

CUANTIFICACIONES DE LAS ANOMALÍAS DE LOS ESPERMATOZOOS DE CONEJOS SOMETIDOS A ESTRÉS TÉRMICO.*

P. Morera¹, A.M. Fausto², A.R. Taddei²

¹ Centro Experimental de Cría No-Convencional del Conejo. Instituto de Producción Animal, Universidad de la Tuscia, 01100 Viterbo, Italia.

² Departamento de Ciencia Ambiental, Universidad de la Tuscia, 01100 Viterbo, Italia.

Resumen

Diez conejos de raza Neozelandesa blanca, homogéneos por edad, peso y volumen del eyaculado, se alojaron en una cámara climática por 9 semanas a 30°C por 22 horas al día con 2 horas de remisión a 25°C. La humedad relativa fue mantenida al 70%. El control morfológico y la cuenta se hicieron sobre espermatozoos observados en contraste de fase en el microscopio óptico (400x) y en el microscopio electrónico a escansión (de 2000x a 12000x). Mientras en el microscopio óptico no se observaron variaciones de las anomalías de la cabeza, en el electrónico aumentaron de una vez y media inmediatamente después del estrés (+150%; $P < 0,001$) y se mantuvieron después al mismo nivel. Mucho más evidentes fueron las modificaciones de la cola. También en este caso las anomalías observadas con el microscopio electrónico fueron mayores (+23%; $P < 0,05$). Con el óptico se observó un aumento más evidente en la cuarta y quinta semana (+95%; $P < 0,001$) con decremento sucesivo. El microscopio electrónico ofrece la posibilidad de relevar cantidades mucho más grandes de gotas citoplasmáticas. En el periodo de pre-estrés las colas redobladas observadas al óptico son cerca del doble (+98%; $P < 0,001$); después las diferencias crecen hasta un máximo en la cuarta y quinta semana (+221%; $P < 0,001$) para disminuir después. El incremento de colas redobladas observable al microscopio óptico es importante porque permite un control rutinario que puede avisar que los reproductores han quedado sometidos demasiado tiempo al estrés térmico.

Summary: *Quantification of spermatozoa abnormalities in rabbits exposed to high ambient temperature.*

Ten N.Z.W. rabbit bucks, homogeneous for age, body weight and sperm output, were located into a climatic chamber for 9 weeks at 30°C. The exposition time was 22 hours a day with a relative

* Trabajo financiado con aportes del Consejo Nacional Italiano de Investigaciones.

remission for 2 hours at 25°C. Relative humidity was 70%. Quantitative analysis of abnormalities were performed on spermatozoa observed by contrast light microscope (400x) and scanning electron microscope (from 2000x to 12000x). Variability of head abnormalities, observed by light microscope, was very low. On the contrary variability observed by electron microscope showed a significant increase immediately after the heat stress (+150%; $P < 0.001$) and still remained significantly high till the end of the treatment. By light microscope tail abnormalities had a peak at the fourth and fifth week of heat stress (-95%; $P < 0.001$) followed by decreasing values. By electron microscope a much larger quantity of cytoplasmatic droplets can be observed. On the contrary the number of coiled tails, studied by light microscope, appear larger (+98% ; $P < 0.001$) in the pre-stress period in comparison to electron microscope. The difference increases up to +221% ($P < 0.001$) at the 4th- 5th week of heat stress. The variation of number of coiled tails observed by light microscope appears useful to control if rabbit bucks have undergone an heat stress.

Introducción

Las temperaturas ambientales elevadas, frecuentes en los veranos de los países Mediterráneos, determinan una disminución de los parámetros productivos y reproductivos del conejo. Entre éstos se observa un descenso del ardor sexual y un empeoramiento de las características cuanti cualitativas del esperma (Bagliacca et al., 1987; Radnai et al., 1988; Kuzminsky et al., 1990; Panella y Castellini, 1990; Battaglini et al., 1992; Finzi et al., 1995; Morera et al., 1995).

Puesto que el control microscópico del semen es rutinario e indispensable en la práctica de los centros especializados y, en Italia, es común también en las empresas cuniculas que, en su mayoría, practican autónomamente la inseminación artificial, se ha investigado si el control de las anomalías espermáticas tiene utilidad en la evaluación de la calidad del semen en relación con el estrés térmico.

Además, para averiguar la cantidad de información obtenible, se han comparado las observaciones con el microscopio óptico con las efectuadas con el microscopio electrónico a escansión.

Material y métodos

Diez conejos de raza Neozelandesa blanca, homogéneos por edad (9 meses), peso ($4,0 \pm 0,2$ Kg) y volumen del eyaculado ($0,6 \pm 0,1$ ml), se alojaron en una cámara climática por 3 semanas de adaptación. La temperatura ambiental en la cámara se reguló a 20°C y la humedad relativa al 70%.

La iluminación fue de 12 horas diarias. Después de este periodo, la temperatura de la cámara fue elevada por 9 semanas, a 30°C por 22 horas al día, con 2 horas de remisión a 25°C. La humedad relativa y el fotoperiodo fueron mantenidos invariados.

El semen se recogió con vagina artificial 3 veces por semana. Cada muestra fue formada por dos eyaculados consecutivos. La primera de las tres muestras semanales se dividió para ser analizada al microscopio óptico y electrónico.

Los espermatozoos se observaron en contraste de fase al microscopio óptico (Nikon SE) que, con 400x, permite individuar muchos tipos de anomalías morfológicas (Boussit, 1989). Cada muestra de semen fresco fue diluida 1:100 con una solución salina al 3% de NaCl (Bagliacca et al., 1987) al fin de matar las células y permitir la cuenta. El análisis fue efectuado en cámara de Bürker después dos minutos. El control morfológico y la cuenta se hicieron sobre 600 espermatozoos por cada uno de los 10 machos a lo largo de las 12 semanas (3 en fase de pre-estrés). El examen al microscopio electrónico a escansión (5200 Jeol JSM) se hizo después de fijación del semen por dos horas en buffer 0,1M de cacodilato, pH 7,2, con 5% de glutaraldehído y 4% de paraformaldehído (Karnovsky, 1965). La desecación se hizo con CO₂ líquido en aparato Balzers (CPD 020) aplicado al soporte de las muestras y revestido con oro en evaporador (Balzers Union MED 010). La ampliación utilizada fue de 2000x a 12000x y las anomalías observadas se clasificaron conforme a un trabajo anterior (Kuzminsky et al., 1996). La cuenta y el control morfológico se hicieron sobre 100 espermatozoos en 8 machos por 11 semanas (2 en fase de pre-estrés).

Los datos fueron tratados estadísticamente por análisis del χ^2 (Camussi, 1995).

Resultados y discusión

Las anomalías de la cabeza son menos frecuentes de las de la cola (fig.1). Se distinguen fácilmente también al examen óptico, pero con el microscopio electrónico se cuentan cantidades mayores ($P < 0,001$) y las variaciones son más evidentes. Esto se debe al mayor poder de resolución de la escansión que permite observar también las anomalías acrosómicas (acrosoma anguloso, vesiculado y corrugado) además de las visibles al microscopio óptico (macro y microcéfalos, acrosomas hinchados, incompletos y ausentes).

Mientras con el microscopio óptico no se observaron variaciones, con el microscopio electrónico las anomalías de la cabeza aumentaron de una vez y media inmediatamente después del estrés (+150%; $P < 0,001$) y se mantuvieron después a éste nivel.

Mucho más evidentes fueron las modificaciones de la cola (fig.1). Se han considerado como mayormente representativas las colas dobladas, redobladas y con gota citoplasmática. También en este caso las anomalías observadas con el microscopio electrónico fueron mayores (+23%; $P < 0,05$).

Con el óptico se observó un aumento desde la tercera semana pero se hizo más evidente en la cuarta y quinta semana (+ 95%; $P < 0,001$) con decremento sucesivo.

Para estudiar el efecto del estrés térmico sobre las anomalías de los espermatozoos se confirma que, con el microscopio óptico, es conveniente hacer referencia a las anomalías de la cola (Finzi et al., 1995).

La presencia de gotas citoplasmáticas es debida a un residual de citoplasma al interior de la cola e indica formas inmaduras (Bart y Oko, 1989). El microscopio electrónico ofrece la posibilidad de relevar la presencia de cantidades mucho más grandes que con el óptico (fig.2), pero en ambos casos se observa una disminución inicial con aumento después de la quinta semana.

Las cantidades de colas dobladas no difieren mucho con ambos sistemas de observación. Por el contrario, hay que subrayar que con el microscopio óptico las colas redobladas, única e importante excepción, aparecen mucho más numerosas en comparación con el microscopio electrónico. En el período de control son cerca del doble (+98%; $P < 0,001$) y después las diferencias crecen hasta un máximo en la cuarta y quinta semana (+221%; $P < 0,001$). Hay entonces que explicar el paradójico resultado de la mayor cantidad de anomalías observadas con el microscopio óptico y porque las curvas difieren entre ellas.

Este trend es típico de otros parámetros influenciados por el estrés térmico, como por ejemplo la libido y la movilidad. Ambos llegan a su mínimo en la cuarta semana de estrés térmico (Morera et al., 1995). En este período llegan a la eyaculación los espermatozoos que empezaban su formación al subir de la temperatura ambiental. Por esta razón la curva de aumento de las colas redobladas hasta la cuarta semana y su disminución sucesiva se pueden interpretar como la expresión de un fenómeno real no observable con el microscopio electrónico.

La explicación más simple es que la solución salina, utilizada para la preparación de las muestras, determina un efecto de torción sobre las colas de los espermatozoos que han perdido su movilidad, cuyo numero crece con el alargarse del período de estrés. El incremento de colas redobladas observable al microscopio óptico es importante porque permite un control rutinario que puede avisar que los reproductores han quedado sometidos demasiado tiempo al estrés térmico.

Por el contrario no es posible una indicación inmediata de sufrimiento porque las gotas citoplasmáticas y las alteraciones acrosómicas, que aumentan desde la primera semana de estrés, son observables tan sólo con el microscopio electrónico.

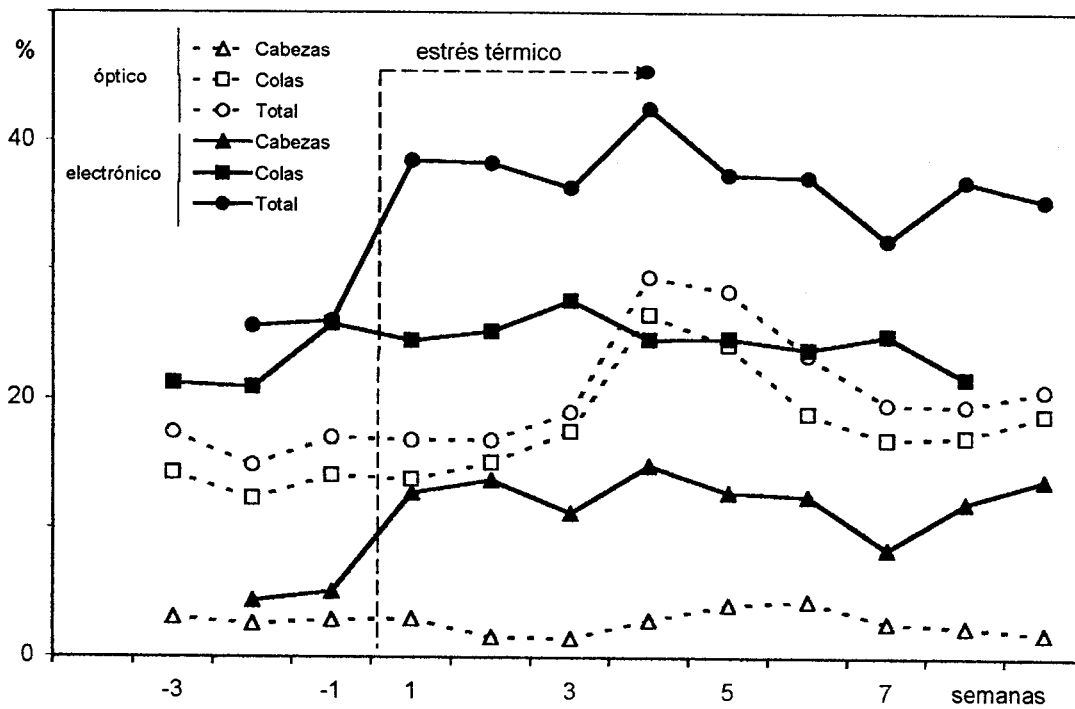


Fig.1. Porcentajes de las anomalías espermáticas de conejos sometidos a estrés térmico.

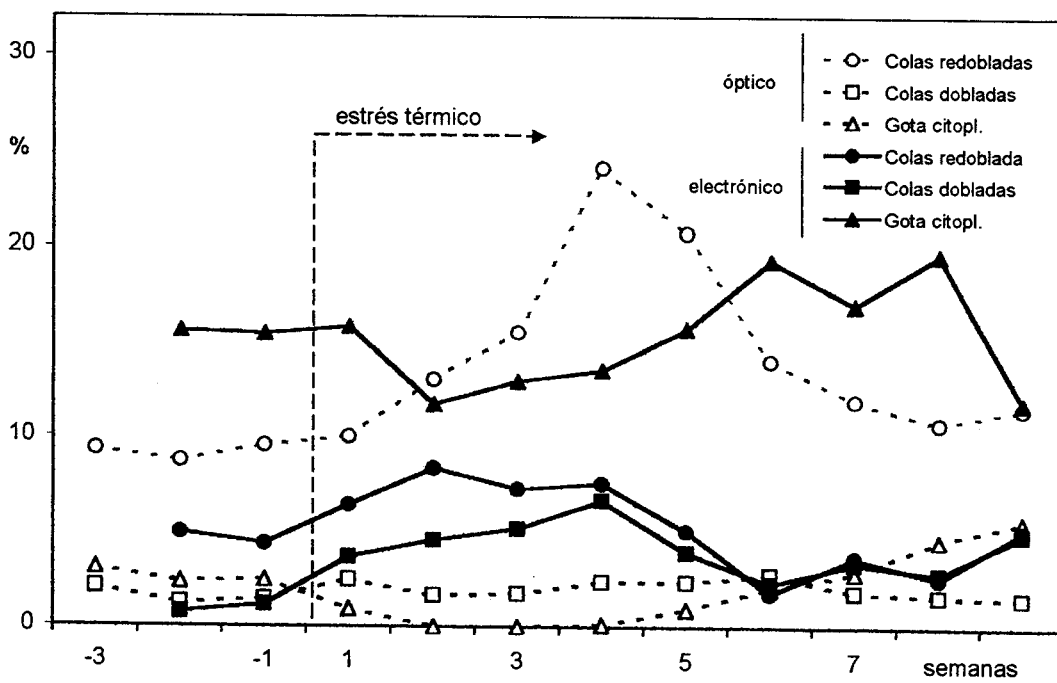


Fig.2. Porcentajes de los espermatozoos con anomalías de la cola.

Bibliografia

- Bagliacca M., Camillo F., Paci G.. (1987). Temperatura e performance di conigli maschi riproduttori. *Riv. di Coniglicoltura*, 24 (10): 61-65.
- Battaglini M., Castellini C., Lattaioli P.. (1992). Variability of the main characteristics of rabbit semen. *J. Appl. Rabbit Res.*, 15: 439-446.
- Bart A.D., Oko R.J. (1989). Abnormal morphology of bovine spermatozoa. 1st Edn. Ames: Iowa State University Press, pp.285.
- Boussit B. (1989). Reproduction et insemination artificielle en cuniculture. Ed. Ass. Fr. De Cuniculture, Lempdes, France.
- Camussi A., Möller F., Ottaviano E., Sari Gorla M. (1995). Metodi statistici per la sperimentazione biologica. *Zanichelli*. pp.500.
- Finzi A., Morera P., Kuzminsky G.. (1995). Sperm abnormalities as possible indicators of rabbit chronic heat stress. *World Rabbit Sci.*, 3 (4): 157-161.
- Karnovsky MJ. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 27: 137A-138A.
- Kuzminsky G., Morera P., Finzi A.. (1990). Tempi di raccolta dell'eiaculato come misura della libido nel coniglio. *3th Meeting Nazionale su: "Studio della efficienza riproduttiva degli animali di interesse zootecnico"*. Bergamo, 30 Novembre, 139-143.
- Kuzminsky G., Fausto A.M., Morera P.. (1996). Morphological abnormalities of rabbit spermatozoa studied by scanning electron microscope and quantified by light microscope. *Reprod. Nutr. Dev.*, 36: 565-575.
- Morera P., Kuzminsky G., Finzi A.. (1995). Estrés térmico crónico: variaciones de algunos caracteres del semen y de la libido del conejo macho. *XX Symp. de Cunicultura*, Santander, 26-27 Mayo, 95-102.
- Panella F., Castellini C.. (1990). Fattori ambientali e genetici che influiscono sulle caratteristiche del seme di coniglio. *Riv. Di Coniglicoltura*, 27 (8): 39-41.
- Radnai I., Zelei Tòth I., Bàn B.. (1988). Investigations on semen abnormalities of angora rabbits. *Proc. 4th World Rabbit Congr.* Budapest, 2: 465-471.