

ARTÍCULOS TÉCNICOS

Alteración de la calidad espermica en moruecos como consecuencia de la acción sinérgica de elevadas temperaturas y humedades relativas

pR 8, núm. 1: 8-14 (2007)

S. VEGA; F. FORCADA; J.A. CEBRIÁN-PÉREZ; J.A. ABECIA; T. MUIÑO-BLANCO; I. PALACÍN
Facultad de Veterinaria. Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza

Foto: J. M. Pueyo

INTRODUCCIÓN

Está claro que los factores ambientales influyen notablemente en la productividad de los animales de granja. Además, distintos autores coinciden en señalar que en la actualidad puede existir una mayor susceptibilidad del ganado a los efectos negativos de las altas temperaturas que en el pasado, debido fundamentalmente a la mayor productividad y a una cría más intensiva. Este hecho es particularmente cierto en avicultura o en ganado porcino, pero también es referido con frecuencia en ganado bovino lechero, donde se detecta claramente un antagonismo entre nivel productivo y tolerancia al calor, lo que lleva a una notable reducción de la productividad en climas cálidos (Ravagnolo *et al.*,

2000). Mucho más escasos son los estudios relativos al ganado ovino, donde la gran diversidad de razas en función de la notable adaptación de la especie a diferentes condiciones climáticas y de disponibilidad de recursos hace que sea difícil diseñar ensayos y extrapolar resultados.

Los efectos negativos del calor no se deben únicamente a las elevadas temperaturas, sino que otros factores ambientales parecen influir notablemente en la percepción del estrés térmico por parte del animal. Se habla de 5 factores: temperatura del aire, humedad, movimiento del aire, radiación solar y precipitación. De esta forma, existen distintas aproximaciones para evaluar el estrés térmico. Una de las más simples y efectivas es utilizar fórmu-

las que relacionan temperatura y humedad, teniendo en cuenta que una excesiva humedad es claramente perjudicial para los animales cuando se asocia tanto a temperaturas altas [dificulta la pérdida de calor por evaporación] como a temperaturas bajas [condensaciones, mayor incidencia de procesos infecciosos, etc.]. Una de las que más se ha relacionado con los niveles productivos es la utilizada por Hahn (1969), McDowell *et al.* (1979) y por García-Ispierto *et al.* (2006) en nuestro país, si bien en todos los casos estudiando su efecto sobre el ganado bovino. De este modo, parece que cuando dicho índice de temperatura-humedad (ITH) alcanza el valor de 72 o superior, la vaca se encuentra en una situación de estrés térmico. Del



mismo modo, García-Ispierto *et al.* (2006) han mostrado recientemente que un ITH por encima de 70 se asocia claramente con un aumento significativo de las pérdidas embrionarias durante el primer mes de gestación en 3 explotaciones de bovino lechero del Nordeste de España (1.400 gestaciones analizadas).

Por su parte y aunque los resultados son a menudo contradictorios, la producción de semen parece verse afectada por temperaturas elevadas, de manera que es bien conocida la necesidad de que la temperatura testicular esté por debajo de la temperatura corporal para la producción óptima de espermatozoides (Waites, 1970). No obstante, no es fácil estudiar la incidencia de la temperatura sobre la producción y calidad espermática, sobre todo en especies como la ovina en la que, además del calor, el fotoperíodo juega un papel muy importante en la eficiencia reproductiva, de manera que es difícil disociar ambos factores. Además, hay que tener en cuenta asimismo la variabilidad individual en la sensibilidad al estrés por calor. En conjunto, parece claro que la producción y calidad espermática se reducen durante los meses de verano-inicio de otoño en relación al resto del año, particularmente en ganado ovino (Beltrán de Heredia *et al.*, 1995).

Aunque existe alguna referencia in ovino que ha estudiado el efecto de un golpe de calor más o menos prolongado sobre la producción y calidad espermáticas (Smith 1971), no existe ningún estudio de las alteraciones producidas por el binomio temperatura-humedad. Es por ello que el presente estudio se planteó como objetivo fundamental el análisis de la influencia

de dicho binomio sobre los parámetros seminales de moruecos de raza Rasa Aragonesa durante un periodo concreto de tiempo, los meses de junio y julio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recogida del semen

El estudio se realizó desde el 1 de junio al 21 de julio con semen ovino procedente de moruecos de raza Rasa Aragonesa alojados en las instalaciones del Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza, que cumple los requisitos de la Unión Europea en relación al alojamiento y manejo de los animales utilizados para procedimientos científicos (European Community Commission, 1986). La metodología de manejo de los animales fue, asimismo, aprobada por la Comisión Ética de la Universidad de Zaragoza. Los moruecos se alojaron en compartimentos individuales, evitando así los saltos entre ellos.

Las extracciones se llevaron a cabo por personal técnico especializado de dicho Servicio mediante vagina artificial, a primera hora de la mañana, antes de comer, y cada dos días, obteniéndose dos eyaculados de cada morueco. Para evitar diferencias individuales, el estudio tuvo lugar sobre la mezcla de los segundos eyaculados de 3 moruecos, dado que su calidad seminal es mayor que la de los primeros (Ollero *et al.*, 1996). Los tubos colectores se mantuvieron en un baño de agua a 35° C antes de su uso y durante su traslado al laboratorio, donde se colocaron en una estufa a esa misma temperatura.

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE SEMEN

Viabilidad (integridad de la membrana celular)

El método se basa en la tinción diferencial de espermatozoides viables y no viables, y se realiza mediante tinción simultánea con diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) y yoduro de propidio (IP) (Harrison y Vickers, 1990). La hidrólisis del primero por las esterasas de membrana produce carboxifluoresceína, que tiñe de verde la cabeza del espermatozoide. Por su parte, el IP se une a ácidos nucleicos produciendo un color rojizo, de manera que si la membrana está intacta (espermatozoide viable), no penetra y no manifiesta el color rojo. Al contrario para espermatozoides no viables, con alteración de la membrana. Las células se evaluaron en un microscopio de fluorescencia, determinando el porcentaje de espermatozoides negativos al IP con cabeza verde fluorescente (viables, con la membrana intacta y funcional), los positivos al mismo (no viables, con la membrana dañada) y los que presentan la cabeza roja y el acrosoma amarillo (membrana plasmática dañada pero conservan intacta la membrana acrosomal). El recuento se realizó por duplicado con un mínimo de 200 células por alícuota.

Movilidad de espermatozoides

Mediante determinación del porcentaje de espermatozoides móviles e inmóviles en una muestra de semen diluida (1:100) y atemperada a 37° C, utilizando un microscopio óptico con contraste de fases a 10X aumentos.

Concentración espermática

Se realizó por recuento al microscopio utilizando la cámara de Neubauer. Se homogeneiza la muestra de semen fresco y se diluye a 1:2000. Se añaden 5 μ l de formaldehído y se colocan 6 μ l de muestra a cada lado de la cámara de Neubauer (zonas superior e inferior). El recuento celular se realiza con un microscopio de contraste de fases y objetivo de 10X, contando las células en 16 cuadrículas de la cámara y expresando el valor final en cél/ml.

Análisis de los factores climáticos

Se tomaron registros diarios de temperaturas máximas y mínimas, así como de humedad relativa, en el lugar de aloja-

miento de los moruecos. Posteriormente se calculó el ITH tanto para las temperaturas medias como para las máximas. Ambos índices se calcularon en función de la fórmula siguiente [McDowell *et al.*, 1979; García-Ispuerto *et al.*, 2006]:

$$ITH = 0,8 \times T + HR/100 \times (T - 14,4) + 46,4$$

Siendo T la temperatura media o máxima cada día y HR la humedad relativa expresada en porcentaje.

Análisis estadístico de los datos

Se intentó relacionar las variables climáticas con los parámetros utilizados para determinar la calidad espermática. Dicha relación se estableció con los datos climáticos del día anterior o del día -14 a la recogida del semen, dado que se estima en dos semanas el periodo de maduración epididimaria en ganado ovino [Evans y Maxwell, 1990]. De este modo, se calcularon los coeficientes de correlación entre temperaturas medias y máximas e ITH de ambas y los citados parámetros en los días -1 y -14 al de la recogida del semen. Asimismo, se evaluaron por ANOVA las diferencias entre los distintos parámetros seminales estudiados en función de que los ITH fueran superiores e inferiores a 75 (utilizando para el cálculo las temperaturas medias) o superiores e inferiores a 80 (utilizando las temperaturas máximas), en ambos casos considerando asimismo los valores para el día -1, -14 e incluso la media de los valores entre -1 y -14.

RESULTADOS

Los resultados relativos a la calidad espermática aparecen representados gráficamente en la Figura 1, mientras que los parámetros climáticos relativos a las temperaturas máximas se exponen en la Figura 2. No se observa una variación importante de los parámetros seminales a lo largo del estudio. En cuanto a los factores climáticos, es de destacar el progresivo aumento de la humedad relativa conforme el estudio avanzaba, lo que ha supuesto asimismo un aumento paralelo del ITH.

No se pudo evidenciar ninguna correlación significativa entre los parámetros seminales y climáticos. Tampoco los ITH para temperaturas medias a día -1 ó -14 modificaron la calidad del semen. Sin embargo, los ITH para temperaturas máximas a día -1 mostraron una cierta influencia

Figura 1. Movilidad individual [a], concentración espermática [b] y porcentajes de viables (●) y no viables (▲) [c] en moruecos de raza Rasa Aragonesa a lo largo del periodo estudiado.

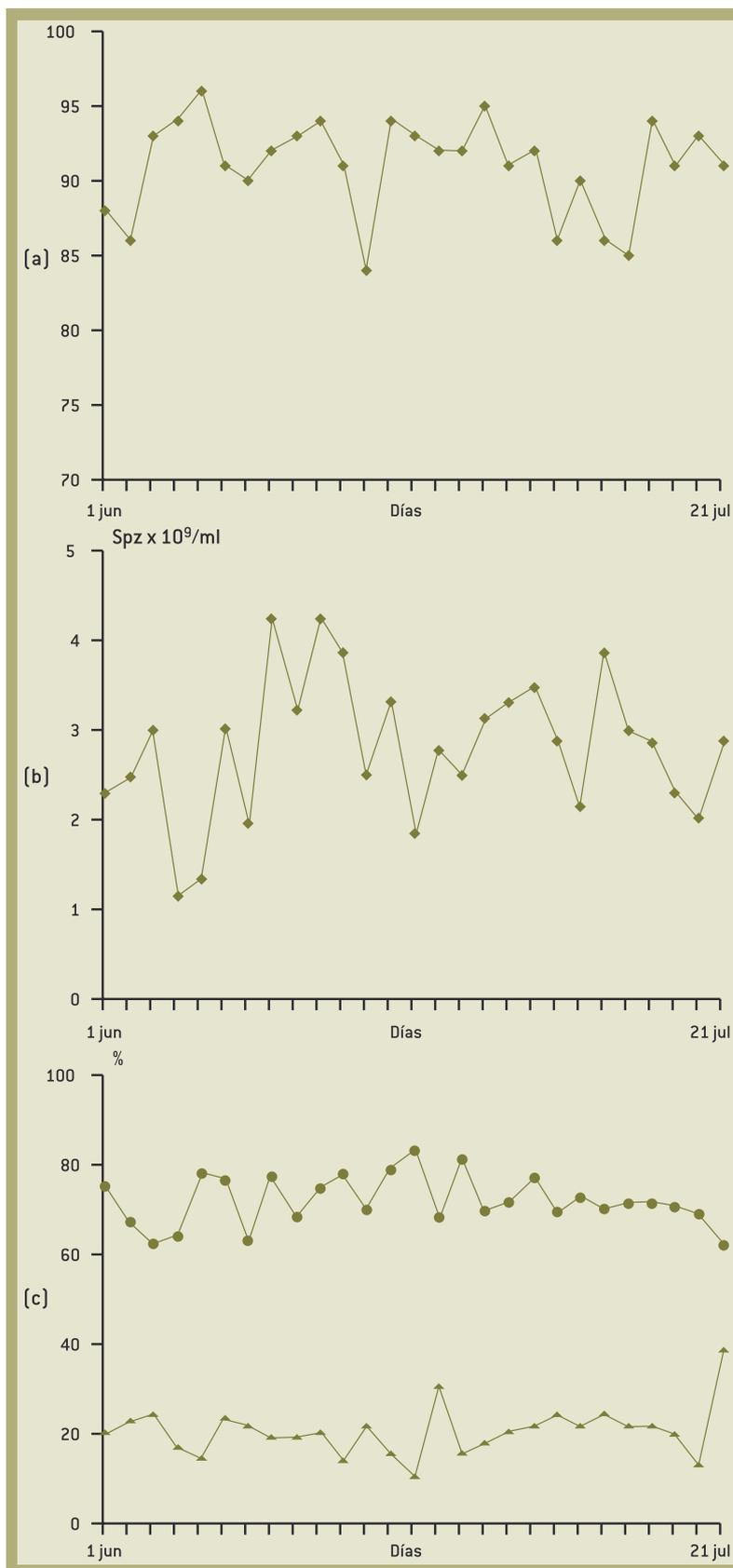
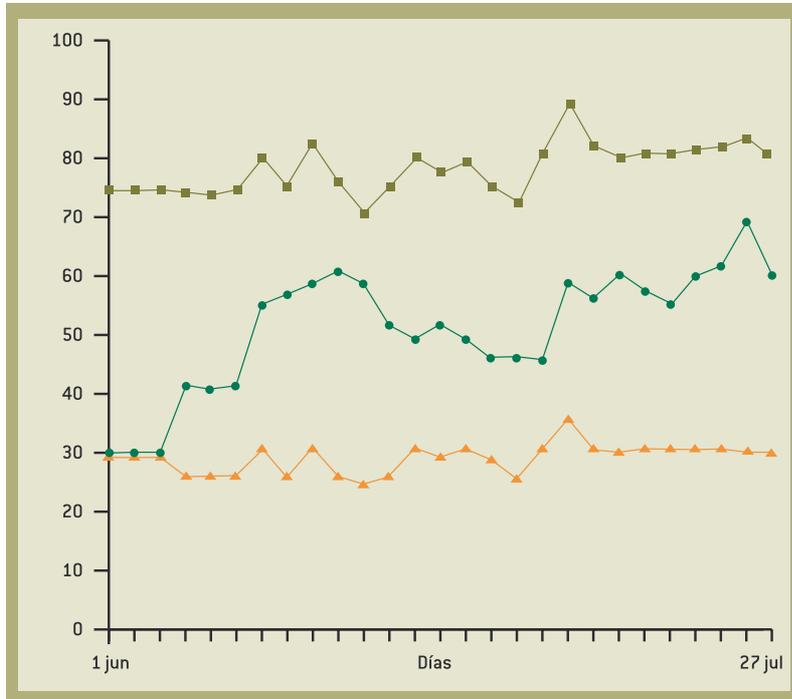


Tabla 1. Parámetros seminales en función del ITH para temperaturas máximas el día anterior a la recogida del semen. Media \pm error estándar.

	ITH < 80	ITH > 80	Significación
N	15	12	-
Movilidad individual (%)	91,7	90,9	NS
Concentración, céls x 10 ⁹ /ml	2,8	2,8	NS
Espermatozoides viables (%)	73,0	68,3	P<0,05
Espermatozoides no-viables (%)	18,4	22,7	P<0,05

Figura 2. Datos climatológicos en el alojamiento de moruecos de raza Rasa Aragonesa a lo largo del periodo estudiado: temperatura máxima (▲), humedad relativa (●) e ITH para temperaturas máximas (■).



sobre la calidad espermática (Tabla 1), de manera que un índice superior a 80 el día anterior a la recogida del semen se asocia con una reducción significativa de la viabilidad (integridad de membrana) [P<0,05] en relación a índices inferiores a 80. Índices superiores a 80 se alcanzan con temperaturas máximas superiores a 30° C y humedades relativas superiores al 50%.

DISCUSIÓN

La espermatogénesis y la maduración epididimaria duran en ovino unos 45 días, de manera que los factores ambientales pueden alterar la calidad espermática en este periodo de tiempo. Dada la extensión temporal del presente estudio, no ha sido posible investigar el efecto del estrés por calor a medio plazo, de manera que únicamente se ha considerado el efecto a día -14 (maduración epididimaria) y día -1 en relación al momento de la recogida.

En conjunto, parece claro que las altas temperaturas pueden afectar negativamente a la calidad espermática. Referencias en la especie bovina indican que el calor reduce dicha calidad tanto al día siguiente de la recogida (Taylor *et al.*, 1985), en el periodo de maduración epididimaria (Meyerhoeffer *et al.*, 1985) o en ambos (Fuerst-Waltz *et al.*, 2006). No obstante, es muy importante la variabilidad racial y la adaptación previa de los animales a periodos prolongados de calor, de manera que Brito *et al.* (2002) no detectaron, también en ganado bovino, ningún efecto de la temperatura sobre la producción de semen en el trópico.

Por lo que al ganado porcino se refiere, existen abundantes referencias que



Aspecto de las instalaciones donde se desarrolló el ensayo.

documentan una alteración de la calidad espermática asociada a temperaturas elevadas. En concreto, parece que el calor puede influir negativamente sobre la morfología espermática como consecuencia de alteraciones de la espermatogénesis, en particular del epitelio de los túbulos seminíferos (Malmgren y Larsson, 1989). En concreto, una de las alteraciones morfológicas más importantes en esta especie es la presencia de gotas citoplasmáticas proximales, que, a pesar de ser consecuencia de alteraciones testiculares, también pueden presentarse pocos días tras el choque térmico (Larsson y Einarsson, 1984), lo que demuestra una implicación de la maduración epididimaria en dichas alteraciones morfológicas. Además, también en ganado porcino parece claro que los efectos combinados de elevadas temperaturas y humedades relativas son más perjudiciales sobre la calidad espermática que los de ambos factores considerados por separado (Suriyasomboon *et al.*, 2005).

Aunque en ganado ovino no existe apenas información sobre los efectos del calor sobre la producción y calidad espermática, parece claro que ambas se ven alteradas en el verano-inicio de otoño (Beltrán de Heredia *et al.*, 1995). De hecho, Smith (1971) mostró claramente que la exposición a un golpe de calor (41° C) durante varias horas (entre 4 y 13 horas) redujo significativamente la calidad espermática, especialmente en la tercera sema-

na consecutiva al estrés térmico. Dado que el periodo de maduración epididimaria del esperma tiene lugar en esta especie durante 14 días, estos resultados parecen indicar que dicho periodo es particularmente sensible al daño producido por las elevadas temperaturas.

Los resultados de nuestro estudio muestran claramente cómo la asociación de temperaturas y humedades relativas elevadas puede comprometer a corto plazo la calidad espermática en moruecos alojados individualmente, con posibles efectos sobre la fertilidad. No existen datos en ovino del efecto combinado de ambos parámetros sobre los parámetros reproductivos, de manera que nuestros resultados permiten llamar la atención sobre la importancia de la humedad relativa en este sentido. Así, una humedad relativa media o alta durante el verano dificulta notablemente las pérdidas de calor por evaporación, con lo que si un determinado genotipo no está habituado a tales condiciones, puede ver comprometidos sus rendimientos a corto plazo, particularmente si el estrés ambiental coincide con momentos particularmente sensibles de los ciclos reproductivos. Así, en bovino lechero se ha visto que el periodo próximo a la implantación del embrión es particularmente sensible al ITH, de manera que altos niveles de dicho índice se asocian con un aumento significativo de la mortalidad embrionaria (García-Ispuerto *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES Y APLICACIONES PRÁCTICAS

Una combinación de altas temperaturas y elevada humedad relativa es particularmente negativa sobre la calidad espermática del semen de morueco obtenido el día siguiente. En este sentido, el ITH se revela como una herramienta efectiva para cuantificar y objetivar el estrés térmico. Destaca la importancia de la humedad relativa en verano incluso en zonas donde ésta no suele alcanzar valores próximos al 100%, como es el caso de Zaragoza. Por tanto, un control periódico de la misma nos puede ayudar a adoptar medidas que puedan paliar tales efectos negativos, como un aumento de la ventilación (renovación del aire) cuando se detecta un aumento de la misma (por encima del 50%) en momentos de calor elevado, con temperaturas máximas por encima de 30° C en el alojamiento de los moruecos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Merial España su colaboración en el desarrollo del presente ensayo, en particular con los instrumentos de medida de los parámetros ambientales (Kit de Control Ambiental).



Foto: J. Lopera

ARTÍCULOS TÉCNICOS



Foto: I. Muñoz

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELTRÁN DE HEREDIA, I., URARTE, E., ARRESE, F., UGARTE, E., OMAETXEBARRIA, M.J. 1995. Control del fotoperiodo y de la temperatura en un centro de selección e inseminación artificial de ovino lechero. ITEA, Vol. Extra nº 16 (I), 437-439.
- BRITO, L.F.C., SILVA, A.E.D.F., RODRIGUES, L.H., VIEIRA, F.V., DERAGON, L.A.G., KASTELIC, J.P. 2000. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. *Anim. Reprod. Sci.*, 70, 181-190.
- EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. 1990. Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza, 192 págs.
- FUERST-WALTZ, B., SCHWARZENBACHER, H., PERNER, C., SÖLKNER, J. 2006. Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, 95, 27-37.
- GARCÍA-ISPIERTO, I., LÓPEZ-GATIUS, F., SANTOLARIA, P., YÁÑIZ, J.L., NOGAREDA, C., LÓPEZ-BÉJAR, M., DE RENSIS, F. 2006. Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. *Theriogenology*, 65, 799-807.
- HANN, G.L. 1969. Predicted vs measured production differences using summer air conditioning for lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 52, 800-801.
- HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 88, 343-352.
- LARSSON, K., EINARSSON, S. 1984. Seminal changes in boars after heat stress. *Acta Vet. Scand.*, 25, 57-66.
- MALMGREN, L., LARSSON, K. 1989. Experimental induced testicular alterations in boars: histological and ultrastructure finding. *Zbl. Vet. Med. A*, 36, 3-14.
- MCDOWELL, D., HOOVEN, N., CAMERON, K. 1979. Effects of climate on performance of Holsteins in first lactation. *J. Dairy Sci.*, 68, 2418-2435.
- MEYERHOEFFER, D.C., WETTEMANN, R.P., COLEMAN, S.W., WELLS, M.E. 1985. Reproductive criteria of beef bulls during and after exposure to increased ambient temperature. *J. Anim. Sci.*, 60, 352-357.
- OLLERO, M., MUIÑO-BLANCO, T., LÓPEZ-PÉREZ, M., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. 1996. Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *Int. J. Androl.*, 19, 287-292.
- RAVAGNOLO, O., MISZTAL, I., HOOGENBOOM, G. 2000. Genetic component of heat stress in dairy cattle. Development of heat index function. *J. Dairy Sci.*, 83, 2120-2125.
- SMITH, J.F. 1971. The effect of temperature on characteristics of semen in rams. *Aust. J. Agric. Res.*, 22, 481-490.
- SURIYASOMBOON, A., LUNDEHEIM, N., KUNAVONGKRIT, A. AND EINARSSON, S. 2005. Effect of temperature and humidity on sperm morphology in Duroc boars under different housing systems in Thailand. *J. Vet. Med. Sci.*, 67, 777-785.
- TAYLOR, J.F., BEAN, B., MARSHALL, C.E., SULLIVAN, J.J. 1985. Genetic and environmental components of semen production traits of artificial insemination Holstein bulls. *J. Dairy Sci.*, 68, 2703-2722.
- WAITES, G.M.H. 1970. Temperature regulation and the testis. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R., Vandemark, N.L. (Eds.), *The Testis*, vol. 1. Academic Press, London, 241-279.