

*Artículo original:*

## **ESTIMACIÓN DE LA MORFOMETRÍA DE LOS ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE UN PUMA (*Puma concolor*) MEDIANTE UN SISTEMA INTEGRADO DE ANÁLISIS ESPERMÁTICO (ISAS®)**

### **Assessment of epididymal Puma (*Puma concolor*) sperm morphometry by Integrated Sperm Analysis System (ISAS®)**

**Cucho H., Alarcón V., Ordóñez C., INTRODUCCIÓN  
Ampuero E., Meza A.**

*Carrera Profesional de Zootecnia, Universidad  
Nacional de San Antonio Abad del Cusco.*

Email: hernancucho@yahoo.com

*Palabras Clave:*

*Puma, espermatozoide, morfometría, CASA*

El puma andino (*Puma concolor*) según la legislación peruana es una especie que se encuentra casi amenazada tan igual como la vicuña. Es sabido que las especies silvestres muestran muchas dificultades reproductivas cuando se hallan en cautiverio. Algunas investigaciones han determinado las características microscópicas del semen de pumas, en el caso de la morfología espermática la información es bastante subjetiva (Souza, 2009; Swanson *et al.*, 2003; Wildt *et al.*, 1988); el presente estudio trata de caracterizar objetivamente al espermatozoide de esta especie empleando para ello un sistema computarizado de análisis de semen (ISAS®), pues estos parámetros son importantes para determinar la fertilidad en machos como se ha demostrado en otras especies.

---

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se llevó a cabo entre marzo y mayo del 2013, en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS) La Raya de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, con alturas que van de los 4200 a 5100 metros de altitud. Las muestras de espermatozoides se obtuvieron de los epidídimos de un puma adulto de entre 7 a 10 años y de 55 – 60 kg de peso corporal, las que fueron procesadas tan pronto llegaron al laboratorio (aproximadamente 5 horas) durante ese lapso se conservaron a temperatura ambiente.

Los espermatozoides fueron colectados de la porción caudal de los epidídimos, este método proporciona mejores muestras que las obtenidas por electroeyaculación y que pueden ser criopreservadas y usadas en inseminación artificial o fertilización in vitro (Gomedio *et al.*, 2006). Los epidídimos fueron seccionados con un bisturí y lavados con 2ml de base Tris (Tris: 3.025 g; ácido cítrico: 1.7 g, fructuosa: 1.25 g, agua bidestilada: 100ml) (Souza, 2009), una muestra (5 µl) fue colocada en un microscopio UOP – UB200i, equipado con una lente de 10X de contraste de fase negativo para verificar la existencia de espermatozoides.

Se realizaron frotis de ambos epidídimos empleando 5 µl por cada muestra, una vez secas fueron teñidas con Hemacolor (Merck, Darmstadt, Alemania) que consiste en realizar 5 inmersiones de la muestra en una solución de fijación (metanol 50%), 5 inmersiones en la primera solución de tinción (eosina) y el mismo número en la segunda solución de inmersión (azur). El análisis morfométrico fue realizado usando el módulo de morfología del Integrated Sperm Analysis System (ISAS® v1.1), un sistema computarizado de análisis de semen (Proiser R+D, Paterna, Valencia, España), las muestras

fueron examinadas usando un microscopio UOP – UB200i, equipado con un objetivo de campo claro de 100X; la señal de video fue adquirida con una video cámara Proiser 782C. La resolución de las imágenes fue de 0.084 µm/pixel en los ejes horizontal y vertical. Se realizó la captura manual de al menos 250 espermatozoides provenientes de cada epidídimo, las medidas evaluadas en la cabeza del espermatozoide fueron área:

*largo: L, ancho: W y perímetro P;*

*también se obtuvieron cuatro parámetros no dimensionales:*

*elipticidad  $(L/W)$ , elongación  $[(L-W)/(L+W)]$ ,*

*rugosidad  $[4\pi(A/P^2)]$  y regularidad  $[\pi(L*W/4*A)]$ ,*

*porcentaje de acrosoma; mientras de la pieza intermedia se evaluó la distancia y ángulo de inserción de la misma.*

La información se almacenó en la computadora para su análisis posterior. Al ser un estudio exploratorio se usó estadística descriptiva, determinándose medidas de tendencia central, variabilidad, forma y distribución. Los análisis fueron realizados usando el SAS 9.1.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se han analizado 581 espermatozoides colectados del epidídimo de un puma adulto, luego de ser capturados (Figura 1), el sistema los analizaba agregándole colores para distinguir la cabeza, acrosoma, pieza intermedia y líneas para el largo, ancho, perímetro (Figura 2).



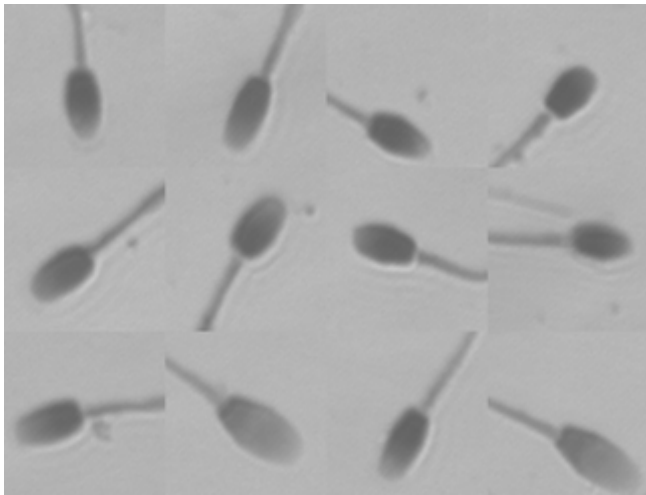


Figura 1. Imágenes digitalizadas de espermatozoides de puma coloreados con Hemacolor

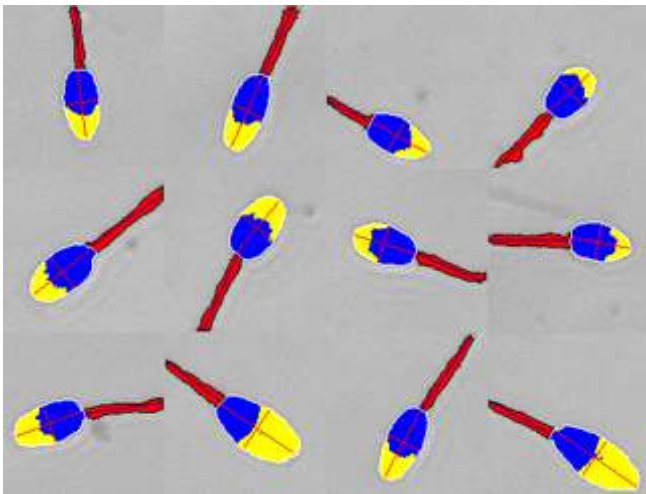


Figura 2. Imágenes digitalizadas de espermatozoides de puma analizados por el ISAS®

Solamente se tienen reportes de largo y ancho del espermatozoide del tigre (Cummins y Woodall, 1985) y leopardo (Gage, 1998). Los estudios realizados en pumas por Swanson *et al.* (2003), Souza (2009) y Wildt *et al.* (1988) muestran información de porcentajes de espermatozoides normales y anormalidades, todos ellos reportan mayores porcentajes de anormalidades en la pieza intermedia y cola; pero ninguno menciona medidas del espermatozoide de esta especie. Los promedios, desviación estándar, coeficiente de variabilidad, asimetría, curtosis y test de Kolmogorov – Smirnov, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Promedio, desviación estándar, coeficiente de variabilidad, asimetría, curtosis y test de Kolmogorov - Smirnov de la caracterización morfométrica de los espermatozoides de puma

UNIDAD	f	T	COEF. VARIAB.	ASIMETRÍA	CURTOSIS	TEST DE K-S
Longitud cabeza spz (µm)	581	4.5770	0.5120	11.1864	1.2507	1.8169 <0.0100
Ancho cabeza spz (µm)	581	2.4211	0.2839	11.7273	1.6919	4.3047 <0.0100
Área cabeza spz (µm <sup>2</sup> )	581	9.3626	1.9916	21.2719	2.0539	4.1724 <0.0100
Perímetro cabeza spz (µm)	581	12.5242	1.4127	11.2799	1.5178	2.3499 <0.0100
Elipticidad *	581	1.9015	0.2002	10.5294	0.4862	0.5796 <0.0100
Rugosidad *	581	0.7467	0.0512	6.8571	-0.3841	-0.1157 <0.0100
Elongación *	581	0.3075	0.0469	15.2714	0.0340	0.1622 >0.1500
Regularidad *	581	0.9329	0.0374	3.9981	0.3863	0.5019 0.0344
Acrosoma (%)	581	40.9168	8.4908	20.7516	0.2705	0.8132 <0.0100
Ángulo inserción PI (grados)	581	6.2791	7.2361	115.2422	5.2410	4.2569 <0.0100
Distancia PI (µm)	581	0.1464	0.0982	67.1384	1.4774	3.1569 <0.0100

\* medidas no dimensionales

Tanto el largo como el ancho de la cabeza del espermatozoide del puma son similares a los reportados por Gage (1998) para el leopardo, una especie de similar tamaño al puma; pero más pequeños que los del tigre (Cummins y Woodall, 1985), el más grande de los felinos; empero no hay reportes de las variables morfométricas del espermatozoide del puma, solo de la incidencia de anormalidades como se mencionó en párrafos precedentes.

Se han encontrado coeficientes de variabilidad altos en las variables estudiadas. Los valores de asimetría y curtosis, y el test de Kolmogorov – Smirnov (Test K – S) nos indican que las variables no presentan una distribución normal (excepto elongación), lo cual ha sido reportado en alpacas, llamas, ovinos, peces y otras especies cuando se trata de medidas morfométricas de los espermatozoides.

## CONCLUSIONES

Se han caracterizado 11 medidas morfométricas de la cabeza y pieza intermedia de los espermatozoides de puma andino (*Puma concolor*), las mismas que muestran alta variabilidad y no cuentan con distribución normal.

## BIBLIOGRAFIA

- Cummins J, Woodall P. 1985. *J Reprod Fert* 75:153 - 175
- Gage M. 1998. *Proc Royal Soc London B* 265: 97 – 103
- Gomendio M, Malo A, Soler A, Fernández-Santos M, Esteso M, García A. 2006. *Science* 314: 1445-1447
- Souza T. 2009. *Tesis Magister Scientiae*. Universidad Federal de Viçosa. Viçosa. Brasil.
- Swanson W, Johnson W, Cambre R, Citino S, Quigley K, Brousset D, Morais R, Moreira N, O'Brien S, Wildt. 2003. *Zoo Biol* 22:421 – 441.
- Wildt E, Phillips L, Simmons L, Chakraborty P, Brown J, Howard J, Teare A, Bush M. 1988. *Biol Reprod* 38:245-255

