

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA DEL ESPERMATOZOIDE DE CUY (*Cavia porcellus*)

Morphological and morphometric characterization of the guinea pig sperm (*Cavia porcellus*)

Urbano Cabeza¹, César Ordóñez¹, Aydee Meza¹ , Hernán Cucho¹ 

¹ Escuela Profesional de Zootecnia, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Peru.

* Corresponding author: Hernan Cucho. e-mail: hernan.cucho@unsaac.edu.pe

Recibido: 05/12/2020

Aceptado: 29/12/2020

Publicado: 31/12/2020

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the morphological and morphometric characteristics of guinea pig sperm (*Cavia porcellus*), using an image analysis system. Semen from collected from five type 1 guinea pigs, four months old (1.19 ± 0.15 kg) by electroejaculation method, between 3 and 5 times for each animal, making a total of 22 adequate collections. The volume, pH, sperm concentration, total motility and percentage of live sperm were determined. The samples for the analysis of sperm morphology and morphometry were stained with Spermac® and analyzed using the Motic Image Plus® software. The morphology was analyzed according to the dynamics of its acrosomal reaction, distinguishing 4 classes. The length, width, area, perimeter, ellipticity, elongation, regularity and rugosity of the head of the guinea pig sperm were determined, as well as the midpiece length and the tail of the spermatozoa. Guinea pig sperm morphology was analyzed with a complete random design, and the morphometric parameters by random blocks, using Duncan's test to compare means in both cases. In relation to morphology, significant differences ($P < 0.05$) were found in the percentage distribution of classes, the most recurrent being class 2 (41.67%), higher than the other 3 groups. An animal effect ($P < 0.05$) was found in the morphometric variables of head and midpiece of guinea pig spermatozoa. The morphometric measurements of guinea pig spermatozoa were: length (7.45 ± 0.29 μm), width (6.55 ± 0.25 μm), area (43.02 ± 3.03 μm^2), perimeter (26.56 ± 1.07 μm), midpiece length (12.02 ± 0.70 μm) and spermatozoa tail length (92.96 ± 3.96 μm).

Keywords: Guinea pig, semen analysis, electroejaculation, morphology, spermatozoa morphometry

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar las características morfológicas y morfométricas del espermatozoide de cuy (*Cavia porcellus*), utilizando un sistema de análisis de imágenes. Se colectó semen de cinco cuyes del tipo 1, de cuatro meses de edad (1.19 ± 0.15 kg) por el método de electroeyaculación, entre 3 y 5 veces por cada animal, realizándose un total de 22 colectas adecuadas. Se determinó el volumen, pH, concentración espermática, movilidad total y porcentaje de espermatozoides vivos. Las muestras para el análisis de la morfología y morfometría espermática fueron teñidas con Spermac®, y analizadas utilizando el software Motic Image Plus®. La morfología se analizó en función de la dinámica de su reacción acrosomal, distinguiéndose 4 clases. Se determinó la longitud, anchura, área, perímetro, elipticidad, elongación, regularidad y rugosidad de la cabeza del espermatozoide de cuy, así como la longitud de la pieza intermedia y de la cola del espermatozoide. La morfología del espermatozoide de cuy se analizó con un diseño completo al azar, y los parámetros morfométricos mediante bloques al azar, empleando la prueba de Duncan para comparar medias en ambos casos. Con relación a la morfología, se halló diferencias significativas ($P < 0.05$) en la distribución porcentual de clases, siendo la más recurrente la clase 2 (41.67%), superior a los otros 3 grupos. Se halló un efecto animal ($P < 0.05$) en las variables morfométricas de cabeza y pieza intermedia de los espermatozoides de cuy. Las medidas morfométricas del espermatozoide de cuy fueron, longitud (7.45 ± 0.29 μm), anchura (6.55 ± 0.25 μm), área (43.02 ± 3.03 μm^2), perímetro (26.56 ± 1.07 μm), longitud de la pieza intermedia (12.02 ± 0.70 μm) y longitud de la cola del espermatozoide (92.96 ± 3.96 μm).

Palabras clave: Cuy, análisis semen, electroeyaculación, morfología, morfometría espermatozoide

INTRODUCCION

El cuy (*Cavia porcellus*) es una fuente importante de proteínas para los pobladores andinos (Grégoire et al., 2010); en otras latitudes es usado como animal de laboratorio (Clemons y Seeman, 2011). Los últimos años su importancia económica se ha visto incrementada, para el año 2017, el Ministerio de Agricultura del Perú, estimó una producción anual de 21 103 toneladas de carne de cuy, alcanzando un consumo per cápita de 0.66 kg/habitante/año (MINAGRI, 2019).

Los eyaculados de los cuyes machos, tiene características peculiares, como la de producir tapones copulatorios para prevenir la fecundación de la hembra por otros machos (Martan y Sheperd, 1976), otra de sus peculiaridades es la presencia de rouleaux, o apilamiento de espermatozoides, descrita por varios autores (Freund 1958, 1969; Fawcett y Hollenberg, 1963; McGlinn et al., 1979), característica que ocurre en el epidídimo y probablemente este influenciada por los andrógenos (McGlinn et al., 1979).

El análisis seminal es determinante para conocer la fertilidad del macho, usualmente la evaluación de la movilidad, concentración y morfología se consideran en un espermiograma, siendo la morfología espermática la más relevante con la genética del hombre y animales (Landry et al., 2003; Kosova et al., 2014; Ray et al., 2017).

La evaluación de la morfología del espermatozoide de cuy, en general se ha realizado en función de otros roedores (Freund, 1969; Pinduisaca, 2018; Benavides et al., 2020); Kim et al., (2001), ha diferenciado 4 clases de células espermáticas de cuy, en función de la dinámica de la reacción de su acrosoma, característica que puede ser usada para clasificarla morfológicamente. Debido a que el acrosoma del espermatozoide del cuy excede su cabeza (Kim et al., 2001; Yucra, 2013), su caracterización morfométrica ha sido dificultosa, existiendo escasos reportes al respecto (Cummins y Woodall, 1985; Gallardo et al., 2002; Loor, 2015). Por ello que el presente estudio se ha realizado con la finalidad de realizar una caracterización objetiva de la morfología y morfometría del espermatozoide de cuy, información que servirá para la aplicación de biotecnologías reproductivas en esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Código de ética

Los autores declaran que el presente estudio se ha llevado a cabo de acuerdo con el Código de Ética para los experimentos con animales, tal y como se refleja en la normativa: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm.

Del lugar de estudio y los animales

El estudio fue realizado en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos CICAS - La Raya, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, ubicado en el distrito de Maranganí, provincia de Canchis, departamento del Cusco, Perú, ubicado a una altitud de 4130 metros. El área pertenece a la zona de vida de páramo húmedo - subalpino subtropical (Holdridge, 1967).

El estudio se realizó entre abril y setiembre del 2018. Se utilizaron 5 cuyes machos del tipo 1, con una edad de 4 meses y un peso promedio de 1.19 ± 0.15 kg; la alimentación fue mixta (concentrado comercial y forraje verde).

Colección de semen

La colección de semen fue realizada por el método de electroeyaculación (EE), se siguió el procedimiento propuesto por Meza et al., (2018), que empezó con el pesado de los animales. Las colectas de semen se realizaron entre 7 y 8 am. Los animales fueron anestesiados por vía intramuscular con xylacina 2% (0.05 ml/kg) y ketamina 10% (0.10 ml/kg) en función al peso. Se esperó entre 1 y 2 minutos, para que el animal este completamente alestargado, y se lo sujetó en posición decúbito-dorsal con la cabeza ligeramente levantada; para evitar que el cuy se moviera se sujetaba de las extremidades anteriores y posteriores, tras lo cual se realizó la limpieza de la zona pene-prepuccial con agua destilada atemperada a 35°C, se desvainó el pene y se colocó el tubo colector.

Se construyó un transductor de 6 cm de largo y 0.4 cm de diámetro, con dos electrodos bipolares, que se conectaba a un electroeyaculador (Minitube®, Tiefenbach, Alemania); el transductor, se lubricaba con gel de ecografía y se introducía aproximadamente 5 cm en el recto del animal. El voltaje al que fueron sometidos los animales fue de 2 a 9 voltios (V), éste se incrementaba en 1 V, la duración de cada estímulo fue de 3 segundos, con 4 repeticiones en cada voltaje, los estímulos eran constantes sin intervalos de descanso hasta llegar a los 8 V. El proceso se realizó en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de La Raya, en un ambiente temperado entre 15 a 20°C. La erección del pene ocurrió entre los 3 y 4 V. En la primera colecta de todos los animales se observó un coagulado blanquecino (tapón), que se endureció al tomar contacto con el medioambiente, que fue desechado, luego de la expulsión de éste se produjo el eyaculado del semen. Estos tapones copulatorios se producen a partir de proteínas coagulantes secretadas tanto por las vesículas seminales como por las glándulas coagulantes, su función sería la de prevenir la fecundación de la hembra por otros machos (Martan y Sheperd, 1976), que de igual forma ha sido reportada en ratones (Sutter et al., 2016); también se verificó la presencia de rouleaux, o apilamiento de espermatozoides.

La duración de la colección fluctuó de 15 a 20 minutos, con variaciones individuales, la eyaculación ocurrió en promedio a los 8 V. El intervalo entre las colecciones de semen fue de una semana, se realizaron 5 colectas por animal, obteniéndose 22 colectas adecuadas (88%) entre 3 y 5 por cada animal. Se desechó el semen contaminado con orina o con concentraciones de espermatozoides menores a 10×10^6 /mL.

Análisis del semen

Se determinó el volumen (mL) por observación directa; el pH se evaluó utilizando tiras reactivas de pH, la coloración final indicaba el grado de acidez.

La concentración de espermatozoides (millones de espermatozoides por mL), se evaluó con una cámara Spermtrack® (Proiser R+D, S.L., Paterna España), empleando 3 μ L de semen puro, que fue evaluado a 100 aumentos, tras

lo cual se realizó la dilución de la muestra empleando base Tris (Souza, 2009), hasta alcanzar una concentración final de 10 – 15 millones de espermatozoides por mL. Las evaluaciones de la movilidad total, porcentaje de espermatozoides vivos, morfología y morfometría espermática se realizaron con la muestra diluida. La movilidad de los espermatozoides se evaluó utilizando un sistema CASA - Mot (ISAS®v1, Proiser R + D, Paterna, España), empleando un objetivo de 10X de contraste de fase negativo, los archivos de video se grabaron y 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, esta variable se analizó en un microscopio de contraste de fases (UOP; Proiser R+D) del sistema ISAS® v1.

El porcentaje de espermatozoides vivos se valoró empleando eosina y nigrosina (Minitube®, Tiefenbach, Alemania), usando 5 µL de semen, que luego fue mezclado con la misma cantidad de eosina y nigrosina, las muestras se evaluaron en un microscopio trinocular con cámara (Motic BA310; Kowloon, Hong Kong), empleando el objetivo de 40X, se contó no menos de 100 espermatozoides por muestra.

Análisis de la morfología y morfometría del espermatozoide de cuy

Se realizaron frotis empleando 5µL de muestra de semen, una vez secos (20 minutos), se tiñeron con Spermac® (Stain Enterprises, Onderstepoort, Sudáfrica), según protocolo del producto.

El primer análisis que se realizó fue el de morfología, empleando los frotis preparados con Spermac®, para su estudio se usó un microscopio con cámara (Motic BA310; Kowloon, Hong Kong) de 3.0 Megapíxeles, las imágenes fueron tomadas con el software Motic Image Plus 2.0®, utilizando el objetivo de 40X, la resolución de las imágenes fue de 2048 x 1536 píxeles, se capturaron 6325 espermatozoides de las 22 colectas.

Kim et al., (2001), ha diferenciado 4 clases de células espermáticas de cuy, en función de la dinámica de la reacción de su acrosoma y de los patrones de tinción que éstos produjeron, indican que los espermatozoides de cuy de la clase 1, son células completamente intactas; los de la clase 2 tienen un acrosoma que empieza a hincharse levemente producto del inicio de la reacción acrosomal. Los espermatozoides de clase 3, presentan un acrosoma que empieza a descomponerse; las células de la clase 4 han perdido la mayoría, si no todo el contenido acrosómico (Figura 1).

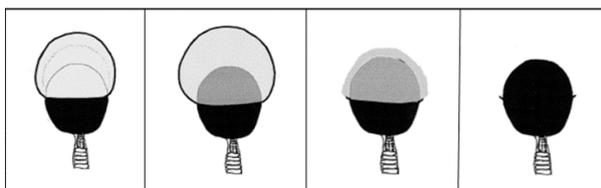


Figura 1. Representación gráfica de las clases espermáticas de *Cavia porcellus* en función de su reacción acrosomal y patrones de tinción (Kim et al., 2001).

En este estudio, al realizar las evaluaciones morfológicas de los espermatozoides, se encontraron las 4 clases descritas por Kim et al., (2001), discriminándose de forma visual estas células, en cada una de las clases; todas las evaluaciones morfológicas fueron realizadas por el mismo operador.

El segundo análisis efectuado, fue el de las características morfométricas, para ello se analizaron 1025 imágenes de los espermatozoides evaluados morfológicamente. La cantidad de espermatozoides evaluados de cada clase estaba en función de las proporciones halladas al realizar la evaluación precedente.

Se midieron los siguientes parámetros morfométricos: longitud (L, µm), anchura (W, µm), área (A, µm²) y perímetro (P, µm) de la cabeza del espermatozoide; la longitud de la pieza intermedia y de la cola del espermatozoide, para las mediciones se empleó el software Motic Image Plus 2.0®. De las medidas de longitud, anchura, área y perímetro, se determinaron los parámetros de forma de la cabeza del espermatozoide: elipticidad (L/W), elongación $[(L-W)/(L+W)]$, regularidad $(\pi LW/4A)$ y rugosidad $(4\pi A/P^2)$. Todas las evaluaciones morfométricas fueron realizadas por el mismo operador. El estudio de la morfometría de un espermatozoide nos permite detectar alteraciones en la espermiogénesis y en la maduración epididimaria (Hidalgo et al., 2006), lo que conllevaría a una eficiente selección de reproductores.

Análisis estadístico

Se aplicó la estadística descriptiva para el volumen, pH, concentración espermática, movilidad total y porcentaje de espermatozoides vivos. Se determinó la normalidad de datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas con la de Levene.

La distribución morfológica porcentual por clases no presentaba distribución normal, fue transformada por su logaritmo decimal, y analizada con un diseño completamente al azar, la comparación de medias se hizo con la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

Todos los parámetros morfométricos del espermatozoide excepto el área de la cabeza, no mostraban distribución normal, se empleó el procedimiento Transreg del SAS para su transformación. Estas variables fueron analizadas con un diseño de bloques al azar, la comparación de medias se hizo con la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$). Todos los procedimientos estadísticos se realizaron con el programa SAS v 9.4.

RESULTADOS

Colección y evaluación del semen

La eficiencia de las colecciones de semen por EE, fue de 88%, presentando el 12% restante concentraciones de espermatozoides menores a 10×10^6 /mL, presencia de orina, o eyaculación parcial, lo que motivo su exclusión del estudio. En total, se analizaron 22 muestras adecuadas de semen, entre 3 y 5 colectas de cada animal. Las características seminales de los animales evaluados se muestran en la Tabla 1. En todas las muestras analizadas se ha encontrado la presencia de rouleaux o apilamiento de los espermatozoides.

Tabla 1. Características seminales de cinco cuyes machos (promedio, desviación estándar, coeficiente de variabilidad, máximos y mínimos) colectadas por electroeyaculación (n= 22 colectas de semen).

Variables	Promedio	C.V.	Max	Min
Volumen (mL)	0.38	32.08	0.70	0.20
pH	7.05	5.76	7.50	6.50
Concentración (10 ⁶ /mL)	47.33	53.67	116.00	13.84
Movilidad total (%)	69.40	19.51	88.80	39.89
Espermatozoides vivos (%)	72.65	11.27	86.96	55.88

D.S.: desviación estándar; C.V.: coeficiente de variabilidad; n: colección de semen; Max: máximo; Min: mínimo.

Morfología espermática

Los 6325 espermatozoides de cuy se clasificaron en función de la dinámica de su reacción acrosomal (Kim et al., 2001), las imágenes de las 4 clases encontradas se muestran en la Figura 2, y su distribución porcentual por clase y animal en la Tabla 2.

Tabla 2. Distribución porcentual (%) de la clasificación morfológica de los espermatozoides de cuy en función de su dinámica acrosomal.

Clase morfológica	Cuy					Promedio
	1	2	3	4	5	
1	27.86	29.40	26.84	28.43	28.74	28.19 ^b
2	44.20	39.70	38.40	43.83	42.70	41.67 ^a
3	7.94	11.68	10.02	6.07	6.18	8.44 ^d
4	20.00	19.23	24.74	21.67	22.38	21.70 ^c

Número total de células de cada animal: cuy 1 = 1281; cuy 2 = 972; cuy 3 = 1317; cuy 4 = 1127; cuy 5 = 1628. a-d Superíndices distintos dentro de columna indican diferencias significativas entre clases. $P < 0.05$.

Morfometría espermática

La longitud y área de la cabeza de los espermatozoides de la clase morfológica 4, son diferentes ($P < 0.05$), en relación a las otras 3 clases; en el caso de la anchura espermática, es mayor ($P < 0.05$), la de las células que pertenecen a las clases 4, 1, 2; el perímetro de las clases morfológicas 1, 2 es superior al de las clases 3 y 4. Las principales secciones del espermatozoide de cuy se muestran en la Figura 3 y las medias y desviación estándar de las variables morfométricas evaluadas en función de las clases morfológicas en la Tabla 3.

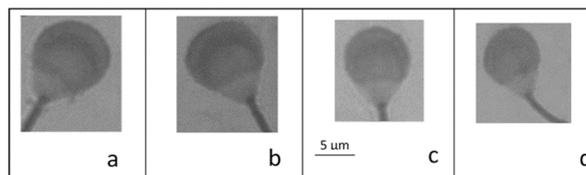


Figura 2. Imágenes capturadas con el microscopio Motic Image Plus 2.0®, utilizando el objetivo de 40X. (a) clase 1; (b) clase 2; (c) clase 3; (d) clase 4. Escala de barra = 5 µm aplicable a todas las imágenes.

Se halló diferencias significativas ($P < 0.05$) en la distribución porcentual de clases, siendo la más recurrente la clase 2, que vienen a ser los espermatozoides que muestran un acrosoma que empieza a hincharse levemente producto del inicio de la reacción acrosomal, que era seguida por las células espermáticas de clase 1, que son las intactas; ambas clases se podrían considerar como espermatozoides intactos y con probable capacidad de fertilizar un ovocito, los que suman 69.86% de los espermatozoides de las muestras, fluctuando los porcentajes de los animales evaluados en el rango de 65.24 a 72.26%.

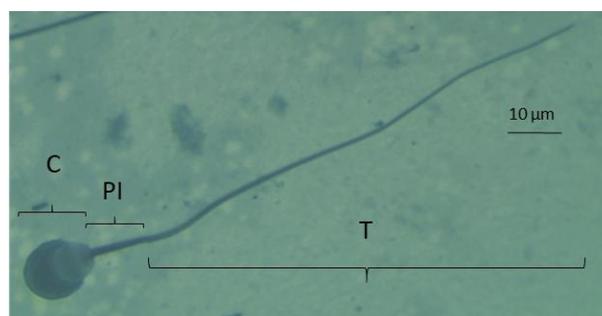


Figura 3. Secciones del espermatozoide normal (clase 2) de *Cavia porcellus*. C: cabeza; PI: pieza intermedia; T: cola. Escala de barra = 10 µm aplicable a la imagen.

Tabla 3. Variables morfométricas de la cabeza, pieza intermedia y cola del espermatozoide de cuy (media \pm DS) en función de su clase morfológica.

Variable	Clase morfológica				Promedio
	1	2	3	4	
Longitud (μm)	7.40 \pm 0.31 ^b	7.44 \pm 0.29 ^b	7.24 \pm 0.26 ^c	7.62 \pm 0.19 ^a	7.45 \pm 0.29
Anchura (μm)	6.54 \pm 0.26 ^a	6.57 \pm 0.25 ^a	6.36 \pm 0.23 ^b	6.57 \pm 0.21 ^a	6.55 \pm 0.25
Área (μm^2)	42.41 \pm 3.08 ^b	42.85 \pm 3.03 ^b	42.33 \pm 3.39 ^b	44.64 \pm 2.16 ^a	43.02 \pm 3.03
Perímetro (μm)	26.55 \pm 1.02 ^a	26.74 \pm 0.99 ^a	25.50 \pm 1.25 ^c	26.33 \pm 1.06 ^b	26.56 \pm 1.07
Elipticidad	1.13 \pm 0.04 ^b	1.13 \pm 0.04 ^b	1.14 \pm 0.02 ^b	1.16 \pm 0.02 ^a	1.14 \pm 0.04
Rugosidad	0.76 \pm 0.02 ^c	0.75 \pm 0.02 ^c	0.82 \pm 0.06 ^a	0.81 \pm 0.04 ^b	0.77 \pm 0.04
Elongación	0.06 \pm 0.02 ^b	0.06 \pm 0.02 ^b	0.06 \pm 0.01 ^b	0.07 \pm 0.01 ^a	0.06 \pm 0.02
Regularidad	0.90 \pm 0.04 ^a	0.90 \pm 0.03 ^a	0.86 \pm 0.04 ^c	0.88 \pm 0.03 ^b	0.89 \pm 0.04
Longitud PI (μm)	11.95 \pm 0.70 ^b	12.11 \pm 0.73 ^a	11.74 \pm 0.65 ^c	11.91 \pm 0.54 ^b	12.02 \pm 0.70
Longitud cola (μm)	92.89 \pm 3.77 ^a	93.42 \pm 4.07 ^b	90.75 \pm 3.61 ^c	92.30 \pm 3.52 ^b	92.96 \pm 3.96

DS: desviación estándar. PI: pieza intermedia. Número total de células de cada clase morfológica: clase 1 = 203; clase 2 = 590; clase 3 = 67; clase 4 = 165. a-c Superíndices distintos dentro de filas indican diferencias significativas entre variables. $P < 0.05$.

Hubo efecto animal ($P < 0.05$) en las variables morfométricas de cabeza, longitud de la pieza intermedia y cola del espermatozoide de cuy (Tabla 4). Las variables morfométricas

mostraban bajos coeficientes de variación (3.16 a 7.04%), excepto la elongación que mostraba un 24.33%.

Tabla 4. Variables morfométricas de la cabeza, pieza intermedia y cola del espermatozoide de cuy (media \pm DS) en función del animal.

Variable	Animal				
	1	2	3	4	5
Longitud (μm)	7.38 \pm 0.25 ^b	7.47 \pm 0.27 ^a	7.47 \pm 0.33 ^a	7.49 \pm 0.33 ^a	7.43 \pm 0.27 ^a
Anchura (μm)	6.54 \pm 0.23 ^a	6.52 \pm 0.26 ^b	6.58 \pm 0.24 ^a	6.56 \pm 0.29 ^a	6.55 \pm 0.24 ^a
Área (μm^2)	43.10 \pm 2.89 ^a	42.69 \pm 3.21 ^b	43.43 \pm 3.07 ^a	43.09 \pm 3.38 ^a	42.73 \pm 2.62 ^b
Perímetro (μm)	26.57 \pm 1.07 ^a	26.42 \pm 1.08 ^a	26.64 \pm 1.08 ^a	26.49 \pm 1.22 ^a	26.62 \pm 0.92 ^a
Elipticidad	1.13 \pm 0.03 ^c	1.15 \pm 0.04 ^a	1.14 \pm 0.04 ^b	1.14 \pm 0.03 ^b	1.14 \pm 0.03 ^b
Rugosidad	0.77 \pm 0.04 ^a	0.76 \pm 0.03 ^b			
Elongación	0.06 \pm 0.01 ^c	0.07 \pm 0.02 ^a	0.06 \pm 0.02 ^b	0.07 \pm 0.01 ^a	0.06 \pm 0.02 ^b
Regularidad	0.88 \pm 0.04 ^c	0.90 \pm 0.03 ^a	0.89 \pm 0.04 ^b	0.90 \pm 0.04 ^a	0.90 \pm 0.03 ^a
Longitud PI (μm)	11.95 \pm 0.60 ^a	11.86 \pm 0.72 ^b	12.09 \pm 0.75 ^a	11.94 \pm 0.67 ^b	12.20 \pm 0.70 ^a
Longitud cola (μm)	92.90 \pm 4.20 ^b	91.82 \pm 3.71 ^c	93.83 \pm 3.77 ^a	91.29 \pm 3.80 ^c	94.31 \pm 3.47 ^a

DS: desviación estándar. PI: pieza intermedia. Número total de células por animal: cuy 1=216; cuy 2=184; cuy 3=230; cuy 4=170; cuy 5=225. a-c Superíndices distintos dentro de filas indican diferencias significativas entre variables. $P < 0.05$.

DISCUSIÓN

Colección y evaluación del semen

Los primeros reportes de colección de semen en cuyes domésticos por electroeyaculación fueron de Freund (1958, 1962, 1969); Sumar et al., (1968), hizo los primeros reportes en el cuy silvestre, en estos trabajos, aún no se anestesiaba a los animales, como se realiza en la actualidad (Meza et al., 2018; Benavides et al., 2020).

Benavides et al., (2020), reporta una efectividad de 95% en el procedimiento de colecta de semen, ligeramente superior al obtenido en este estudio, la diferencia podría deberse a las edades de los animales, en el primer caso adultos con una descendencia de al menos 7 camadas, y en el presente, con cuyes que empiezan su etapa reproductiva; también se debería a las diferencias en el protocolo de colección de semen. El protocolo de colección de semen que empleamos fue

el propuesto por Meza et al., (2018), que alcanzaba el 69% de eficiencia, que en este trabajo se incrementó a 88%. El 77% de colectas, no mostraban el tapón copulatorio, el cual no fue reportado por Benavides et al., (2020), según indican por el protocolo de electroeyaculación usado; pero que sí fue observado por Freund (1958), Martan y Sheperd (1976) en cuyes domésticos y Sumar et al., (1968) en cuyes silvestres.

El volumen (0.38 mL), es inferior a los reportados por Freund (1969), Paredes et al., (2020), y Benavides et al., (2020). Los dos primeros reportes provienen de colectas sin sedación de los animales; y son ligeramente superiores a los reportados por Pindúsaca (2018). Los valores que se obtuvo solamente son comparables con los hallados por Freund (1969) y Benavides et al., (2020), que provienen de colectas sucesivas. En este estudio, no se ha observado una tendencia creciente o decreciente del volumen producto de las colectas sucesivas con intervalos de una semana.

El pH seminal que reportamos (7.05) es similar a los obtenidos por Benavides et al., (2020) y Mise (2014), en todos los estudios, se usó tiras de papel para su evaluación.

Los informes de concentración espermática obtenida por el método de EE y que provienen de colectas repetidas, van desde 13.38 hasta 43.87 x 10⁶ espermatozoides por mL (Freund, 1969; Meza et al., 2018; Benavides et al., 2020;), los valores obtenidos en este estudio (47.33 x 10⁶), son superiores, y muestran una gran dispersión de datos, similar a lo reportado por Benavides et al., (2020) y Meza et al., (2018). En el cálculo de esta variable se usó un Spermtrack®, que ha mostrado mejores resultados que las cámaras de Neubauer para estas evaluaciones (Soler et al., 2012; Crespilho et al., 2017), que lo diferencia de los estudios antes mencionados.

La movilidad total obtenida (69.40 %), es inferior a los reportados por Paredes et al., (2020) y Benavides et al., (2020), también obtenidos por EE; la diferencia con ambos viene a ser el empleo de un sistema CASA, que nos proporciona una evaluación objetiva de esta variable, además ninguno de ellos informó la presencia de rouleaux, que encontramos en todas las colectas. El porcentaje de espermatozoides vivos de semen de cuy es similar a lo reportado por Aragón (2019), estudio que también se realizó en La Raya y con la misma metodología.

Morfología espermática

Existen dos tipos de especies animales en función de su morfología espermática, los homomorfos y los heteromorfos; los primeros tienen una morfología constante entre individuos, así como dentro de animal (Soler et al., 2014), como es el caso del cuy.

Existen reportes que han evaluado la morfología del espermatozoide de cuy, en función de otras especies como los conejos (Benavides et al., 2020) u otros roedores, es por ello que los valores de espermatozoides normales que se informan son elevados como 95% (Freund, 1969); 96% (Pinduisaca, 2018); 81.74% (Benavides et al., 2020); pero en dichas evaluaciones, no se ha considerado que los espermatozoides de cuy muestran un capuchón acrosomal que excede la cabeza espermática (Figura 1 y 2), y que al momento de colectar su semen a éste lo podemos encontrar en diferentes estados, desde intacto hasta ausente, peculiaridad que comparte con el cuy silvestre (*Cavia aperea*) (Cooper et al., 2000). Esta característica debería ser más valorada al realizar la evaluación de la morfología espermática del cuy, y que en nuestro caso alcanza alrededor del 70% de células intactas y con probable capacidad fecundante, y que se podría considerar como normales.

Se encontró que aproximadamente el 30% de espermatozoides colectados no presentan acrosoma, o lo han perdido en su mayor parte, que podríamos considerarlos anormales; en la investigación no se ha determinado defectos especialmente de la cola espermática, por lo cual posiblemente este grupo sea algo mayor.

Morfometría espermática

Se tienen escasos reportes sobre la morfometría del espermatozoide de *Cavia porcellus*, que informan sobre la longitud (7.5 a 10.87 µm) y anchura (6.6 a 9.45 µm) de la cabeza del espermatozoide; la longitud de la pieza intermedia (8.75 a 9.31 µm) y de la cola (84.41 a 92.3 µm) (Cummins y Woodall, 1985; Gallardo et al., 2002; Loor, 2015); en estos casos las células analizadas son escasas, los dos primeros informes no usaron software alguno de análisis de imágenes, además las tinciones empleadas fueron diferentes, ninguna específica para espermatozoides, lo que conlleva a diferentes valores de morfometría de las células (Soler et al., 2005; Cucho et al., 2019).

Yucra (2013), ha evaluado los espermatozoides epididimarios de cuy empleando un Sistema de Análisis Computarizado de Semen (CASA), hallando una longitud de 7.68 µm, anchura de 6.98 µm, con un área y perímetro de la cabeza de 42.25 µm² y 26.26 µm, respectivamente; las ligeras diferencias podrían deberse a la tinción empleada Diff Quik®, y en este estudio Spermac®; a los equipos usados para la medición, y principalmente a que no se discriminaron las clases a las que pertenecían los espermatozoides, que en este estudio se encontraron y que presentaban diferencias significativas.

Entre las variables de forma de la cabeza de los espermatozoides, la elongación es la más relevante, ya que ésta influye en la velocidad de los espermatozoides, porque reduce el grado de arrastre y, por tanto, la energía necesaria para el movimiento de los espermatozoides (Malo et al., 2006; Humphries et al., 2008), considerando ello, es probable que el espermatozoide de cuy requiera mayor energía para transportarse, que una célula espermática de carnero o verraco, que presenta formas más aerodinámicas.

Esta investigación es el más completo reporte sobre las características morfométricas del espermatozoide de *Cavia porcellus*, con parámetros no solamente de dimensiones de su cabeza, también de su forma, de su pieza intermedia y cola espermática.

CONCLUSIONES

Se halló 4 clases morfológicas de espermatozoides de cuy en función de su dinámica acrosomal, las clases 1 y 2, que representarían a las células intactas alcanzan alrededor del 70% de los espermatozoides, también se encontró un efecto animal ($P < 0.05$) en las variables morfométricas de cabeza y pieza intermedia de los espermatozoides de cuy, variables que muestran escasos coeficientes de variación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés personal o económico, ni sus intereses han influenciado en los resultados del estudio.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Preparación y ejecución: HC, UC, AM; desarrollo de la metodología: UC, AM, CO; concepción y diseño: HC; edición del artículo: HC, UC, AM; supervisión del estudio: HC, CO.

AGRADECIMIENTOS

Financiado por el programa Yachayninchis Wiñarinanpaq de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), Perú.

REFERENCIAS

- Aragón S. Características macroscópicas, microscópicas, estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas en semen de cuy (*Cavia porcellus*). 2019. Tesis Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Disponible http://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/UNSAAC/4280/253T20190366_TC.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Benavides F, Sutovsky P, López V, Kennedy C, Echevarría L. Semen Parameters of Fertile Guinea Pigs (*Cavia porcellus*) Collected by Transrectal Electroejaculation. *Animals (Basel)*. 2020; 10 (5):767. Published 2020 Apr 28. doi:10.3390/ani10050767
- Clemons D, Seeman J. *The Laboratory Guinea Pig*. Second Edition by CRC Press Taylor & Francis Group; 2011: 169pp
- Cooper TG, Weydert S, Yeung CH, Künzl C, Sachser N. Maturation of epididymal spermatozoa in the nondomesticated guinea pigs *Cavia aperea* and *Galea musteloides*. *J Androl*. 2000; 21(1):154-163.
- Crespilho AM, Chiaradia L, Cortez A, Dinelli M, Papa FO, Gomes GM, Peixoto KC. Sensitivity evaluation of the computer-assisted sperm analysis (CASA) in the determination of frozen-thawed bull semen concentration. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2017 54 (3): 247-252. doi: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.127773
- Cucho H, López Y, Caldeira C, Valverde A, Ordóñez C, Soler C. Comparison of three different staining methods for the morphometric characterization of alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using ISAS® CASA-Morph system. *Nova Biol Reperta*. 2019; 6 (4): 284-291. doi: 10.29252/nbr.6.3.284
- Cummins JM, Woodall PF. On mammalian sperm dimensions. *J Reprod Fertil*. 1985; 75 (1):153-175. doi:10.1530/jrf.0.0750153
- Fawcett DW, Hollenberg RD. Changes in the acrosome of the guinea pig spermatozoa during passage through the epididymis. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1963; 60: 276-292. doi:10.1007/BF00350481
- Freund M. Collection and liquefaction of guinea pig semen. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1958; 98(3):538-540. doi:10.3181/00379727-98-24099
- Freund M. Initiation and development of semen production in the guinea pig. *Fertil Steril*. 1962; 13:190-201. doi:10.1016/s0015-0282(16)34448-x
- Freud M. Interrelationships among the characteristics of guinea-pig semen collected by electro-ejaculation. *J. Reprod. Fert*. 1969; 19(3): 393 – 403. doi:10.1530/jrf.0.0190393
- Gallardo MH, Mondaca FC, Ojeda RA, Köhler N, Garrido O. Morphological diversity in the sperms of caviomorph rodents. *J Neotrop Mammal*. 2002; 9 (2): 159 – 170.
- Grégoire A, Joly T, Huamán E, Silva RM, Silva T. Crioconservación de los recursos genéticos del cuy (*Cavia porcellus*): producción y congelación de embriones, *Bulletin de l'Institut français d'études andines*, 2010; 39: (1): 185 – 188. <http://bifea.revues.org/2164>
- Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado J, Soler C. Morphometric classification of Spanish Thoroughbred stallion semen according to sperm head size measurements. *Anim Reprod Sci*. 2006; 94(1): 26 - 28. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.03.038
- Holdridge LR. *Life zone ecology*. San José, Costa Rica. Tropical Science Center. 1967
- Humphries S, Evans JP, Simmons LW. Sperm competition: linking form to function. *BMC Evol Biol*. 2008; 8: 319. Published 2008 Nov 25. doi:10.1186/1471-2148-8-319
- Kim KS, Foster JA, Gerton GL. Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis. *Biol Reprod*. 2001; 64(1):148-156. doi:10.1095/biolreprod64.1.148
- Kosova G, Hotaling JM, Ohlander S, Niederberger C, Prins GS, Ober C. Variants in DPF3 and DSCAML1 are associated with sperm morphology. *J Assist Reprod Genet*. 2014; 31 (2):131-137. doi:10.1007/s10815-013-0140-9
- Landry C, Geyer LB, Arakaki Y, Uehara T, Palumbi SR. Recent speciation in the Indo-West Pacific: rapid evolution of gamete recognition and sperm morphology in cryptic species of sea urchin. *Proc Biol Sci*. 2003; 270(1526):1839-1847. doi:10.1098/rspb.2003.2395
- Loo Al. Caracterización morfológica del espermatozoide del cobayo (*Cavia porcellus*) en el Canton Latacunga. 2015. Tesis Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Técnica de Cotopaxi. Latacunga-Ecuador. Disponible <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2836>.
- Malo AF, Gomendio M, Garde J, Lang-Lenton B, Soler AJ, Roldan ER. Sperm design and sperm function. *Biol Lett*. 2006; 2 (2): 246-249. doi:10.1098/rsbl.2006.0449
- Martan J, Shepherd BA. The role of the copulatory plug in reproduction of the guinea pig. *J Exp Zool*. 1976; 196(1):79-84. doi:10.1002/jez.1401960108
- McGlenn SM, Shepherd BA, Martan J. Rouleau formation and fertility of spermatozoa in guinea pigs treated with cyproterone acetate. *Arch Androl*. 1979; 2(3): 197-202. doi:10.3109/01485017908987313
- Meza A, Huanca N, Aragón S, Cucho H. Protocolo de la colección de semen de cuy doméstico (*Cavia porcellus*) por el método de electroeyaculación. *Spermova*, 2018; 6 (01): 68- 18. doi 10.18548/aspe/006.08
- MINAGRI. Potencial del mercado internacional para la carne de cuy. Dirección General de Políticas Agrarias – DGPA – DEEIA – MINAGRI. 2019. Disponible http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/tematicas/l-ciencia/I01/mercado_interno_carne_cuy.pdf
- Mise N. Evaluación de la crioconservación del semen de cobayo (*Cavia porcellus*). 2014. Tesis Médico Veterinario. Universidad Técnica de Cotopaxi. Latacunga-Ecuador. Disponible <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2863>

- Paredes M, Guevara J, Mantilla J, Ortiz P. Características del semen y desempeño reproductivo de cuyes nativos y mejorados en cruzamiento recíproco. *Spermova*, 2020; 10 (1): 11 -17. doi. 10.18548/aspe/0008.02.
- Pinduisaca F. Colecta y evaluación de semen de cuyes (*Cavia porcellus*) extraído por la técnica de electroeyaculación en el Centro Experimental Uyumbicho. 2018. Tesis Médico Veterinario. Universidad Central del Ecuador, Quito. Disponible <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15292>
- Ray PF, Toure A, Metzler-Guillemain C, Mitchell MJ, Arnout C, Coutton C. Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function. *Clin Genet*. 2017; 91(2):217-232. doi:10.1111/cge.12905
- Soler C, Gadea B, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Estes MC, Núñez J, Moreira PN, Núñez M, Gutiérrez R, Sancho M, Garde JJ. Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS®. *Theriogenology*. 2005; 64 (5): 1236-1243. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.02.018
- Soler C, Fuentes MC, Sancho M, García A, Núñez de Murga M, Núñez de Murga J. Effect of counting chamber on seminal parameters, analyzing with ISASv1®. *Rev Int Androl*. 2012 10 (4): 132-138. [https://doi.org/10.1016/S1698-031X\(12\)70069-9](https://doi.org/10.1016/S1698-031X(12)70069-9)
- Soler C, Sancho M, García A, Fuentes M, Núñez J, Cucho H. Ejaculate fractioning effect on llama sperm head morphometry as assessed by the ISAS(®) CASA system. *Reprod Domest Anim*. 2014; 49(1): 71-78. doi:10.1111/rda.12226
- Souza T. Avaliação andrológica e criopreservação de sêmen de pumas (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) adultos. 2009. Tesis Maestría. Viçosa, Universidad Federal de Viçosa. Disponible <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/4980>
- Sumar J, Novoa C, Franco E. Contribución al conocimiento de la vida reproductiva de los roedores peruanos. *Tercer Bol Ext IVITA (Perú)*, 1968: 255-259.
- Sutter A, Lindholm AK. The copulatory plug delays ejaculation by rival males and affects sperm competition outcome in house mice. *J Evol Biol*. 2016; 29 (8):1617-1630. doi:10.1111/jeb.12898
- Yucra A. Características microscópicas del semen y morfometría del espermatozoide del cuy doméstico (*Cavia porcellus*) y silvestre (*Cavia tschudii*). 2013. Tesis Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.