

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON IMPLANTES DE MELATONINA EN FERTILIDAD DE SEMEN CONGELADO DE CARNEROS DE LAS RAZAS OVINAS MERINA PRETA Y CAMPANIÇA

ROMÃO, R.J.¹; BETTENCOURT, E.M.V.¹; BETTENCOURT, C.M.V.² y MATOS, C.A.P.²

¹Universidade de Évora, Polo de la Mitra, Apartado 94 7002-554 ÉVORA. PORTUGAL

E-mail: rjromao@uevora.pt; emvb@uevora.pt

²Centro de Experimentação del Baixo Alentejo, DRAAI, Herdad de la Abóbada, Vila Nova de São Bento 7830 SERPA. PORTUGAL

E-mail:cmvb.abobada@draal.min-agricultura.pt; capm.abobada@draal.min-agricultura.pt

RESUMEN

A través de la aplicación de implantes de melatonina es posible simular la estación más favorable a reproducción en ovinos que es el Otoño. En presente trabajo foran aplicados 3 implantes sub-cutáneos de esta hormona la machos de raza Merina Preta (GPT, n=6) y de raza Campaniça (GCT, n=7), mantendo-se uno grupo control de raza Merina Preta sem qualquer tratamiento (GPC, n=6). Semen recogido de todos los carneros foi avaliado por las provas de movilidad individual, coloración vital y endosmose y congelado num período antes y noutro após el efecto esperado de la melatonina, sendo posteriormente aplicado por inseminação laparoscópica intrauterina la hembras de las mismas razas. nose verificaran diferencias en fertilidad entre carneros tratados y não-tratados y entre razas, possivelmente por la menor sazonalidad destas razas en latitud del Sur de Portugal.

Palabras clave

Melatonina, Carnero, Merina Preta, Campaniça, Semen Congelado, Sazonalidade

INTRODUCCIÓN

Nos ovinos, la existênciã de épocas más favorables a reproducción, condicionan los períodos de congelación del semen para posterior utilización. En medida en que el semen de carnero criopreservado en Inverno y Primavera es de menor calidad que el congelado durante el Otoño (Ortavant *et al.*, 1985), algunos autores preconizan la congelación de semen en auge de la estación reproductiva o la utilización de razas pouco sazonais, como las mediterrânicas (Chagas y Silva, 1992). A pesar de existirem estudios que referem menor capacidad fecundante del semen obtido en Primavera del que en Otoño (Colas, 1981; Guerin, 1990), otros autores conseguiran tasas de fertilidad semelhantes, cuando utilizaran semen recogido durante los vários meses del año (Hill *et al.*, 1998). Fiser y Faifull (1986, citados por López-Brea *et al.*, 1995) indican que el semen congelado de carneros sujetos la fotoperíodo decreciente representa melhores resultados, a descongelación, del que cuando es cogido en fotoperíodo creciente. Tal coincide con otros trabajos en que se verificou aumento de la fertilidad del semen congelado cuando los animales foran sujetos la "días cortos" (Fiser y Batra, 1984, Fiser y Fairfull, 1983, 1986, Zheltobryuk *et al.*, 1990, citados por Salamon y Maxwell, 1995).

Em todas las especies sazonais el fotoperíodo es el principal factor responsable por las variaciones estacionales observadas y este comportamiento es más marcado en latitudes elevadas (Ortavant *et al.*, 1985; Sebastian, 1989; Chemineau *et al.*, 1991; Malpaux *et al.*, 1996; Fitzgerald, 1997; Stellflug *et al.*, 1997; Bodin *et al.*, 1999; Forcada *et al.*, 2000a; Gerlach y Aurich, 2000; Hafez y Hafez, 2000). en medida en que la estacionalidad es modulada por la melatonina (Wayne *et al.*, 1988; Deveson *et al.*, 1992; Hafez *et al.*, 2000), produzida la nivel de la glândula pineal, foran desenvolvidas formas de aplicación de esta hormona, en implantes subcutáneos, que permiten simular uno fotoperíodo corto, característico de la época reproductiva más favorable que es el Otoño (Chemineau *et al.*, 1992; Chemineau *et al.*, 1996; Thimonier, 1996). Estos dispositivos permiten el establecimiento de niveles séricos elevados (100 la 300 pg/ml) de melatonina durante 100 días (Forcada y Abecia, 2000; Forcada *et al.*, 2000b). Los tratamientos, para ser efectivos, necesitan ser precedidos por un período suficientemente largo de días crecientes, sensibilizador del sistema, apuntándose un mínimo de dos meses de duración (Hanif y Williams, 1991; Chemineau, 1992; Rosa *et al.*, 2000). Los ovinos mantidos en regiones mediterrâneas están sujetos a un clima moderado y la una pequeña diferencia entre el día más corto (9 la 10 horas de luz) y el día más largo (14 la 15 horas), lo que condiciona una cierta flexibilidad en las épocas reproductivas (Forcada *et al.*,

2000a). En latitud del Sur de Portugal, se preconiza que la aplicación de implantes de melatonina debe ser efectuada próximo del equinoccio de Primavera (Forcada y Abecia, 2000; Forcada *et al.*, 2000b), estando mismo descritos resultados interesantes en hembras, con inicio de tratamiento al final de Enero (Riocerezo *et al.*, 2001).

En el presente trabajo pretendemos evaluar se la aplicación de implantes de melatonina en carneros de las razas Merina Preta y Campaniça permite mejorar los resultados de fertilidad del semen congelado, durante la Primavera, lo que permitiría garantizar buenos resultados en criopreservación de semen de carnero durante todo el año.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los trabajos decorreran en Centro de Experimentação del Baixo Alentejo (Latitud 37° 57' N, Longitud 7° 26' W, Altitud 242 m). Foran utilizados 12 machos y 69 hembras de la raza Merina Preta (MP) y 7 machos y 52 hembras de la raza Campaniça (C).

No dia 14 de Março de 2002 foran colocados 3 implantes de melatonina en cada uno de los machos C y en la mitad de los machos MP, escogidos aleatoriamente, de forma que fueran constituídos 3 grupos, uno grupo contro de raza MP, sin cualquier tratamiento (GPC; n=6), un grupo de raza MP tratado con melatonina (GPT; n=6) y un grupo C, también tratado con melatonina (GCT; n=7).

Procediose después a la congelación de semen de todos los animales, en dos períodos. El primero decorreu 6 la 14 dias después de la colocación de los implantes y el segundo 66 la 67 dias después de la misma fecha. Fué hecha la valoración cuantitativa del semen la fresco por las pruebas de movilidad individual, coloración vital y test de endosome (HOST).

En el processo de congelación se utilizó un diluidor comercial conteniendo yema de huevo y glicerol tendo sido hecha la congelación del semen, en micropajuelas de 0,25 ml, por método manual, con equilibrio durante 4 horas la 4°C y congelación vertical, primeramente en vapores de nitrógeno líquido (-75 la -125°C) y después en nitrógeno líquido (-196°C).

En una fase posterior se valoró la fertilidad del semen, de los lotes de semen que se habían constituído, recurriendo a la inseminación artificial intrauterina por laparoscopia de hembras de las mismas razas, emparejadas equitativa y aleatoriamente por los carneros.

Los resultados fueron tratados estadísticamente recurriendo al Procedimiento GLM del SAS (*SAS Institute Inc.*, 1999-2000). En el análisis de varianza para los carneros de raza MP (GPT vs. GPC) se incluyeron los efectos del período (2 niveles) y del tratamiento con melatonina (2 niveles) como factores principales, los efectos de los tests de movilidad individual, coloración vital y endosome como covariables y ainda el residuo como efecto aleatorio. En el análisis de varianza para los carneros tratados con melatonina (GPT vs. GCT) el factor melatonina fué substituído por el factor raza (2 niveles), considerándose igualmente el factor período (2 niveles).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se indica el número de ovejas paridas en total de inseminadas, bien como la respectiva tasa de fertilidad, para cada una de las razas y períodos de congelación del semen.

Tabla 1. Número de ovejas paridas sobre el total de inseminadas (P/n) y tasa de fertilidad (F) para los vários grupos de ovejas en que foi aplicado semen congelado de los três grupos de carneros (GPC, GPT, GCT), referente aos dos períodos de congelación.

RAZA	GRUPO	PERÍODO	P/n	F (%)
Merina Preta	GPC	1	6/19	31,6
	GPC	2	4/18	22,2
	GPT	1	4/16	25,0
	GPT	2	3/16	18,8
Campaniça	GCT	1	3/23	13,0
	GCT	2	12/29	41,4

A análise estatística de los resultados está indicada en tabla 2, pudiendo observarse que ninguno de los factores se mostró estadísticamente significativo ($p < 0,05$). De hecho, podemos concluir que la aplicación

de implantes de melatonina en machos no influenció la tasa de fertilidad del semen congelado cuando se compararon los animales tratados o no con melatonina (GPT vs. GPC; $p < 0,05$). No se verificaron también quaisquer diferencias entre las dos razas estudiadas, en todos los animales tratados (GPT vs. GCT; $p < 0,05$). Por outro lado, nenhuma de las provas consideradas como covariáveis mostrou ter relação con la fertilidad ($p < 0,05$).

Tabla 2. Análisis de variância en comparación entre carneros de raza MP tratados y não-tratados con melatonina (GPC vs. GPT) y entre razas MP y C (GPT vs. GCT), en função de los factores y provas avaliadas, para los quais se referem los graus de libertad (GL). Indicam-se também los valores de F, el coeficiente de determinação (R^2), el coeficiente de variación y ainda las médias de tasa de fertilidad.

Fontes de Variação	G. L.	GPC vs. GPT Valor de F	GPT vs. GCT Valor de F
Período	1	1,30	0,05
Melatonina / Raza	1	0,11	0,36
Mobilidad Individual	1	0,35	0,09
Coloración Vital	1	1,91	1,15
HOST	1	1,71	0,87
R^2		0,0064	0,058
Coeficiente de variación		179,42	161,98
Média de tasa de Fertilidad (%)		24,2	28,2

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

Fué demostrado por algunos autores que la acción de la melatonina en carneros ocurre algunas semanas después de la colocación de los implantes, ya que apenas 45 días después de esa fecha se notan aumentos de los niveles séricos de testosterona (Chemineau *et al.*, 1992; Kokois *et al.*, 2000). En las hembras referem-se 70 días como duración ideal del tratamiento, observándose una elevación de los niveles de la gonadotropina LH entre los 40 y los 60 días (Staples *et al.*, 1992; Chemineau *et al.*, 1996; Vigué *et al.*, citado por Forcada *et al.*, 2000a; Bittman *et al.*, 1985, citados por Forcada *et al.*, 2000b). Por esta razón, en presente trabajo, esperavam-se algunas diferencias en fertilidad del semen congelado en segundo período, altura en que havian já decorrido 66 la 67 días de la colocação de los implantes.

Parece que las razas existentes en latitudes mediterráneas, y concretamente en Portugal, representan menor estacionalidad reproductiva (Sebastian, 1989; Silva, 1991; Bettencourt y Fialho, 1992; Alonso de Miguel y Cognié, 1980, citados por Chemineau, 1992; Bettencourt, 1999; Bodin *et al.*, 1999; Pelletier *et al.*, 2000; Azcona *et al.*, 2001). Este hecho permite inferir que la fertilidad del semen cogido al largo del año no representa grandes diferencias. Por esta razón, los tratamientos con melatonina, que visan simular una época favorable, pueden no alterar significativamente la calidad del semen nesta localización geográfica. en latitudes más elevadas, con tratamientos luminosos, fué posible mejorar la fertilidad en cubrición natural (Schanbacher, 1979) y también la fertilidad del semen congelado (Fiser y Batra, 1984, Fiser y Fairfull, 1983, 1986, Zheltobrjuk *et al.*, 1990, citados por Salamon y Maxwell, 1995). Kokois *et al.* (2000) refieren que el tratamiento con melatonina permitió aumentar la actividad de la enzima acrosina, con posibilidad de mejorar la fertilidad del semen congelado.

De los resultados obtenidos concluimos que el tratamiento con melatonina aplicado la carneros de las razas MP y C no provocó diferencias en fertilidad del semen congelado, notendo sido también notadas diferencias entre las dos razas. La ausencia de diferencias en tasa de fertilidad puede ser justificada por la menor estacionalidad de las razas estudiadas en latitude del Sur de Portugal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZCONA, V.A., GONZÁLEZ, A.M., JURADO, J.C.M., GARCÍA, GARCÍA-CERVIGÓN, M., PASAMONTES, M.D.P., ANGULO, V.M. 2001. influencia de los implantes de melatonina sobre la calidad seminal en los moruecos del esquema de selección de la raza ovina manchega. in: *XXVI Jornadas Científicas y V Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*, Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla, España, pp. 997-982.
- BETTENCOURT, C.M.V., FIALHO, J.B. 1992. SAZONALIDAD REPRODUCTIVA Y "EFECTO MACHO" EN OVEJAS DE LA RAZA MERINO Branco. In: *Publicações del 5º Simpósio Internacional de Reproducción*

- Animal: comunicações livres: bovinos, ovinos, equinos, suínos, outras especies, volume II, Luso, Portugal, pp. 256-262.
- BETTENCOURT, E.M.V. 1999. Caracterização de parâmetros reprodutivos nas razas ovinas Merina Branca, Merina Preta y Campaniça. *Tese de Mestrado*, Lisboa, FMV/UTL.
- BODIN, L., ELSEN, J.M., HANOCQ, E., FRANÇOIS, D., LAJOUS, D., MANFREDI, E., MIALON, M.M., BOICHARD, D., FOULLEY, J.L., SAN-CRISTOBAL-GAUDY, M., TEYSSIER, J., THIMONIER, J., CHEMINEAU, P. 1999. Génétique de la reproduction chez les ruminants. *INRA Productions Animales*, 12 (2): 87-100.
- CHAGAS Y SILVA, J.N. 1992. Inseminação artificial en ovinos. *Colectânea S.P.O.C.*, 3 (1): 61-80
- CHEMINEAU, P. 1992. Medio ambiente y reproducción animal. In: Conferência de clausura de de las VI Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, Salamanca, España.
- <http://www.fao.org/ag/aga/agap/war/wrall/v165ob/v165ob04.htm>
- CHEMINEAU, P., CAGNIE, Y., GUERIN, Y., ORGEUR, P., VALLET, J-C. 1991. *Training manual on artificial insemination in sheep and goats*. FAO Animal Production and Health Paper, 83. Editor: Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- CHEMINEAU, P., MALPAUX, B., DELGADILLO, J.A., GUERIN, Y., RAVAUULT, J.P., THIMONIER, J., PELLETIER, J. 1992. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Animal Reproduction Science*, 30: 157-184.
- CHEMINEAU, P., MALPAUX, B., PELLETIER, J., LEBOEUF, B., DELGADILLO, J.A., DELETANG, F., POBEL, T., BRICE, G. 1996. Emploi des implants de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maîtriser la reproduction saisonnière chez les ovins et les caprins. *INRA Productions Animales*, 9 (1): 45-60.
- COLAS, G. 1981. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Île-de-France. II. Fécondance: relation avec les critères qualitatifs observés *in vitro*. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 21(3): 399-407.
- DEVESON, S.L., ARENDT, J., FORSYTH, L.A. 1992. The influence of the pineal gland and melatonin on the reproductive performance of domesticated female ungulates. *Animal Reproduction Science*, 30: 113-134.
- Fitzgerald, J. 1997. Applied reproductive physiology of the ram. In: *Current therapy in large animal theriogenology*, 1st edition. Editor: Robert S. Youngquist, Philadelphia, USA, pp. 571-574.
- FORCADA, F., ABECIA, J.A. 2000. Control de la actividad reproductiva del ovino. *Mundo Ganadero*, 122.
- FORCADA, F., ABECIA, J.A., ZARAZAGA, L.A., LOZANO, M. 2000a. Importancia del fotoperiodo en la regulación de la actividad reproductora. *Ovis*, 71: 13-32.
- FORCADA, F., ABECIA, J.A., ZÚÑIGA, O., MARTINO, A. 2000b. Posibilidades de aplicación práctica de la melatonina en el control de la actividad reproductora del ganado ovino. *Ovis*, 71:65-86.
- GERLACH, T., AURICH, J.E. 2000. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ran and hamster. *Animal Reproduction Science*, 58: 197-213.
- GUERIN, Y. 1990. Méthodes de conservation de la semence ovine. *Élevage & Insemination*, 236: 3-14.
- HAFEZ, B., HAFEZ, E.S.E., 2000. Reproductive cycles. In: *Reproduction in Farm Animals*, 7th edition. Editor: B. Hafez, E.S.E. Hafez, Lippincott Willian & Wilkins, Philadelphia, pp. 55-67.
- HAFEZ, E.S.E., JAINUDEEN, M.R., ROSNINA, Y. 2000. Hormones, Growth Factors and Reproduction. In: *Reproduction in Farm Animals*, 7th edition. Editor: B. Hafez, E.S.E. Hafez, Lippincott Willian & Wilkins, Philadelphia, pp. 33-54.
- HANIF, M., WILLIAMS, H. 1991. The effects of melatonin and light treatment on the reproductive performance of yearling Suffolk rams. *British Veterinary Journal*, 147: 49-56.
- HILL, J.R., Thompson, J.A., Perkins, N.R. 1998. Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28 447 Merino ewes under commercial conditions: la survey. *Theriogenology*, 49: 697-709.
- KOKOIS, N., THEODOSIADOU, E., TSANTARLIOUTOU, M., REKKAS, C., GOULAS, P., SMOKOVITIS, A. 2000. The effect of melatonin implants on blood testosterone and acrosin activity in spermatozoa of the ram. *Andrologia*, 32: 107-114.
- LÓPEZ-BREA, J.J.G., AGUADO, M.I., PÉREZ, S., GARRIDO, D., VAZQUEZ, I. 1995. Tecnología para la conservación del semen de morueco. *Ovis*, 36: 37-47.

- MALPAUX, B., VIGUIÉ, C., THIÉRY, J.C., CHEMINEAU, P. 1996. Contrôle photopériodique de la reproduction. *INRA Productions Animales*, 9(1), 9-23.
- ORTAVANT, R., PELLETIER, J., RAVAUULT, J.P., THIMONIER, J., VOLLAND-NAIL, P. 1985. Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm mammals. *Oxford Rev Reproduction Biology*, 7: 305-354.
- PELLETIER, J., BODIN, L., HANOCQ, E., MALPAUX, B., TEYSSIER, J., THIMONIER, J., CHEMINEAU, P. 2000. Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene for Mel_{1a} receptor in the ewe. *Biology of Reproduction*, 62: 1096-1101.
- RIOCEREZO, C.P., DELETANG, F., MARTINO, A. 2001. Utilización de implantes de melatonina para la cubrición del mês de Marzo en una ganadería de alta producción de leche. In: *XXVI Jornadas Científicas y V Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*, Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla, España, pp. 1066-1070.
- ROSA, H.J.D., JUNIPER, D.T., BRYANT, M.J. 2000. Effects of sexual experience and melatonin treatment of rams on plasma testosterone concentration, sexual behavior and ability to induce ovulation in seasonally anoestrous ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120: 169-176.
- SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. 1995. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, 38: 1-36.
- SCHANBACHER, B.D. 1979. Increased lamb production with rams exposed to short day lengths during the nonbreeding season. *Journal of Animal Science*, 49 (4): 927-932.
- SEBASTIAN, A.L. 1989. Estacionalidad de la reproducción. *Ovis*, 1: 59-73.
- SILVA, J.R. 1991. Controlo do ciclo éstrico en ovinos: justifica-se sincronizar con hormonas en Portugal?. *Colectânea de la S.P.O.C.*, 2 (1): 143-144.
- STAPLES, L.D., MCPHEE, S., KENNAWAY, D.J., WILLIAMS, A.H. 1992. The influence of exogenous melatonin on the seasonal patterns of ovulation and oestrus in sheep. *Animal Reproduction Science*, 30: 185-223.
- STELLFLUG, J.N., WEEMS, Y.S., WEEMS, C.W. 1997. Clinical reproductive physiology of ewes. In: *Current therapy in large animal theriogenology*, 1st edition. Editor: Robert S. Youngquist, Philadelphia, USA, pp. 594-598.
- THIMONIER, J. 1996. Photopériode et reproduction. *INRA Productions Animales*, 9(1): 3-8.
- WAYNE, N.L., MALPAUX, B., KARSCH, F.J. 1988. How does melatonin code for day length in the ewe: duration of nocturnal melatonin release or coincidence of melatonin with the light-entrained sensitive period? *Biology of Reproduction*, 39: 66-75.

SUMMARY

Use of melatonin implants can mimic sheep's most favourable reproductive season, autumn. In this study, 3 subcutaneous implants of this hormone were used to treat Merino Preto (GPT, n=6) and Campaniça rams (GCT, n=7), keeping the control group of Merino Preto rams (GPC, n=6). Individual motility, vital stain and HOST tests were evaluated in semen from all rams. Semen was frozen in two periods, i.e. before and after the expected effect of melatonin. Then, frozen semen was used in ewes of the same breeds by laparoscopic intrauterine insemination. No differences in fertility were observed between treated and non-treated rams and between breeds. These facts may be due to the lower seasonality exhibited by both local breeds at the latitude of Southern Portugal.

Key words

Campaniça, Frozen semen, Melatonin, Merino Preto, Ram, Seasonality