

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EFFECTO DEL SELENIO EN LA FERTILIDAD Y LA CONSERVACIÓN DE  
SEMEN EN CARNEROS MERINO**

**por**

**María Yanina PRESA MANZUR**

**TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el  
título de Ingeniero Agrónomo.**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2009**

Tesis aprobada por:

Director: -----  
Ing. Agr. Daniel Fernández Abella

-----  
Dr. Vet. Álvaro López

-----  
Lic. Oscar Irabuena

Fecha: -----

Autor: -----  
Maria Yanina Presa Manzur

**AGRADECIMIENTOS**

Al Ing. Agr. Daniel Fernández Abella por la conducción y revisión de éste trabajo.

A Nelson Villegas (†), por su paciencia y enseñanza.

Al Dr. Vet. Álvaro López y al Lic. Oscar Irabuena por la revisión de la Tesis.

A la Lic. Sully Toledo por la corrección del trabajo.

A mis padres, por el apoyo incondicional a lo largo de toda la carrera.

Al Téc. Agr. Esteban A. Mello por la colaboración en la realización de esta Tesis.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES .....	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	3
2.1 APARATO GENITAL DEL CARNERO.....	3
2.2 EL SEMEN Y SUS COMPONENTES.....	6
2.3 ANÁLISIS DEL SEMEN.....	7
2.3.1 <u>Métodos de evaluación</u> .....	8
2.4 FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA PRODUCCIÓN DE SEMEN.....	11
2.4.1 <u>Raza</u> .....	11
2.4.2 <u>Edad</u> .....	11
2.4.3 <u>Fotoperíodo</u> .....	12
2.4.4 <u>Temperatura</u> .....	12
2.4.5 <u>Frecuencia de eyaculados</u> .....	13
2.4.6 <u>Alimentación</u> .....	13
2.5 MANEJO DEL SEMEN.....	14
2.5.1 <u>Extracción del semen</u> .....	14
2.5.1.1 <u>Vagina artificial</u> .....	15
2.5.1.2 <u>Electroeyaculador</u> .....	15
2.5.2 <u>Dilución y conservación del semen</u> .....	16
2.5.2.1 <u>Crioprotectores</u> .....	17
2.5.2.2 <u>Métodos de congelación del semen</u> .....	19
2.5.2.3 <u>Dilución del semen</u> .....	20
2.5.2.4 <u>Descongelación</u> .....	24
2.6 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.....	24
2.6.1 <u>Método vaginal a ciegas</u> .....	26
2.6.2 <u>Método cervical</u> .....	26
2.6.3 <u>Método intrauterino</u> .....	28
2.7 SINCRONIZACIÓN DE CELOS.....	28
2.7.1 <u>Métodos farmacológicos</u> .....	28
2.8 SELENIO.....	32
2.8.1 <u>Generalidades</u> .....	32
2.8.2 <u>Consumo de selenio</u> .....	33
2.8.3 <u>Reproducción y selenio</u> .....	33
2.8.4 <u>Metabolismo del selenio</u> .....	34
2.8.5 <u>Selenoproteínas y Glutation Peroxidasa                 (GSH-Px)</u> .....	35

2.8.6	<u>Glutación peroxidasa (GSH-Px) en las patologías asociadas a deficiencias de selenio en rumiantes</u> .....	35
2.8.7	<u>Selenio y espermatozoides</u> .....	37
2.8.8	<u>Estrés oxidativo y administración de antioxidantes</u> .....	39
3.	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	41
3.1	ENSAYO I.....	41
3.1.1	<u>Localización</u> .....	41
3.1.2	<u>Animales</u> .....	41
3.1.3	<u>Tratamiento</u> .....	41
3.1.4	<u>Manipulación y análisis del semen</u> .....	43
3.1.5	<u>Materiales</u> .....	47
3.1.5.1	Materiales utilizados para extracción y análisis de semen.....	47
3.1.5.2	Limpieza y acondicionamiento de los materiales.....	47
3.2	ENSAYO II.....	48
3.2.1	<u>Localización</u> .....	48
3.2.2	<u>Animales</u> .....	48
3.2.3	<u>Tratamiento</u> .....	48
3.2.4	<u>Materiales</u> .....	49
3.2.4.1	Materiales utilizados para la extracción de semen e inseminación artificial.....	49
3.3.	ENSAYO III.....	50
3.3.1	<u>Localización</u> .....	50
3.3.2	<u>Animales</u> .....	50
3.3.3	<u>Tratamiento</u> .....	50
3.3.4	<u>Análisis estadístico</u> .....	51
4.	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> .....	52
4.1	ENSAYO I: EFECTO DEL SELENIO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES (VOLUMEN, MOVILIDAD MASAL Y CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA).....	52
4.2	ENSAYO II: EFECTO DEL SELENIO SOBRE LA FERTILIDAD, LA PROLIICIDAD Y LA FECUNDIDAD EN OVEJAS (I.A CERVICAL CON SEMEN FRESCO).....	58
4.3	ENSAYO III: EFECTO DEL SELENIO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES; Y SOBRE LA FERTILIDAD, LA PROLIFICIDAD Y LA FECUNDIDAD EN OVEJAS (I.A	

INTRAUTERINA CON SEMEN CONGELADO).....	60
4.3.1 <u>Análisis de semen de carnero con y sin Selenio (03/02/09)</u> .....	60
4.3.2 <u>Calidad de semen post-congelado en carneros con y sin selenio (03/02/09)</u> .....	61
4.3.3 <u>Evaluación de la fecundidad del semen</u> .....	62
5. <u>CONCLUSIONES</u> .....	63
6. <u>RESUMEN</u> .....	64
7. <u>SUMMARY</u> .....	65
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	66
9. <u>ANEXOS</u> .....	78

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

<b>Cuadro No.</b>	<b>Página</b>
1. Composición de Selfos Plus.....	42
2. Determinación de la concentración espermática a través del color del eyaculado.....	44
3. Relación entre la movilidad grupal (masal) y el porcentaje de espermatozoides móviles del semen (movilidad individual).....	45
4. Relación entre la lectura en el densímetro con la concentración espermática (millones/mL).....	46
5. Calidad del semen según prueba de azul de metileno.....	46
6. Fertilidad, prolificidad y fecundidad.....	58
7. Evaluación de la concentración espermática, movilidad masal y volumen seminal del grupo tratado y grupo testigo.....	60
8. Fertilidad, prolificidad y fecundidad en ovejas a las que se les practicó I.A intrauterina con semen congelado.....	62
 <b>Figura No.</b>	
1. Anatomía del aparato reproductor del Carnero.....	3
2. Línea de tiempo para actividades realizadas (Ensayo I).....	42
3. Línea de tiempo para actividades realizadas (Ensayo II).....	49

4. Línea de tiempo para actividades realizadas (Ensayo III).....	50
---	----

**Gráfica No.**

1. Evolución promedio de la movilidad masal del grupo tratado y grupo testigo.....	52
2. Evolución promedio de la concentración espermática promedio para el grupo tratado y grupo testigo.....	53
3. Evolución promedio del volumen seminal del grupo tratado y grupo testigo.....	55
4. Minutos que tarda la mezcla (semen + azul de metileno) en virar al blanco, según grupo(tratado y testigo) y época del año.....	56
5. Variación de la producción espermática(concentración x volumen) según grupo (tratado y testigo) y época del año.....	57
6. Movilidad espermática post-congelación para cada grupo (tratado y testigo) en dos momentos.....	61

## **1. INTRODUCCIÓN**

Las tendencias mundiales demuestran que las lanas finas y superfinas, junto a otras fibras de lujo (cashmere, alpaca y mohair), están destinadas a ocupar un nicho de mercado de productos de alta calidad y valor, dirigidos a consumidores de alto poder adquisitivo, ubicados preferencialmente en Europa y Asia, donde la expectativa es que los precios tengan mejores valores a diámetros cada vez menores (Cardellino y Trifoglio, 2003).

Estas tendencias mundiales en el consumo de fibras textiles han sido interpretadas por las industrias laneras de Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica como una necesidad de incrementar la producción mundial de lanas finas (menores a 19 micras) (Montossi et al., 2003).

En Uruguay, sin embargo, la producción de este tipo de fibra era insignificante cuando se estableció la necesidad de promover la misma a finales de la década de los 90, representando esta realidad una posible limitante para el crecimiento futuro del complejo agroindustrial lanero del país.

Entonces, la producción de lana superfina de la raza Merino surgió como una alternativa de valorización y mejora de la competitividad del rubro ovino en las regiones de Basalto y Cristalino, particularmente para aquellos productores laneros que desarrollaban sus sistemas productivos sobre suelos superficiales con escasas posibilidades de diversificación de la producción (Montossi et al., 2003). Pero gran parte de este avance en el mediano y largo plazo está definido por el mejoramiento genético de dicha raza y para lograr esto uno de los factores a mejorar es el nivel de fecundidad.

La mejora en la eficiencia reproductiva trae como consecuencia un aumento en los ingresos y un incremento en el progreso genético (Fernández Abella et al., 1995).

Este trabajo tiene como principal objetivo evaluar los cambios en la fertilidad del semen de carneros de la raza

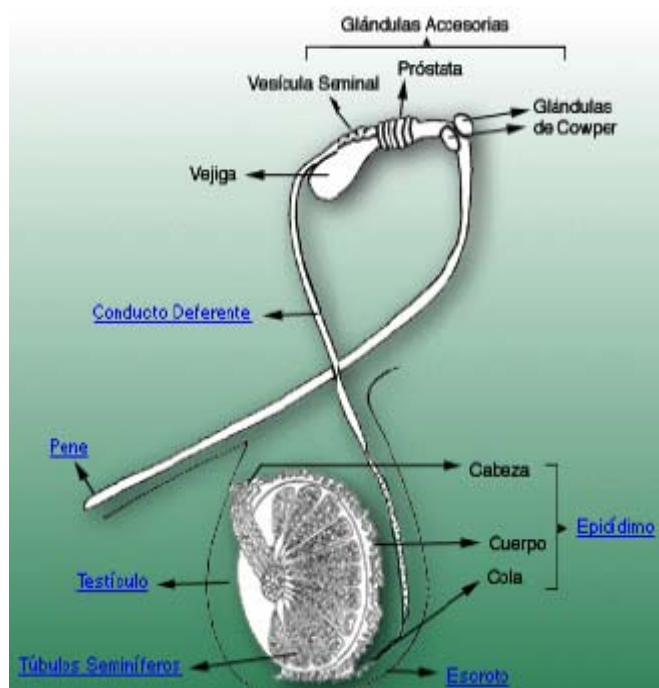
Merino Australiano a través de la administración de selenio.

Para lograr este objetivo se evaluó el efecto del selenio sobre las características seminales (volumen, movilidad masal y concentración espermática), sobre la fertilidad, la prolificidad y la fecundidad en ovejas de la raza Merino Australiano, a las que se les practicó inseminación artificial (I.A cervical con semen fresco e I.A intrauterina con semen congelado).

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 APARATO GENITAL DEL CARNERO

FIGURA No.1. Anatomía del aparato reproductor del carnero



FUENTE: López (2008).

Se distinguen en el carnero tres grupos de órganos:

- Los encargados de la formación y almacenamiento de espermatozoides (testículos y epidídimos);
- Las glándulas anexas o accesorias donde se secreta gran parte del plasma seminal; y
- Los órganos de evacuación (canales deferentes, ampollas, pene) (Fernández Abella 1993, Razmi et al. 2004).

En el carnero la formación de espermatozoides en el testículo (espermatogénesis) es un proceso que dura aproximadamente dos meses. Dicho proceso se produce a una temperatura 4-5 °C inferior a la corporal (39,5°C). No sólo

la ubicación de los testículos fuera del abdomen en la bolsa testicular, permite una adecuada temperatura sino que existen varios mecanismos que aseguran una eficiente termorregulación (Fernández Abella 1993, 1996, Oatley et al. 2005): red capilar del escroto, túnica dartos (movilidad testicular), plexo venoso pampiniforme, glándulas sudoríparas del escroto y lana escrotal.

El testículo está protegido por una túnica externa resistente, fibrosa, de color blanco llamada albugínea. De esta última parten trabéculas musculares que llegan al interior de la gónada subdividiendo el parénquima en lóbulos.

El parénquima interno de estos lóbulos, de color amarillento, está constituido por numerosos túbulos seminíferos muy contorneados y por un tejido intersticial que secreta hormonas masculinas. Los túbulos seminíferos están muy apelotonados, terminando a nivel del cuerpo de Highmore en un canalículo derecho. Estos canalículos se unen para formar el rete-testis o red testicular que cumple el rol de canal colector. A nivel del polo proximal del testículo, los túbulos del rete-testis atraviesan la albugínea para comunicarse con el epidídimo por medio de una red de 12 a 15 canales eferentes. Cada testículo contiene 7.000 metros de tubos seminíferos (Setchell 1984, Ülker et al. 2005).

La pared de los túbulos seminíferos está constituida por una membrana basal y por un epitelio germinal pluri estratificado productor de espermatozoos. En dicho epitelio encontramos las células germinales en sus distintos estados de diferenciación y las células de Sertoli que cumplen entre otras funciones la de regular y coordinar la formación y liberación de espermatozoides (Fernández Abella 1993, Bielli et al., 2001, Johnson et al., 2008).

Entre los tubos seminíferos se encuentra el tejido conjuntivo laxo que contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nerviosos, y células intersticiales o de Leydig, principales secretores de testosterona.

Al salir del testículo, los espermatozoides son vertidos en un canal denominado epidídimo.

El epidídimo puede dividirse en tres partes: la cabeza, el cuerpo y la cola (perilla). En el carnero por problemas traumáticos (golpes) o por infecciones (Brucelosis, Clamidiosis) se producen inflamaciones importantes de la cola del epidídimo con endurecimiento de sus paredes (epididimitis).

En la cola del epidídimo se encuentran 100-120 mil millones de espermatozoides que representan un 70% del total existente en el epidídimo. Estas cantidades de espermatozoides descienden durante el período de inseminación o servicio, a la mitad y en carneros muy exigidos a niveles de un 10-20%. Esto es fácil de controlar, siendo conveniente palpar cada 10-15 días ambas colas de los carneros exigidos.

El epidídimo cumple varias funciones, entre ellas: transporte espermático, maduración espermática, sobrevivencia y almacenamiento espermático.

El canal deferente conduce el esperma desde la cola del epidídimo hasta la uretra. El corte de un fragmento del canal deferente a este nivel se denomina vasectomía y determina la infecundidad del macho (carnero vasectomizado o retarjo). La vasectomía provoca una epididimitis al incrementarse la resorción de espermatozoides en la cola del epidídimo por impedir su pasaje al exterior.

Las glándulas anexas o accesorias vierten sus secreciones hacia la uretra en el momento de la eyaculación mezclándose con los espermatozoides y secreciones localizadas en las ampollas. Estas son: las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales o de Cowper.

La producción espermática está directamente relacionada al desarrollo del testículo. En promedio por gramo testicular se producen 20 a 25 millones de espermatozoides por día. De este modo a mayor tamaño testicular mayor producción de semen.

Existen tres formas de medir el tamaño testicular: el diámetro, la circunferencia y el volumen. La que presenta mayor correlación (0,7-0,8) con el peso testicular y producción de esperma es el volumen testicular. El diámetro y circunferencia, si bien presentan una correlación positiva con la producción de esperma, la magnitud de la correlación es menor (0,4-0,5) (Fernández Abella 1993, 1996, Janett et al. 2001, Kasimanickam et al. 2007).

Para Fernández Abella et al. (1990), no hubo relación entre el tamaño testicular y la producción de esperma, medido al mismo tiempo, ni entre el peso vivo y la producción de esperma.

## **2.2 EL SEMEN Y SUS COMPONENTES**

El semen es el líquido generativo del macho ya que contiene los gametos masculinos (espermatozoides), se deposita en la vagina de la hembra durante la cópula o puede recogerse por medios artificiales para su estudio, almacenamiento y uso en inseminación artificial (Evans y Maxwell 1990, Lezama et al. 2002).

El semen está constituido por dos partes:

- Las células espermáticas o espermatozoides
- El plasma seminal o espermático (menstruo)

El plasma seminal sirve de vehículo para los espermatozoides pero su mayor importancia radica en las sustancias que posee, las cuales condicionan la actividad de los mismos. El plasma es secretado por glándulas anexas.

Las vesículas seminales secretan un líquido opaco, viscoso, rico en proteínas, sales de potasio, ácido cítrico y fructosa, de color amarillento que puede llegar a ser más del 50% del eyaculado.

La próstata en el carnero tiene una pequeña contribución de sales y enzimas. En algunas especies la próstata origina las prostaglandinas del semen, pero en el carnero el origen de estas son las vesículas seminales.

Las glándulas bulbouretrales producen un líquido viscoso, claro, de pH alcalino, que permite limpiar la uretra (Fernández Abella 1993, Marti et al. 2007, Marco-Jiménez et al. 2008).

La relación plasma seminal/espermatozoides es de 75/25, pudiendo alcanzar valores de 95/5, cuando la recolección se realiza con electroeyaculador. El pH del semen tiene un rango de variación entre 6,3 y 6,8 (Fernández Abella 1987, Vicente y Viudes-de-Castro 2008).

Un espermatozoide (célula espermática aislada) es una célula altamente especializada. Cada célula espermática esta formada por dos partes principales: cabeza y cola. La cabeza es plana y en su casi totalidad ocupada por el núcleo, donde están los cromosomas que son los responsables de portar la información genética paterna. La parte anterior de la cabeza esta cubierta por una caperuza especial, llamada acrosoma, portadora de las enzimas necesarias para el proceso de fertilización. La cola, semejante a un flagelo, es el órgano locomotor de los espermatozoides. El movimiento de la cola es el responsable de la propulsión de los espermatozoides en los líquidos, la cola esta conectada a la cabeza por medio de un corto cuello conocido como la región de implantación. La cola puede estar diferenciada en tres regiones: pieza media, pieza principal y pieza terminal. Existe un núcleo axial común formado por una serie de elementos contráctiles o fibrillas. La contracción y relajación de estas fibrillas determina el movimiento (Fernández Abella, 1987, 2008).

### **2.3 ANÁLISIS DEL SEMEN**

La importancia de realizar un análisis del semen antes de ser procesado y/o utilizado, radica básicamente en la relación que existe entre la calidad del mismo y su fertilidad. El examen del semen es una medida indirecta de su fertilidad (Azzarini y Ponzoni 1971, Zakrzewska et al. 2002).

### 2.3.1 Métodos de evaluación

Se pueden clasificar en:

- a) Pruebas macroscópicas
- b) Pruebas microscópicas
- c) Pruebas biológicas
- d) Pruebas bioquímicas

#### a) Pruebas macroscópicas:

Volumen: Varía entre 0,5 y 2 cc, dependiendo de la excitación previa, estado nutricional y sanitario, edad del carnero, época del año (máxima en otoño) y número de eyaculados diarios.

Color: Lo normal es blanco cremoso, variando según la concentración espermática. El color rosado determina la presencia de sangre, el amarillo verdoso la presencia de orina o pus y el amarillo amorronado (parduzco) la presencia de gran proporción de espermatozoides muertos.

Olor: El semen debe ser inodoro, de lo contrario puede estar contaminado con orina o presentar una infección (Fernández Abella 1987, Piperelis et al. 2008).

Movilidad en masa: Se observan ondas que son el resultado de la concentración espermática, movilidad de los espermatozoides y porcentaje de células espermáticas vivas.

pH: Puede ser medido con papel indicador. Debería evaluarse mensualmente, descartándose sémenes que no estén en el rango normal (6,3-7,2) (Fernández Abella 1993, 1996, Piperelis et al. 2008).

#### b) Pruebas microscópicas:

Existen microscopios portátiles a pila que permiten observar el movimiento y morfología del esperma (Fernández Abella, 1993, 1996).

Es aconsejable mantener el semen a una temperatura de 35 a 37°C, a través de una estufa, calentar el porta objeto o la platina del microscopio eléctricamente.

Movilidad: Se define como la cantidad de espermatozoides con movimiento progresivo por cada 100 células observadas. El movimiento progresivo es cuando el espermatozoide se proyecta hacia delante. Según Elliot (1979) define el movimiento normal de espermatozoide cuando es recto y progresivo, al mismo tiempo que rota sobre su eje longitudinal. El movimiento progresivo normal es el que determina que el espermatozoide avance y pueda fecundar. Los rangos de movilidad observados por diferentes autores varían entre un 60 a 90% (Sorensen 1980, Mara et al. 2005).

Concentración: La evaluación de la concentración del esperma es fundamental para realizar la dilución. Lo lógico sería obtener el dato real de la misma sin tener que recurrir a su estimación a través del color.

Se define como el número de espermatozoides por unidad de volumen. Existen diferentes métodos para determinar la concentración: recuento por cámara de Neubauer o Thoma, y el fotocolorímetro.

Morfología: Existe una correlación elevada entre el porcentaje de formas anormales y el poder fecundante. Un eyaculado con un porcentaje de anomalías mayor a 20% debe eliminarse, aunque esto dependerá del tipo de formas anormales que integren ese porcentaje, ya que las anomalías del flagelo están menos relacionadas con la fertilidad del semen (Fernández Abella 1993, 1996).

A través de un frotis no solo evaluamos las formas anormales, sino que también podemos estimar el porcentaje de células espermáticas vivas.

El semen fresco se puede teñir con tinta china o con una solución de eosina-nigrosina. Ésta última permite observar también los espermatozoides muertos que se colorean de rosado. Es necesario contar, dentro de varios campos, un total de 150 células espermáticas para determinar el porcentaje de vivos, así como de anomalías (Fernández Abella 1993, 1996, Bag et al. 2004).

c) Pruebas biológicas:

Porcentaje de preñez: Evaluación del semen a través de su utilización en hembras fértiles. Éste método a pesar de ser el más exacto, tiene la limitante del tiempo requerido para obtener los resultados.

Resistencia del espermatozoide: La resistencia que tengan los espermatozoides a la titulación con ácido, a la solución con cloruro de sodio o al choque térmico por frío, se han propuestos como indicadores de calidad (Salisbury et al. 1978, Pérez et al. 2002, Muiño et al. 2008).

Viabilidad: Se define como la capacidad de los espermatozoides para ser móviles tras la incubación a temperaturas ambientales superiores a las normales o después de conservación a temperaturas más bajas. Las diferencias en viabilidad del semen están determinadas por diferentes factores, como ser el contenido de fructosa (exceso o déficit) o la capacidad tampón para impedir un excesivo descenso en el pH (Salisbury et al. 1978, Pérez et al. 2002, Muiño et al. 2008).

d) Pruebas bioquímicas:

Coeficiente respiratorio: Consiste en determinar el consumo de oxígeno, careciendo de valor práctico.

Índice de fructólisis: Basado en la conversión de fructosa en ácido láctico.

Reducción del azul de metileno: Se basa en que los espermatozoides consumen la fructosa (azúcar del semen) transformándola en ácido láctico. Este pasa luego a anhídrido carbónico y agua, liberando hidrógeno. Este reacciona con el azul de metileno cambiando de color. La prueba consiste en el tiempo que tarda la mezcla en virar del azul al blanco.

Acidez: El pH del semen varía entre 6,5 y 6,8. Un pH del semen de 7, indica baja fertilidad o concentración, por un elevado contenido de plasma seminal. A valores de pH superiores a 7, el semen es infértil. El descenso del pH

indica una buena fertilidad por actividad metabólica (Fernández Abella 1993, 1996, Piperelis et al. 2008).

#### **2.4 FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA PRODUCCIÓN DE SEMEN**

Se ha informado que la producción y la calidad del semen de carneros se encuentran influenciadas por el fotoperíodo, la raza, la latitud geográfica y la temperatura (Fiser et al., 1983).

También la nutrición afecta marcadamente la producción de semen. Cambios en la nutrición en carneros adultos, provocan altas respuestas en el tamaño testicular y por ende en la tasa de producción de semen (Martin et al., 1995).

Otras causas que reducen o anulan la fertilidad del macho son: estados febriles ocasionados por enfermedades infecciosas o miasis, defectos anatómicos (escroto pequeño) o inflamatorios (orquitis, epididimitis) o defectos congénitos.

##### **2.4.1 Raza**

No existen diferencias en tamaño testicular entre nuestras razas laneras (Bonino Morlán et al. 1987, Fernández Abella y Villegas 1992b, Fernández Abella et al. 1992, 1993).

##### **2.4.2 Edad**

Los carneros adultos presentan una mayor talla testicular que los borregos, lo que determina una mayor producción espermática diaria. Durante el primer año de vida, el crecimiento testicular esta más relacionado con el peso vivo que con la edad. Por esto se puede mejorar la producción espermática de los borregos de dos dientes mejorando su peso vivo. En el carnero adulto (4 dientes o más) no existe relación entre peso vivo y el tamaño testicular.

Por otra parte existe una correlación negativa (-0,6/-0,7) entre las formas anormales y la fertilidad. Como el

semen de borregos presenta un elevado porcentaje de formas anormales su fertilidad es inferior respecto al carnero (Fernández Abella et al. 1992, 1993, Sanford y Dickson 2008).

#### **2.4.3 Fotoperíodo**

En el carnero el peso testicular evoluciona en sentido inverso a la duración de horas de luz. Los cambios en el peso testicular son consecuencia de la eficiencia del proceso de espermatogénesis que afecta la cantidad de espermatozoides liberados desde el testículo hacia los tubos seminíferos.

En nuestra latitud (30-35°) el efecto del fotoperíodo en los machos, no sería tan importante trabajando con razas de origen ecuatorial (Merino y cruza de lana fina y media) (Fernández Abella 1992, Domínguez et al. 2008).

#### **2.4.4 Temperatura**

Las altas temperaturas (>32°C) actúan directamente sobre el testículo, alterando la producción, la maduración y el almacenamiento del semen. Sin embargo el volumen de los eyaculados y la libido de los carneros no se ven mayormente modificados.

En nuestro país, se observa poca incidencia de la temperatura sobre la producción espermática, actuando principalmente sobre la libido en primavera, intensificándose sus efectos en diciembre, enero y principios de febrero. Esto lleva a pérdidas en la fertilidad potencial (Fernández Abella et al. 1992, 1993).

Por esto en las inseminaciones de verano se puede observar infertilidad temporaria, especialmente cuando los carneros pasan varios días expuestos en potreros sin sombra, a altas temperaturas con humedades relativas elevadas (HR>60%).

Por otro lado, la temperatura no tiene efecto sobre la concentración de fructosa y la libido de los carneros, indicando que la secreción de testosterona no fue afectada

(Cupps et al. 1980, Paulenz et al. 2002, Domínguez et al. 2008).

#### **2.4.5 Frecuencia de eyaculados**

El aumento del número de eyaculados por día reduce el volumen y la concentración espermática, sin alterar el porcentaje de espermias anormales (Chang 1945, Salamon 1962, Colas 1983).

En los ensayos realizados en la EEFAS, se observa que en nuestras razas laneras una frecuencia de 3 o más eyaculados por día lleva a que los carneros recurran a sus reservas extragonadales. Por este motivo es fundamental que los machos comiencen los servicios con un buen volumen testicular e importantes reservas en el epidídimo (Fernández Abella et al., 1993).

#### **2.4.6 Alimentación**

En latitudes intermedias como el Uruguay y bajo condiciones de cría a pastoreo, la evolución del tamaño testicular acompaña los cambios en el crecimiento de las pasturas (Masters y Fels 1984, Fernández Abella et al. 1993, Louvandini et al. 2008).

Los cambios nutricionales afectan más rápidamente el volumen testicular que el peso corporal, por esto un suplemento proteico favorece la espermatogénesis en moruecos (carnero padre) alimentados a nivel de mantenimiento o submantenimiento (Setchell et al. 1965, Branden et al. 1974, Lindsay 1976, Lindsay et al. 1976, Oldham et al. 1978, Louvandini et al. 2008).

La subnutrición severa reduce el aporte hormonal al testículo, decaen los niveles de testosterona, al reducirse los pulsos de la LH y el carnero no sólo disminuye la producción espermática, sino que también pierde la libido (Lindsay et al. 1984, Martin et al. 1990, Louvandini et al. 2008).

Los cambios drásticos del nivel de alimentación se observan 7-8 semanas después, por afectar los estadios de

la espermatogénesis a partir de la última división espermatogonial (Cameron et al., 1988).

Las deficiencias en minerales y vitaminas afectan la producción de semen. Alteraciones morfológicas y reducciones en la concentración espermática se observan en carneros alimentados con pasturas secas en períodos prolongados ya que se agotan sus reservas corporales después de 6-7 semanas (Sapsord 1951, Assis et al. 2008).

La nutrición aparece como el factor dominante en controlar la actividad testicular y las respuestas a cambios en la nutrición pueden contrarrestar los efectos del fotoperíodo (Martin et al., 1990).

En aquellos carneros con alto nivel de ingesta de alimento, su peso vivo aumentó un 32% y el volumen de testículo en un 67% durante el período de alimentación de 9 semanas. En los carneros cuyos testículos aumentaron de tamaño, se pudo observar mediante la castración una proporción de tubos seminíferos en relación al volumen testicular significativamente mayor que en carneros con menor nivel de ingesta de alimento (testículos de menor tamaño). Estas grandes diferencias en el peso del testículo, se tradujo en grandes diferencias en la producción de espermatozoides entre carneros alimentados con diferentes niveles de ingesta de alimento (Lindsay et al. 1978, Assis et al. 2008).

Ambos factores, la nutrición y el fotoperíodo actúan sobre el mismo mecanismo: la frecuencia de pulsos de la hormona LH (Martin et al., 1990).

## **2.5 MANEJO DEL SEMEN**

### **2.5.1 Extracción del semen**

Los métodos de extracción de semen se pueden dividir en dos grandes grupos: métodos directos y métodos indirectos (Fernández Abella 1987, Marco et al. 2008).

El método de extracción directa, consiste en hacer servir la oveja por el carnero del cual se quiere obtener

el semen, y una vez realizado el servicio se retira del fondo de la vagina de la oveja por medio de una pipeta o jeringa, el producto del evacuado. El volumen así obtenido es escaso y en condiciones higiénicas deficientes (Durán del Campo, 1980), por lo que ha caído en desuso desde que se desarrollaron otros métodos más adecuados, como los métodos indirectos (Azzarini, 1991).

Los métodos indirectos de extracción de semen, vagina artificial y electroeyaculador, son los más usados actualmente (Salisbury et al. 1978, López 1987, Fernández Abella 1987, Azzarini 1991, Marco et al. 2008).

#### **2.5.1.1 Vagina artificial**

La vagina artificial tiende a imitar a la vagina de la oveja en temperatura y humedad. El carnero eyacula previa desviación del pene con la mano de manera que penetre en la vagina artificial. Existen diferentes modelos, pero en general consta de dos tubos: uno externo (metal, caucho, plastiducto, PVC) variable en longitud entre 15 y 25 cm. y un diámetro de 6 a 9 cm.; y uno interno o camisa de goma flexible de mayor longitud que el anterior, lo cual permite doblar sus puntas determinando un espacio libre entre ambos. Este a través de válvulas se llena de agua tibia y aire. De esta manera se busca obtener una temperatura y presión similares a las de la vagina de la hembra. En uno de los extremos se adapta una copa de vidrio para la recolección del semen. En el otro extremo se coloca un lubricante (aceite mineral, vaselina neutra, etc.) de manera de facilitar la penetración del pene (Fernández Abella 1987, Marco et al. 2008).

Este método ha dado excelentes resultados, siendo sumamente económico y de fácil manejo, teniendo además la ventaja de poder recolectar el 100% del semen emitido, en forma totalmente higiénica (Durán del Campo, 1980).

#### **2.5.1.2 Electroeyaculador**

Este método consiste en un electrodo bipolar que se introduce en el recto unos 15 a 20 cm, haciendo pasar una corriente de 6 a 12 voltios y un número elevado de amperes.

Son necesarios de dos a tres choques eléctricos para que se produzca la eyaculación.

No todos los carneros responden al electroeyaculador, por eso no se recomienda aplicar más de cinco o seis choques de corriente.

El uso del electroeyaculador tiene como ventaja que el carnero no necesita un acostumbramiento previo, como en el caso de la vagina artificial. También permite obtener semen de animales que no pueden montar por defectos físicos no hereditarios.

El volumen del eyaculado es más elevado debido a una mayor cantidad de líquido seminal provenientes de las glándulas accesorias. Existe la posibilidad de que el semen tenga menor calidad por estar contaminado por orina.

Es un método a utilizar en casos especiales, ya que el semen obtenido no sólo se encuentra más diluido sino que presenta menor resistencia al choque térmico producido por el descenso de la temperatura durante el proceso de conservación (Fernández Abella 2008, Marco et al. 2005, 2008).

### **2.5.2 Dilución y conservación del semen**

Al aumentar las horas de conservación el semen pierde fertilidad, por ello para poder conservar el semen por mayor tiempo y permitir su uso y transporte se debe inevitablemente recurrir a la refrigeración a 4-5 ° C (24-48 horas) o la congelación (años de conservación) (Fernández Abella, 2008). En este último caso, luego de recolectado el semen se lleva a baño María a 30°C aproximadamente, agregándole un diluyente según el método de congelación. Se enfría paulatinamente con el agregado de agua fría hasta 5°C, mediante el pasaje escalonado por recipientes con diferente temperatura o utilizando cubitos de hielo para que el agua se enfríe lentamente.

Posteriormente, en algunas técnicas de congelación se agrega el diluyente a 5°C, en otras todo el diluyente se agrega a 30°C y el semen se congela cuando ha alcanzado 4-6

°C. Siempre se deben realizar períodos de equilibrio luego del agregado del diluyente. Estos varían entre una a dos horas (Fernández Abella, 1995).

### **2.5.2.1 Crioprotectores**

Gran cantidad de investigadores han estudiado los efectos desfavorables de la congelación y descongelación sobre la célula espermática.

El llevar una célula al estado de congelación implica dos etapas:

1) Pasaje de temperatura corporal a temperatura ligeramente superior a su punto de congelación (0-4°C).

2) Pasaje de esta temperatura hasta diferentes temperaturas por debajo de 0°C.

En la primera etapa el agua intracelular pasa de estado líquido a uno de "tipo gel" (viscoso) llamándose a este proceso cambio de fase. Este cambio interrumpiría la actividad enzimática y con ello el metabolismo produciendo daños que pueda ser o no reversibles. Este proceso de alteración se inicia a temperaturas de 12-13°C en semen puro y entre 20 a 25°C en semen diluido (Alberio 1979, Byrne et al. 2000).

El cambio de fase trae como consecuencia un espesamiento de los lípidos de las membranas provocando una contracción y en consecuencia un aumento de la permeabilidad celular. La membrana celular ve alterado su "estado de estabilidad" al disminuir la temperatura debiendo adquirir otro nuevo estado en cada temperatura. De no existir tiempo para la readaptación por ser muy rápida la velocidad de enfriamiento, la estabilidad de la membrana será inferior, agravándose esto en las temperaturas más bajas.

A 0°C se producen dos fenómenos: la formación de hielo intracelular y la deshidratación celular. La cristalización o la formación de hielo intracelular originan problemas mecánicos, determinando que el contenido celular se expanda dañando las estructuras celulares y provocando la muerte del espermatozoide.

La deshidratación se produce por consecuencia de la congelación del medio extracelular, lo cual por diferencias de presiones induce la salida del agua celular. Esto lleva a un aumento de electrolitos variando el equilibrio de los mismos, con descenso del pH lo que contribuye a la precipitación de las proteínas celulares. Se produce la desnaturalización de las proteínas protoplasmáticas al desdoblarse los puentes disulfúricos que al descongelarse el semen son destruidos. Los daños más importantes son a nivel de las proteínas citoplasmáticas, sobre todo las del acrosoma y lesiones secundarias a nivel de las fibrillas de la pieza media por acumulación de calcio.

La velocidad de enfriamiento en la congelación y descongelación es de fundamental importancia en la magnitud de los daños. Si la congelación es lenta, provoca un mayor período de acción de las altas concentraciones de sales intracelulares, favoreciendo la deshidratación. La congelación muy rápida determina la pérdida de permeabilidad de la membrana celular en breve lapso, incrementando la cristalización intracelular.

Para reducir los daños se utilizan sustancias crioprotectoras, la más usada es el glicerol. Este se une a la molécula de agua y provoca un descenso del punto de congelamiento aumentando la viscosidad, lo cual retarda la formación del hielo (prolongando la fase líquida) y la rápida concentración de solutos (reduce la deshidratación debido a la formación de puentes H entre el agua y el glicerol). Tiene acción crioprotectora especialmente en la fase de cristalización (-12 a -15°C), suele presentar un efecto negativo sobre la membrana del acrosoma, por ello se utiliza en bajos porcentajes. A mayores temperaturas penetra más rápidamente en la célula. Por ello según el momento de aplicación (30°C o 4 °C) variará el porcentaje utilizado y la velocidad de congelación. Las congelaciones rápidas han dado mejores resultados que las lentas, particularmente entre -15 a -50°C por situarse en ese intervalo las mayores lesiones del espermatozoide. Aproximadamente a los -50°C (fase líquida ausente) se terminan los perjuicios debidos a la presión osmótica. Agregando yema de huevo junto con el glicerol reducimos el efecto negativo de este último sobre la membrana del

acrosoma (Salamon y Visser 1974, Colas 1975, Helwood et al. 1980, Fiser y Batra 1984, Byrne et al. 2000).

La inseminación con semen congelado rápido resultó en una tasa de preñez significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) independientemente del método de inseminación. Los datos muestran que la tasa de congelación afecta a la proporción de espermatozoides que mantienen su capacidad de fertilización después de la descongelación. Sin embargo, una vez que se haya producido la fecundación, el desarrollo de la fase de blastocito es independiente de la tasa de congelación (Byrne et al., 2000).

Los espermatozoides de carnero son sensibles a cambios de temperatura durante el proceso de congelación y descongelación. El grado del daño depende de un efecto combinado de diversos factores, entre ellos la temperatura inicial de congelación.

El estudio indica que la temperatura inicial de congelación tiene un efecto significativo en la motilidad post-descongelación de los espermatozoides. La mejor respuesta se logró con una temperatura inicial de congelación de  $-125^{\circ}\text{C}$  (Sadhan et al., 2002).

Los espermatozoides de carnero pueden conservarse a 5 grados centígrados durante un máximo de 48 horas antes de la congelación sin efectos perjudiciales sobre la motilidad e integridad de membrana (Purdy, 2007).

#### **2.5.2.2 Métodos de congelación del semen**

El semen ovino puede congelarse en pastillas (pellets) o en pajuelas (paillettes). El método utilizado depende de las preferencias y necesidades.

Desde el punto de vista práctico la congelación en pajuelas presenta la ventaja de ser más homogénea al proveer mayor superficie de contacto al frío, mayor higiene y mejor identificación del semen.

Las pajuelas son selladas, luego del llenado, con alcohol polivinílico finamente tapizado o por medio de un

tapón con soldadura térmica o presión. Las mismas pueden ser impresas, existiendo en diferentes colores, lo que facilita su identificación.

Las pastillas (0,05 a 0,10 ml) presentan la ventaja de almacenar una mayor cantidad de semen (dosis) dentro de un bióstato (termo de nitrógeno), así como una reposición menos frecuente del nitrógeno al ubicarse en la parte inferior de los canisters (canastillos) del termo.

Las pastillas se obtienen colocando un pequeño volumen de semen sobre hielo seco, este es previamente moldeado para obtener pastillas de igual tamaño. Luego de formadas (2-4 min) son introducidas en nitrógeno líquido. En nuestro país por un problema de practicidad y economía los pellets se realizan sobre una placa de acrílico sometida a los vapores de nitrógeno líquido.

No existen diferencias en la congelación obtenida con el hielo seco (-78,8°C) y el nitrógeno líquido (-196°C), ya que a partir de los -50°C se terminan los daños de la congelación (Fernández Abella 1995, Fernández Abella et al. 2001).

### **2.5.2.3 Dilución del semen**

Luego de la colecta del semen, el mismo se coloca en baño María a 30°C, pudiendo agregar un poco de diluyente según el método de congelación.

Existen actualmente a nivel mundial dos principales diluyentes, uno a base de leche descremada puesta a punto por Coles (1975) en Francia y otro a base de hidroximetil-amino-metano (TRIS) utilizado por Salamon (1976) en Australia.

### **Congelación con diluyente TRIS**

El hidroximetil aminometano (TRIS) es el diluyente más utilizado en la congelación de semen de carnero.

El diluyente debe contener 1000 U.I de Penicilina y 1 mg de estreptomina por cada ml de solución madre (Tris, glucosa o fructosa, ácido cítrico y agua biodestilada).

El diluyente (solución madre, yema de huevo y glicerina) debe prepararse el mismo día de la congelación.

El huevo a utilizar debe ser fresco (3-4 días de su postura). La yema se separa de la clara y se coloca sobre papel higiénico, haciéndola rodar suavemente para eliminar los restos de clara. Se extrae la cantidad de yema necesaria atravesando con una jeringa la membrana.

Para la congelación de pajuelas la dilución se hace primero en la copa colectora (1:3) para luego pasar a un tubo de mayor tamaño y realizar la dilución final (1:8 a 1:12).

Luego de realizada la dilución conviene observar la motilidad progresiva. Si la misma es inferior al 70% no conviene congelar el semen.

Las pajuelas se llenan mecánicamente o en forma manual aspirando el semen por el extremo con tapón. Tomándolas del extremo con tapón para no hacer subir la temperatura del semen, se secan con papel higiénico y por medio de una jeringa (insulina o tuberculina) se crea una cámara de aire. Luego se sellan con alcohol polivinílico humedeciendo las pajuelas en agua. Posteriormente las mismas se llevan a un ambiente a 4-5°C durante 2 a 3 horas (tiempo de equilibrio) (Fernández Abella 1995, Yániz et al. 2008).

Tiempo de equilibrio: es el tiempo que transcurre desde que se agrega glicerol hasta que se congela (López, 1987).

Luego las pajuelas son sometidas en forma horizontal a los vapores de nitrógeno líquido (4cm por encima del nivel:-120°C), durante 6 a 10 minutos. También se pueden congelar dejando las pajuelas durante 2 minutos a un nivel de 14 cm del nitrógeno y luego en un nivel inferior (2,5 cm del nivel) durante 3 minutos. El recipiente de congelación debe ser amplio (30 x 20cm o más) y el nitrógeno debe estar a 6 cm respecto del fondo como mínimo. Pasado dicho lapso

las mismas se sumergen en el nitrógeno y luego son envasadas en los Goblets (tubos de plástico).

En la congelación de pastillas se hace la dilución en la copa recolectora y se pasa su contenido en un tubo. El mismo se lleva a un ambiente a 4-5°C, en la práctica se utilizan cubitos de hielo y una conservadora de espuma plástica. Lo ideal es que a los 30-35 minutos se logre alcanzar los 5°C.

Luego de pasar el período de equilibrio (90 a 120 minutos) se aspira el semen diluido con una pipeta y se pipetea sobre una placa de acrílico previamente enfriada (5 minutos a 4-5 cm del nivel del nitrógeno). Es necesario dejar las pastillas en formación durante 2 minutos sobre la placa de acrílico, para luego volcarlas en el nitrógeno líquido.

Cuando se congela en pastillas podemos realizar la dilución en dos pasos. Agregando la mitad del diluyente sin glicerol a 30°C y el resto de diluyente con glicerol a los 90 minutos posteriores (4°C) en dos fracciones con un intervalo de 15 minutos. Luego del agregado de la última fracción debemos esperar 60 minutos para congelar.

Antes de almacenar el semen congelado es conveniente evaluar dos o más pastillas de cada partida, rechazándose aquellas que tengan una movilidad inferior al 40%.

Las pastillas se guardan en globets tapados con algodón seco (Fernández Abella 1995, 2001).

### **Congelación con leche descremada**

La técnica se basa en agregar el diluyente en dos pasos. Una primera dilución se realiza a 31°C en base a lactosa y yema de huevo, y luego de un período de equilibrio a 4°C (90 a 120 minutos) se agrega el segundo diluyente en base a leche descremada y glicerol (en dos o tres fracciones cada 10-20 minutos). Luego de otro período de equilibrio de 1 a 2 horas se realiza la congelación.

La concentración final es de 160 a 200 millones de espermatozoides por ml, lo que determina 40 a 50 millones por dosis (pajuelas de 0,25 ml).

La lactosa-yema de huevo más el eyaculado deben ser la 3/5 partes del volumen final, mientras que 2/5 restante se completa con el diluyente leche descremada y glicerol.

La leche descremada se prepara disolviendo 10 g de la misma en 90 ml de agua destilada. Se pone a ebullición en baño María durante 15-20 minutos. Se deja enfriar y se agrega 100000 U.I de penicilina y 0,1 g de estreptomycin. La leche preparada se puede conservar en la heladera durante 3-4 días.

La congelación con pajuelas o pastillas se realiza de la forma ya descrita en la congelación con Tris.

En nuestras condiciones se ha encontrado que el uso de la leche descremada no sería conveniente congelando en forma de pastillas, tampoco se justificaría su utilización congelando en pajuelas debido a que es más engorrosa la técnica de congelación con leche descremada (dos pasos) frente a la técnica a base de Tris (un paso). No obstante se obtuvo, realizando la técnica en un paso (agregado de leche descremada y glicerol a 31°C) resultados similares (Fernández Abella 1995, Fernández Abella et al. 2001, Yániz et al. 2008).

Los componentes básicos de un diluyente son:

- agua, que se comporta como solvente de los componentes seminales y del diluyente;
- sustancias disueltas iónicas y no iónicas, para mantener la osmolaridad y tamponar el pH del medio;
- sustancias orgánicas, con capacidad para impedir el choque de frío (por lo general yema de huevo o leche);
- azúcares simples como forma de energía;
- antibióticos para controlar agentes microbianos;
- un agente crioprotector (glicerol o DMSO).

#### **2.5.2.4 Descongelación**

La descongelación del semen se realiza a 37-45°C. Si el semen fue congelado en pajuelas las mismas se sumergen durante 40 segundos (baño María), para ser secadas posteriormente con papel higiénico. Se corta la punta sellada con el alcohol polivinílico y se coloca en el aplicador de semen (transcap) previa introducción en aspic (vaina con piston).

Si el semen fue congelado en pastillas se debe descongelar en un diluyente similar a la solución madre. De no conocer el diluyente de su congelación puede utilizarse suero fisiológico o citrato de sodio al 3%. Las pastillas se vierten en los tubos de ensayo conteniendo 3 o 4 gotas por tubo.

No conviene descongelar muchas dosis, sino realizar en tandas, de acuerdo a las necesidades y velocidad de la inseminación. Aquellas pastillas que se caen al suelo no se deben utilizar.

Al descongelar el semen, este debe tener 30-40% de espermatozoides móviles. Luego de 3-4 horas de incubación no debe disminuir sensiblemente. Para realizar la misma se utiliza 1-2 cc de solución de citrato de sodio al 2,7%.

El agregado de antioxidantes (acetato de alfa tocoferol y butiloxitoluol), así como prostaglandinas, oxitocina, ergonovina, fenilerina, en el momento de la descongelación mejora el transporte del semen aumentando su fertilidad (Gustafsson et al., 1975; Shaildulin, 1978; Harwk, 1983; Anil et al, 2006). En nuestro país, Castrillejo y Rodríguez (1981) lograron mejorar la fertilidad en el semen de buena calidad (de 50 a 64%) con el agregado de 10 microgramos de prostaglandina F2 alfa, sin obtener respuesta cuando el esperma era de baja calidad (Fernández Abella 1995, Fernández Abella et al. 2001, Anil et al. 2006).

#### **2.6 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL**

La inseminación artificial es el acto de introducir semen en los genitales de la hembra, junto a otra serie de

procedimientos que acompañan este acto (Durán del Campo, 1993). De esta manera según su complejidad y expectativas de éxito, se diferencian en inseminación vaginal, cervical e intrauterina (Evans y Maxwell 1990, Milczewski et al. 2000, Wulster et al. 2004).

La inseminación vaginal, es el método más rápido y sencillo cuando se utiliza semen fresco diluido, pero requiere una dosis de semen mayor que si se utiliza alguno de los otros métodos. En términos generales no es un método recomendable pero puede ser útil cuando el tiempo de inseminación es limitado, o en hembras vírgenes en las cuales la estrechez de la parte vestibular no permite la penetración del espéculo.

La inseminación cervical, es el método más comúnmente usado cuando el semen es fresco. Exige un equipo simple y permite inseminar gran cantidad de ovejas en poco tiempo, obteniendo altos resultados de fertilidad comparables a la monta natural.

Los resultados de la inseminación cervical con semen congelado-descongelado han sido bajos, por lo cual se ha intentado inseminar por inseminación intrauterina, teniendo resultados mejores. Esta técnica implica una cirugía menor (laparoscopia).

Como ventaja, en cuanto a mejora genética la inseminación artificial con semen congelado, permite la posibilidad de usar carneros genéticamente superiores, y dado que estos dejan más descendencia que las hembras, se hace hincapié en la selección de estos carneros (Evans y Maxwell, 1990). Esta ventaja es mantenida en el tiempo con semen congelado, incluso después de muerto el reproductor, y potencializado por la cantidad de dosis que se puede congelar en comparación con el uso directo del carnero (Evans y Maxwell 1990, Milczewski et al. 2000, Wulster et al. 2004).

También las técnicas de inseminación artificial y el uso de semen congelado han permitido el transporte de semen a grandes distancias, logrando la incorporación de "sangre nueva", sin la necesidad de transportar machos, ventaja que

tiene importancia en traslados fuera de fronteras, reduciendo los costos y evitando problemas sanitarios por inclusión de enfermedades de otras regiones, e incluso al evitar el contacto entre machos y hembras se eliminan problemas de propagación de enfermedades venéreas y otras (Evans y Maxwell, 1990).

La inseminación artificial también presenta como ventaja, la posibilidad de usar semen de carneros que por alguna razón no pueden realizar la monta, ya sea por lesiones o por edad, pero que tienen suficiente valor genético como para su conservación y utilización por inseminación artificial (Evans y Maxwell 1990, Milczewski et al. 2000).

La inseminación artificial puede reducir la fertilidad comparada con inseminación natural, en caso de mala manipulación o poco cuidado del semen (Evans y Maxwell, 1990).

#### **2.6.1 Método vaginal a ciegas**

El semen es depositado en la cavidad vaginal requiriéndose gran cantidad de esperma. Este método desvirtúa uno de los principales fines de la I.A. o sea el uso más eficiente del esperma eyaculado.

Muchas veces se debe realizar por no ser posible la introducción de la cánula en el cervix, aumentando la dosis (dos o tres veces) para incrementar la probabilidad de fecundación.

#### **2.6.2 Método cervical**

Cuando el semen se deposita en el canal cervical a nivel del segmento más próximo al útero se denomina cervical profunda (vacunos) y cuando se deposita en el segmento más próximo a la vagina, se denomina cervical superficial.

La estructura del cuello del útero en la oveja impide que la cánula se introduzca más de 0,5-1,0 cm.

El cervix mide de 4 a 8 cm de longitud, presenta 3 a 7 pliegues en su mucosa, los cuales impiden o dificultan la penetración profunda de la cánula inseminadora.

La técnica de método cervical consiste en introducir el vaginoscopio con una mano, localizando el cuello del útero. Con la otra mano se introduce la pistola dosificadora (multidosis) dentro del vaginoscopio y con la ayuda del mismo se retira el mucus exterior para facilitar la observación del orificio. También se puede utilizar un hisopo de algodón para dicho fin, aunque este limpia las primeras ovejas y contamina las siguientes.

Localizado el orificio se introduce la cánula hasta hacer tope y antes de depositar se retira la misma unos milímetros para facilitar la salida del esperma. Se retira el vaginoscopio unos centímetros para evitar que el contacto del mismo sobre la pared vaginal determine que semen fluya hacia la vagina, lográndose con esa operación el plegamiento vaginal.

Luego de depositar la dosis de semen (80 a 100 millones) se retira la pistola y el vaginoscopio a la vez. Conviene que la cánula quede dentro del vaginoscopio para evitar que al ser liberada, la oveja rompa la misma de una patada.

La dosis con semen fresco no debe ser menor a 60 millones para no perder fertilidad. El volumen de la dosis no debe ser mayor a 0,06 cc (6 rulos). Cuando el mismo sea superior (semen conservado), se debe dividir la dosis en 2 o 3 pistolazos.

Cuando se usa semen conservado por vía cervical se deben utilizar dosis superiores a los 250 millones (Milczewski et al. 2000, Fernández Abella 2002).

La inseminación artificial (IA) con semen congelado es el único medio para evaluar carneros en centrales de prueba, sin necesidad de transportarlos y aún cuando estos no sean contemporáneos (Cueto y Gibbons, 2002).

### **2.6.3 Método intrauterino**

El semen se introduce en el cuerpo del útero permitiendo esto la manutención de la capacidad fertilizadora por 18-35 horas y utilizar menor cantidad de espermatozoides.

La técnica más utilizada es la laparoscopia que permite obtener resultados iguales o superiores a los obtenidos con el método cervical, permitiendo al igual que otras técnicas intrauterinas utilizar menores cantidades de células espermáticas (10-20 millones: semen fresco), lo cual significa una enorme economía especialmente trabajando con semen congelado (30-50 millones). Tiene la desventaja del precio del equipo y el grado de especialización de la persona que utiliza el laparoscopio (Fernández Abella 2002, Wulster et al. 2004).

A nivel internacional se recomienda para la IA con semen congelado ovino, emplear la técnica laparoscópica y el uso de la sincronización de estros mediante progestágenos intravaginales y la administración de Gonadotropina Coriónica equina (eCG)(Cueto y Gibbons 2002, Wulster et al. 2004).

## **2.7 SINCRONIZACIÓN DE CELOS**

Se conocen varios métodos de sincronización de celos, pudiéndose agrupar en dos categorías: farmacológicos (progestágenos y prostaglandinas) y naturales (efecto macho).

### **2.7.1 Métodos farmacológicos**

Estos se pueden dividir en dos tipos según su principio fisiológico, los que utilizan progestágenos o prostaglandinas.

Los progestágenos actúan estimulando la acción del cuerpo lúteo natural. Cuando se suministra diariamente por 12-14 días progestágenos a ovejas, no aparece ni estro ni ovulación. A los 2-3 días de suspendido el tratamiento se observa la presencia de celo. Este tratamiento actúa en

forma similar que un cuerpo lúteo; durante la presencia de progestágenos se suprime la liberación de gonadotropinas hipofisiarias y cuando descienden los niveles de progestágenos la hipófisis incrementa la liberación de gonadotropina, lo cual estimula el crecimiento folicular y la ovulación (Evans y Maxwell 1990, Méndez et al. 2000, González et al. 2005).

Para la aplicación de progestágenos, existen dos métodos: el intravaginal y el subcutáneo.

Existen dos formas de aplicar el progestágeno intravaginal: esponjas (pesarios) o el CIDER (liberador de sustancias internamente controlado), este último no está suficientemente controlado como para asegurar su efecto sobre la fertilidad.

La esponja viene con una cuerda incorporada a efectos de facilitar su retiro, y son colocadas dentro de la vagina con la ayuda de un aplicador formado por un tubo de plástico por dentro del cual se empuja la esponja con la ayuda de una varilla a una profundidad de 10 o 15 cm. Cada esponja debe estar embebida con antibióticos a efectos de evitar infecciones.

Debe tenerse cuidado, al momento de retirar el aplicador, de verificar que la cuerda asome de la vagina unos 15-20cm. Entre distintas aplicaciones debe desinfectarse el aplicador, de manera de evitar contagios y propagación de infecciones.

Luego de transcurrido 12-14 días de aplicadas las esponjas, se retiran. Esto se realiza tirando la cuerda hacia fuera y ligeramente hacia abajo con suavidad y firmeza. La salida de la esponja puede venir acompañada de líquido mal oliente, el cual es normal sino viene acompañado de pus o sangre, lo cual estaría indicando infección vaginal. Estas hembras serían tratadas con antibióticos y retiradas del programa de inseminación. No debería esperarse más de 1-2% de pérdidas de esponjas, si estas fueron colocadas en forma adecuada.

Luego de retiradas las esponjas, las hembras presentaran celo en 2-3 días. La fertilidad de las hembras inseminadas en este primer celo, generalmente es más baja que hembras no tratadas; esto se puede superar con doble inseminación cervical con dosis mayores, inseminación intrauterina, tratamiento con gonadotropinas exógenas para estimular el estrógeno y la ovulación, o incluir 5-10% de retarjos en el momento de retirar las esponjas, para estimular el estrógeno y la ovulación (Evans y Maxwell 1990, González et al. 2005).

Si bien los progestágenos inducen la ovulación, la misma no ocurre en la totalidad de los animales. Para remediar esto se usan hormonas que induzcan la ovulación, como por ejemplo las gonadotropinas. La más conocida es la que se extrae del suero de la yegua preñada: PMSG o eCG (gonadotropina coriónica equina) mejora la sincronización del celo y de la ovulación lo que repercute en la fertilidad obtenida (Méndez et al. 2000, Fernández Abella 2008).

Los implantes subcutáneos están impregnados en progestágenos y logran también un buen control del estrógeno. Se coloca generalmente bajo la piel de la oreja o bajo el hoyuelo de la pata delantera con la ayuda de un aplicador especial con una aguja.

Este método no es tan usado en establecimientos comerciales ya que implica pequeñas operaciones quirúrgicas consumiendo mucho tiempo, produciendo estrés al animal, deja heridas abiertas con posibilidad de infectarse (Evans y Maxwell, 1990).

El método de prostaglandinas se basa en la administración de prostaglandina F2 alfa o prostaglandina sintética, para cortar la duración del cuerpo lúteo. Este método depende necesariamente de la existencia de un cuerpo lúteo lo cual determina su utilización sólo para épocas reproductivas, a diferencia del método de progestágenos que se puede usar en cualquier momento del año.

Cuando la oveja está en la mitad o al final de la fase luteal del ciclo estral, el cuerpo lúteo puede destruirse

administrando prostaglandina F2 alfa. Al romperse el cuerpo lúteo, el efecto inhibitor de la progesterona sobre la hipófisis se anula, con lo que aumenta la liberación de gonadotropina. Así se estimula el crecimiento folicular y el estro se manifiesta a los 2-3 días.

Las prostaglandinas se administran en forma intramuscular y para sincronizar totalmente un rebaño, se deben aplicar dos inyecciones con un intervalo de 10-14 días, ya que el cuerpo lúteo responde a la prostaglandina entre los días 5-14 del ciclo estral. De esta forma la mayoría de las ovejas ciclan 2-3 días después de la segunda inyección.

La respuesta a la prostaglandina y la fertilidad es variada, pero la fertilidad en el celo inducido es menor que para el caso del tratamiento con esponja con progestágenos. Para superar esta baja fertilidad se puede adoptar las mismas soluciones que para las esponjas.

El método de sincronización natural (efecto macho), consiste en la introducción masiva de machos (< 4%) que induce a las ovejas en anestro superficial a la ovulación y sincroniza los celos.

El uso del "efecto macho" junto a la sincronización hormonal mejora la misma y permite reducir las dosis de gonadotropina necesarias.

Lo más recomendable es introducir los machos al día siguiente de retirar la esponja o Cider, ya que esto permite mejorar la tasa ovulatoria y por ende la fertilidad. Porcentajes mayores al 6% de retarjos son más eficientes, así como la introducción de otras ovejas en celo al momento de retirar los pesarios.

Cuando se utilizan prostaglandinas, es aconsejable que la introducción de los machos (con arneses o tiza), se realice 36 horas posteriores a la segunda aplicación.

No olvidar que los retarjos son más efectivos que los capones u ovejas androgeneizadas para inducir el celo y la ovulación (González et al. 2005, Fernández Abella 2008).

## **2.8 SELENIO**

### **2.8.1 Generalidades**

El Selenio forma parte de la glutatión peroxidasa, enzima que cataliza la eliminación del peróxido de hidrógeno, con lo que protege a las membranas de la oxidación. La glutatión peroxidasa contiene cuatro átomos de selenio y forma una segunda línea de defensa tras la vitamina E, ya que algunas peroxidases permanecen a pesar de que los niveles de vitamina E sean adecuados. El selenio tiene un efecto ahorrador de vitamina E, facilitando la absorción normal de la vitamina. Se debe a su intervención en la conservación de la integridad del páncreas, y por lo tanto, asegurando una adecuada digestión de las grasas. Además el selenio reduce la cantidad de vitamina E necesaria para mantener la integridad de las membranas lipídicas y colabora en la retención de vitamina E en el plasma. La vitamina E ahorra selenio al mantener al elemento mineral en su forma activa y evitar su pérdida. Reduce la producción de hidroperóxido y, por lo tanto, la cantidad de glutatión peroxidasa necesaria para proteger a las células. No obstante existen límites en la sustitución mutua entre selenio y la vitamina E (McDonald et al. 1995, Burk y Hill 2005).

En los rumiantes, la deficiencia de selenio, nutriente relacionado con la vitamina E, reduce la fertilidad (McDonald et al., 1995).

El selenio es un elemento traza, los elementos trazas son necesarios para la síntesis de vitaminas, hormonas de producción, actividad de enzimas, formación de colágeno, síntesis de tejidos, transporte de oxígeno, producción de energía y otros procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento, reproducción y salud (Burk y Hill 2005, Gurdogan et al. 2006).

Internacionalmente se conoce que la administración de Selenio mejora la fertilidad de los carneros, la fertilidad de las ovejas, la supervivencia neonatal y el crecimiento de los corderos (Piper et al. 1980, Langlands et al. 1991a,

1991b, 1991c, Rooke et al. 2003, Ali et al. 2004, Balicka-Ramisz 2006).

### **2.8.2 Consumo de selenio**

La concentración de selenio en las pasturas y en sangre indica una diferencia marginal durante el verano. La respuesta en el peso vivo y el crecimiento de lana mostró que la concentración en las pasturas de al menos un elemento durante el verano fue por debajo de los niveles críticos de producción. Para elementos trazas solo las concentraciones de selenio y zinc fueron por debajo de los niveles recomendados, siendo el mínimo recomendado de selenio de 0.05 mg/kg. DM. Las concentraciones de todos los macroelementos excepto el calcio y el magnesio disminuyeron en la pastura a medida que el verano progresaba (White et al., 1992).

### **2.8.3 Reproducción y selenio**

En nutrición esta bien claro que el sinergismo entre el selenio y la vitamina E, tiene un efecto antioxidante.

Diferentes investigaciones indican que estos dos micronutrientes juegan un papel fundamental en la espermatogénesis. Deficiencias de vitamina E producen degeneración testicular. La vitamina E tiene un efecto antioxidante en los espermatozoides por lo que aumenta la motilidad y capacidad fecundante de los mismos.

El Selenio es muy importante para el desarrollo de las células de Sertoli y por ende en la capacidad de producción de espermatozoides maduros y de reservas espermáticas testiculares.

Niveles adecuados de selenio mostraron un menor número o porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas, como así también una mayor concentración de ATP en las células espermáticas y una mayor tasa de fertilización (Mateos 1997, Kendall et al. 2000).

En animales alimentados con dietas ricas en selenio, se pudo observar un mayor número de células de Sertoli y de

espermatidas redondas. En cambio se pudo observar que los animales que consumían dietas ricas en vitamina E, el número de células de Sertoli no se modificaron.

Los resultados indican que el selenio tiene un papel muy importante en la determinación del número de espermatozoides de reserva y células de Sertoli, mientras que suplementos de vitamina E, no afectó dichos criterios.

A causa de la temporada de cría y la poligamia del carnero, las necesidades de producción de semen serán relativamente grandes en una breve temporada de reproducción y esto puede provocar una deficiencia de selenio, lo que da lugar a una disminución en la calidad de semen.

La administración de selenio mediante "bolo de vidrio" generaría un aumento significativo de la motilidad, la proporción de espermatozoides vivos y la proporción de membranas intactas indicado por el HOS (Kendall et al., 2000).

#### **2.8.4 Metabolismo del selenio**

Una de las fuentes de Selenio en el forraje, como la selenometionina, se libera en el rumen y no puede absorberse en dicho órgano en una cantidad apreciable (Hidiroglou y Jenkind 1973, Surai 2006).

En el abomaso, la absorción es limitada, de allí pasa a la primera porción del intestino delgado, para absorberse principalmente en el yeyuno (Wright y Bell 1996, Surai 2006). La absorción de este elemento en poligástricos alcanzaría el 35% (Underwood 1977, Surai 2006).

En un estado deficitario de Selenio, se aumenta su absorción y el exceso del mineral en dieta, es excretado por heces y orina (Ceballos et al. 1996, Yu y Beynen 2001, Surai 2006).

Después de la absorción intestinal, el Selenio es llevado al hígado y vertido nuevamente a la circulación sanguínea, se distribuye en los diferentes órganos del

cuerpo y se almacena principalmente en los tejidos que contienen proteínas (Krishnamuti et al. 1989, Yu y Beynen 2001).

Posterior al proceso de absorción y distribución a los tejidos, el Selenio es incorporado en la estructura de la enzima antioxidante Glutación Peroxidasa GSH-Px (Levander 1986, Yu y Beynen 2001).

La excreción del Selenio es realizada por diferentes vías en el cuerpo, la vía fecal es la más importante seguido de la vía urinaria, biliar, salivar y pulmonar (Langlandsy et al. 1991, Yu y Beynen 2001).

#### **2.8.5 Selenoproteínas y Glutación Peroxidasa (GSH-Px)**

La Glutación Peroxidasa (GSH-Px), es una selenoproteína, enzima de 80.000 Daltons, con 4 sub-unidades que contienen 4 átomos-gramo de Selenio por mol. Esta enzima cataliza la conversión del Peróxido de Hidrógeno a agua y peróxido lipídico en alcohol. Estos peróxidos son agentes que causan estrés oxidativo.

El Selenio como parte esencial de la GSH-Px se reconoce generalmente por su función antioxidante (Arthur 1997, Burk y Hill 2005, Muiño et al. 2008).

La vitamina E no necesariamente debe administrarse con Selenio. Su acción, es sobre la membrana celular, su función es prevenir la formación de peróxidos grasos por secuestro de radicales libres antes de que ellos inicien la peroxidación grasa (Salvatore et al., 1995).

#### **2.8.6 Glutación peroxidasa (GSH-Px) en las patologías asociadas a deficiencias de selenio en rumiantes**

El selenio tiene función protectora contra el daño oxidativo, al ser un componente de la enzima glutación peroxidasa.

La GSH-Px presenta además el 75% del selenio sanguíneo, estando contenido en el interior de los glóbulos rojos a los que se incorpora durante la eritropoyesis (Hill et al.,

2007). El hecho de que exista una fuerte correlación entre selenio sanguíneo y GSH-Px, y que su determinación en sangre sea rápida y sencilla, hace que esta enzima se perfile en la actualidad como una de las medidas indirectas más importantes en el diagnóstico de procesos carenciales de selenio (Wheatley y Beck 1988, Marti et al. 2007).

La GSH-Px dependiente de selenio desempeña un papel central en los procesos de óxido-reducción celulares, al catalizar las reacciones que ayudan a destruir tanto al agua oxigenada como a los peróxidos de ácidos grasos (hidroperóxidos orgánicos) que se generan en el organismo. Los peróxidos son reducidos mediante la reacción general catalizada por la GSH-Px, en la cual el glutatión reducido (GSH) actúa como donante de hidrógeno; a continuación el glutatión oxidado se reduce de nuevo, es decir, es regenerado por reacciones subsiguientes, mediante una reacción en la que participan la glutatión reductasa y un donante de hidrógeno (NADPH+H<sup>+</sup>).

La producción endógena de radicales libres ocurre durante el metabolismo aerobio habitual. En condiciones normales las células metabolizan la mayor parte del oxígeno (95%) hasta agua mediante una vía de reducción tetravalente ( $O_2 + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$ ), mientras que un pequeño porcentaje (5%) lo hace mediante una reducción univalente, formándose productos intermediarios altamente tóxicos como anión superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxilo ( $OH^-$ ), junto con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). No obstante, los organismos evolucionados han desarrollado una serie de mecanismos de defensa contra estas formas de oxígeno altamente reactivas.

Básicamente estos mecanismos antioxidativos pueden clasificarse dentro de dos grandes grupos; los enzimáticos y los no enzimáticos. El grupo de enzimas que catalizan las reacciones de los radicales libres está integrado por la superóxido-dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa; todas ellas actúan acelerando las reacciones por las cuales los radicales libres se reducen rápidamente a agua.

En situaciones donde existe una importante actividad metabólica (etapas de crecimiento y desarrollo activos,

procesos inflamatorios y otras fuentes productoras de estrés), ocurre una mayor demanda tisular de oxígeno y parte de él se metaboliza siguiendo la vía univalente, generándose multitud de radicales libres nocivos. Si la carga de oxidantes supera las defensas antioxidantes locales y generales, estos compuestos altamente reactivos lesionan los tejidos al fijarse a los componentes estructurales básicos de las células: ácidos nucleicos (producción de tumores y enfermedades auto inmunes), proteínas (generando alteraciones enzimáticas de las permeabilidades iónicas de la membrana), carbohidratos (patologías asociadas a la diabetes, cataratas y enfermedades reumáticas) y lípidos (desencadenando una peroxidación lipídica responsable de cambios estructurales y rotura de la bicapa lipídica de las membranas celulares) (Lunec y Blake 1990, Burk y Hill 2005, Muiño et al. 2008).

Estas alteraciones orgánicas, relacionadas con disturbios oxidativos, adquieren gran importancia con animales con deficiencia de selenio en la dieta, asociados o no a bajas concentraciones de vitamina E en la misma, especialmente en situaciones donde existe una intensa actividad metabólica que hace que los mecanismos de defensa celulares se desborden y aparezcan numerosos efectos tóxicos.

El selenio también muestra una gran influencia en la fertilidad del macho afectando a la calidad del semen.

Se encontró que el plasma seminal contiene elevadas cantidades de GSH-Px, cuya función es proteger a la membrana del espermatozoide del ataque peroxidativo; además, en la cola del gameto masculino hay un selenopéptido (PGH-Px) que hace que ante una deficiencia de selenio se produzca una fractura en la pieza media de la cola del espermatozoide (Capaul et al. 1988, Marti 2007).

### **2.8.7 Selenio y espermatozoides**

La PHG-Px (de la sigla del inglés Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase) es una variante de GSH-Px y juega un papel importante como antioxidante en los testículos postpuberales. Sin embargo, en el espermatozoide

maduro, la PHG-Px se encuentra de manera exclusiva en la cápsula mitocondrial de la porción media de la célula y su función es desconocida (Sprinker et al. 1971, Marti et al. 2007, Uysal y Bucak 2007).

Wennemuth et al. (2004) publican los resultados de un estudio en ratones según los cuales la PHG-Px cambia sus características físicas y sus funciones biológicas durante la maduración del espermatozoide, de una peroxidasa soluble en espermátides a una enzima inactiva pero que se polimeriza para formar una malla proteica que brinda estabilidad estructural a la porción media mitocondrial, en los espermatozoides maduros. Tal parece que esta variación se alcanza al incorporar a su estructura puentes disulfuros, derivados de la exposición de las células a hidroperóxidos en presencia de bajas concentraciones de glutatión, tal como ocurre en los estadios avanzados de la espermatogénesis. Además, la proteína constituye el 50% del material de la cápsula mitocondrial.

Los autores afirman que los espermatozoides maduros dependen de la PHG-Px como proteína estructural, puesto que las alteraciones de la morfología de la porción media de las células, que se observan en la deficiencia de Selenio, probablemente resultan de una síntesis alterada de la selenoproteína. Por lo tanto, concluyen que no es su capacidad antioxidante sino la habilidad para formar un elemento estructural lo que es fundamental para la fertilidad.

La deficiencia de selenio en la dieta generó un retraso en el crecimiento testicular durante el desarrollo puberal. Las gónadas del macho mostraron una atrofia severa, los túbulos seminíferos redujeron considerablemente su diámetro. Las alteraciones fueron reversibles y la espermatogénesis fue restaurada con una alimentación adecuada que incluya selenio. Los resultados indican que la morfología testicular y sus funciones se ven afectadas por una grave deficiencia de selenio, y que este elemento es necesario para la biosíntesis de testosterona, formación y desarrollo normal de los espermatozoides (Behne et al. 1996, Marti et al. 2007).

Los resultados indican que el suplemento de selenio a la dieta tiene un papel importante en la determinación de la concentración espermática y en el número de células de Sertoli, mientras que los suplementos de vitamina E no afecto a estos criterios (Guzman-Marín et al., 2000).

Los espermatozoides localizados en el epidídimo con deficiencia de selenio, presentan reducción o pérdida de la motilidad y muestran defectos en el flagelo principalmente en la pieza media (McCoy y Weswig, 1969). También la deficiencia de selenio reduce el tamaño de los testículos, y una prolongada deficiencia atrofia el epitelio seminífero (Sprinker et al. 1971, Hill et al. 2007).

### **2.8.8 Estrés oxidativo y administración de antioxidantes**

La alteración de los espermatozoides causada por una producción excesiva de radicales libres se ha estudiado extensamente como uno de los mecanismos de esterilidad. Las células que viven en condiciones aeróbicas enfrentan continuamente la paradoja del oxígeno. El oxígeno es necesario para la vida, pero sus metabolitos, como los radicales libres pueden modificar las funciones celulares, poner en peligro la supervivencia celular o ambas cosas. Por lo tanto, se debe inactivar continuamente el exceso de radicales libres y conservar solo una pequeña cantidad necesaria para mantener la función celular normal. El estrés oxidativo surge como consecuencia de la producción excesiva de radicales libres y del deterioro de los mecanismos de defensa antioxidante (Agarwal y Ferreira 2000, Uysal y Bucak 2007).

Las concentraciones moderadamente altas de peróxido de hidrógeno no afectan la viabilidad de los espermatozoides, pero los inmovilizan, generalmente por agotamiento del ATP intracelular y disminución ulterior en la fosforilación de las proteínas del axonema. Las altas concentraciones de peróxido de hidrógeno inducen la peroxidación lipídica y producen la muerte celular (Agarwal y Ferreira 2000, Muiño et al. 2008).

Gómez et al. (1980), señalaron que los niveles de producción de radicales libres por las poblaciones

espermáticas puras se correlacionaron negativamente con la calidad del semen.

El vínculo entre una mala calidad de los espermatozoides y el aumento de la generación de radicales libres, es la presencia de excesivo citoplasma residual. Los espermatozoides sufren una notable transformación durante la etapa final de su diferenciación, por lo cual pierden el componente citoplasmático de la célula durante la liberación de la espermátide madura de las células de Sertoli. Tras esta liberación, cualquier citoplasma residual asociado con los espermatozoides se retiene a nivel de la pieza media como una masa citoplasmática individual. Si este citoplasma residual ocupa más de un tercio de la cabeza espermática, se lo denomina gota espermática. En estas circunstancias, se cree que los espermatozoides liberados son inmaduros y deficientes funcionalmente (Marti et al., 2007).

Parte de la reducción de la motilidad espermática y la fertilidad asociado a la criopreservación puede ser debido al daño oxidativo de la excesiva o inadecuada formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Guthrie y Welch 2006, Marti et al. 2007).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 ENSAYO I**

##### **3.1.1. Localización**

El ensayo fue realizado en la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía en el departamento de Salto (EEFAS), ubicada en el paraje San Antonio, tercera sección judicial del departamento, kilómetro 21 de la Ruta 31 (31°25' latitud sur).

##### **3.1.2. Animales**

Se utilizaron 10 carneros de la raza Merino Australiano, que pesaron en promedio 58 kg (máx: 67 kg y mín: 45 kg). De los 10 carneros, 2 eran de 2 dientes, 6 de 4 dientes, y 2 de boca llena. La condición corporal promedio fue 4,0 y la circunferencia escrotal promedio 32,6 cm (máx: 40 cm y min: 28 cm). Los carneros fueron manejados como un solo lote y pastorearon campo natural.

##### **3.1.3. Tratamiento**

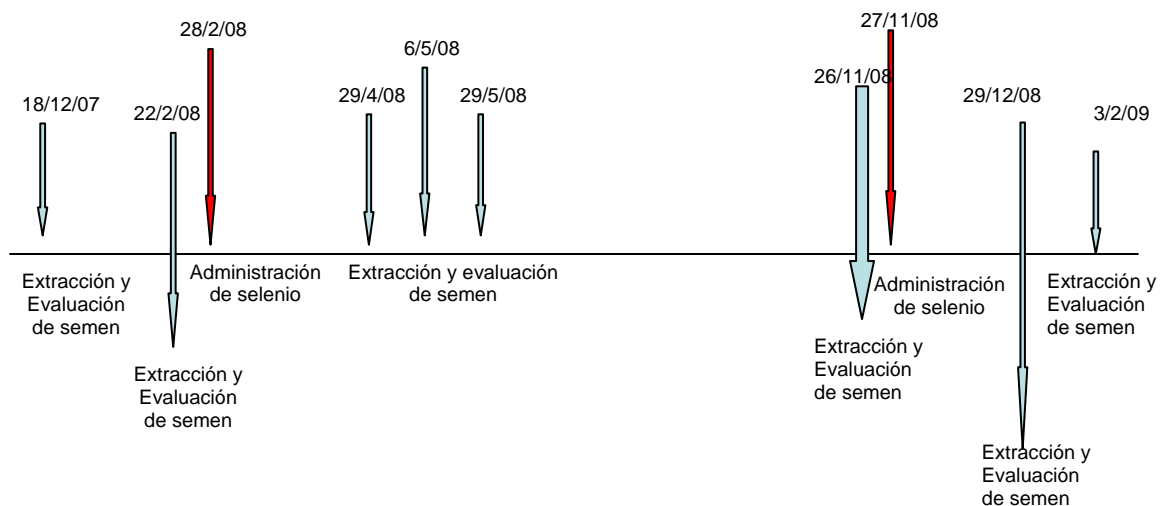
Los carneros se separaron al azar en dos lotes, uno tratado con selenio y el otro lote como testigo.

Al lote tratado con Selenio, se le administró a cada carnero 1,5 mL de Selfos Plus, vía subcutánea. Este compuesto es elaborado por el laboratorio argentino AGROINSUMOS S.A; contiene Selenio, Fósforo y Vitaminas (A, D y E).

CUADRO No.1. Composición de Selfos Plus

Selenito de Sodio	0,347 g
Vitamina A (Retinol Palmitato)	1200000 U.I
Vitamina D2 (Ergocalciferol)	600000 U.I
Vitamina E (DL-a-Tocoferol Acetato)	2500 U.I
Glicerofosfato de Sodio	30 g
Excipientes c.s.p	100 mL

FIGURA No.2. Línea de tiempo para actividades realizadas (Ensayo I)



El 18 de diciembre del 2007, se realizaron las primeras medidas que consistió en medir peso, circunferencia escrotal, condición corporal y edad; además se extrajo semen y se realizaron pruebas macroscópicas (color, volumen y movilidad en masa).

El 22 de febrero del 2008, se colectó semen a los diez carneros evaluados y se realizaron pruebas macroscópicas.

El 28 de febrero se inyectó por vía subcutánea 1,5 mL de Selfos Plus, a seis de los diez carneros evaluados. Se realizaron dos extracciones de semen por carnero y se midió la concentración espermática (primer y segundo eyaculado).

El 29 de abril, se realizaron 2 extracciones de semen por carnero, éste se evaluó mediante pruebas macroscópicas y se midió la circunferencia escrotal.

El 6 de mayo, se midió la condición corporal según técnica de Jefferies (1961) y se pesaron los carneros. Se realizaron dos colectas de semen por carnero.

El 29 de mayo y el 26 de noviembre del 2008, se realizaron extracciones de semen de carneros tratados y sin tratar, evaluándose la calidad.

El 27 de noviembre del 2008, se administró otra dosis de selenio a los carneros.

El 29 de diciembre del 2008 además de determinar la calidad, se evaluó la concentración, volumen y movilidad masal del semen. El 3 de febrero del 2009, se evaluó lo mismo excepto la determinación del volumen seminal en ambos grupos de carneros.

#### **3.1.4 Manipulación y análisis del semen**

La colecta de semen se realizó por medio de una vagina artificial y como estímulo para la colecta, se utilizó una oveja que estaba en celo al momento de las colecciones.

Una vez recolectado el semen se midió el volumen del eyaculado, la concentración y la movilidad espermática.

El volumen se determinó mediante una jeringa graduada.

A través del color del eyaculado y el siguiente cuadro se estimó la concentración espermática mínima.

CUADRO No.2. Determinación de la concentración espermática a través del color del eyaculado

<b>Tonalidad</b>	<b>concentración mínima estimada (millones/mL)</b>
crema muy oscuro	4000
crema oscuro	2800
crema	2000
crema claro	1600
lechoso	1000
lechoso claro	500
nublado	100
claro	insignificante

FUENTE: Fernández Abella y Villegas, modificado  
Fernández Abella (2002).

Para determinar la movilidad en masa, se observa en la propia copa recolectora a poca distancia del observador (en presencia de luz). Se aprecian ondas que son resultado de la concentración espermática, movilidad de los espermatozoides y porcentaje de células espermáticas vivas (Fernández Abella, 1995).

CUADRO No.3. Relación entre la movilidad grupal (masal) y el porcentaje de espermatozoides móviles del semen (movilidad individual)

Grado	Movilidad masal (macroscópica)	Movilidad individual (microscópica)
0	sin corrientes	sin movimiento progresivo
1	pocas corrientes	20% de movimiento progresivo
2	muchas corrientes moderadas	40% de movimiento progresivo
3	muchas corrientes	60% de movimiento progresivo
4	muchas corrientes rápidas	80% de movimiento progresivo
5	numerosas ondas de tipo tumultuoso rápidas y vigorosas	casi 100% de movimiento progresivo

FUENTE: Moule (1951).

Para pesar los carneros se utilizó una balanza mecánica, para la condición corporal se utilizó la escala de Jeffries 1961 y para medir la circunferencia escrotal se utilizó una cinta métrica (exactitud  $\pm 1$  cm).

La concentración se midió a través de un densímetro de la siguiente forma:

Constitución de la suspensión con semen de carnero:

A) Se toma en el densímetro 10 mL de una solución salina (99% NaCl y 1% Formol).

B) Se toma 0,05 mL del semen a ser examinado (lo más exacto posible) y agregue a la solución de NaCl.

C) Se cierra el instrumento con su dedo pulgar y voltéelo dos o tres veces cuidadosamente para suspender las

células espermáticas uniformemente dentro de la solución de NaCl.

CUADRO No.4. Relación entre la lectura en el densímetro con la concentración espermática (millones/mL)

lectura en el densímetro	Concentración espermática (millones/mL)
60	1000
55	1250
50	1500
45	1750
40	2000
35	2250
30	2500
25	3000
20	3500
10	4000

Para evaluar la calidad del semen se realiza la prueba de reducción del azul de metileno. Se mezcla igual cantidad de semen y de una solución al 0,05 % de azul de metileno. Luego se aspira la mezcla con una pajuela de 0,5 mL y se introduce la misma en agua tibia (35 a 48 °C). La prueba consiste en el tiempo que tarda la mezcla en virar del color azul al blanco (Fernández Abella, 2008).

CUADRO No.5. Calidad del semen según prueba de azul de metileno

Tiempo (min)	Calidad de semen
0 a 1	excelente
1 a 2	muy bueno
2 a 3	Bueno
3 a 5	Regular
+ de 5	Malo (no usar)

FUENTE: Fernández Abella (1995).

### **3.1.5 Materiales**

#### **3.1.5.1 Materiales utilizados para extracción y análisis de semen**

- 2 vaginas artificiales
- 6 copas recolectoras de vidrio
- 30 tubos de ensayo
- 1 conservadora de espuma plast
- 1 termo
- 1 termómetro
- 1 baño María
- 2 jeringas graduadas tipo insulina
- 1 densímetro
- Solución salina (NaCl)
- Formol
- Azul de metileno
- vaselina
- Agua destilada
- Cronómetro
- Toallas de papel
- Pistola de inseminación
- Vasos de bohemia
- Cánulas
- Agua (45°C)

#### **3.1.5.2 Limpieza y acondicionamiento de los materiales**

La vaina externa e interna de la vagina artificial, se limpia con agua y jabón, utilizando un cepillo. Luego se enjuaga repetidas veces con agua corriente, secándolas al aire.

Las copas recolectoras de semen, se lavan con agua y jabón, utilizando un cepillo. Luego se enjuaga con agua corriente, poniéndolas a secar a estufa; una vez secas se tapan con papel aluminio para guardarlos hasta su utilización.

El mismo tratamiento se realiza con los otros materiales de vidrio utilizados.

Las jeringas, densímetro y pistola de inseminar, se lavaron con agua y jabón; se desinfectaron con agua destilada y se secaron al aire

## **3.2 ENSAYO II**

### **3.2.1. Localización**

Este ensayo se realizó en el Establecimiento "Saudades", propiedad de Ofelia Piegas y María Ofelia Preve. Dicho establecimiento se localiza en Cerros de Vera, departamento de Salto (31° 50' latitud sur).

### **3.2.2. Animales**

Se utilizaron 381 ovejas de la raza Merino Australiano pertenecientes al Establecimiento, con condición corporal 2.5-2.75 y sincronizadas con progestágenos (esponja de MAP 60 mg, Laboratorio Universal) inserta en la vagina durante 14 días. Se eliminaron 6 ovejas que perdieron las esponjas.

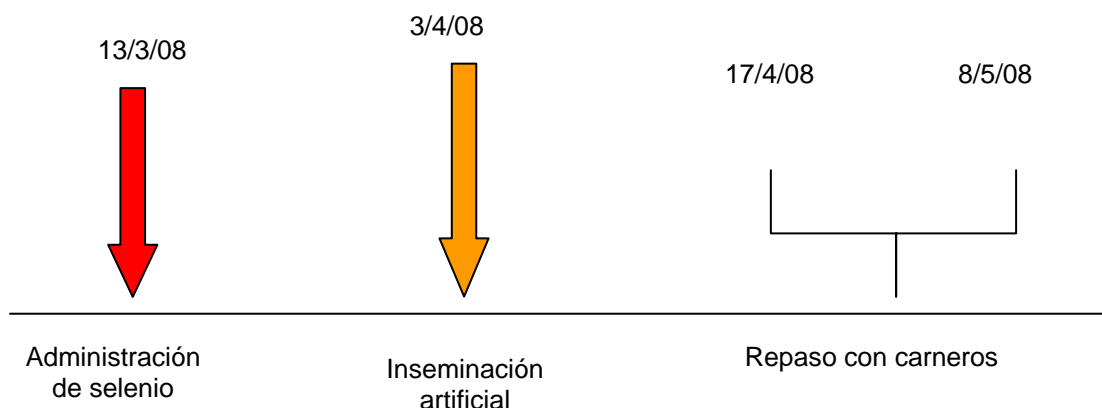
Se utilizaron 6 carneros de la raza Merino Australiano pertenecientes al Establecimiento, de 8 dientes y de buena calidad de semen.

### **3.2.3. Tratamiento**

Se realizaron dos lotes:

- 1) Inseminación artificial más repaso a 184 ovejas, con la mezcla de los eyaculados de 3 carneros tratados con Selenio (administración de 2 mL de Selfos Plus 3 semanas antes del servicio).
- 2) Lo mismo se le realizó a 191 ovejas, con la mezcla de los eyaculados de los 3 carneros sin tratar (testigos).

FIGURA No.3. Línea de tiempo para actividades realizadas (Ensayo II)



La inseminación artificial se realizó el 3 de abril del 2008 con semen fresco que se extrajo con vagina artificial.

El método de inseminación artificial usado fue el cervical superficial, el cual consiste en depositar el semen en el segmento del canal cervical más próximo a la vagina.

El repaso se realizó desde el 17 de abril al 8 de mayo del 2008, con y sin selenio administrado.

Se evaluó la fertilidad (inseminación artificial más repaso), la prolificidad y la fecundidad de ambos lotes (tratado y testigo).

### **3.2.4 Materiales**

#### **3.2.4.1 Materiales utilizados para la extracción de semen e inseminación artificial**

- vagina artificial
- vaselina
- 1 termo
- Agua (45°C)
- Termómetro

- 1 bandeja
- Pistola de inseminar
- Vaginoscopio
- Toallas de papel

La limpieza de los materiales fue igual que en el Ensayo I.

### 3.3. ENSAYO III

#### 3.3.1. Localización

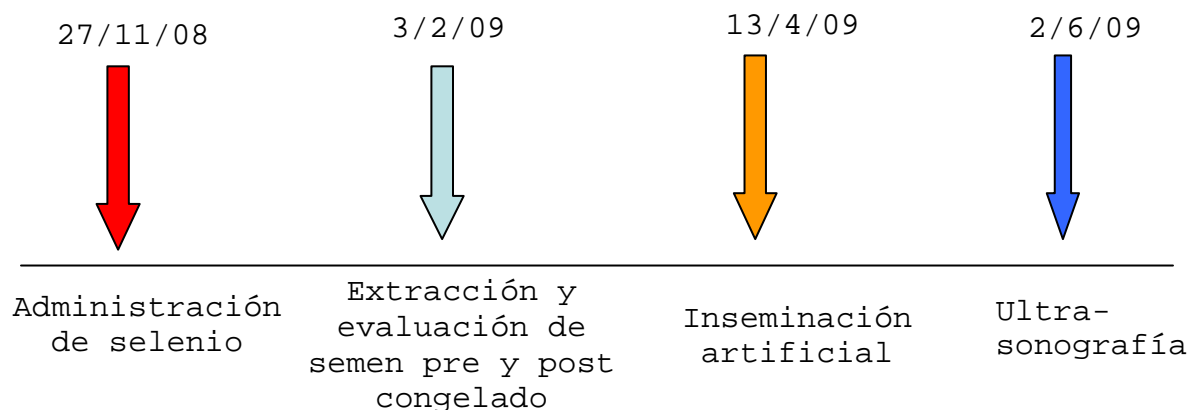
Establecimiento "Saudades".

#### 3.3.2. Animales

Se utilizaron 6 carneros de la raza Merino Australiano pertenecientes a la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía en el departamento de Salto. Se utilizaron 81 ovejas de la misma raza que los carneros, propiedad del Establecimiento "Saudades".

#### 3.3.3. Tratamiento

FIGURA No.4. Línea de tiempo para actividades realizadas (Ensayo III)



El 27 de noviembre del 2008 se administró 1,5 mL de selenio (Selfos Plus vía subcutánea) a 4 carneros y se dejaron 4 carneros como testigo (sin selenio).

El 3 de febrero del 2009 se extrajo semen a 3 de los 4 carneros tratados y a 3 de los 4 carneros sin tratar.

El semen de los 6 carneros utilizados fue analizado (concentración espermática, movilidad y volumen) previa congelación.

Se analizó la calidad post-congelado (movilidad) de cinco pajuelas de la mezcla de semen perteneciente a tres carneros tratados con selenio y la misma cantidad de pajuelas de semen congelado de los carneros sin tratar.

El 13 de abril del 2009, se inseminaron por laparoscopia (vía intrauterina) 41 ovejas con semen congelado de carneros tratados y 40 ovejas con el semen congelado de los carneros testigos. Dos días antes de la inseminación, se les retiró las esponjas a las ovejas y se les inyectó vía intramuscular 250 U.I de eCG (PMSG) a cada oveja.

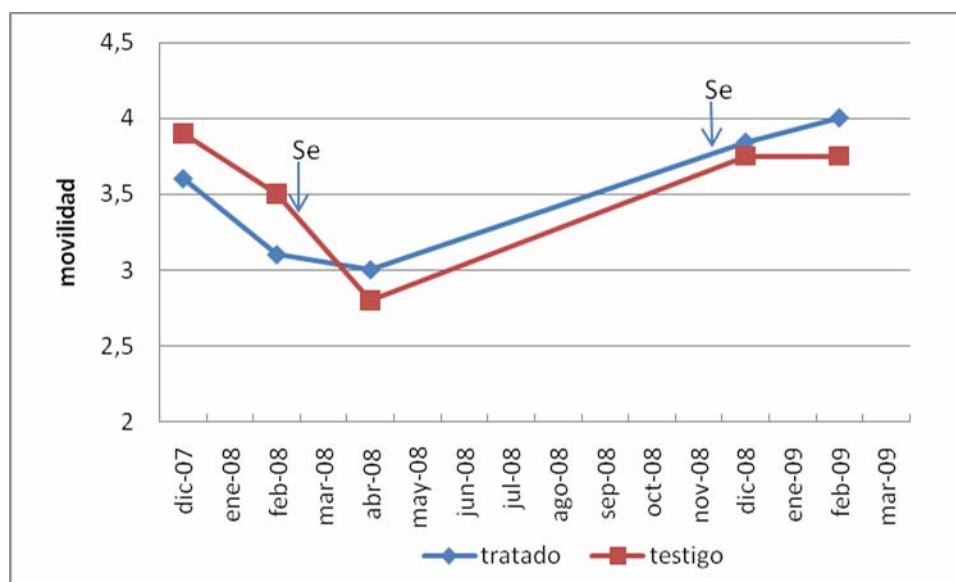
El 2 de junio del mismo año, mediante ultrasonografía se evaluó la fertilidad, la prolificidad y la fecundidad obtenidas.

#### **3.3.4 Análisis estadístico**

Se trabajó con distintos procedimientos provistos por el paquete estadístico SAS versión 8.0 (SAS Institute, 1999). Las características del semen que muestran una distribución normal y continua, se analizaron mediante el procedimiento GLM, utilizando la prueba "t" de Diferencia Mínima Significativa (D.M.S). Las características seminales de distribución discreta o porcentual, así como los parámetros reproductivos se analizaron mediante el GENMOD, mediante la prueba Kruskal & Wallis. Se analizaron los datos con un grado de significancia de 0.10.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1 ENSAYO I: EFECTO DEL SELENIO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES (VOLUMEN, MOVILIDAD MASAL Y CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA)



GRÁFICA No.1. Evolución promedio de la movilidad masal del grupo tratado y grupo testigo

La movilidad masal presentó valores muy buenos durante el período experimental.

Los valores no mostraron diferencias previas o posteriores a la administración de selenio entre grupos.

Si bien el número reducido de animales no permitió realizar una evaluación, no se observó cambios de magnitud en la movilidad masal del grupo de carneros tratados.

La movilidad masal promedio de los dos grupos de carneros tendió a disminuir desde el mes de diciembre hasta el mes de abril ( $p > 0.10$ ).

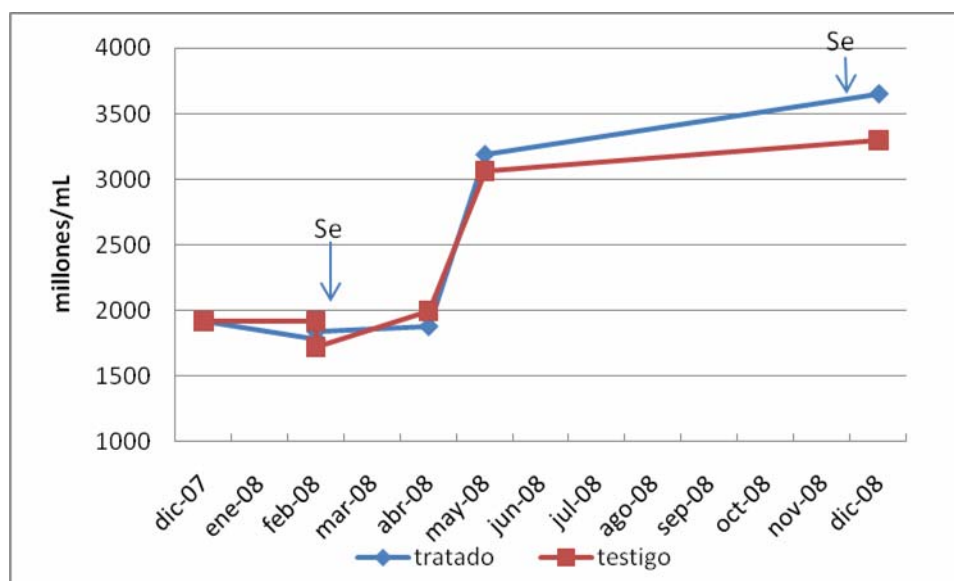
Dicha disminución pudo deberse a las altas temperaturas del verano que actúan directamente sobre los testículos, alterándolos; o sobre la nutrición, donde la evolución del

tamaño testicular acompaña los cambios en el crecimiento de las pasturas (campo natural).

Para Fernández Abella et al. (1993), de los factores ambientales que afectan la calidad y la cantidad de semen, la nutrición es el único que lo hace permanentemente, afectando el crecimiento testicular, enmascarando y/o reduciendo el efecto del fotoperíodo.

En nuestro país las altas temperaturas actúan principalmente sobre la libido de los carneros sin afectar los niveles de testosterona (Fernández Abella et al., 1999).

Con respecto a la nutrición, los carneros pesados en diciembre y luego en abril, no bajaron de peso e incluso tuvieron un pequeño aumento.



GRÁFICA No.2. Evolución promedio de la concentración espermática promedio para el grupo tratado y grupo testigo

Antes de la aplicación de selenio a los carneros en febrero, la concentración espermática promedio del semen del grupo testigo no presentó diferencias con la

concentración espermática promedio del grupo tratado (ambos grupos de carneros sin selenio).

En el mes de diciembre del 2008, el grupo tratado presentó un incremento superior en su concentración espermática ( $p < 0.05$ ).

Según Martín et al. (1990), la nutrición aparece como el factor dominante en controlar la actividad testicular.

Para Sapsord (1951), las deficiencias en minerales y vitaminas afectan la producción de semen.

Esta diferencia pudo deberse a que los cambios nutricionales afectan rápidamente el volumen testicular, por lo tanto a mejor nivel nutricional, mayor volumen testicular y como consecuencia mayor proporción de tubos seminíferos. Es en la pared de los tubos seminíferos donde se producen los espermatozoides y donde se encuentran las células de Sertoli que regulan y coordinan la formación y liberación de espermatozoides.

En efecto, Mateos (1997), Guzman-Marin (2000), indican que el suplemento de Selenio a la dieta tiene un papel importante en la determinación de la concentración espermática y en el número de células de Sertoli.

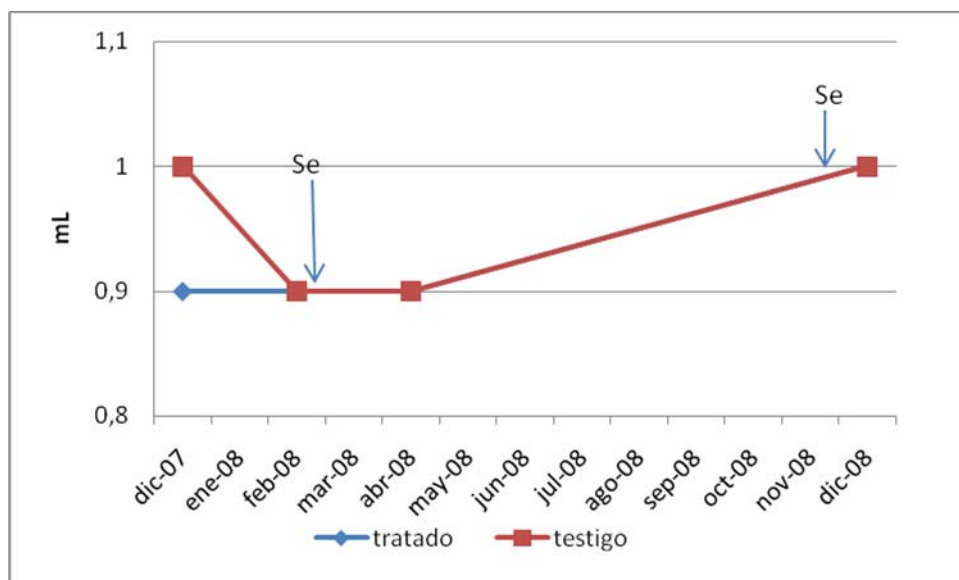


GRÁFICO No.3. Evolución promedio del volumen seminal del grupo tratado y grupo testigo

El gráfico muestra como aumentó el volumen seminal promedio en los carneros, sin mostrar diferencias entre los tratamientos.

Para Fernández Abella et al. (1993), el volumen del eyaculado es una característica que presenta escasas variaciones frente a cambios en el fotoperíodo o temperatura, presentando una correlación media con la talla testicular.

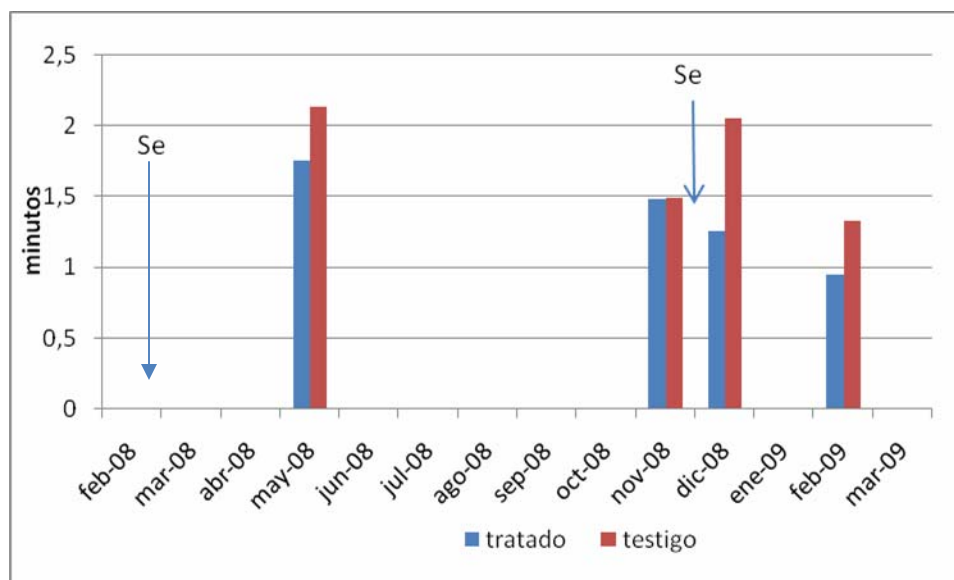


GRÁFICO No.4. Minutos que tarda la mezcla (semen + azul de metileno) en virar al blanco, según grupo (tratado y testigo) y época del año

El 29 de mayo del 2008, el grupo tratado tuvo buena a excelente calidad de semen, en cambio el grupo testigo tuvo regular a muy buena calidad de semen.

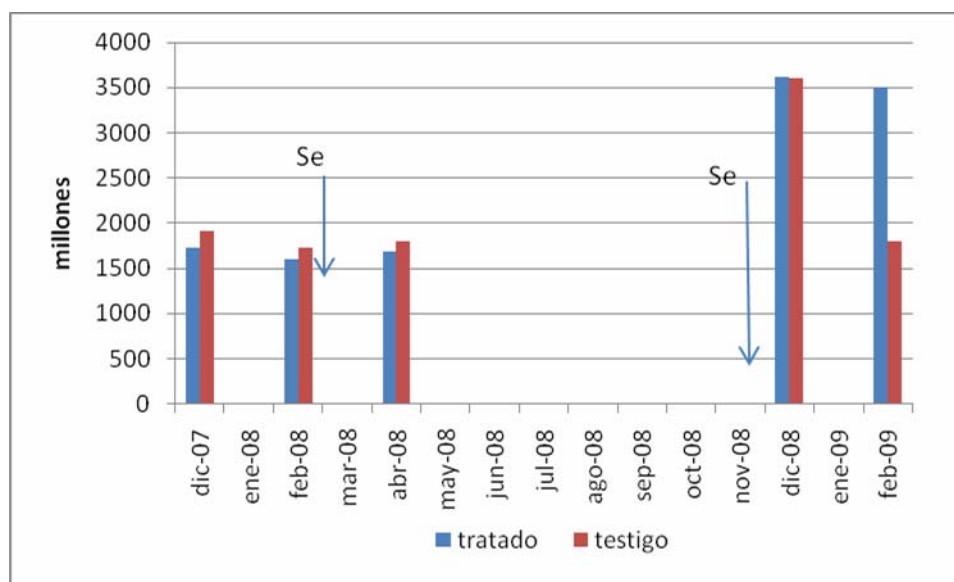
El 26 de noviembre del 2008, ambos grupo presentaron semen de muy buena calidad. Por lo tanto no se observaron diferencias importantes entre los tratamientos.

El selenio permanece en el hígado del animal dos meses aproximadamente antes de su eliminación; por lo que la administración de este elemento en febrero no tuvo efecto en las características seminales en noviembre.

Se inyectó nuevamente selenio el 27 de noviembre del 2008 a un grupo de carneros y se dejó otro grupo como testigo.

El 29 de diciembre del 2008, el grupo tratado presentó semen de muy buena calidad y el grupo testigo presentó semen de regular a muy buena calidad.

El 3 de febrero del 2009, la calidad del semen aumentó en ambos grupos. Pero el semen del grupo tratado fue de excelente calidad frente al grupo testigo que fue de muy buena calidad.



GRÁFICA No.5. Variación de la producción espermática (concentración x volumen) según grupo (tratado y testigo) y época del año

Los cambios producidos en la concentración espermática fueron los determinantes del incremento en la producción espermática (concentración x volumen) de esta tesis. El volumen seminal de ambos grupos de carneros mostró una evolución similar, lo que demostró el imperceptible efecto del selenio en esta característica.

Por lo tanto los carneros con mejor estatus mineral por la administración de Selenio, tuvieron mayor producción espermática colectada en esta tesis (3619 millones) que los carneros sin tratar (3270 millones), explicado fundamentalmente por la mayor concentración espermática de los primeros ( $p < 0.05$ ).

Por lo tanto a mejor nivel nutricional, mayor volumen testicular y esto se relaciona con mayor cantidad de tubos seminíferos (lugar donde se producen los espermatozoides).

En consecuencia más eficiente será la espermatogénesis y mayor la producción espermática.

#### **4.2 ENSAYO II: EFECTO DEL SELENIO SOBRE LA FERTILIDAD, LA PROLIFICIDAD Y LA FECUNDIDAD EN OVEJAS (I.A CERVICAL CON SEMEN FRESCO)**

CUADRO No.6. Fertilidad, prolificidad y fecundidad

machos	fertilidad (%)			prolificidad	fecundidad (%)
	I.A	repaso	total		
tratado	51,1	46,8	97,9	1,01	99,0
testigo	38,2	53,9	92,1	1,01	93,7

Se observa que el porcentaje de fertilidad fue superior en ovejas inseminadas con semen fresco de carneros del grupo tratado (administrado 3 semanas antes del servicio), que en carneros del grupo testigos, las diferencias son significativas ( $p < 0.01$ ). En cambio en el repaso no existen diferencias entre grupos.

La fertilidad total (I.A + repaso) fue superior cuando se utilizaron carneros del grupo tratado que del grupo testigo. Esta diferencia en % de fertilidad entre los tratamientos fue significativa ( $p < 0.01$ ).

La fecundidad (fertilidad x prolificidad) en las ovejas es mayor cuando se utilizan carneros del grupo tratado que carneros del grupo testigo. Las diferencias entre los tratamientos son significativas ( $p < 0.01$ ).

Esto permitió aseverar que el mayor porcentaje de fertilidad en ovejas se debió al efecto del selenio en las características seminales del grupo tratado, que aumentaron las probabilidades de fecundación.

Para Behne (1996) la morfología testicular y sus funciones se ven afectadas por una grave deficiencia de selenio en la dieta, y que este elemento es necesario para la formación y desarrollo normal de los espermatozoides.

McCoy y Weswig (1969) afirman que los espermatozoides localizados en el epidídimo con deficiencia de selenio, presentan reducción o pérdida de la motilidad y muestran defectos en el flagelo, principalmente en la pieza media.

Para entender lo anteriormente citado, McDonald (1995) explica que el Selenio forma parte de la glutatión peroxidasa (GSH-Px), enzima que cataliza la eliminación del peróxido de hidrógeno, con lo que protege a la membrana de la oxidación.

Según Capaul et al. (1988), el plasma seminal contiene elevadas cantidades de GSH-Px, cuya función es proteger a la membrana del espermatozoide del ataque peroxidativo, además en la cola del gameto masculino hay una selenoproteína llamada PHG-Px (Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase) que es una variante de GSH-Px y que ante una deficiencia de selenio se produce una fractura en la pieza media de la cola del espermatozoide.

Para Wennemuth et al. (2004), la PHG-Px cambia sus características físicas y sus funciones biológicas durante la maduración del espermatozoide, transformándose en una enzima inactiva pero que se polimeriza para formar una malla proteica que brinda estabilidad estructural a la porción media en los espermatozoides maduros. Estos autores afirman que los espermatozoides maduros dependen de la PHG-Px como proteína estructural, donde alteraciones de la morfología de la porción media que se observan por la deficiencia de selenio, probablemente resulten en una síntesis alterada de la selenoproteína. Esto provocaría una fractura en la mitad de la cola del espermatozoide y como consecuencia anularía su motilidad.

Para Agarwal y Ferreira (2000), las concentraciones moderadamente altas de peróxido de hidrógeno no afectan la viabilidad de los espermatozoides, pero los inmoviliza, por agotamiento del ATP intracelular y disminución ulterior en la fosforilación de las proteínas del axonema. En cambio las altas concentraciones de peróxido de hidrógeno inducen la peroxidación lipídica y producen la muerte celular.

**4.3 ENSAYO III: EFECTO DEL SELENIO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES; Y SOBRE LA FERTILIDAD, LA PROLIFICIDAD Y LA FECUNDIDAD EN OVEJAS (I.A INTRAUTERINA CON SEMEN CONGELADO)**

**4.3.1 Análisis de semen de carnero con y sin selenio (03/02/09)**

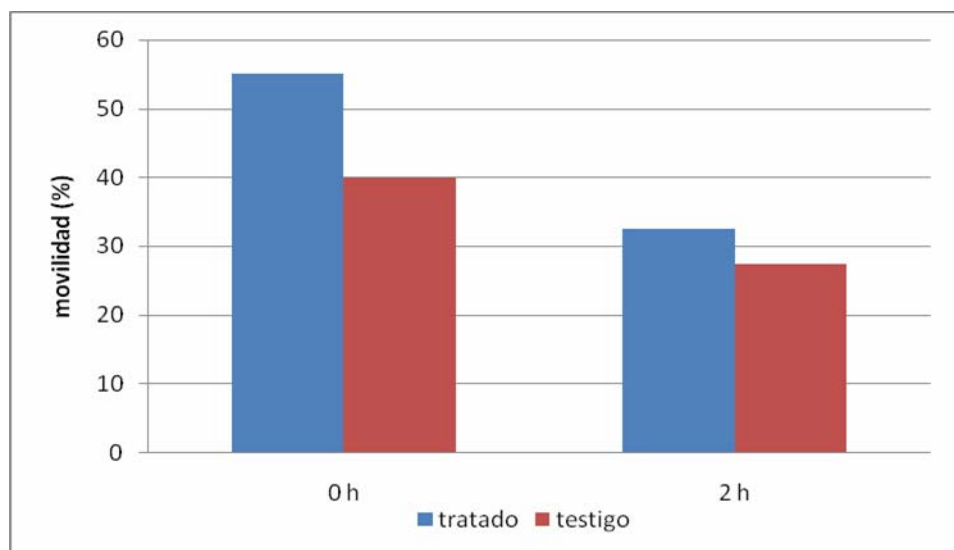
CUADRO No.7. Evaluación de la concentración espermática, movilidad masal y volumen seminal del grupo tratado y grupo testigo

Machos	movilidad	millones/mL	volumen(mL)	Prod. esperm. (millones)
tratado	3,7	2267	1,33	3015
testigo	3,5	2133	1,0	2133

El cuadro muestra que el semen del grupo tratado es de mejor calidad que el semen del grupo testigo. Esto se debe a su mayor movilidad y concentración espermática ( $p < 0.05$ ).

El volumen seminal del grupo tratado, es levemente superior que el del grupo testigo pero esta diferencia no es significativa.

#### 4.3.2 Calidad de semen post-congelado en carneros con y sin selenio (03/02/09)



GRÁFICA No.6. Movilidad espermática post-congelación para cada grupo (tratado y testigo) en dos momentos

Al momento de descongelar el semen (0 h), se observó que el semen del grupo tratado tuvo mayor porcentaje de movilidad, aproximadamente 15 puntos de porcentaje más que el semen del grupo testigo ( $p < 0.05$ ).

La movilidad fue afectada por la habilidad de los espermatozoides de resistir al congelamiento-descongelamiento.

La congelación y descongelación sobre la célula espermática genera efectos desfavorables que desestabilizan su membrana celular.

El Selenio tiene función protectora al ser un componente de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px), cuya función es proteger a la membrana del espermatozoide del ataque oxidativo, evitando su muerte.

El porcentaje de movilidad esta correlacionado positivamente con el porcentaje de movilidad antes del congelamiento.

A medida que pasaron las horas (2 h) la movilidad de los espermatozoides fue disminuyendo, tanto para el semen del grupo tratado como para el grupo testigo.

#### **4.3.3 Evaluación de la fecundidad del semen**

CUADRO No.8. Fertilidad, prolificidad y fecundidad en ovejas, a las que se les practicó I.A intrauterina con semen congelado

	Fertilidad (%)	Prolificidad	Fecundidad (%)
tratado	53,7	1,09	58,6
testigo	37,5	1,07	40,0

El porcentaje de fertilidad fue superior en ovejas inseminadas con semen congelado del grupo tratado que del grupo testigo, las diferencias son significativas ( $p < 0.10$ ).

Se observa una leve superioridad en prolificidad en ovejas al utilizar el grupo tratado que el testigo, pero esa diferencia no es significativa.

La fecundidad (fertilidad x prolificidad) en ovejas, fue mayor cuando se utilizó semen congelado del grupo tratado que del grupo testigo. Las diferencias entre los tratamientos son significativas ( $p < 0.10$ ). McCoy y Weswig (1969) afirman que los espermatozoides localizados en el epidídimo con deficiencia de selenio, presentan reducción o pérdida de la motilidad y muestran defectos en el flagelo, principalmente en la pieza media. Por lo tanto tendrán mayores dificultades para fecundar y como consecuencia la fertilidad de la oveja disminuirá.

Según Guthrie y Welch (2006), parte de la reducción de la motilidad espermática y la fertilidad asociado a la criopreservación puede ser debido al daño oxidativo de la excesiva o inadecuada formación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

## 5. CONCLUSIONES

Los carneros con mejor estatus nutricional por la administración de Selenio, tuvieron mayor producción espermática promedio colectada, explicado fundamentalmente por la mayor concentración espermática.

No se observaron cambios de magnitud en la movilidad masal del grupo de carneros tratados con selenio. Dicho grupo se encontraba con buen nivel nutricional y con altos valores de movilidad masal durante todo el experimento (antes y después de la administración de Selenio).

La fertilidad en ovejas inseminadas con semen fresco (I.A cervical) o congelado (I.A laparoscopia) del grupo tratado fue significativamente superior que con el grupo testigo. Esto se debió al efecto del selenio en las características seminales del grupo tratado que aumentaron las probabilidades de fecundación.

Los espermatozoides del grupo tratado tienen mayor habilidad de resistir los daños de la criopreservación, debido a la función protectora del Selenio frente al ataque oxidativo.

## 6. RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto del selenio en la fertilidad y la conservación de semen en carneros merino. Se realizaron tres Ensayos; el ensayo I se localizó en la EEFAS (Salto), donde se administró Selenio a 5 carneros y se dejó igual número de machos como testigo. Se le extrajo semen a ambos grupos y se evaluó las características seminales (volumen, movilidad masal y concentración espermática). En el Ensayo II se realizó en un predio comercial de Salto, con ovejas y carneros Merino. Se realizó inseminación artificial más repaso a 184 ovejas, con semen fresco del grupo de carneros tratados con Selenio. Lo mismo se realizó a 191 ovejas, con semen fresco del grupo de carneros testigos. Se evaluó la fertilidad, la prolificidad y la fecundidad de las ovejas. En el Ensayo III también se realizó en dicho predio, donde se utilizaron 3 carneros tratados con Selenio y 3 carneros testigos. El semen de los 6 carneros utilizados fue analizado pre y post congelación. Se realizó inseminación artificial por laparoscopía a 91 ovejas Merino, con semen congelado del grupo tratado (41 ovejas) y del grupo testigo (40 ovejas). Mediante ultrasonografía se evaluó la fertilidad, la prolificidad y la fecundidad obtenida. Los resultados no mostraron cambios de magnitud en la movilidad masal ni en el volumen seminal del grupo tratado. Pero tuvieron mayor producción espermática promedio colectada y mejor calidad de semen que el grupo testigo. La fertilidad en ovejas inseminadas con semen fresco (I.A cervical) o congelado (I.A laparoscopía) del grupo tratado fue significativamente superior que con el grupo testigo. Se puede concluir con estos datos preliminares que la administración de Selenio en carneros Merino con buen nivel nutricional, muestra una significativa mejora en la conservación y en la fertilidad del semen.

Palabras clave: Carnero; Selenio; Semen; Fertilidad; Crio preservación.

## 7. SUMMARY

The objective of this thesis was to assess the effect of selenium in semen fertility and conservation of Merino rams. Three Tests were performed; test I was carried out in EEFAS (province of Salto), where Selenium was administered to 5 rams, leaving equal number of males as a control group. Semen was extracted from both groups and the seminal characteristics (volume, mass mobility and spermatic concentration) were assessed. Test II was conducted on a commercial field in the province of Salto, with Merino sheep and rams. Artificial insemination and reinforcement procedures were carried out on 184 sheep, with fresh semen of the group of rams treated with Selenium. The same procedures were implemented on 191 sheep, with fresh semen of the control group of rams. Sheep fertility, prolificacy and fecundity were assessed. Test III was also carried out in the same place as Test II, where 3 rams treated with Selenium and 3 rams of the control group were used. The semen of the 6 used rams was analyzed pre and post freezing. Artificial insemination was carried out by laparoscopy on 91 Merino sheep, with frozen semen of both the treated group (41 sheep) and the control group (40 sheep). The achieved fertility, prolificacy and fecundity were assessed through ultrasonography. The results showed no significant changes as to mass mobility or the seminal volume of the treated group. But its average collected spermatic production was larger and its semen quality was better than the control group's. The fertility of sheep inseminated with fresh (I. A cervical) or frozen (I. A laparoscopy) semen of the treated group was significantly higher than the control group's. According to these preliminary data, it can be concluded that the administration of Selenium in Merino rams with good nutritional levels, leads to a significant improvement in semen conservation and fertility.

Key Word: Ram; Selenium; Semen; Fertility; Crio preservation.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. ANIL, J; MATHUR, A; NAQVI, S.; MITTAL, J.2006.  
Influence of osmolality of complete semen extender on motion characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa. (en línea).Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 19 (12): 1716-1721. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
2. ASSIS, R. M.; PÉREZ, J.; BARRETO FILHO, J. B.; PAULA, O.DE; ALMEIDA, T.; MACEDO JUNIOR, G.; FRANÇA, P. M.2008. Testicle weight evolution of Santa Inês lambs fed different energy levels. (en línea) Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.60 (5): 1219-1226. Consultado 19 abr. 2009.  
Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science>
3. AZZARINI, M.; PONZONI, R. 1971. Aspectos modernos de la producción ovina; 1ª. contribución. Montevideo, Departamento de Publicaciones de la Universidad de la República. 197 p.
4. BAG, S. 2002. Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in a semi-arid tropical environment. (en línea). Small Ruminant Research. 43 (1):23-29. Consultado 19 abr. 2009.  
Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science>
5. \_\_\_\_\_.; JOSHI, A.; RAWAT, P.S.; MITTAL, J.P. 2004.  
Effect of post-thaw incubation on sperm kinematics and acrosomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized French straws. (en línea). Theriogenology. 62 (3/4): 415-424. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
6. BRANDEN, A.W.H. 1974. Effect of protein and energy content on the diet on the rate of sperm production in rams. Australian Journal of Biological Science. 27:67.

7. BIELLI, A.; KATZ, H.; PEDRANA, G.; GASTEL, M. T.; MORANA, A.; CASTRILLEJO, A.; LUNDEHEIM, N.; FORSBERG, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2001. Nutritional management during fetal and postnatal life, and the influence on testicular stereology and Sertoli cell numbers in Corriedale ram lambs. (en línea). *Small Ruminant Research*. 40 (1): 63-71. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
8. BONINO MORLAN, J.; CASVESTANY, D.; SIENRA, R. 1987. Circunferencia escrotal en los carneros según la raza, edad, peso y época del año e incidencia de Brucelosis genital. In: Bonino Morlán, J.; Durán del Campo, A.; Mari, J.J. eds. *Enfermedades de los lanares*. Montevideo, Hemisferio Sur. v. 3, pp. 192-207.
9. BURK, R.; HILL, K. 2005. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. (en línea). *Annual Review of Nutrition*. 25: 215-235. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
10. BYRNE, G.P.; LONERGAN, P.; WADE, M.; DUFFY, P.; DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; BOLAND, M.P. 2000. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. (en línea). *Animal Reproduction Science*. 62(4):265-75. Consultado 18 abr. 2009. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
11. CAMERON, A.W.H.; MURPHY, P.M.; OLDHAM, C.M. 1988. Nutrition of rams and output of spermatozoa. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*. 17: 162-165.

12. COLAS, G. 1983. Factors affecting the quality of rams semen. In: Haresign, W. ed. Sheep production. London, Butterworths. pp. 453-465.
13. CUETO, M.I.; GIBBONS, A.E. 2002. Eficiencia de la inseminación artificial con semen congelado en ovinos.(en línea). Bariloche, INTA. s.p. Consultado 18 abr. 2009. Disponible en <http://www.inta.gov.ar/bariloche/info/documentos/animal>
14. CUUPS, P.T.; MCGOWAN, B.; RAHLMANN, D.F. 1980. Seasonal changes in the semen of rams. Journal of Animal Science. 19: 208-213.
15. CHANG, M.C. 1945. The sperm production of adult rams in relation of frequency o semen collection. Journal of Agricultural Science. 35: 243-245.
16. DOMÍNGUEZ, M. P.; FALCINELLI, A.; HOZBOR, F.; SÁNCHEZ, E.; CESARI, A.; ALBERIO, R. H. 2008. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. (en línea). Theriogenology. 69 (5): 564-573. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
17. EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Inseminación artificial en ovejas y cabras. Zaragoza, Acribia. 192 p.
18. FERNANDEZ ABELLA, D. 1987. Temas de reproducción ovina. Salto, Facultad de Agronomía. 247 p.
19. \_\_\_\_\_.; BECU, D.; LACAU, I.M.; VILLEGAS, N.; BENTANCUR, O. 1990. Sperm production, testicular size, serum Gonadotropins and testosterone levels in Merino and Corriedale breeds. (en línea). Reproduction Nutrition Development. 39: 617-624. Consultado 17 jun. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
20. \_\_\_\_\_.; VILLEGAS, N. 1992. Evaluación de diferentes técnicas de medición de la talla testicular y la

producción de semen de carnero. Boletín Técnico de Ciencias Biológicas. 2: 71-74.

21. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; N.; ECHEVERRIA, D. ;ROBAINA, J. 1993a. Evaluación de las variaciones estacionales en la producción espermática de cuatro razas ovinas. Boletín Técnico de Ciencias Biológicas. 3: 23-34.
22. \_\_\_\_\_. 1993b. Principios de fisiología reproductiva ovina. Montevideo, Hemisferio Sur. 247 p.
23. \_\_\_\_\_.; BONILLA RIERA, C.; BONILLA RIERA, R.; VILLEGAS, N.; IBAÑEZ, W. 2001. Effect of ram semen conservation at 4-5°C for 24 hours on sperm transport. Producción Ovina. 14: 55-63. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
24. FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. 1983. Effects of changes in photoperiod on freezability of ram spermatozoa. Cryobiology. 20: 648-689.
25. GONZALEZ-BULNES, A.; VEIGA-LOPEZ, A.; GARCIA, P.; GARCIA-GARCIA, R. M.; ARIZNAVARRETA, C.; SANCHEZ, M. A.; TRESGUERRES, J. A. F.; COCERO, M. J.; FLORES, J. M. 2005. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. (en línea). Theriogenology. 63 (9): 2533-2534. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
26. GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. 2006. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. (en línea). Journal of Animal Science. 84: 2089-2100. Consultado 19 abr. 2009. Disponible en

<http://www.animal-science.org/cgi/content/abstract>

27. HILL, K. E.; ZHOU, J. D.; AUSTIN, L. M.; MOTLEY, A. K.; HAM, A. J. L.; OLSON, G. E.; ATKINS, J. F.; GESTELAND, R. F.; BURK, R. F. 2007. The selenium-rich C-terminal domain of mouse selenoprotein P is necessary for the supply of selenium to brain and testis but not for the maintenance of whole body selenium. (en línea). Journal of Biological Chemistry. 282 (15): 10972-10980. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
28. JANETT, F.; HÜSSY, D.; LISCHER, C.; HÄSSIG, M.; THUN, R. 2001. Semen characteristics after vasectomy in the ram. (en línea). Theriogenology. 56 (3): 485-491. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
29. JOHNSON, L.; THOMPSON, D. L., JR.; VARNER, D. D. 2008. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. (en línea). Animal Reproduction Science. 105 (1/2): 23-51. Consultado 22 mayo 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
30. KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; PELZER, K. D.; DASCANIO, J. J. 2007. Effect of breed and sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of ram-lamb spermatozoa during storage at 4°C.(en línea). Animal Reproduction Science. 101 (1/2): 60-73. Consultado 22 mayo 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
31. KENDALL, N.R.; MCMULLEN, S.; GREEN, A.; RODWAY, R.G. 2000. The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. (en línea). Journal of Animal Science. 62 (4):277-83. Consultado 18 abr. 2009. Disponible en <http://www.animal-science.org/cgi/content/abstract>

32. LEZAMA, V.; ORIHUELA, A.; ANGULO, R. 2002. Sexual behavior and semen characteristics of rams exposed to their own semen or semen from a different ram on the vulva of the ewe.(en línea). Applied Animal Behaviour Science. 75 (1): 55-60. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
33. LINDSAY, D.R.; GHERARDI, P.B.;OLDHAM, C.M. 1976a. The effect of feeding a high protein supplement before joining on testicular volume of rams. In: International Congress of Sheep Breeding (1976, Muresk). Proceedings. Perth, Australian Institute of Technology. pp. 323-338.
34. \_\_\_\_\_.; TOMES, G.J.; ROBERTSON, D.E.; LIGHTFOOT, R.J. 1976b. Mating behaviour in sheep. In: Tomes, G.J; Robertson, D.E; Lightfoot, R.J. eds. Sheep breeding. Perth, Australian Institute of Technology. pp. 473-479.
35. \_\_\_\_\_. 1978. The influence of level of feed intake on sperm-producing capacity of testicular tissue in the ram. (en línea). Australian Journal of Agricultural Research. 29(1):173 - 179. Consultado 19 abr. 2009. Disponible en <http://www.publish.csiro.au/paper>
36. \_\_\_\_\_. 1984. Changes in photoperiod and nutrition and their effect on testicular growth of rams. Journal of Reproduction and Fertility. 71: 351-356.
37. LÓPEZ, A.G. 1987. Evaluación de diferentes técnicas para la congelación de semen ovino. Tesis Maestro en ciencias. Cautitlán Izcalli, México. Facultad de Estudios Superiores. 93 p.
38. \_\_\_\_\_. 2008. Clase teórica del Curso de Anatomía y Fisiología Animal. Montevideo, Facultad de Agronomía. s.n.t.

39. LOUVANDINI, H.; MCMANUS, C.; MARTINS, R. D.; LUCCI, C. M.; CORRÊA, P.S. 2008. Testicular biometric characteristics in Santa Inês sheep submitted to protein supplementation and anti-helminth treatments. *Ciência Animal Brasileira*. 9 (3): 638-647. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
40. MARA, L.; ACCARDO, C.; PILICHI, S.; DATTENA, M.; CHESSA, F.; CHESSA, B.; BRANCA, A.; CAPPALÀ, P. 2005. Benefits of TEMPOL on ram semen motility and in vitro fertility; a preliminary study.(en línea). *Theriogenology*. 63 (8): 2243-2253. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
41. MARCO-JIMÉNEZ, F.; PUCHADES, S.; GADE, J.; VICENTE, J. S.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P. 2005. Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology*. 64 (8): 1756-1765. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
42. \_\_\_\_\_. 2008. Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra ram. (en línea). *Reproduction in Domestic Animals*. 43 (4): 403-408. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
43. MARTI, E.; MARA, L.; MARTI, J. I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. 2007. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma.(en línea). *Theriogenology*. 67 (9): 1446-1454. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
44. MARTIN, G. 1990. Enviromental and genetic factors affecting reproductive activity in the Merino ram. *In: Oldham, C.M.; Martin, G.B. eds. Reproductive phsylogy of Merino sheep; concep and consequences. Perth, University of Western Australia. pp. 109-130.*

45. \_\_\_\_\_.; WALKDEN-BROWN, S. W. 1995. Nutritional influences on reproduction in mature male sheep and goats. In: Scaramuzzi, R.J.; Nancarrow, C.D.; Doberska, C. eds. Reproduction in domestic ruminants III. Cambridge, University of Western Australia. pp. 437-449.
46. MASTERS, D.G.; FELS, H.E. 1984. Seasonal changes in the testicular size of grazing rams. Proceedings of the Australian Society of Animal Production. 15: 444-447.
47. MÉNDEZ, M.; HERNÁNDEZ, J.; PACHECO, N. O.; PORRAS, A. 2000. Estrous synchronization using progestogens combined with estrogens induce estral behaviour in ovariectomized ewes. (en línea). Veterinaria México. 31 (4): 371-373. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
48. MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L.; LUZ, S.; NEVES, J. 2000. Intrauterine and cervical artificial insemination in sheep using cooled semen. (en línea). Archives of Veterinary Science. 5: 35-39. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
49. MONTOSSI, F.; SAN JULIÁN, R.; DE MATTOS, D.; BERRETTA, E.J.; ZAMIT, W.; LEVRATTO, J.; RÍOS, M. 1998. Producción de lana fina; una alternativa de valorización de la producción ovina sobre suelos superficiales del Uruguay con escasas posibilidades de diversificación. In: Seminario de Actualización en Tecnologías para Basalto (1998, Tacuarembó). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 307 - 315 (Serie Técnica no. 102).
50. \_\_\_\_\_.; DE BARBIERI, I.; MEDEROS, A.; DE MATTOS, D.; FRUGONI, J.C.; MARTÍNEZ, H.; ZAMIT, W.; LEVRATTO, J.; GRATTAROLA, M.; PÉREZ JONES, J. 2003. Núcleo Fundacional del Proyecto Merino Fino del Uruguay. In: Jornada de Producción Animal y Pasturas en Basalto (2003, Tacuarembó). Trabajos presentados.

Montevideo, INIA. pp. 41- 42 (Actividades de Difusión no. 335).

51. MUIÑO, T.; PÉREZ, R.; CEBRIÁN, J. A. 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. (en línea). *Reproduction in Domestic Animals*. 43 (s4): 18-31. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
52. OATLEY, J. M.; TIBARY, A.; AVILA, D. M. DE; WHEATON, J. E.; MCLEAN, D. J.; REEVES, J. J. 2005. Changes in spermatogenesis and endocrine function in the ram testis due to irradiation and active immunization against luteinizing hormone-releasing hormone. (en línea). *Journal of Animal Science*. 83 (3): 604-612. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
53. OLDHAM, C.M.; ADAMS, N.R.; GHERARDI, P.B., LINDSAY, D.R., MACKINTOSH, J.B. 1978. The influence of level of feed intake on sperm producing capacity of testicular tissue in the ram. *Australian Journal of Agriculture Research*. 29: 173-179.
54. PAULENZ, H.; SÖDERQUIST, L.; PÉREZ-PÉ, R.; BERG, K. A. 2002. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. (en línea). *Theriogenology*. 57 (2): 823-836. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
55. PÉREZ, R.; GRASA, P.; FERNÁNDEZ, M.; PELEATO, M. L.; CEBRIÁN, J. A.; MUIÑO, T. 2002. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. (en línea). *Molecular Reproduction and Development*. 61 (2): 226-233. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
56. PIPERELIS, S. G.; VAFIADIS, D.; BOSCO, C. M.; BROZOS, C.; KIOSSIS, E.; ALEXOPOULOS, C. 2008. Efficiency assessment of a swift method to enhance

- substandard viability ram ejaculates. (en línea). *Reproduction in Domestic Animals*. 43 (1): 111-116. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
57. PURDY, P.H. 2007. Preserving ram semen: new science shows it can be stored for up to two days before freezing. (en línea). *Sheep! Magazine*. 12 (2) :40-41. Consultado 18 abr. 2009. Disponible en [hppt://www.ars.usda.gov/research/publications](http://www.ars.usda.gov/research/publications)
58. RAZMI, N.; JELODAR, G. A.; NAZIFI, S.; DEGHANI, A. 2004. Arginase status in the ram reproductive system. (en línea). *Journal of Applied Animal Research*. 26 (1): 57-59. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
59. SALISBURY, G.M.; VAN DEMARK, N.L.; LODGE, J.R. 1978. Fisiología de la reproducción e inseminación artiicial de los bóvidos. Zaragoza, Acribia. 831 p.
60. SANFORD, L. M.; DICKSON, K. A. 2008. Prolactin regulation of testicular development and sexual behavior in yearling Suffolk rams. (en línea). *Small Ruminant Research*. 77 (1): 1-10. Consultado 22 may. 2009. Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
61. SAPSORD, C.S. 1951. Seasonal changes in spermatogenesis in rams; their relation to plane of nutrition and to vitamin A status. *Australian Journal of Agricultural Research*. 2: 331-341.
62. SETCHELL, B.P. 1965. Effect of under nutrition on testicular blood flow and metabolism and the output of testosterone in ram. *Journal of Reproduction and Fertility*. 9: 149-162.
63. SLAMON, S. 1962. Studies on the artificial insemination of Merino sheep. III. Effect of frequent ejaculation on semen characteristic and

fertilizing capacity. Australian Journal of Agricultural Research. 13: 1137-1150.

64. SORENSEN, A.M. 1980. Animal reproduction; principals and practices. New York, American Press. 496 p.
65. SURAI, P. F. 2006. Selenium in nutrition and health. Selenium in nutrition and health. (en línea). Nottingham, Nottingham University Press. 974 p. Consultado 22 may. 2009.  
Disponibile en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
66. ÜLKER, H.; KANTER, M.; GÖKDAL, Ö. ; AYGÜN, T.; KARAKUS, F.; SAKARYA, M. E.; AVILA, D. M. DE; REEVES, J. J. 2005. Testicular development, ultrasonographic and histological appearance of the testis in ram lambs immunized against recombinant LHRH fusion proteins. (en línea). Animal Reproduction Science. 86 (3/4): 205-219. Consultado 22 mayo 2009.  
Disponibile en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
67. UYSAL, O.; BUCAK, M. 2007. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. (en línea). Acta Veterinaria Brno. 76 (3): 383-390. Consultado 22 may. 2009.  
Disponibile en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>
68. WHITE, C.L.; MASTERS, D.G.; PETER, D.W.; PURSER, D.B.; ROE, S.P.; BARNES, M.J. 1992. A multi element supplement for grazing sheep. I. Intake, mineral status and production responses. Australian Journal of Agriculture Research. 43: 795-808.
69. WULSTER, M. C.; WANG, S. Q.; LEWIS, G. S. 2004. Transcervical artificial in sheep; effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. (en línea). Theriogenology. 62 (6): 990-1002. Consultado 22 may. 2009.  
Disponibile en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>

70. YÁNIZ, J. L.; SANTOLARIA, P.; MARCO-AGUADO, M. A.; LÓPEZ-GATIUS, F. 2008. Use of image analysis to assess the plasma membrane integrity of ram spermatozoa in different diluents. (en línea). Theriogenology. 70 (2): 192-198. Consultado 22 may. 2009.

Disponible en <http://www.web.ebscohost.com/ehost>

## **9. ANEXOS**

El selenio se inyectó el 28 de febrero del 2008, a los carneros con No. de caravana 3, 4, 8, 15 y 20. Se tomaron como testigos (sin selenio) a los carneros con No. de caravana 5, 6, 7, 10 y 16.

El carnero No.5 desapareció.

En los carneros No. 8 Y 10, los valores de la 2ª vuelta fueron en el 3º eyaculado, eso pudo haber variado el volumen y la concentración espermática.

El día 27 de noviembre del 2008 se inyectó selenio a carneros con caravana No. 3, 4, 8 y 16.

Se tomaron como testigo (sin selenio) a los carneros con No. de caravana 7, 10, 15 y 11.

Las variables de respuesta fueron: volumen (mL), concentración (espermatozoides/mL), motilidad en fresco y post congelado (%).

CUADRO No.1

Fecha 18/12/07							
No. Carav.	peso (kg)	CC	edad	CE (cm)	Color (concent.)	Volumen eyac. (mL)	Movil.
3	63	4,25	4D	32	crema	0,9	4
4	56	3,75	4D	28	crema	1,1	4
6	57	4	4D	34,5	crema	1	3,5
7	63	4	4D	33	crema claro	0,9	4
8	63	3,5	4D	31	crema	1,2	3
10	67	4,5	BLL	33,5	crema	1	4
11	45	3,5	2D	35	crema	0,7	4
15	55	4	2D	40	crema claro	0,8	3
16	50	4	BLL	29	crema	1,2	4
20	63	4	4D	30	crema	0,7	3,5

CUADRO No. 2

Fecha 22/2/08				
1° eyaculado				
No. Carav.	edad	color (concent.)	Volumen Eyaculado (mL)	movil.
3	4D	crema	1	3
4	4D	crema claro	1	3
6	4D	crema	1,3	3
7	4D	crema	1	4
8	4D	crema	0,5	4
10	BLL	crema claro	0,5	3
11	2D	crema	1	3,5
15	2D	crema claro	0,9	2
16	BLL	crema claro	0,9	4
20	4D	crema	0,8	3,5
2° eyaculado				
3	4D	crema	0,9	3
4	4D	lechoso	0,8	2
6	4D	crema	1,1	3
7	4D	crema oscuro	1,2	4
8	4D	crema	0,7	4
10	BLL	crema claro	0,8	3
11	2D	crema	0,9	3
15	2D	crema	1,4	3
16	BLL	crema claro	0,7	4
20	4D	crema claro	1,3	3,5

vol (prom.)	millones/mL	movilidad
1,45	2000	3
0,9	1300	2,5
1,2	2000	3
1,1	2400	4
0,6	2000	4
0,65	1600	3
0,95	2000	3,25
1,15	1800	2,5
0,8	1600	4
1,05	1800	3,5
prom.0,985	prom. 1850	prom. 3,28

CUADRO No. 3

Fecha 28/2/08		
Ensayo con selenio		
No. caravana	concentración	concentración
	1º eyaculado	2º eyaculado
3	2500	1750
4	2000	1250
5	2000	1750
6	2000	2000
7	1750	2400
8	2250	2000
10	1250	1250
15	2300	1250
16	2000	1150
20	2000	1100

El carnero No.5 desapareció.

Los carneros cuyo número de caravana tiene fondo verde, son a los que se les inyectó selenio.

CUADRO No.4

Fecha 29/04/2008				
1° eyaculado				
No. caravana	CE (cm)	Color (concentración)	movilidad	volumen eyaculado (mL)
3	31	crema	3,25	1
4	29	crema	2,75	0,9
6	30	crema	2,75	1,2
7	34	crema	2,75	0,9
8	27,5	crema claro	3	0,8
10	35	crema	2,75	0,8
11	35	crema	3,5	1,1
15	33	crema claro	2,5	1
16	30	crema	2,75	0,9
20	21,5	crema	3	1,3
2° eyaculado				
No. carnero	CE (cm)	color (concentración)	movilidad	volumen eyaculado (mL)
3	31	crema	3	1,3
4	29	crema	4	0,9
6	30	crema	2,75	1,2
7	34	crema	3	1
8	27,5	crema	3	0,6
10	35	crema	3	0,5
11	35	crema	3	1
15	33	crema	3	0,6
16	30	crema	2,75	0,7
20	21,5	crema claro	2,75	0,7

vol prom	millones/mL	movilidad
1,15	2000	3,125
0,9	2000	3,375
1,2	2000	2,75
0,95	2000	2,875
0,7	1800	3
0,65	2000	2,875
1,05	2000	3,25
0,8	1800	2,75
0,8	2000	2,75
1	1800	2,875
prom 0,92	prom 1940	prom 2,963

0,93	1900	3,06	con selenio
0,9	2000	2,8	testigo

En los carneros No. 8 Y 10, los valores de la 2ª vuelta fueron en el 3º eyaculado, eso pudo haber variado el volumen y la concentración espermática.

CUADRO No. 5

Fecha 06/05/2008					
				lectura en el densímetro	
nº caravana	peso (kg)	CC	edad	1º eyaculado	2º eyaculado
3	68	4,25	4D	25	35
4	58	3,75	4D	10	20
6	52	3,5	4D	25	20
7	64	4,25	4D	20	10
8	67	4,0	4D	20	25
10	68	4,25	BLL	30	40
11	44	3,0	2D	20	23
15	57	3,5	2D	30	20
16	51	4,0	BLL	30	20
20	63	3,5	4D	22	25

CUADRO No. 6

Fecha 29/05/2008		
No. caravana	Tiempo (min)	Calidad del semen
3	1 a 2	muy bueno
4	1 a 2	muy bueno
6	1 a 2	muy bueno
7	3 a 5	regular
8	0 a 1	excelente
10	1 a 2	muy bueno
11	1 a 2	muy bueno
15	2 a 3	bueno
16	2 a 3	bueno
20	1 a 2	muy bueno

El día 27 de noviembre del 2008 se inyectó selenio a carneros con caravana No. 3, 4, 8 y 16.

Se tomaron como testigo (sin selenio) a los carneros con No. de caravana 7, 10, 15 y 11.

CUADRO No. 7

26/11/2008			
azul de metileno			
No. caravana	segundos	minutos	calidad
3	67	1,11	muy bueno
4	130	2,16	bueno
7	75	1,25	muy bueno
8	85	1,41	muy bueno
10	123	2,05	bueno
13	70	1,16	muy bueno
14	75	1,25	muy bueno
15	90	1,5	muy bueno
16	90	1,5	muy bueno

CUADRO No. 8

Fecha 29/12/08				
1° eyaculado				
No. Carav.	color (concent.)	Movili.	volumen eyacu. (mL)	millones/mL
8	crema	4	1	3500
3	crema	4	1,1	3500
10	crema	4	1,2	2000
15	crema	3	1	2000
7	crema	3	1,1	2500
4	crema	3	1	3500
16	crema	4	1	3500
11	crema	4	0,8	3000
2° eyaculado				
No. Carav.	color (concent.)	Movili.	volumen eyacu. (mL)	millones/mL
8	crema	4	0,9	3500
3	crema	4	1	4000
10	crema	4	1,2	4000
15	crema claro	3	0,8	3500
7	crema	4,5	1,6	4000
4	crema	4	1,1	3750
16	crema	3,75	0,8	4000
11	crema	4,5	1	3000

No. Carav.	Tiempo (min)		Promedio	
	1° eyacu.	2° eyacu.		
8	1,3	1	1,15	1 a 2
3	1,5	0,6	1,05	1 a 2
10	2	2	2	1 a 2
15	3	5	4	3 a 5
7	1	1,1	1,05	1 a 2
4	1	1,4	1,2	1 a 2
16	1,2	2	1,6	1 a 2
11	1	1,3	1,15	1 a 2

1° eyaculado	2° eyaclado	Promedio
millones/mL	millones/mL	
3500	3500	3500
3500	4000	3750
2000	4000	3000
2000	3500	2750
2500	4000	3250
3500	3750	3625
3500	4000	3750
3000	3000	3000
	con selenio	3656
	testigo	3000

volumen (mL)		
1°	2°	prom(mL)
1	0,9	0,95
1,1	1	1,05
1,2	1,2	1,2
1	0,8	0,9
1,1	1,6	1,35
1	1,1	1,05
1	0,8	0,9
0,8	1	0,9
	con selenio	0,99
	testigo	1,09

CUADRO No.9

03/02/2009			
CALIDAD DE SEMEN PRECONGELADO:			
	COLOR	MOVILIDAD	VOLUMEN (mL)
3	Crema	4	1,5
4	Crema	4	2
14	crema oscuro	3	0,5
7	Crema	3,5	1
10	crema oscuro	4	0,5
15	crema claro	3	1,5

CUADRO No.10

CALIDAD SEMEN POST-CONGELACIÓN (3/2/09)

MOVILIDAD POSTCONGELACIÓN

MEZCLA DE SEMEN DE  
CARNEROS

SELENIO (3, 4, 14)

TESTIGO (7,10,15)

	0 h	2 h
SELENIO	50-60%	30-35%
TESTIGO	35-45%	25-30%

	0 h	2 h
con selenio	55	32,5
Testigo	40	27,5

CUADRO No.11

Resultados reproductivos

Administración de selenio a los carneros 3 semanas previas al servicio.

machos	fertilidad			Prolif.	Fecund.
	I.A (3/4/08)	repaso (17/4- 8/5)	total		
c/selenio (n=184)	51,1	46,8	97,9	1,01	99
testigo (n=191)	38,2	53,9	92,1	1,01	93,7
	p<0,01		p<0,01		p<0,01
	sig.	no sig.	sig.	no sig	sig