

CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA Y CLASIFICACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES DE VICUÑA (*Vicugna vicugna*) USANDO EL SISTEMA ISAS® CASA-Morph

Morphometric characterization and classification of vicuña sperm (*Vicugna vicugna*) using ISAS® CASA-Morph system

Hernán Cucho¹, Olger Puelles¹, Aydee Meza¹, Darwin Urquiza¹, Leonidas Coila², Anthony Valverde³

- ¹ Escuela Profesional de Zootecnia, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Perú
- ² Consejo Regional de Camélidos Sudamericanos, Gobierno Regional Cusco, Perú
- ³ Escuela de Agronomía, Campus Tecnológico Local San Carlos, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.

* Corresponding author:
Hernán Cucho
E-mail:
hernan.cucho@unsaac.edu.pe

Recibido: 30/10/2021

Aceptado: 19/12/2021

Publicado: 31/12/2021

ABSTRACT

The aim of the study was to determine the morphological and morphometric characteristics of the vicuña sperm (*Vicugna vicugna*), looking for possible subpopulations in its structure. Semen was collected by electroejaculation method from three adult male vicuñas weighing 50.33 ± 2.52 kg, once per animal. The volume, color and concentration, sperm morphology and morphometry were determined. The samples for the analysis of sperm morphology and morphometry were stained with Hemacolor®, and analyzed using the CASA-Morph, Integrated Semen Analysis System (ISAS®v1). Five forms of the vicuña sperm head were distinguished: normal, piriform, long, short and rounded. The morphometric parameters determined were the length, width, area, perimeter, ellipticity, elongation, regularity and rugosity of the vicuña sperm head, percentage of acrosome, head gray level, as well as the width, area, distance and angle of insertion of midpiece of the sperm. In relation to morphology, significant differences ($P < 0.05$) were found in the percentage distribution of head shapes, with the normal shape (55.7%) being the majority and different from the other shapes. Significant differences ($P < 0.05$) were found between animals in the morphometric variables of head, percentage of acrosome, ellipticity, rugosity, elongation and gray level; while the variables of the midpiece and regularity did not show differences ($P > 0.05$). The morphometric variables were distributed in four main components (PCA) called elongation, area, circularity and midpiece width, which explained 84.59% of the total variance. The cluster analysis determined five subpopulations (SP): SP1 grouped small cells of low length, width and area (18.8%); SP2 of sperm of large size, both in area and width of the head (17.38%); SP3 of rounded cells with high values of percentage of acrosome and head gray level (24.04%); SP4 of spermatozoa of intermediate size and elongated, with greater ellipticities and elongation (23.61%); and SP5 of cells of intermediate size and short, with low values of area and length (16.71%).

Keywords: vicuña, CASA-Morph, sperm morphometry, subpopulations

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar las características morfológicas y morfométricas del espermatozoide de vicuña (*Vicugna vicugna*), buscando posibles subpoblaciones de acuerdo con su estructura. Se colectó semen por el método de electroeyaculación de tres vicuñas machos adultos con un peso de 50.33 ± 2.52 kg, en una oportunidad por animal. Se determinó el volumen, color y concentración, la morfología y morfometría espermática. Las muestras para el análisis de la morfología y morfometría espermática, fueron teñidas con Hemacolor®, y analizadas utilizando el sistema CASA-Morph, Integrated Semen Analysis System (ISAS®v1). Se distinguió 5 formas de la cabeza del espermatozoide de vicuña: normal, piriforme, larga, corta y redondeada. Los parámetros morfométricos determinados fueron la longitud, anchura, área, perímetro, elipticidad, elongación, regularidad y rugosidad de la cabeza del espermatozoide de vicuña, porcentaje de acrosoma, nivel de gris, así como la anchura, área, distancia y ángulo de inserción de la pieza intermedia del espermatozoide. En relación con la morfología, hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) en la distribución porcentual de formas de la cabeza, siendo

la forma normal (55.7%) la mayoritaria y diferente a las otras formas. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre animales en las variables morfométricas de cabeza, porcentaje de acrosoma, elipticidad, rugosidad, elongación y nivel de gris; mientras que las variables de la pieza intermedia y regularidad no mostraron diferencias ($P > 0.05$). Las variables morfométricas, se distribuyeron en cuatro componentes principales (PCA) denominados elongación, área, circularidad y anchura de la pieza intermedia, y explicaron un 84.59% de la varianza total. El análisis de clústeres determinó cinco subpoblaciones (SP): SP1 agrupó células pequeñas de baja longitud, anchura y área (18.8%); SP2 de espermatozoides de tamaño grande, tanto en área y anchura de la cabeza (17.38%); SP3 de células redondeadas con valores altos de porcentaje de acrosoma y nivel de gris (24.04%); SP4 de espermatozoides de tamaño intermedio y alargadas, con mayores elipticidades y elongación (23.61%); y SP5 de células de tamaño intermedio y cortas, con valores bajos de área y longitud (16.71%).

Palabra clave: vicuña, CASA-Morph, morfometría del espermatozoide, subpoblaciones

INTRODUCCIÓN

La vicuña (*Vicugna vicugna mensalis*), es el camélido silvestre con mayor población en el Perú (DGFFS, 2014), se distinguen dos subespecies, la sureña *Vicugna vicugna vicugna*, que se halla entre los 22° y 29° latitud sur, y la del norte (*Vicugna vicugna mensalis*), que se encuentra entre los 9°30' y 18° de latitud sur (Wheeler y Laker, 2009). En el Perú se la encuentra entre los 3800 y 4800 de altitud, especialmente en el piso ecológico de Puna (Zuñiga, 2007). Su alimentación mayormente está compuesta de gramíneas y ciperáceas de estrato corto, además de algunos arbustos, muestra preferencia por especies botánicas similar a la alpaca (Cassini et al, 2009).

La IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources), clasifica a la vicuña como de Preocupación Menor, dada su amplia gama de distribución, población, su tendencia creciente y su presencia en varias áreas protegidas (Acebes et al., 2018). En el Perú, la vicuña, figura en el listado de especies casi amenazadas (NT), aunque éstas no se consideran en sentido estricto como una especie amenazada (MINAM, 2018). Toda la población de vicuñas del Perú, está incluida en el Apéndice II de CITES, que permite, bajo estrictas regulaciones entre países exportadores e importadores, el comercio de fibras y productos derivados (Acebes et al., 2018), sin embargo, al ser una especie silvestre protegida por el estado, es necesario obtener permisos para su estudio, que en el área reproductiva son escasos, por la dificultad de obtener muestras.

Las referencias sobre las características seminales de la *Vicugna vicugna*, son escasas, y las que reportan información sobre las características morfológicas y morfométricas son aún menos (Enciso, 2009; Pacheco et al., 2011; Giuliano et al., 2013), ésta última característica, es determinada gracias al desarrollo de los sistemas CASA-Morph (Computer Assisted Semen Analysis), lo que ha abierto nuevas posibilidades para la evaluación seminal (Soler et al., 2016; Valverde et al., 2019a).

Varios estudios sobre morfometría espermática han indicado variaciones importantes en animales de una misma población (Soler et al., 2017; Thurston et al., 2001), que también ha sido reportado en otros camélidos sudamericanos como alpacas (Cucho et al., 2019) y llamas (Cucho et al., 2021). Gracias a la gran cantidad de células analizadas con los sistemas CASA, se dispone de información de los espermatozoides individuales y que permiten realizar procedimientos multivariados de análisis para determinar diferentes patrones morfométricos en el semen (Barquero et al., 2021; Yániz et al., 2016) y

probables subpoblaciones espermáticas como ha sido demostrado en llamas (Cucho et al., 2021). Por ello el objetivo del estudio fue determinar las características morfológicas y morfométricas del espermatozoide de vicuña (*Vicugna vicugna*), buscando posibles subpoblaciones en su estructura.

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.

Lugar de estudio

El estudio fue realizado en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos CICAS - La Raya, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco, Perú (14°28'28" S, 71°02'47" W). El área pertenece a la zona de vida de páramo húmedo - subalpino subtropical (Holdridge, 1967), presenta una temperatura promedio de 7.5°C, con rangos que van desde -7°C a 18°C, y una precipitación pluvial de 650 mm anuales concentradas entre los meses de diciembre y marzo (Estación meteorológica La Raya).

De los animales

La vicuña (*Vicugna vicugna mensalis*), es una especie protegida por el Estado Peruano; para realizar este estudio, se obtuvo la autorización del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre, quienes emitieron la resolución N° 356-2016-SERFOR/DGGSPPFS, autorizando su ejecución empleando hasta cinco individuos de vicuñas machos, en capturas realizadas en la región Cusco.

El estudio se realizó entre mayo a septiembre 2017, las muestras seminales se colectaron en el mes de junio, y provenían de tres vicuñas de aproximadamente 5 años de edad, determinada por cronometría dentaria (boca llena), del módulo de uso sustentable de vicuñas (MUSV) de La Raya, Cusco, Perú, los animales tenían un peso de 50.33 ± 2.52 kg. El tamaño del testículo izquierdo fue $4.27 \pm 1.01 \times 2.06 \pm 0.08$ cm, y el derecho fue de $3.85 \pm 0.55 \times 2.07 \pm 0.26$ cm. Los animales se alimentaban de pastos naturales, las especies vegetales predominantes del MUSV de La Raya fueron *Calamagrostis amoena*, *Calamagrostis curvula*, *Calamagrostis minima*, *Distichia muscoides* y *Oxycloe andina* (Cuellar, 2009).

Colección de semen

Las muestras seminales se colectaron en el módulo de uso sustentable de vicuñas del referido centro (14°25'51" S, 71°00'14" W) a 4620 metros sobre el nivel del mar, y 18 kilómetros del laboratorio de Biotecnologías Reproductivas del CICAS – La Raya. Primero se realizó la captura de los animales mediante un "chaccu" o arreo, y se seleccionaron los machos a ser colectados, tras lo cual fueron liberados.

La colección de semen se efectuó por el método de electroeyaculación, y siguió el procedimiento propuesto por (Director et al., 2007), que empezó con el pesado de los animales y la determinación de la distancia ano – próstata, evaluada con un ecógrafo Agroscaan® L (Angoulême, Francia), que fue en promedio de 10.8 cm. Se suministró dosis de 0.3 mL de xylacina y 2.8 mL de ketamina por 100 kg de peso corporal (Rodríguez, 2013) por vía endovenosa, el tiempo de pérdida de la sensibilidad de los animales fue de 25 a 30 segundos, tras lo cual se sujetó a la vicuña. Se limpió la zona del pene prepucio con 20 mL de agua destilada a 37 °C, y también la vía rectal, tras lo cual se inició con la relajación de la S peneana, el desvainado y sujeción de pene. La sonda del electroeyaculador (Minitube®, Tiefenbach, Alemania), lubricada con gel de ecografía, fue introducida sobre la próstata. La estimulación eléctrica empezó a los 3 voltios (V), con tres descargas de 1 segundo (s), y 2 s de descanso, tras lo cual se incrementaba el voltaje 1 V (Cucho et al., 2021). El procedimiento tuvo una duración promedio de 13 minutos, en el cual el voltaje alcanzaba un máximo de 15 V. Se realizó una única colecta por cada vicuña. Las muestras de semen se recuperaron en tubos graduados de 50 mL, que se mantuvieron a 37°C hasta su llegada al laboratorio.

Análisis seminal

Se determinó el volumen (mL) y color seminal como características macroscópicas. Ninguna de las muestras presentaba movilidad espermática al ser evaluada en laboratorio. 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), también se evaluó la morfología y morfometría.

Análisis de la morfología y morfometría del espermatozoide de vicuña

Existen dos tipos de especies en función de la morfología espermática, los homomorfos y los heteromorfos; los primeros tienen una morfología constante entre individuos, así como dentro de animales (Soler et al., 2014a), mientras que los segundos presentan distintas formas de la cabeza espermática, tanto entre individuos y dentro de animales, como ocurre con la vicuña. La clasificación de la forma de las cabezas espermáticas se basó en las propuestas por Buendía et al., (2002) y Soler et al., (2014a), para alpacas y llamas respectivamente, dicha clasificación la realizó un solo operador.

Se efectuaron frotis empleando 5 µL de semen. Luego de 20 minutos de secado se tiñeron con Hemacolor® (Merck, Alemania), según protocolo del producto, tinción usada previamente en estudios de morfometría en alpacas (Buendía et al., 2002; Cucho et al., 2019) y llamas (Cucho et al., 2021). El análisis de la morfología y 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 µm/píxel en ambos ejes (Cucho et al., 2021).

Se capturaron las imágenes de 915 espermatozoides, los que sirvieron para los análisis de morfología de la cabeza del espermatozoide (Fig. 1), y también para determinar las características morfométricas.

Se analizaron los siguientes parámetros morfométricos: longitud (L, µm), anchura (W, µm), área (A, µm²), perímetro (P, µm), elipticidad (L/W), elongación $([L-W]/[L+W])$, regularidad $(\pi LW/4A)$ y rugosidad $(4\pi A/P^2)$ de la cabeza del espermatozoide. Asimismo, la anchura (µm), área (µm²), distancia de inserción (distancia entre la cabeza y el eje de la pieza intermedia, µm) y ángulo de inserción (°) de la pieza intermedia del espermatozoide. La evaluación de la morfometría de un espermatozoide es importante, ya que permite detectar alteraciones en la maduración epididimaria durante la espermatogénesis (Hidalgo et al., 2006).

Análisis estadístico.

Se aplicó la estadística descriptiva para el volumen. La prueba de normalidad y homocedasticidad fue realizada con el test de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. La distribución morfológica porcentual por formas de la cabeza del espermatozoide de vicuña 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 Tukey ($\alpha=0.05$).

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.

Primero se realizó un análisis de componentes principales (PCA) o análisis factorial de todos los datos para obtener un menor número de combinaciones lineales (PCA) que aún conservaran la mayor cantidad de información posible de las variables originales. El número de componentes principales (PCA) utilizados en el siguiente proceso del análisis se determinó a partir del criterio de Kaiser; seleccionando sólo aquellos con un valor propio (eigenvalue; varianza extraída de cada PCA >1). Además, se realizó la prueba de esfericidad de Bartlett y la prueba KMO (Kaiser-Meyer-Olkin) (Spencer, 2013). La bondad de ajuste de las variables regularidad de la cabeza espermática, distancia y ángulo de inserción de la pieza intermedia presentaban un valor inferior a 0.5, por lo que fueron retiradas del análisis factorial. 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 las células unidas 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).

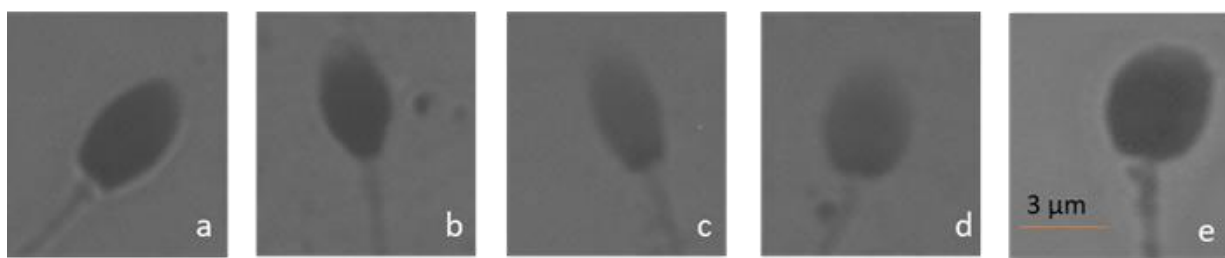


Fig. 1. Representación de cada forma de cabeza de espermatozoide de vicuña. (a) normal; (b) piriforme; (c) larga; (d) corta; (e) redondeada. Escala de la barra = 3 μ m aplicable a todas las imágenes.

Morfología espermática

Se analizó 915 células, para clasificar la forma de la cabeza de los espermatozoides, en base a los estudios de Buendía et al., (2002) y Soler et al., (2014a); las imágenes de las 5 formas espermáticas se muestran en la Figura 1.

Se halló diferencias significativas ($P < 0.05$) en la distribución porcentual de la forma de la cabeza de los espermatozoides de vicuña, siendo la más recurrente la forma normal en los 3 animales estudiados; y las formas redondeadas y largas las que el siguen en porcentaje, siendo la primera más abundante en la vicuña 3, y la segunda más frecuente en los animales 1 y 2. La forma piriforme es la menos repetida en todos los animales, los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución porcentual de la forma de la cabeza del espermatozoide de vicuña (n=915).

Vicuña	Forma (%)				
	Normal	Piriforme	Larga	Corta	Redondeada
1	59.03	3.13	12.50	7.64	17.71
2	61.82	2.74	12.16	5.99	17.29
3	46.51	6.98	18.60	13.95	13.95
Promedio	55.78 ^a	4.28 ^b	14.42 ^b	9.20 ^b	16.32 ^b

Número total de células de cada animal: vicuña 1 = 288; vicuña 2 = 584; vicuña 3 = 43. ^{a-b} Superíndices distintos dentro de fila indican diferencias significativas entre forma. $P < 0.05$

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

El volumen de semen colectado de las 3 vicuñas fue de 1.83 ± 0.42 mL, con un rango de 1.5 a 2.3 mL, el 75% de eyaculados fue de color blanco cristalino, y el 25% fue blanco lechoso. No se halló movilidad de los espermatozoides. La concentración espermática de las muestras fue de $14.68 \pm 4.93 \times 10^6$ espermatozoides/mL

Morfometría espermática

Se halló diferencias significativas ($P < 0.05$) entre animales en las variables morfométricas de cabeza, porcentaje de acrosoma, elipticidad, rugosidad, elongación y nivel de gris; mientras que las variables que correspondían a la pieza intermedia y la regularidad no mostraban diferencias ($P > 0.05$), información que se muestra en la Tabla 2.

Componentes principales (PCA) y estructura subpoblacional

El análisis de componentes principales indicó cuatro PCA:

- Elongación (PCA1), representada por la elongación, elipticidad, la anchura y longitud de la cabeza del espermatozoide. El efecto del valor propio de las dos primeras variables fue muy similar (0.994 y 0.993), mientras que para la anchura de la cabeza fue de -0.602, y la longitud de la cabeza fue 0.626; por lo que en este grupo se encontraban aquellas células con menor anchura y longitud de la cabeza.
- Área (PCA2), se refería al área, anchura, longitud y perímetro de la cabeza del espermatozoide, en este grupo se encontraban las células con las cabezas más anchas y largas, y de mayor perímetro.
- PCA3, representado por el perímetro de la cabeza, nivel de gris, la rugosidad y el porcentaje de acrosoma, denominada circularidad dada principalmente por rugosidad (-0.820).
- PCA4, representado por anchura de la pieza intermedia y área de la pieza intermedia, denominado anchura de la pieza intermedia.

La varianza total explicada de los 4 PCA fue de 84.59%; los resultados indicaron que la forma y el tamaño del

espermatozoide tiene un efecto relativamente mayor sobre la varianza total que las otras variables (Tabla 3).

Tabla 2. Promedio y desviación estándar (DS) de las variables morfométricas de la cabeza y pieza intermedia (medias \pm DS) del espermatozoide de vicuña (*Vicugna vicugna*).

Variable	Promedio \pm DS	Vicuña		
		1	2	3
Longitud cabeza (μm)	5.01 \pm 0.46	4.88 \pm 0.45 ^b	5.11 \pm 0.42 ^a	4.47 \pm 0.41 ^c
Anchura cabeza (μm)	3.15 \pm 0.28	3.23 \pm 0.29 ^a	3.13 \pm 0.25 ^b	2.83 \pm 0.34 ^c
Área cabeza (μm^2)	13.00 \pm 1.66	12.92 \pm 1.57 ^b	13.24 \pm 1.53 ^a	10.32 \pm 1.57 ^c
Perímetro cabeza (μm)	15.94 \pm 1.70	15.63 \pm 1.50 ^b	16.28 \pm 1.61 ^a	13.33 \pm 1.48 ^c
Acrosoma (%)	52.41 \pm 8.52	52.21 \pm 6.92 ^a	53.26 \pm 8.89 ^a	42.88 \pm 6.10 ^b
Elipticidad	1.60 \pm 0.18	1.52 \pm 0.17 ^b	1.64 \pm 0.17 ^a	1.59 \pm 0.13 ^a
Rugosidad	0.65 \pm 0.09	0.67 \pm 0.08 ^b	0.64 \pm 0.09 ^c	0.74 \pm 0.08 ^a
Elongación	0.23 \pm 0.05	0.20 \pm 0.05 ^b	0.24 \pm 0.05 ^a	0.23 \pm 0.04 ^a
Regularidad	0.95 \pm 0.05	0.96 \pm 0.05 ^a	0.95 \pm 0.05 ^a	0.97 \pm 0.05 ^a
Nivel de gris	91.45 \pm 7.94	88.54 \pm 3.76 ^b	94.09 \pm 6.84 ^a	75.06 \pm 14.04 ^c
Anchura PI (μm)	1.25 \pm 0.48	1.22 \pm 0.41 ^a	1.28 \pm 0.52 ^a	1.18 \pm 0.33 ^a
Área PI (μm^2)	2.75 \pm 0.74	2.97 \pm 0.65 ^a	2.67 \pm 0.75 ^a	2.46 \pm 0.70 ^a
Distancia inserción PI (μm)	0.27 \pm 0.19	0.26 \pm 0.18 ^a	0.27 \pm 0.20 ^a	0.26 \pm 0.15 ^a
Ángulo inserción PI ($^\circ$)	11.61 \pm 9.91	14.20 \pm 13.20 ^a	10.50 \pm 7.76 ^a	9.22 \pm 6.36 ^a

Número total de células de cada animal: vicuña 1 = 288; vicuña 2 = 584; vicuña 3 = 43. PI: pieza intermedia. DS: desviación estándar. ^{a-c} Superíndices distintos dentro de filas indican diferencias significativas entre animales. $P < 0.05$.

Tabla 3. Valores propios de componentes principales (PCA) para variables morfométricas en espermatozoides de vicuña (*Vicugna vicugna*)

Variable	Componentes principales			
	PCA1	PCA2	PCA3	PCA4
Elongación	0.994			
Elipticidad	0.993			
Área cabeza		0.962		
Anchura cabeza	-0.602	0.778		
Longitud cabeza	0.626	0.745		
Perímetro cabeza		0.691	0.636	
Nivel de gris			0.831	
Rugosidad			-0.820	
Acrosoma (%)			0.800	
Anchura PI				0.826
Área PI				0.812
Varianza explicada (%)	25.88	23.96	22.26	12.49
Varianza total explicada = 84.59%				

Los datos del análisis de conglomerados mostraron cinco subpoblaciones (SP). Los valores morfométricos correspondientes a cada subpoblación se caracterizaron por: (a) células pequeñas, de poca longitud, anchura y área, además de poseer menor porcentaje de acrosoma. (SP1), que mostró la anchura ($2.87 \pm 0.016 \mu\text{m}$), área de la cabeza ($11.28 \pm 0.097 \mu\text{m}^2$) y porcentaje de acrosoma ($45.70 \pm 0.517\%$) más bajo; comprendía el 18.8% del total de células; (b) células de tamaño grande (SP2), mostrando áreas de la cabeza ($14.66 \pm 0.101 \mu\text{m}^2$) y anchuras ($3.46 \pm 0.016 \mu\text{m}$) más altas; la longitud de la cabeza era intermedia; comprendía al 17.38% de los espermatozoides; (c) células

redondeadas (SP3), con los mayores valores de porcentaje de acrosoma ($59.18 \pm 0.457\%$) y nivel de gris (95.24 ± 0.439), y con los valores más bajos de longitud de la cabeza ($4.68 \pm 0.024 \mu\text{m}$), correspondería a los espermatozoides de forma redondeada, el 24.04% de espermatozoides se hallaba en este conglomerado; (d) células de tamaño intermedio y alargadas (SP4), que se caracterizó por tener la mayor longitud ($5.43 \pm 0.024 \mu\text{m}$) y perímetro de la cabeza ($17.05 \pm 0.094 \mu\text{m}$), así como también las mayores elipticidades y elongación, esta subpoblación representó el 23.61% del total de espermatozoides; y (e) células de tamaño intermedio y cortas (SP5), con valores bajos de área ($12.78 \pm 0.105 \mu\text{m}^2$) y longitud ($4.97 \pm 0.029 \mu\text{m}$) de la cabeza del espermatozoide, aunque mostraban la mayor anchura y área de la pieza intermedia ($3.66 \pm 0.049 \mu\text{m}^2$), comprendía al 16.17% de espermatozoides.

La subpoblación SP5 mostró la menor proporción de células (16.17%), seguida de SP2 con 17.38% del total de células espermáticas (Tabla 4).

DISCUSIÓN

Colección y evaluación del semen

El volumen colectado de $1.83 \pm 0.42 \text{ ml}$ fue inferior a los 2.5 ml obtenidos por Fernández Baca y Novoa (1968), similar a los de Giuliano et al., (2013), y superior a los obtenidos por Enciso (2009) y Pacheco et al., (2011), en todos los casos el semen fue colectado por electroeyaculación. Esta variable es dependiente de la libido del macho, de la estación reproductiva, y del hábitat donde viven los animales, que en los estudios anteriores en su mayoría fueron de animales en estado de semicautiverio.

Tabla 4. Subpoblaciones espermáticas (SP) para variables morfométricas (medias \pm SEM) en vicuñas (*Vicugna vicugna*)

	Subpoblación				
	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5
Nro. de células (%)	172 (18.80)	159 (17.38)	220 (24.04)	216 (23.61)	148 (16.17)
Longitud cabeza	4.74 \pm 0.027 ^d	5.20 \pm 0.028 ^b	4.68 \pm 0.024 ^d	5.43 \pm 0.024 ^a	4.97 \pm 0.029 ^c
Anchura cabeza	2.87 \pm 0.016 ^d	3.46 \pm 0.016 ^a	3.25 \pm 0.014 ^b	3.06 \pm 0.014 ^c	3.10 \pm 0.017 ^c
Área cabeza	11.28 \pm 0.097 ^d	14.66 \pm 0.101 ^a	12.74 \pm 0.086 ^c	13.58 \pm 0.087 ^b	12.78 \pm 0.105 ^c
Perímetro cabeza	14.03 \pm 0.105 ^c	16.18 \pm 0.109 ^b	16.12 \pm 0.093 ^b	17.05 \pm 0.094 ^a	15.98 \pm 0.113 ^b
Acrosoma %	45.70 \pm 0.517 ^d	46.82 \pm 0.537 ^d	59.18 \pm 0.457 ^a	55.19 \pm 0.461 ^b	52.12 \pm 0.557 ^c
Elipticidad	1.66 \pm 0.010 ^b	1.51 \pm 0.010 ^d	1.44 \pm 0.009 ^e	1.78 \pm 0.009 ^a	1.61 \pm 0.011 ^c
Rugosidad	0.72 \pm 0.006 ^a	0.71 \pm 0.006 ^a	0.62 \pm 0.005 ^b	0.59 \pm 0.005 ^c	0.64 \pm 0.006 ^b
Elongación	0.24 \pm 0.003 ^b	0.20 \pm 0.003 ^d	0.18 \pm 0.003 ^e	0.28 \pm 0.003 ^a	0.23 \pm 0.003 ^c
Nivel de gris	84.09 \pm 0.497 ^d	87.56 \pm 0.516 ^c	95.24 \pm 0.439 ^a	95.84 \pm 0.443 ^a	92.10 \pm 0.535 ^b
Anchura PI	1.10 \pm 0.028 ^c	1.22 \pm 0.030 ^b	1.16 \pm 0.025 ^b	1.04 \pm 0.025 ^c	1.92 \pm 0.031 ^a
Área PI	2.50 \pm 0.046 ^c	2.90 \pm 0.047 ^b	2.53 \pm 0.040 ^c	2.44 \pm 0.041 ^c	3.66 \pm 0.049 ^a

SP: subpoblación; PI: pieza intermedia

^{a-e} Superíndices distintos dentro de fila indican diferencias significativas entre subpoblaciones espermáticas (P<0.05).

Pacheco et al., (2011) también encontró que la mayoría de eyaculados fueron de color blanco cristalino, como en el presente estudio; mientras que Enciso (2009) y Giuliano et al., (2013), reportaron muestras blanquecinas o incoloras, esta variable es subjetiva, y es dependiente de la apreciación del operador.

La concentración espermática hallada, es superior a las reportadas por Enciso (2009) y Pacheco et al., (2011) que son de 1.66 y 6.26 x 10⁶ espermatozoides/mL; y se encuentran en el rango de las obtenidas por Giuliano et al., (2013) que fue de 10 a 140 x 10⁶ espermatozoides/mL. Una de las diferencias con estos estudios fue el instrumento de medición (cámara hemocitométrica), y en éste el empleo de un Spermtrack®, que muestra una mejor performance que las cámaras de Neubauer para estas evaluaciones (Soler et al., 2012; Crespihlo et al., 2017); otra de las diferencias pudo ser que los otros estudios trabajaron principalmente con animales en semicautiverio, y en éste se empleó animales que vivían en silvestría.

Morfología espermática

Los espermatozoides de algunas especies muestran una morfología constante entre individuos, así como dentro de éstos (Soler et al., 2014a), como es el caso de los ovinos (Sancho et al., 1998) o cuyes (Cabeza et al., 2020); mientras otras especies presentan variaciones de la forma de su cabeza como los humanos (Pérez-Sánchez et al., 1994), y otros camélidos como las alpacas (Buendía et al., 2002) o llamas (Casaretto et al., 2012; Soler et al., 2014a)

La forma predominante de la cabeza del espermatozoide de vicuña fue normal (55.78%), que también es la dominante en alpacas (Buendía et al., 2002) y llamas (Soler et al., 2014a); a diferencia de estas especies de camélidos sudamericanos, en la que la forma alargada es la segunda en proporción; la forma redondeada (16.32%) lo es en vicuñas. En llamas la forma redondeada es la menos frecuente (1%), y en alpacas la forma estrecha (7%), mientras que en el caso de las vicuñas la forma piriforme es la de menor incidencia (4.28%). Es evidente que estas diferencias se deben a los animales como se muestra en la Tabla 1, en la que solamente la forma normal es la predominante en los animales evaluados, no así las otras

formas que varían entre animales, lo que también ha sido reportado por Buendía et al., (2002) y Soler et al., (2014a) en alpacas y llamas respectivamente.

Morfometría espermática

El análisis de la morfometría espermática con los sistemas de análisis computarizado de semen (CASA-Morph), da información precisa y objetiva de las variables morfométricas de una muestra de semen (Martí et al., 2012; Valverde et al., 2020). Se evaluó la morfometría de 915 espermatozoides de 3 vicuñas, se halló diferencias significativas (P< 0.05) entre animales en la mayoría de las variables morfométricas de la cabeza del espermatozoide, como en otros estudios en camélidos (Casaretto et al., 2012; Soler et al., 2014b; Cucho et al., 2021).

En el análisis de la morfometría de la cabeza del espermatozoide de vicuña, los valores de longitud, anchura, área y perímetro, son similares a los reportados por Enciso (2009), que también empleó un sistema CASA, el Sperm Class Analyzer® (Microptic, Barcelona, España), y la coloración de Papanicolaou, en el análisis de espermatozoides de vicuñas; Giuliano et al., (2013), reportaron valores menores de longitud, anchura, área, perímetro, elipticidad y rugosidad de la cabeza del espermatozoide, posiblemente debido al software generalista que usaron para dichos análisis (Kondron Bildanalyse) y la Tinción 15® (Biopur, Argentina), ya que el uso de diferentes medios de tinción, proporcionan diferentes valores de morfometría (Soler et al., 2005; Cucho et al., 2019). Los parámetros morfométricos de la pieza intermedia del espermatozoide de vicuña, no fueron reportados en ningún estudio, y no mostraban diferencias estadísticas (P>0.05) entre animales, contrario a lo hallado por Cucho et al., (2019; 2021) en alpacas y llamas respectivamente.

El área de la cabeza del espermatozoide de vicuña es menor a los reportados en alpacas por Buendía et al., (2002), y Cucho et al., (2019) que fluctúan entre 15.1 y 15.9 μ m², y también son menores a los hallados por Soler et al., (2014) y Cucho et al., (2021), en llamas, que varían 13.75 y 14.13 μ m², ello probablemente se deba a una adaptación propia de la especie.

Componentes principales y subpoblaciones espermáticas

Las especies que muestran una morfología espermática heteromorfa, son las que tienen gran variabilidad de su morfometría intra e inter animal, como es el caso de los camélidos sudamericanos; en éstas, la existencia de diferentes subpoblaciones probablemente ayude en el proceso de fertilización (Thilagavathi et al., 2012), estos estudios, se efectúan gracias a la información proporcionada por los sistemas CASA-Morph, que combinado con la estadística multivariada, ha mostrado la verdadera estructura de la población espermática, 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 vicuñas. En llamas, Cucho et al., (2021), reportó 5 componentes principales (PCA) que explicaban el 81.6% de la varianza total; en vicuñas se halló 4 PCA que explican una varianza total de 84.59%, en ambos estudios la forma y el tamaño del espermatozoide tiene un efecto relativamente mayor sobre la varianza total que las otras variables, siendo responsables de 3 PCA en los estudios en llamas y vicuñas.

Se identificaron cinco subpoblaciones (SP) espermáticas en función de la morfometría de dicha célula; en llamas, Cucho et al., (2021) encontró 4 SP, una de células pequeñas, otra de intermedias, de células alargadas y de pieza intermedia grande, con porcentajes que fluctuaban entre 9.9 y 36.8%; en este caso la estructura de SP es mucho más homogénea con porcentajes que varían de 16.17 a 24.04%, en el caso de las células de tamaño intermedio y cortas, y las células redondeadas, Valverde et al., (2019b) indica que los espermatozoides se agrupan en subpoblaciones bien definidas de acuerdo con sus características cinéticas y/o morfométricas, y se ha visto que la distribución subpoblacional varía entre individuos, lo cual indicaría diferentes estrategias de competencia entre eyaculados; por ende, probablemente las estrategias que emplean los espermatozoides de llamas y vicuñas sean diferentes. En otras especies se reportaron tres SP en pumas (Cucho et al., 2016), cuatro en gatos (Gutiérrez-Reinoso y García-Herreros, 2016) y cinco SP en gallinas de guinea (García-Herreros, 2016).

CONCLUSIONES

Se distinguió 5 formas de la cabeza del espermatozoide de vicuña: normal, piriforme, larga, corta y redondeada, siendo la forma normal (55.7%) la preponderante y diferente a las otras formas. Se encontraron diferencias significativas entre animales en las variables morfométricas de la cabeza, porcentaje de acrosoma, elipticidad, rugosidad, elongación y nivel de gris, con la información proporcionada por un sistema CASA-Morph apoyado con la estadística multivariada basada en el análisis de componentes principales se pudo determinar por primera vez la estructura de subpoblaciones espermáticas de la vicuña, identificándose cinco subpoblaciones con características diferentes de su morfometría.

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, OP, AM; desarrollo de la metodología: OP, AM, DU; concepción y diseño: HC; edición del artículo: HC, AV; supervisión del estudio: HC, AV.

Agradecimiento

Al Dr. Virgilio Alarcón, Administrador del Centro Experimental La Raya por las facilidades brindadas para realizar el estudio.

REFERENCES

- Acebes P, Wheeler J, Baldo J, Tuppia P, Lichtenstein G, Hoces D, Franklin WL. *Vicugna vicugna*. The IUCN Red List of Threatened Species. 2018: e.T22956A18540534. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22956A18540534.en>
- Barquero V, Roldan ERS, Soler C, Yániz JL, Camacho M, Valverde A. Predictive Capacity of Boar Sperm Morphometry and Morphometric Sub-Populations on Reproductive Success after Artificial Insemination. *Animals (Basel)*. 2021; 11(4): 920. <https://doi.org/10.3390/ani11040920>.
- Buendía P, Soler C, Paollichi F, Gago C, Urquieta B, Pérez-Sánchez F, Bustos-Obregón E. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm head using the Sperm-Class Analyzer computer-assisted system. *Theriogenology*. 2002; 57(4): 1207-1218. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00724-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00724-5)
- Cabeza U, Ordoñez C, Meza A, Cucho H. Caracterización morfológica y morfométrica del espermatozoide de cuy (*Cavia porcellus*). *Spermova*. 2020; 10(2): 94 – 101. <https://doi.org/10.18548/aspe/0008.14>
- Casaretto C, Lombardo D, Giuliano S, Gambarotta M, Carretero M, Miragaya M. Morphometric analysis of llama (*Lama glama*) sperm head. *Andrologia*. 2012; 44: 424-430. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01200.x>
- Cassini M, Borgnia M, Arzamendia Y, Benítez V, Vilá B. Sociality, Foraging and Habitat use by vicuña. The vicuña in the Andean Altiplano. In: Gordon IJ (ed.), *The vicuña. The theory and practice of community-based wildlife management*, pp. 35 - 49. Springer, Boston. 2009.
- Crespilho AM, Chiaradia L, Cortez A, Dinelli M, Papa FO, Gomes GM, Peixoto Junior 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. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.127773>
- Cucho H, Alarcón V, Ordóñez C, Ampuero E, Meza A, Soler C. Puma (*Puma concolor*) epididymal sperm morphometry. *Asian J Androl*. 2016; 18 (6): 879- 881. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.187584>
- 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. <https://doi.org/10.29252/nbr.6.3.284>

- Cucho H, Gallegos M, Ccoiso R, Meza A, Ampuero E, Ordóñez C, Valverde A. Morfometría y subpoblaciones de espermatozoides de llama (*Lama glama*) usando el sistema ISAS® CASA-Morph. Rev Inv Vet Perú. 2021; 32(1):e19506. <https://doi.org/10.15381/rirep.v32i1.19506>
- Cuellar E. Evaluación de pastizales dentro y fuera del cerco permanente de vicuñas en época de secas en CILCAS La Raya – UNSAAC – Cusco. 2009. Tesis Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Director A, Giuliano S, Carretero M, Pinto M, Trasorras V, Miragaya M. Electroejaculation and seminal characteristics in llama (*Lama glama*). J Camel Pract Res. 2007; 14(2): 203-206.
- DGFFS. Censo poblacional de vicuñas 2012. Lima, Perú. Dirección General Forestal y de Fauna Silvestre. Ministerio de Agricultura y Riego. 2014
- Enciso MA. Reproducción en la vicuña macho: evaluación de la contención química, colección de semen, evaluación del eyaculado y biométrica testicular. 2009. Tesis de Maestría en Zoología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Fernández Baca S, Novoa C. Primer ensayo de inseminación artificial de alpacas (*Lama pacos*) con semen de vicuña (*Vicugna vicugna*). Rev Fac Med Vet 22: 9-18
- García-Herreros M. Sperm subpopulations in avian species: a comparative study between the rooster (*Gallus domesticus*) and guinea fowl (*Numida meleagris*). Asian J Androl. 2016; 18 (6): 889-894. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.188448>
- Giuliano SM, Spirito SE, Miragaya MH, Rutter B, Agüero A, Capdevielle EF, Boquet MD, Ferrari MR. Aparato reproductor y parámetros seminales de vicuña (*Vicugna Vicugna*). In Vet. 2013; 15(1): 47 - 55
- Gutiérrez-Reinoso M, García-Herreros M. Normozoospermic vs teratozoospermic domestic cats: differential testicular volume, sperm morphometry and subpopulation structure during epididymal maturation. Asian J Andro. 2016; 18 (6): 871-878. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.187583>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.038>
- Holdridge LR. Life zone ecology. San José, Costa Rica. Tropical Science Center. 1967
- Kaiser HF. The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. Psychometrika. 1958 23: 187-200. doi.org/10.1007/BF02289233
- Kaufman L, Rousseeuw PJ. Finding groups in data: an introduction to cluster analysis. Wiley. 2005.
- Martí JJ, Aparicio IM, Leal CLV, García-Herreros M. Seasonal dynamics of sperm morphometric subpopulations and its association with sperm quality parameters in ram ejaculates. Theriogenology; 2012; 78(3): 528-541. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.035>
- MINAM. Listado de especies de Fauna Silvestre CITES-Perú. Lima, Perú. Dirección General de Diversidad Biológica. 2018.
- Murtagh F, Legendre P. Ward's hierarchical agglomerative clustering method: which algorithms implement ward's criterion?. J Classif. 2014 31: 274-295. <https://doi.org/10.1007/s00357-014-9161-z>
- Pacheco JI, Mamani RH, Deza HW. Colección de semen mediante electroeyaculación de vicuñas mantenidas en cautiverio. Spermova. 2011; 1(1): 131 – 133
- Pérez-Sánchez F, de Monserrat JJ, Soler C. Morphometric analysis of human sperm morphology. Int J Androl. 1994; 17 (5): 248 – 255. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1994.tb01250.x>
- Rodríguez M. Índice de fragmentación del ADN espermático y test de HOS en semen de llamas (*Lama glama*) utilizando el Integrated Semen Analysis System (ISAS). 2013. Tesis de Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Sancho M, Pérez-Sánchez P, Tablado L, de Monserrat JJ, Soler C. Computer-assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. Theriogenology. 1998; 50 (1): 27 – 37. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00110-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00110-1)
- 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. <https://doi.org/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
- 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. 2014a; 49(1): 71-78. <https://doi.org/10.1111/rda.12226>
- Soler C, Sancho M, García-Molina A, Núñez J, Parráquez VH, Contell J, Bustos-Obregón E. Llama and alpaca comparative sperm head morphometric analysis. J Camelid Sci. 2014b; 7: 48-58
- Soler C, Cooper TG, Valverde A, Yáñez JL. Afterword to Sperm morphometrics today and tomorrow special issue in Asian Journal of Andrology. Asian J Androl. 2016; 18(6): 895-897. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.188451>.
- Soler C, Contell J, Bori L, Sancho M, García-Molina A, Valverde A, Sagarvall J. Sperm kinematic, head morphometric and kinetic - morphometric subpopulations in the blue fox (*Alopex lagopus*). Asian J Androl. 2017; 19 (2): 154-159. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.188445>
- Spencer NH. Essentials of multivariate data analysis. Boca Raton, FL, USA: Taylor and Francis Group, CRC Press. 2013.

- Thilagavathi J, Venkatesh S, Kumar R, Dada R. Segregation of sperm subpopulations in normozoospermic infertile men. *Syst Biol Reprod Med.* 2012; 58(6) :313-318. <https://doi.org/10.3109/19396368.2012.706361>
- Thurston LM, Watson PF, Mileham AJ, Holt WV. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl.* 2001; 22(3): 382-394. PMID: 11330638.
- Valverde A, Madrigal-Valverde M, Castro-Morales O, Gadea-Rivas A, Johnston S, Soler C. Kinematic and head morphometric characterization of spermatozoa from the Brown Caiman (*Caiman crocodilus fuscus*). *Anim Reprod Sci.* 2019a.; 207, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.06.011>
- Valverde A, Castro- Morales O, Madrigal- Valverde M, Soler C. Sperm kinematics and morphometric subpopulations analysis with CASA system: a review. *Rev Biol Trop.* 2019b; 67 (6): 1473-1487. <https://doi.org/10.15517/rbt.v67i6.35151>
- Valverde A, Barquero V, Soler C. The application of computer-assisted semen analysis (CASA) technology to optimise semen evaluation. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences.* 2020; 29(3):189-198. <https://doi.org/10.22358/jafs/127691/2020>.
- Wheeler JC, Laker J. The vicuña in the Andean Altiplano. In: Gordon IJ (ed.), *The vicuña. The theory and practice of community-based wildlife management*, pp. 21-34 . Springer, Boston. 2009.
- Yániz JL, Vicente-Fiel S, Soler C, Recreo P, Carretero T, Bono A, Berné JM, Santolaria P. Comparison of different statistical approaches to evaluate morphometric sperm subpopulations in men. *Asian J Androl.* 2016; 18(6): 819-823. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.186872>.
- Zuñiga M. *La vicuña y su manejo técnico*. Lima, Perú. Centro de investigación Editorial. Universidad Alas Peruanas. 2007.