5 a 8 años, ubicados en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, C.A.B.A., Argentina. Los animales fueron alimentados con fardos de alfalfa y alimento balanceado y tuvieron agua *ad libitum*.

### *Obtención y evaluación del semen.*

Las muestras de semen se obtuvieron mediante vagina artificial de acuerdo con la técnica descrita por Giuliano *et al.* (2008).

### *Determinaciones morfométricas*

Se realizaron sobre imágenes digitalizadas de núcleos y cabezas provenientes de un mismo eyaculado de cada animal. Sobre extendidos de semen secados al aire y fijados en Carnoy (3 alcohol absoluto: 1 ácido acético) se colorearon los núcleos espermáticos con la Reacción de Feulgen que es específica y estequiométrica del ADN (Spirito *et al.* (2011)). Las cabezas espermáticas se colorearon con dos técnicas, Tinción 15® (Biopur S.R.L., Rosario, Argentina) y Eosina. La primera es una triple tinción que se realizó sobre extendidos secados al aire. La fijación y tinción del material se hizo por inmersión en las soluciones del kit comercial a temperatura ambiente (20 °C - 22 °C). En cambio, la coloración con Eosina se hizo sin fijación, mezclando una gota de semen (5µl) con una de colorante (5µl) sobre un portaobjeto. Luego de 2 minutos sobre platina térmica a 37 °C se hizo el extendido de manera que todos los espermatozoides quedaran coloreados. La Eosina se preparó al 1% en citrato de sodio 2,92% (300 mosmolar, solución isotónica con los espermatozoides) (WHO, 2010 con modificaciones). Las mediciones se hicieron con un analizador de imágenes (Kontron Bildanalyse, MiniMOP) según Spirito *et al.* (2001). Los parámetros estudiados fueron cuatro de medición directa: Área (A), Perímetro (P), Diámetro Máximo (Dmáx.), Diámetro Mínimo (Dmín) y dos indirectos, adimensionales: Elipticidad (Dmáx/Dmín) y Forma ( $4 \pi \text{ área} / \text{perímetro}^2$ ). Los parámetros anteriores se determinaron sobre la sección máxima del núcleo espermático.

### *Análisis estadístico*

Se empleó estadística descriptiva usando el programa InfoStat.

## RESULTADOS

En la Figura 1 se observan espermatozoides coloreados con la Reacción de Feulgen, Tinción 15® y Eosina. Estas coloraciones fueron hechas sobre espermatozoides de un mismo eyaculado de cada uno de los machos.

En la Tabla 1 se presentan las medias promedio y desvíos estándar obtenidos a partir de los valores determinados en los tres machos estudiados. Así mismo están los coeficientes de variación interindividuales de los parámetros morfométricos. Los cuatro parámetros de medición directa (A, P, Dmáx y Dmín) presentaron valores promedio menores en el núcleo que en la cabeza en los tres machos. Los parámetros indirectos mostraron que la Elipticidad del núcleo fue mayor que la de la cabeza y que la Forma del núcleo fue menor que la de la cabeza. En los tres machos el

D<sub>máx</sub> fue mayor en las cabezas coloreadas con Tinción 15®, mientras que, el D<sub>mín</sub> fue mayor en las coloreadas con eosina. El coeficiente de variación (desvío estándar x 100/media) indicó que el área es el parámetro con mayor variabilidad tanto en la

cabeza como en el núcleo espermático de los tres animales estudiados. Por otra parte, la forma fue el parámetro que tuvo menor variabilidad tanto en el núcleo como en la cabeza.

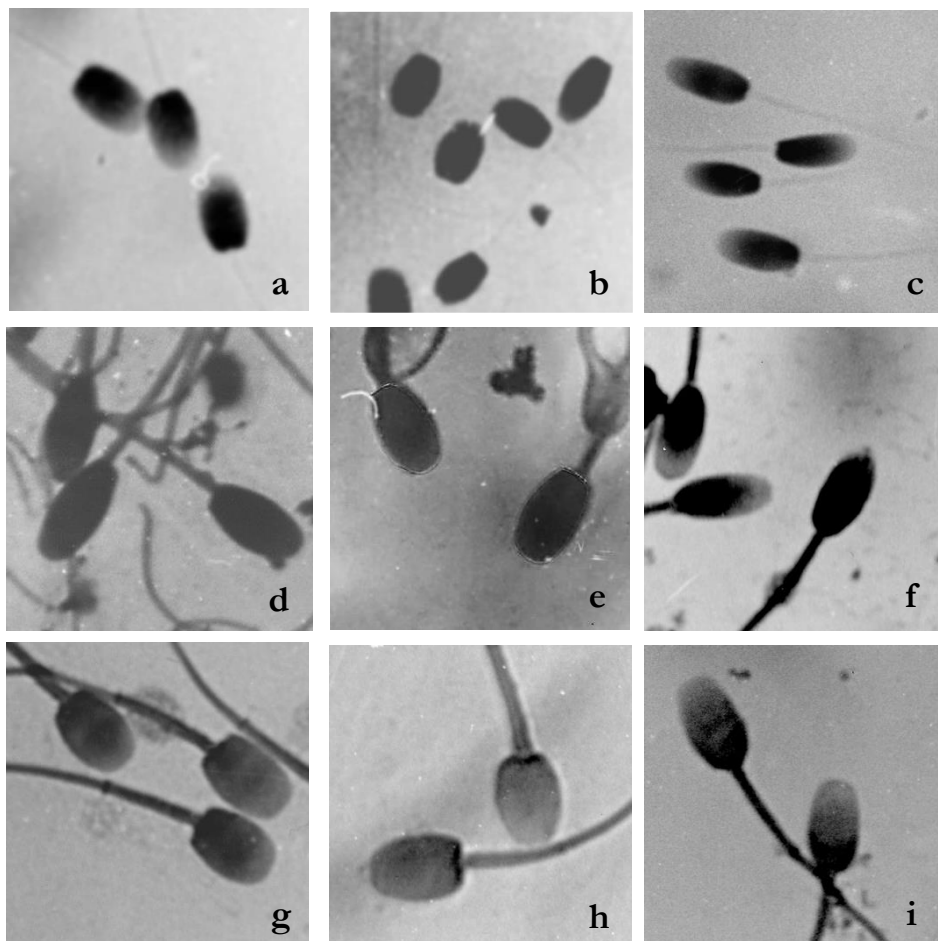


FIGURA 1 Espermatozoides de llamas coloreados con la reacción de Feulgen, Tinción 15® y Eosina. Macho A: a, d, g; macho B: b, e, h; macho C: c, f, i. Coloraciones: Reacción de Feulgen (a, b, c), Tinción 15® (d, e, f), Eosina (g, h, i). Las fotos fueron tomadas con aumento 1000x y se presentan todas en la misma escala.

La Tabla 2 muestra, en los tres machos, la relación Área promedio de la sección máxima del núcleo/Área promedio de la sección máxima de las cabezas espermáticas coloreadas con Tinción 15® y con Eosina. Esta relación fue expresada en porcentaje e indica que el valor del Área nuclear es siempre menor que el valor del área de la cabeza y que la relación entre el Área del núcleo y la cabeza difiere entre los tres machos variando entre 55,38% y 86,45%.

## DISCUSIÓN

Dado que el tamaño y la forma de los núcleos y cabezas espermáticas se relacionan con el funcionamiento normal de los espermatozoides, ambos

parámetros son valiosos en la evaluación de la calidad seminal. Con el objetivo de lograr sistemas rigurosos, repetibles y rápidos de evaluación se han desarrollado técnicas morfométricas. En los CSA, la mayoría de las determinaciones morfométricas se han realizado utilizando distintas coloraciones tanto en alpacas como en llamas (Buendía *et al.*, 2002; Ordóñez *et al.*, 2012; Casaretto *et al.*, 2012; Soler *et al.*, 2014; Evangelista-Vargas *et al.*, 2015). En el presente estudio se hicieron, en un mismo eyaculado, determinaciones morfométricas del núcleo y de la cabeza espermática de llama y se compararon los resultados entre las diferentes coloraciones.

Tabla 1. Medias y desvíos estándar calculados a partir de datos obtenidos en eyaculados de tres machos y coeficientes de variación intermachos (CV %). Los parámetros morfométricos se determinaron en núcleos espermáticos coloreados con la Reacción de Feulgen y en cabezas coloreadas con Tinción 15® y Eosina

Parámetros	Feulgen	Tinción 15®	Eosina
n	450	450	450
Área ( $\mu^2$ )	12,25±0,72 (5,81)	17,09±3,00 (17,56)	18,60±2,59 (13,92)
Perímetro ( $\mu$ )	13,70±0,39 (2,81)	16,73±0,29 (1,74)	16,53±0,88 (5,34)
D máximo ( $\mu$ )	5,42±0,32 (5,83)	6,68±0,42 (6,24)	6,36±0,24 (3,78)
D mínimo ( $\mu$ )	2,69±0,27 (10,06)	3,41±0,36 (10,49)	3,60±0,42 (11,55)
Elipticidad	2,04±0,35 (16,96)	1,98±0,35 (17,47)	1,82±0,24 (13,37)
Forma	0,85±0,02 (2,35)	0,80±0,06 (8,00)	0,84±0,04 (5,19)

n: número total de espermatozoides estudiados

Tabla 2. Relación Área promedio de la sección máxima del núcleo/ Área promedio de la sección máxima de las cabezas espermáticas coloreadas con Tinción 15® y con Eosina. Los resultados están expresados en porcentajes (%)

	A		B		C	
	NF/ CT15	NF/ CE	NF/ CT15	NF/ CE	NF/ CT15	NF/ CE
Área	70,92	72,85	61,94	55,38	86,45	71,95

NF=Núcleo coloreado con Feulgen, CT15=Cabeza coloreada con Tinción 15®, CE=Cabeza coloreada con Eosina.

Al comparar los parámetros nucleares con los de la cabeza se observó que el Área de los núcleos es menor que el Área de la cabeza. Este resultado se justifica en el hecho de que el núcleo además de estar incluido en la cabeza, no presenta acrosoma ni membranas plasmáticas. El valor de esta relación tuvo diferencias entre los machos que podrían ser consecuencia de la variabilidad intermacho y/o de pérdidas de citoplasma diferentes producidas durante la maduración espermática. La Forma es un parámetro derivado cuyo valor máximo es 1 y expresa el grado de redondez de una estructura. El valor de la Forma de la cabeza fue en todos los casos mayor que el del núcleo. Este resultado indicaría una mayor tendencia de la cabeza a la redondez, debida probablemente a

las estructuras membranosas que la componen. Los valores obtenidos para los Dmáx y Dmín de la cabeza sugieren una acción diferente de las dos coloraciones utilizadas. El Dmáx dio valores mayores en las cabezas coloreadas con Tinción 15® mientras que el Dmín tuvo mayores valores en las cabezas coloreadas con Eosina. Estas diferencias en los diámetros traerían como consecuencia diferencias en la forma de la cabeza según la coloración utilizada. Los resultados obtenidos muestran que las cabezas coloreadas con Tinción 15® tienen una Elipticidad promedio mayor que las coloreadas con Eosina. En cambio, las cabezas coloreadas con Eosina tiene valores promedio de Forma mayores que las coloreadas con Tinción 15®.

La Elipticidad es un parámetro que tiene valores  $\geq 1$  y su aumento indica un alejamiento de la redondez. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que técnicas diferentes de coloración aplicadas a las cabezas de espermatozoides de llamas influyen en las dimensiones y formas determinadas mediante morfometría. Las diferencias encontradas en los parámetros de la cabeza según la coloración podría deberse a la técnica de fijación, a la osmolaridad de los colorantes o a condiciones de permeabilidad de las membranas distintas según los colorantes utilizados. Los coeficientes de variación mostraron que el Área es el parámetro con mayor variabilidad individual tanto en la cabeza como en el núcleo mientras que la Forma y el Perímetro son los que tienen menor variabilidad. Resultados similares fueron obtenidos por Casaretto *et al.* (2012) en cabezas espermáticas de llamas. Es interesante observar que en la evaluación mediante microscopía de campo claro, se pudo observar diferencias morfológicas marcadas en los núcleos y cabezas entre los machos (Figura 1). El macho C tiene núcleos y cabezas más alargadas que los otros dos animales. Los datos morfométricos (Dmáx, Dmín, Elipticidad y Forma) ratificaron esta observación como muestra la Tabla 1. De acuerdo con Casaretto *et al.* (2012) las cabezas de los espermatozoides de *Lama glama* tienen una gran variabilidad morfométrica tanto inter como intra-individual.

## CONCLUSIONES

Las diferencias que presentaron los machos en la relación área nuclear/área de la cabeza sugieren diferencias en el proceso de maduración espermática con cambios en la retención de citoplasma.

Las diferencias observadas tanto en los valores de parámetros de medición directa como indirecta entre las cabezas coloreadas con la Tinción 15® y Eosina confirman que las mediciones realizadas objetivamente mediante sistemas computarizados pueden estar influidas por la tinción utilizada para realizarla por lo tanto los resultados obtenidos

dependerían de la misma, por lo tanto entre estudios de diferentes laboratorios no hay mejores o peores resultados.

A la variabilidad individual e intramacho en los patrones morfométricos también hay que contemplar la variabilidad debida a la técnica

## REFERENCIAS

- Buendía P, Soler C, Paolicchi F, Gago G, Urquieta B, Pérez-Sánchez F, Bustos-Obregón E. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the sperm-class analyzer computer-assisted system. *Theriogenology* 2002. 57:1207-1208.
- Evangelista-Vargas D, Evangelista-Vargas S, Santiani-Acosta A, Valdivia-Cuya A. Análisis morfométrico de espermatozoides de alpaca empleando la tinción de Papanicolau. 2015, Libro de Resúmenes del Congreso de SOLARA
- Carretero MI, Lombardo D, Arraztoa CC, Giuliano SM, Gambarotta MC, Neild DM. Evaluation of DNA fragmentation in llama (*Lama glama*) sperm using the sperm chromatin dispersion test. 2012. *M.I. Animal Reproduction Science*. 131(1-2):63-71.
- Carretero MI, Neild DM, Ferrante A, Caldevilla M, Arraztoa CC, Fumuso FG, Giuliano SM. Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on cryopreservation of *Lama glama* spermatozoa. 2014. *Andrologia*. 2014 Jul 25. doi: 10.1111/and.12319
- Casaretto C, Lombardo D, Giuliano MS, Gambarotta M, Carretero MI, Miragaya MH Morphometric analysis of llama (*Lama glama*) sperm head. *Andrologia Suppl*. 2012. 1: 424-430.
- Ferrari MR, Spirito SE, Giuliano SM, Fernández HA Chromatin cytophotometric analysis of abnormal bovine spermatozoa. *Andrologia* 1998. 30: 85-89.