

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**SELECCIÓN DE CARNEROS MERINO AUSTRALIANO, PARA SU
UTILIZACIÓN EN PROGRAMAS DE REPRODUCCIÓN, SUPLEMENTANDO
CON SELENIO E INCORPORANDO NUEVAS METODOLOGÍAS EN EL
ANÁLISIS DEL SEMEN**

“por”

**Juan Ignacio DUVOS SAVIO
Federico FERNÁNDEZ ARBIZA
Juan Carlos LLUBERAS PANISSA**

TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el
título de Doctor en Ciencias
Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2017**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Alejandro Benech

Segundo miembro (Tutor):

Oscar Irabuena

Tercer miembro:

Luis Cal

Fecha:

Autores:

Juan Ignacio Duvos Savio

Federico Fernández Arbiza

Juan Carlos Lluberás Panissa

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a nuestras familias por habernos dado la oportunidad de poder elegir y realizar lo que más nos gusta, brindándonos su apoyo. A nuestras novias por el apoyo incondicional. A los amigos de siempre que más allá de todo siempre estuvieron ahí. Un agradecimiento especial a todo el grupo de OPA norte 2015, con el cual quedaron recuerdos muy lindos de esta carrera. En la parte académica agradecer a todos los profesores y profesionales que fueron parte de nuestra formación, en el trabajo final a Oscar por su paciencia y buena voluntad, a Silvia por estar siempre brindándonos su tiempo y su experiencia. A Mónica Cadenazzi por su aporte. No queremos olvidarnos de la familia Rodríguez Grasso por permitirnos realizar el ensayo en su establecimiento.

TABLA DE CONTENIDOS

	Páginas
Página de aprobación	2
Agradecimientos	3
Lista de tablas y figuras	5
Resumen	6
Summary	7
Introducción	8
Revisión bibliográfica	10
Hipótesis	29
Objetivos	29
Materiales y métodos	30
Análisis estadístico	35
Resultados	37
Discusión	53
Conclusiones	54
Referencias bibliográficas	55

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	Páginas
Tabla N°1 Concentración espermática según color seminal	21
Tabla N°2 Motilidad masal	22
Tabla N°3 Grupo suplementado	33
Tabla N°4 Grupo testigo	33
Tabla N°5 Composición de Selfos plus®	34
Tabla N°6 Medias de condición corporal según tratamiento	37
Tabla N°7 Medias de circunferencia escrotal según tratamiento	37
Tabla N°8 Medias de peso según tratamiento	37
Tabla N°9 Motilidad macroscópica según tratamiento	38
Tabla N°10 Motilidad microscópica según tratamiento	39
Tabla N°11 Contingencia para color seminal, diferenciada por trat.	40
Tabla N°12 Medias de volumen según tratamiento	40
Tabla N°13 Medias de concentración de cada tratamiento	41
Tabla N°14 Medias de concentración para cada método	42
Tabla N°15 Medias de producción total de spz por trat. y método	43
Tabla N°16 Medias para tratamiento anidado según dentición	43
Tabla N°17 Tipos de movimiento según tratamiento expresados en %	44
Tabla N°18 Tipos de velocidad según tratamiento expresados en %	46
Tabla N°19 Tipos de VCL para cada tratamiento	48
Tabla N°20 Tipos de VSL según tratamiento	49
Tabla N°21 Tipos de VAP según tratamiento	50
Figura N°1 Motilidad macroscópica según tratamiento	38
Figura N°2 Motilidad microscópica según tratamiento	39
Figura N°3 Concentración para cada tratamiento	41
Figura N°4 Concentración según método	42
Figura N°5 Tipos de movimiento según tratamiento (spz. Estáticos)	44
Figura N°6 Tipos de movimiento según tratamiento (spz. móviles prog)	45
Figura N°7 Tipos de movimiento según tratamiento (spz.móviles noprog)	46
Figura N°8 QQplot para velocidad	47
Figura N°9 QQplot para tipo de movimiento	48
Figura N°10 Tipos de VCL para cada tratamiento	49
Figura N°11 Tipos de VSL para cada tratamiento	50
Figura N°12 Tipos de VAP para cada tratamiento	51

RESUMEN

En este trabajo, se utilizaron nuevas metodologías en el análisis de semen fresco de carneros Merino Australiano, con y sin suplementación de selenio (Se), con el objetivo de mejorar la selección de los mismos, para su utilización en programas de reproducción. Se formaron dos grupos, cada uno de 7 carneros, uno suplementado para lo cual se inyectó por única vez vía subcutánea 1 cc/50kg de peso vivo de *Selfos plus*® (selenito de sodio 0,347g/100mL, laboratorios AgroInsumos S.A.), y el otro testigo. Al inicio del ensayo se realizó examen de aptitud reproductiva, condición corporal y peso vivo. A los 70 días pos suplementación se extrajo semen a todos los carneros, las muestras se evaluaron a campo y en laboratorio, en este utilizando el sistema computarizado ISASv1®. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los parámetros evaluados en ambas metodologías. Se observó diferencia significativas en la determinación de concentración espermática entre el método manual y el automatizado ($p < 0,05$). Los resultados preliminares obtenidos en este ensayo no muestran mejoras en la calidad seminal en los animales suplementados con Se, bajo las condiciones de este ensayo.

La diferencia significativa en la determinación de la concentración a favor del sistema ISASv1 es una ventaja a tener en cuenta en la preparación de semen para programas de IA especialmente en aquellos reproductores con alto valor genético.

SUMMARY

In this work, new methodologies were used in the analysis of fresh semen of Australian Merino sheep, with and without selenium supplementation, with the objective of improving the selection of these, for use in breeding programs. For this, 1 cc / 50 kg live weight of Selfos plus® (sodium selenite 0.347g / 100mL, laboratories Agrolnsumos S.A.) was injected once by subcutaneous injection. Two groups of 7 rams were formed each, one supplemented and one control. At the beginning of the test, the test was performed on reproductive fitness, body condition and live weight. At 70 days post supplementation, semen was extracted from all rams. The samples were evaluated in the field and in the laboratory, using the ISASv1® computer system. No significant differences were found between treatments in any of the parameters evaluated in both methodologies. A significant difference was observed in the determination of sperm concentration between the manual and automated methods ($p < 0.05$). Preliminary results obtained in this trial do not show improvements in seminal quality in animals supplemented with selenium, under the conditions of this assay.

The significant difference in the determination of the concentration in favor of the ISASv1 system is an advantage to be taken into account in the preparation of semen for AI programs especially in those reproducers with high genetic value.

INTRODUCCIÓN

En Uruguay la producción ovina representa un pilar en la actividad agropecuaria, en el año 2015 el rubro aportó U\$324 millones al PBI, de los cuales el 70 % corresponde a lana y sus productos (SUL; 2016).

Desde hace algunos años la ganadería, principalmente la ovina, se enfrenta a presiones competitivas por los recursos naturales por parte de otros rubros de mayor conveniencia económica, por lo tanto se hace necesario un incremento de la productividad y calidad mediante la mejora de la eficiencia en el uso de los factores de producción. Se señala la eficiencia reproductiva de la majada nacional como la mayor restricción que enfrenta el rubro para su crecimiento sustentable. Los indicadores de producción para la cría, relevados en los últimos 20 años, determinan un porcentaje de señalada que ha oscilado entre el 50 y 70% con una caída del 2% en el año 2015 respecto al 2014 (DICOSE, 2015. MGAP).

En Uruguay 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 desarrollan sus sistemas productivos sobre suelos superficiales con escasas posibilidades de diversificación de la producción (Montossi y col, 2007). 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.

A nivel internacional se reporta que la administración de Se mejora la fertilidad de los carneros y de las ovejas, la supervivencia neonatal y el crecimiento de los corderos (Balicka- Ramisz, 2006). Asimismo, en Uruguay, bajo nuestras condiciones de cría a campo natural (Basalto), la administración de *Selfos plus*® (selenito de sodio 0,347g/100mL, laboratorios AgroInsumos S.A.) en carneros, muestra una significativa mejora en la fertilidad del semen fresco y congelado (Fernández Abella y col, 2013).

En ovinos, la evaluación de la aptitud reproductiva de los carneros se realiza para asegurar y categorizar su potencial habilidad para desarrollar una preñez saludable a término. Dicha evaluación se basa en un examen físico que incluye la determinación de la circunferencia escrotal y valoración del semen: volumen, color, olor, movilidad, concentración, reducción de azul de metileno (Fernández Abella y col 2013).

En base a esto, los carneros se clasifican en tres categorías: satisfactorio, cuestionable e insatisfactorio (Ley y col, 1990). La motilidad de masa e individual y la concentración espermática, son parámetros comúnmente considerados entre las numerosas variables que se tienen en cuenta al seleccionar un carnero, ya sea para servicio natural o para la crío preservación del semen, pero a la vez es aceptado que el examen básico del semen no tiene una gran correlación con la capacidad fertilizante de la muestra estudiada. Por lo tanto, es un reto para los profesionales del área predecir la capacidad de fertilización, debido a que no existe un solo parámetro que prediga la fertilidad "in-vivo".

La incorporación de tecnología de última generación en el análisis de semen ovino, mediante el sistema Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), permite cuantificar de forma automatizada parámetros como morfología y grado de fragmentación de la cromatina de los espermatozoides frente a los parámetros utilizados tradicionalmente a nivel de campo (prueba de azul de metileno, concentración, motilidad).

Utilizando un sistema CASA para evaluar semen de forma automatizada, nos proponemos refrendar (comparar) este método frente a la forma tradicional a campo; para la evaluación de semen de carneros suplementados y no suplementados con Se, con el objetivo de mejorar la selección de los machos para ser utilizados como reproductores.

Por todo lo anteriormente expuesto en este trabajo se propone estudiar que la calidad del semen de carneros suplementados con Se es diferente a la de carneros no suplementados y también probar la incorporación de nuevas tecnologías, mejorando la selección de los carneros frente al método tradicional.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

Aparato reproductor masculino

El aparato reproductor del macho consiste en varios órganos individuales que actúan de manera coordinada para producir espermatozoides y depositarlos en el tracto reproductor femenino. Este mecanismo implica al sistema neuroendocrino (hipotálamo y adeno hipófisis) y al genital (Cunningham y Klein, 2009).

Este aparato está constituido por un par de gónadas, los testículos, encargados de producir gametos (espermatozoides) y hormonas; un par de conductos gonadales, constituido cada uno por un epidídimo y un conducto deferente (*ductus deferens*) que conduce a la uretra los productos exocritos de los testículos, conjunto de glándulas accesorias que se encargan de aumentar el volumen del semen; la uretra masculina, que va desde la vejiga al extremo del pene y se encarga del pasaje de orina y semen; el pene, órgano copulativo masculino que deposita el semen en el tracto reproductor de la hembra; y adaptaciones cutáneas, escroto y prepucio, desarrolladas en relación con los testículos y el pene (Dyce y col., 1999).

Testículos

La forma de los testículos es la de un ovoide y están contenidos en el saco escrotal con su eje dispuesto verticalmente. El tejido testicular normal es de un color blanco amarillento. El mediastino es central y muy sutil, razón por la cual los lóbulos testiculares no son bien visibles. El testículo está cubierto por la hoja visceral de la túnica vaginal. Por debajo de ésta hay una cápsula de tejido conectivo denso denominada túnica albugínea. En el carnero adulto el peso varía entre los 200 y 400 gr. El desarrollo testicular está directamente relacionado con la producción espermática.

En promedio por cada gramo testicular se producen de 20 a 25 millones de espermatozoides por día (Fernández Abella, 2003). Para que la espermatogénesis se desarrolle normalmente, es necesario que la temperatura testicular sea 4 – 5°C inferior a la rectal (39°C), (Fernández Abella, 2003).

El testículo tiene tres compartimentos funcionales. El tejido intersticial que contiene células de Leydig, rodea los túbulos seminíferos. Los otros dos compartimentos se localizan dentro de los túbulos seminíferos, basal y adluminal. El compartimento basal contiene espermatogonias que se dividen por mitosis y el adluminal constituye un medio especial en el que los espermatocitos inician y continúan las divisiones meióticas hasta diferenciarse en espermátida y por último en espermatozoides. En los túbulos seminíferos, las células de Sertoli, proporcionan apoyo y nutrientes a las células germinales en desarrollo, se extienden desde el compartimento basal hasta el adluminal (Cunningham y Klein, 2009).

Epidídimo

Está muy desarrollado en el carnero y se encuentra firmemente adherido por tejido fibroso al testículo. La cabeza de éste es aplanada y ligeramente curva, se ubica en el polo superior del testículo y colocándose lateralmente se continúa con el cuerpo. El cuerpo con forma de cilindro aplanado recorre lateralmente el borde posterior del testículo y en el extremo inferior de éste, se continúa con la cola. La cola está muy desarrollada y semeja la sección de un ovoide con la base aplicada a la extremidad inferior del testículo. Da nacimiento al conducto deferente (Carlos A. Robles, 2004).

El epidídimo cumple tres funciones esenciales:

Transporte espermático. Los espermatozoos se movilizan hacia el canal deferente y la uretra. El transporte se ve facilitado por la presión intra testicular, el movimiento de las cilias existentes en los canales eferentes, los movimientos peristálticos del canal del epidídimo y por las secreciones de líquido desde los túbulos seminíferos y de la red testicular. La duración del tránsito por el epidídimo es variable siendo en promedio unos 14 días (Fernández Abella, 2003).

Maduración espermática. Durante el pasaje por el epidídimo los espermatozoos sufren modificaciones morfológicas y fisiológicas que los capacita para fecundar. No obstante, deben sufrir otros procesos en el aparato reproductor femenino para poder penetrar en el óvulo (Fernández Abella, 2003).

Sobrevivencia y almacenamiento espermático. Si bien en pocos días los espermatozoides pueden atravesar el epidídimo, también pueden sobrevivir allí durante varias semanas. El epidídimo sirve de almacenamiento espermático, principalmente la cola donde se encuentran $100 - 200 \times 10^9$ de espermatozoides que representan el 70% del contenido total a nivel del epidídimo. Estos niveles descienden durante el periodo de apareamiento o servicios, en niveles de $40-60 \times 10^9$, (Fernández Abella, 2003).

Conducto deferente

El conducto deferente, muy sutil en los carneros, se origina de la cola del epidídimo y comienza con un trayecto tortuoso, luego se hace recto, recorre el borde posterior del cordón espermático y luego se dirige internamente, colocándose lateralmente de la vejiga, donde presenta una ampolla (Carlos A. Robles, 2004).

Túnica vaginal y cordón espermático

El proceso peritoneal (túnica vaginal) que envuelve al testículo es una evaginación del revestimiento del abdomen a través del canal inguinal (Dyce y col., 1999).

El cordón espermático consiste en su mayor parte en la arteria y las venas testiculares.

Glándulas anexas

Las glándulas anexas son otros componentes importantes del aparato reproductor. Además de las ampollas, se encuentran las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbo uretral. Ellas le dan fluidez, volumen y movilidad al eyaculado (Duran Del Campo, 1980).

Pene

Esta es la parte final del tracto reproductivo masculino y su función es la de depositar semen en el tracto vaginal de la hembra. El pene finaliza en un tubo estrecho llamado el proceso de la uretra que pulveriza el semen alrededor del cuello del útero de la oveja. El prepucio protege el pene, excepto durante el apareamiento.

Presenta una longitud de 40 centímetros pudiendo dividirse en tres partes: la raíz, el cuerpo y el glande. Es de naturaleza fibroelástico en el carnero. La raíz está unida a la pelvis por dos ramas laterales que se prolongan formando las bandas laterales del cuerpo del pene. Estas y una tercera banda central se unen para formar el cuerpo cavernoso. La banda central llamada también cuerpo esponjoso rodea la uretra.

Los dos músculos retractores del pene, que controlan la longitud de la salida del pene (aproximadamente 5 cm) mediante su acción sobre la flexura sigmoidea están insertos sobre las vértebras sacras. El glande es la parte terminal del pene, donde desemboca la uretra a nivel del surco superficial ventral del cuerpo cavernoso. La uretra presenta una prolongación rizada de 3 a 4 centímetros denominada proceso uretral o apéndice vermiforme. Este apéndice actúa como látigo impulsando el semen contra el cuello del útero. La ausencia por extirpación no afecta la fertilidad (Fernández Abella, 2003).

Pubertad

Según Davis y col, 1986 La pubertad en corderos machos se basa en el desarrollo del pene, parámetros de la espermatogénesis, cambios testiculares y cambios hormonales. Sin embargo Amann y Schanbacher, 1983 describen a efectos prácticos, aunque la pubertad es un proceso paulatino, en carneros se puede definir la pubertad como la edad cuando el eyaculado contiene 50×10^6 espermatozoides/mL y presenta por lo menos un 10% de células móviles.

La maduración postnatal del aparato reproductor masculino implica una serie de cambios en las características morfológicas, funcionales y bioquímicas que son un requisito previo para la producción y la transferencia de gametos viables (Desjardins, 1978).

Esta serie de cambios dan como resultado el desarrollo testicular, la diferenciación de las células germinales en el testículo, la activación de las células de Sertoli y de las células de Leydig y el desarrollo de las glándulas sexuales accesorias. El desarrollo sexual, tal como se indica por el crecimiento de los órganos reproductivos y por la realización de la espermatogénesis en forma completa, parece estar más estrechamente relacionado con el crecimiento del cuerpo que por la edad cronológica (Dyrmundsson, 1973). Por lo tanto el nivel de nutrición durante la cría, o cualquier alteración en el crecimiento, puede tener una marcada influencia en el desarrollo puberal.

En el cordero inmaduro, el glande del pene y el apéndice vermiforme de la uretra están completamente adheridos al prepucio (Dyrmundsson, 1973). La separación de estas adherencias ocurre en forma gradual, dándose primero a nivel del proceso uretral y a continuación en el glande. En la pubertad, el pene se encuentra totalmente libre dentro del prepucio y se puede exponer.

Savoie y col., 1981 han clasificado el desarrollo de la secreción postnatal de LH en tres fases. Una primera fase de aumento de LH durante las dos primeras semanas de vida. El aumento de los niveles de LH durante esta fase es debido a un aumento en la amplitud de los picos de la misma. Una segunda fase caracterizada por altas concentraciones sanguíneas de LH con alta variación entre semanas (desde la tercera semana después del nacimiento hasta la semana 8-11) y la tercera y última fase post puberal cuando baja la concentración sanguínea de LH (Wilson y Lapwood, 1979; Pelletier y col., 1981).

Con respecto a la FSH, los niveles plasmáticos aumentan a partir del nacimiento hasta las 8-10 semanas de edad. Este aumento es esencial para el desarrollo normal de los testículos, establecimiento de la población de células de Sertoli y el comienzo y mantenimiento de la espermatogénesis (Kilgour y col., 1998). Luego disminuye en forma similar al perfil de secreción de la LH (Lee y col., 1976; Savoie y col., 1979; Walton y col., 1980).

Las células de Leydig producen la hormona sexual masculina conocida como testosterona. Cada pulso de LH induce un aumento de testosterona plasmática. El establecimiento de esta relación es un elemento clave en la maduración sexual de los corderos (Wilson y Lapwood, 1979).

Sin embargo, durante el primer mes de vida el testículo no es capaz de responder a todos los pulsos de LH (Lafortune y col., 1984).

Luego del primer mes de vida aumenta la capacidad de las células de Leydig de responder a la LH, alcanzando su plenitud hacia las ocho semanas de edad (Foster y col., 1978).

La mayoría de la testosterona se conduce a la circulación general, resultando de gran importancia para el desarrollo y mantenimiento de la libido, la actividad secretoria de los órganos sexuales accesorios y las características secundarias asociadas al fenotipo masculino, tales como el aumento de la masa muscular y esquelética (anabolismo) (Ungerfeld, 2002).

Espermatogénesis

La espermatogénesis en el carnero demanda unos 63 días, resultante de sumar 49 días para formar espermatozoides y 14 días para la maduración espermática en epidídimo (Simonetti y col., 2014). Se define como el desarrollo de la célula germinal masculina en el mamífero adulto, o como la suma de las transformaciones que resultan en la formación de espermatozoides a partir de espermatogonias, al mismo tiempo que se mantiene constante la cantidad de éstas últimas (Cavestany, 1986). Este proceso se lleva a cabo dentro de los túbulos seminíferos. Si bien la aparición de los primeros espermatozoides en el eyaculado de los carneros varía según las razas, en general se observan entre los 3 y 5 meses de edad (Fernández Abella, 1993).

Las principales hormonas hipofisarias que controlan la espermatogénesis son la LH y la FSH (Amann y Schanbacher, 1983). La LH gobierna la actividad de las células de Leydig, mientras que la FSH actúa sobre las células de Sertoli. La iniciación de la espermatogénesis depende más del desarrollo del animal que de su edad (Courot, 1962). El número de células de Sertoli en los testículos de un animal condiciona el número de células germinales que dicho animal puede producir, lo que limita la capacidad de producción espermática (Orth y col., 1988). Los gonocitos retoman su actividad mitótica y comienzan a diferenciarse aproximadamente a los 2 meses de edad en los corderos machos, lo que lleva a un incremento del tamaño testicular (Courot, 1962).

La presencia constante de LH es necesaria para que la actividad espermatogénica sea normal, debido a que de esta hormona depende la producción de testosterona.

Evans y Maxwell (1990) detallan que la FSH es necesaria para iniciar la producción de espermatozoides en la pubertad o al comienzo de la estación reproductiva, pero no parece ser necesaria para el mantenimiento de la espermatogénesis.

La FSH parece ser de mayor importancia en mantener el número normal de células de Sertoli durante el período prepuberal (Kilgour y col., 1998).

Existen otras hormonas que pueden influir en la actividad espermatogénica. Tal es el caso de la prolactina, que estimula la espermatogénesis a través de un incremento del número de receptores a LH presentes en las células de Leydig (Sharpe, 1982).

Factores que influyen en la espermatogénesis

Está demostrado que el sistema neuroendocrino reproductivo de los carneros es altamente sensible a cambios en la nutrición (Wood y col., 1991a) y en los corderos machos, afecta marcadamente el inicio de la pubertad (Pretorius y Marincowitz, 1968). Los alimentos que contienen alto porcentaje de proteínas logran incrementar aproximadamente un 40% la producción espermática (Oldham y col, 1978; Cameron y col 1988). En cambio, los que son ricos en energía provocan procesos degenerativos en la maduración espermática (Gunn, 1942; Galloway, 1966). Los animales inmaduros son más susceptibles que los adultos a deficiencias nutricionales y en algunas circunstancias pueden sufrir daños permanentes en la función reproductiva (Ferrel, 1991). En el período prepuberal, la desnutrición da como resultado generalmente un desarrollo sexual retardado, caracterizado por un retraso en el inicio de la pubertad, por la aparición tardía de los genitales externos y supresión de la espermatogénesis (Reid, 1960; Baronos y col., 1969; Leathem, 1975). Esto estaría explicado porque una subnutrición retrasa el proceso de maduración a nivel de hipotálamo e hipófisis (Short y Adams, 1988), donde se inhibe la liberación de GnRH, disminuye las reservas hipofisarias (Alkass y col., 1982) y disminuye la cantidad de picos plasmáticos de LH (Lindsay y col., 1984), con la consecuente caída de la producción de testosterona (Setchell y col, 1965).

En lo referido a estacionalidad, sensibilidad del carnero al fotoperiodo no es tan marcada como en la oveja. A diferencia de las ovejas que sólo producen óvulos durante cierta época del año, los carneros producen espermatozoides de manera continua.

Sin embargo, la eficiencia reproductiva varía a lo largo del año, coincidiendo la época cíclica de las ovejas con el mejor desempeño reproductivo de los carneros.

El peso y tamaño testicular alcanza su máximo desarrollo en el otoño (300 gramos en promedio; circunferencia escrotal de unos 30-32 cm), lo que asegura una producción espermática mayor.

La calidad espermática también está afectada por el fotoperiodo, de modo que durante los días largos se tornan más frecuentes las alteraciones morfológicas, tales como la presencia de gota citoplasmática y las anomalías en acrosoma. En las razas más estacionales la libido está afectada por las horas de luz, disminuyendo durante la primavera/verano (Simonetti, y col 2014).

La duración de la secreción nocturna de la melatonina sigue un ritmo circadiano endógeno y actúa como un mensaje pasivo que provee información al eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, activando o inhibiendo su acción (Reiter, 1993).

Dacheux y col. (1981) registraron que la producción del parénquima testicular es 50 a 80% menor en primavera que en otoño. Los cambios estacionales en la actividad reproductiva en los carneros son menos evidentes cuando se mantienen cerca de la zona ecuatorial. Esto se debe a que, en estas áreas, los cambios en el fotoperiodo son menos pronunciados (Souza y col., 2007). Hay notorias diferencias entre razas ovinas, y existe un vínculo entre el origen geográfico de una raza ovina y su grado de estacionalidad. En términos generales, cuanto más cercano a los polos geográficos es el origen de una raza, más marcada es la estacionalidad reproductiva que presenta (Bronson, 1988).

Con respecto a razas con mayor aptitud carnífera o lechera tienden a producir semen de mayor concentración espermática que las razas de aptitud lanera. También se reporta una mayor prepotencia o conducta sexual en los machos carníferos o lecheros (Simonetti y col., 2014).

En un estudio realizado por Fernández Abella y col. (1993) se demostró un descenso del 10% de la producción espermática en la raza Corriedale en

comparación con Ideal, Merino y Merilín, constatada por una menor producción por volumen testicular, lo que reduce la espermatogénesis.

Semen

El semen es el producto de la mezcla del material fluido y morfológico. El primero es producido por los conductos excretores y glándulas anexas del aparato genital, siendo estas las vesículas seminales, próstata, glándulas de Cowper, litre y uretra. En cuanto a la parte morfológica, esta es producida por los testículos, espermatozoides (Duran Del Campo, 1980).

El carnero emite un promedio de volumen de semen de 0.8 a 1 cc³. Del mismo el 74% corresponde a líquido seminal y 26% a los espermatozoides. El fluido seminal presenta un pH ácido de 6.5 a 6.8. Contiene un 86% de agua y el 14% restante es materia seca, siendo la misma diversas sales inorgánicas y trazas minerales. En cuanto a los carbohidratos la fructosa es la más importante y abundante, la misma es la causante de proporcionar energía al espermatozoide mediante su desdoblamiento químico (Duran Del Campo, 1980).

Técnicas de extracción de semen

Hay básicamente dos maneras de obtener semen de un carnero, ello es a través del uso de una vagina artificial o de la electro estimulación.

La extracción con vagina artificial necesita en general de un entrenamiento del carnero, una rampa para saltos (no es imprescindible), un cepo y una hembra en celo. Es una técnica poco traumática por lo que es recomendable su uso en carneros destinados a la producción de semen en programas de Inseminación Artificial.

La electro estimulación por su lado es de aplicación mucho más sencilla, pero más cruenta que la anterior, por lo que es la técnica indicada para obtener semen ocasionalmente, como ocurre cuando se quiere obtener una muestra de semen para chequear la presencia de una enfermedad que afecta el aparato reproductor del macho (Robles, 2004).

Por vagina artificial:

En este caso se usa un instrumento denominado vagina artificial, que simula las características de la vagina de la oveja. Los elementos de la vagina artificial que van a estar en contacto con el pene y el semen del carnero deben ser convenientemente lavados y desinfectados en razón de que la muestra debe ser tomada en la forma más aséptica posible.

Con respecto al carnero se aconseja realizar una buena higiene de la zona prepucial consistente en el recorte de pelos prepuciales, lavado con solución fisiológica o algún desinfectante suave, lavado y secado de toda el área.

Una vez cumplidos con estos requisitos, se puede realizar la extracción del semen. Para ello se debe contar con una hembra en celo, ya sea éste natural o estimulado artificialmente, que se coloca en una rampa o cepo para el salto. Se acerca el carnero, se espera que se excite y finalmente se lo deja montar. En el momento del salto y cuando el carnero desenvaina, se toma el pene con una mano y se lo desvía dentro de la vagina artificial dentro de la cual el carnero eyaculará. Una vez obtenido el eyaculado, retiramos el tubo colector de la punta y tapamos rápidamente para evitar contaminaciones (Robles, 2004).

Por electro estimulación:

En esta variante, que consideramos la más práctica para la evaluación sanitaria del semen, se usa un electro estimulador que consiste en una fuente productora de electro estímulos regulables en intensidad y frecuencia, conectado por un cable a un electrodo bipolar. Al igual que para el caso anterior es necesario hacer una buena higiene de la zona prepucial lavando con solución fisiológica o un desinfectante suave sin olvidar secar el área lavada.

El carnero es colocado en el suelo o sobre una tarima, en decúbito lateral. Un asistente situado sobre el dorso del animal, sujeta a este apretándolo por los ijares y tomando los miembros posteriores, tira de estos hacia atrás.

A continuación se tracciona del pene hasta tenerlo totalmente fuera de la cavidad prepucial, y tras higienizarlo, lo envolvemos por detrás del glande con una gasa lo que nos permitirá mantener con seguridad el pene fuera de la cavidad prepucial.

El electrodo es entonces lubricado con vaselina o similar e insertado en el recto del carnero a una profundidad de 10 a 15 cm., coincidiendo aproximadamente con la ubicación de las glándulas seminales.

Se coloca el extremo del glande dentro del tubo donde recolectaremos el semen y se comienza con los estímulos eléctricos, que suaves y lentos al principio, se van incrementando paulatinamente hasta lograr la excitación del animal y la erección del pene, lo que se logra con 6 a 10 revoluciones. En ese momento, se interrumpe por unos segundos la estimulación, se mueve el electrodo colocándolo un poco más adentro del recto esta vez y se da un nuevo estímulo breve de no más de media vuelta y normalmente se produce la eyaculación (Robles, 2004).

Evaluación del semen

En un eyaculado fecundante, las cualidades que deberían tener los espermatozoides son motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcional de la membrana, integridad de las enzimas asociadas a la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético (Graham, J.K., 1996).

Evaluación macroscópica

La evaluación no determina el grado de fertilidad, simplemente nos indica el estado de la muestra o eyaculado al momento de su colección (Elhordoy, 1998). Además provee información imprescindible para su uso en inseminación artificial. Los parámetros a evaluar son:

-Color

El color del semen se observa en primer término, debiendo el mismo ser blanco-lechoso o cremoso pálido, según la concentración de espermatozoides (Fernández Abella, 2003).

Tabla N°1 Concentración espermática según color seminal

Tonalidad	Millones/ml
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 1992, modificado Fernández Abella 2002.

- Volumen

En cuanto al volumen, normalmente se encuentra entre 0,5 y 2,0 mL, esto depende de la excitación previa del animal, de la época de año en que se realiza la colecta, la edad del mismo, número de eyaculados por día y el método de colecta (Fernández Abella, 2003).

- Olor

El semen debe de ser inodoro, si presenta olor, puede ser causado por infección o contaminación por orina (Fernández Abella, 2015).

- Motilidad en masa

Se observa en el propio tubo de colecta. Se puede observar ondas que son producto de la concentración espermática, movilidad de espermatozoides y porcentaje de células espermáticas vivas (Fernández Abella, 2003).

Relación entre la movilidad grupal (masal) y el porcentaje de espermatozoides móviles del semen:

Tabla N°2 Motilidad masal

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.

Evaluación microscópica:

Estas pruebas son realizadas a microscopio, donde se evalúa: motilidad individual, movimiento en masa, concentración, morfología y vitalidad.

El movimiento en masa se realiza colocando una gota de semen en un portaobjeto limpio, seco y entibiado a 37°C, se lleva a microscopio y se evalúa. En la evaluación de la motilidad individual se verifica el porcentaje de espermatozoides que presenten un movimiento progresivo o normal, ya que esto determina que el espermatozoide avance y pueda fecundar (Fernández Abella, 2003).

En el caso de la concentración su determinación puede ser exacta o estimativa, la primera es fundamental para realizar la dilución de la muestra la cual se utilizará en IA. A su vez dicha determinación puede realizarse en forma manual en un hemocitómetro (Neubauer, Thoma o Makler) o en equipo automatizado (CASA), o en fotolorímetro (Fernández Abella, 2015).

El estudio de la morfología espermática valora la incidencia de las diferentes formas que se apartan de la morfología normal de los espermatozoides. El conocimiento del impacto negativo que tienen elevados porcentajes de anomalías espermáticas, fundamentalmente las de cabeza, sobre la fertilidad de los carneros (Hulet y col., 1965),

así como, la disponibilidad de técnicas accesibles para evaluarla, justifican su incorporación cuando se evalúa semen. El concepto de defectos primarios y secundarios sirve bien para evaluar la aptitud reproductiva.

Cabe recordar que por definición, un defecto primario es aquel que se origina durante la espermatogénesis dentro del testículo y un defecto secundario, el que se origina dentro del epidídimo o en el laboratorio.

Blom, citado por Barth, 1990, introdujo un sistema de clasificación en defectos mayores y menores. Un defecto mayor es aquél que, presente en gran número, ha sido asociado con infertilidad. Los defectos menores son desviaciones que hasta ahora no han sido asociadas con infertilidad. Este sistema de clasificación es abierto y deberá ser modificado a medida que avance el conocimiento.

Una nueva clasificación en defectos compensables y no compensables fue propuesta por Saacke y col. (1994) Los espermatozoides con defectos compensables son aquellos incapaces de alcanzar el oviducto o de participar del proceso de fertilización. Tales espermatozoides tendrían poco efecto sobre la fertilidad, si se insemina con un número suficiente de espermatozoides aptos. En cambio, los espermatozoides con defectos no compensables (cráteres y vacuolas nucleares -defecto diadema-), acceden al óvulo como los espermatozoides normales, son capaces de penetrar la zona pelúcida desencadenar la reacción cortical impidiendo la entrada de otros espermatozoides. La presencia de este tipo de defectos suele ser la causa de baja fertilidad dado que, luego de la fertilización, se desarrollan embriones de mala calidad que mueren durante los primeros días de gestación. (Catena, 1999) También es de importancia la medición del pH, así como las pruebas bioquímicas como por ejemplo la prueba de la deshidrogenasa o reducción del azul de metileno, se basa en que los espermatozoides consumen la fructosa (azúcar del semen) transformándola en ácido láctico.

Posteriormente este produce anhídrido carbónico, agua y libera hidrógeno. A mayor actividad de los espermatozoides (mayor cantidad de vivos, menos formas anormales) mayor liberación de hidrógeno, el cual reacciona con el azul de metileno que cambia de color. La prueba consiste en medir el tiempo que tarda la mezcla en virar del color azul al blanco (Fernández Abella, 2003).

Sistema automatizado de evaluación de semen (CASA)

Un sistema CASA ("Computer Assisted Semen Analysis") es un sistema automático, objetivo y estandarizado para la evaluación de la motilidad en muestras de semen, nos informa tanto de la velocidad, como del número de espermatozoides que se mueven.

El CASA permite la evaluación automatizada y clasificada de la concentración espermática y la motilidad (Osorio, 2013). Proporciona información precisa acerca del estado funcional del axonema y de las membranas espermáticas. De este modo se puede relacionar los datos que nos proporciona con la fertilidad potencial de la muestra.

El software que contiene el CASA, identifica y mide automáticamente los parámetros de los movimientos de los espermatozoides en campos microscópicos capturados con objetivo 10 x, y contraste de fase negativa. También calcula porcentaje y concentración espermática de la muestra seminal. Los resultados del análisis incluyen los parámetros de: Velocidad curvilínea (VCL), Velocidad media (VAP), Velocidad rectilínea (VSL), Índice de rectitud (STR), Índice de linealidad (LIN), Índice de oscilación (WOB), Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH) y Frecuencia de batido de la cabeza (BCF). El tiempo de análisis es de 1 segundo por campo (Bernardi y col, 2011; Beriau y col, 2016).

Oligoelementos

El término micro, oligoelementos o elemento traza se refiere a los elementos que están presentes en pequeñas cantidades en la dieta y son necesarios en pequeñas cantidades para el organismo.

Tan solo 15 elementos minerales han demostrado ser esenciales para el ganado ovino, entre uno de ellos se encuentra el Se (NRC, 2005).

Los minerales son necesarios para transformar la proteína y la energía de los alimentos en componentes del organismo o en productos animales, ayudando al organismo a combatir las enfermedades al mantener al animal en buen estado de salud.

Solos, asociados entre sí o combinados con grupos orgánicos, los minerales ejercen sus funciones esenciales a diferentes niveles dentro del organismo animal, y a pesar que hay diferencias importantes entre los distintos elementos, existe un esquema general para todos ellos.

Un lugar donde ejercen sus funciones específicas es a nivel tisular, con funciones estructurales (formación de huesos y otros tejidos de sostén) o funciones metabólicas (componentes de enzimas o coenzimas, transmisión del impulso).

En general, las carencias y/o desequilibrios de minerales producen un cuadro de situación nutricional que se manifiesta en los animales jóvenes principalmente con retardo del crecimiento y problemas osteoarticulares (Blood et al, 1986), y en adultos, especialmente por problemas reproductivos (Gooneratne y col., 1989; Igarza, 1994) y disminución de la producción.

Los más afectados son los rodeos que están alimentados exclusivamente a base de pasturas y/o forrajes conservados de mala calidad (Corbellini, 1985).

Selenio

El Se es un elemento que se encuentra en forma constante pero en pequeñas cantidades en los tejidos animales. Investigaciones de tipo bioquímico, ubican el Se como uno de los micronutrientes esenciales para los animales.

Metabolismo

El forraje es una de las fuentes de Se, como la selenometionina, se libera en el rumen y no puede absorberse en dicho órgano en una cantidad apreciable. En el abomaso, la absorción es limitada, de allí pasa para absorberse principalmente en el intestino delgado (Wright y Bell, 1996; Surai, 2006).

Sin embargo, no solo la cantidad del elemento en el suelo es importante, también existen diversos factores que pueden afectar la concentración de los minerales en los forrajes, el tipo de suelo, la presencia de otros elementos competitivos, presencia de contaminantes, las sucesivas fertilizaciones, las especies forrajeras presentes, el clima, la estación del año y la edad de las plantas, son algunos de los factores que pueden modificar y anular la posibilidad de que los animales

cubran sus necesidades en microminerales durante el año (Georgievskii y col, 1982).

Existe sin embargo una fuerte relación entre las concentraciones de Se en el suelo, las plantas y los tejidos de los animales que las consumen (Pastrana y col, 1991). Las plantas que crecen en este tipo de suelo sufren la deficiencia y la deficiencia ocurrirá en los animales que se alimentan con ellas. La metilo-selenocisteína es el mayor compuesto selenificado en las plantas, demostrable en raíces como el ajo y la cebolla (Whanger, 2002).

Después de la absorción intestinal, el Se 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 (Krishnamurti y col., 1989).

La GSH-Px que representa el 75% del Se sanguíneo está contenida en el interior de los glóbulos rojos (Oh y col., 1974; Hill y col., 1992).

Dicha enzima citosólica protege las células germinales, las proteínas y las membranas de orgánulos del estrés oxidativo (Ursini y col., 1999).

Al profundizar en el estudio de los mecanismos patogénicos de las deficiencias de Se, se observa una patología oxidativa como causante de los disturbios metabólicos, esto se debe a la incapacidad de la GSH-Px para destruir peróxidos que se producen durante el habitual metabolismo aerobio.

Los 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.

Los peróxidos se reducen 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⁺).

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 como lípidos desencadenando

una peroxidación lipídica responsable de cambios estructurales y rotura de la bicapa lipídica de las membranas celulares (Burk y Hill, 2005; Muiño y col., 2008). Estas alteraciones orgánicas, relacionadas con disturbios oxidativos, adquieren gran importancia con animales con deficiencia de Se en la dieta, asociados o no a bajas concentraciones de vitamina E en la misma. (Silva, M 2015).

Disponibilidad en Uruguay

La información disponible en Uruguay sobre el contenido de minerales en las pasturas es parcial y con una alta variabilidad de los valores publicados (Berretta, 1998; Pigurina y col, 1998; Ungerfeld, 1998; Piaggio y Uriarte, 2005). No obstante, los microelementos como el zinc, el Se, el yodo y el cobalto, asociados a los balances vitamínicos, presentan un contenido marginal en nuestras pasturas (Berretta, 1998; Pigurina y col, 1998; Ungerfeld, 1998; Piaggio y Uriarte, 2005).

El Se se distribuye de forma desigual en la corteza terrestre (constituye aproximadamente 0,09 ppm de la misma), los suelos que son derivados de rocas volcánicas (Basalto), tienen un tenor pobre en Se debido a la volatilización que sufriera este elemento durante la etapa ígnea, caso contrario el de las tierras arables que derivan de rocas sedimentarias, que son ricas en este mineral. El 21% de la superficie del Uruguay está ubicada sobre suelo de Basalto, donde se cría el 45% de la población ovina del país (4 millones) y más específicamente allí se cría el 70% de la población de la raza Merino Australiano (Montossi y col, 2007).

Importancia del Se en la reproducción

Existe información de países de cría ovina extensiva como Australia y Nueva Zelanda que muestran la importancia de los microelementos en la reproducción ovina. Se reporta que la administración de Se mejora la fertilidad de los carneros y de las ovejas, la supervivencia neonatal y el crecimiento de los corderos (Piper y col, 1980; White y col, 1997; Van Ryssen y col, 1999; Balicka-Ramisz, 2006). Existen claras evidencias que los animales presentan mayores necesidades de Se durante la etapa reproductiva,

puesto que en las rutas metabólicas de los organismos en desarrollo, con un alto número de mitosis, se originan gran cantidad de radicales libres como productos intermedios (Lopez Alonso y col., 1997).

El Se 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 Se 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 (Kendall y col., 2000).

HIPOTESIS:

- La calidad del semen de los carneros suplementados con Se es superior a la de los no suplementados.
- La implementación de nuevas tecnologías (CASA) en la evaluación del semen de carneros mejora la misma frente al método tradicional.

OBJETIVOS:

Objetivo general:

Mejorar la selección de carneros Merino Australiano, para su utilización en programas de reproducción, suplementando con Se e incorporando nuevas metodologías en el análisis de semen.

Objetivos específicos:

1-Comparar la calidad del semen resultante de la valoración tradicional a campo y la automatizada ISASv1, para carneros Merino Australiano con y sin suplementación de selenio.

2-Comparar la concentración de espermatozoides determinada por el método tradicional (a campo), frente al método automatizado ISASv1.

MATERIALES Y METODOS:

El ensayo se llevó a cabo entre los meses de enero a mayo de 2015, en el establecimiento “El totoral” propiedad de familia Grasso, siendo responsable del mismo el Sr. Enrique Rodríguez Grasso. El predio está ubicado sobre la ruta nacional Coronel Gorgonio Aguiar, N° 31 km 29, departamento de Salto. Latitud 31°23'18.82"S, longitud 57°38'12.05"O.

Ubicación del departamento de Salto



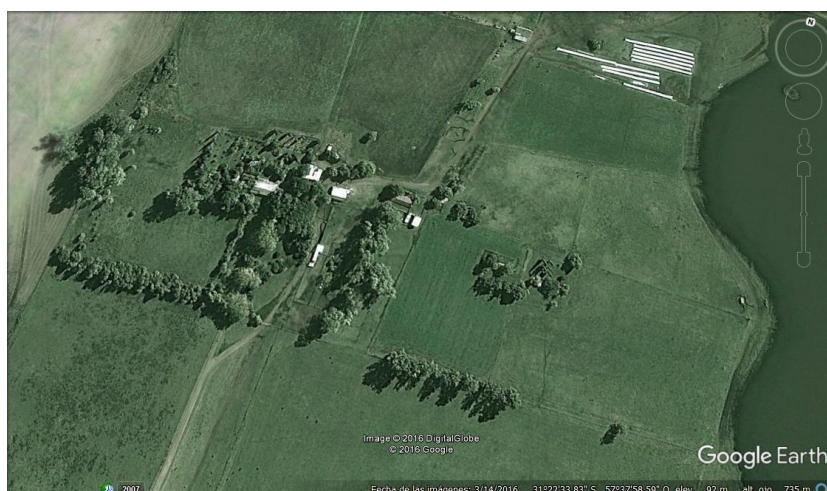
<http://www2.luventicus.org/mapas/uruguay/salto.gif>

Ubicación de “El Totoral” en el departamento de Salto



Fuente: Google Earth.

Imagen del establecimiento



Fuente: Google Earth

Trabajo de campo

Manejo de los carneros:

El día 31 de enero de 2015 a un grupo de 40 carneros de raza Merino Australiano se le realizó un estudio de aptitud reproductiva (medida de circunferencia escrotal, condición corporal, edad), extracción y determinación de la calidad del semen, (pruebas macro y microscópicas, color, volumen, movilidad masal y concentración respectivamente). Se seleccionaron 14 animales para el ensayo, cada uno identificados mediante caravanas numeradas.

Se determinó la condición corporal según la escala de Jefferies, 1961 y para medir la circunferencia escrotal se utilizó una cinta métrica (exactitud $\pm 0,1\text{cm}$), la edad se estimó por la dentición.

Todas las muestras de semen fueron extraídas el mismo día y analizadas según Fernández Abella; 2015.

Se realizó extracción de semen mediante electroeyaculador modelo Electrojac 5, utilizándolo de acuerdo a las instrucciones del fabricante, aplicándoles a todos los animales la misma cantidad de ciclos, en forma automática. Los operadores fueron profesionales entrenados en dicha técnica.

En modo automático, el circuito produce una serie de 32 ciclos, y cada ciclo brinda una intensidad ligeramente superior. Cada ciclo dura 2 segundos, con una pausa de 2 segundos. Diseñado para pasar por los 32 ciclos a menos que sea interrumpido por el interruptor de encendido/apagado o el interruptor de intervalo.

Las muestras se mantuvieron en un baño termostático a 32°C durante la evaluación de la calidad seminal.

A la totalidad de los carneros utilizados en este ensayo se realizó el conteo de huevos por gramo de materia fecal (HPG) utilizando la técnica de Mc Master (Thienpont,1986), para estimar la carga parasitaria de nematodos gastrointestinales en dos oportunidades, día 0 y 70.

El manejo realizado contra parásitos gastrointestinales fue la dosificación al inicio del ensayo con 10mg/kg vía oral de Closantel (Saguicid C-L 10%®. Laboratorio Dispert, Montevideo, Uruguay).

Se formaron dos grupos de 7 carneros homogéneos en cuanto a condición corporal (entre 3 y 4, Jefferies, 1961) y edad (diente de leche y 2 dientes) Tablas N°3 y 4. A un grupo se lo dosificó con una sola dosis de Se, (grupo suplementado), el otro no fue dosificado, grupo testigo. La suplementación se realizó con un producto comercial, Selfos plus® (selenito de sodio 0,347g/100mL, laboratorios Agrolnsumos S.A.) a la dosis indicada por el fabricante (1cc cada 50 kg de peso vivo) vía subcutánea.

Ambos grupos de carneros estuvieron expuestos al mismo manejo alimenticio durante el ensayo, pastorearon rastrojo de soja, pradera y campo natural.

A los 70 días de la suplementación, se obtuvo nuevamente una muestra de semen de cada carnero mediante electro eyaculación y se valoró según lo descrito anteriormente.

Tabla N°3 Grupo suplementado:

Numero	Dentición	CC	CE	Peso
12	DL	3	27	37
13	DL	3	27	49
16	2-D	3.75	35	46
18	2-D	3.5	30	47.5
19	DL	3.5	26	41
20	DL	3	27	39.5
23	2-D	3	28	46
25	2-D	3.5	30	44
27	2-D	3.5	30	59
28	DL	3	26	34

Tabla N°4 Grupo testigo:

Numero	Dentición	CC	CE	Peso
10	DL	3	29	38
11	2-D	3.5	28	47
14	2-D	3.5	30	46.5
15	2-D	3.5	29	40
17	DL	4	26	43
21	2-D	3	25	41
22	2-D	4	27	46.5
24	DL	3	27	38
26	DL	3.5	32	51
29	2-D	3.5	25	35

Tabla N°5 Composición de *Selfos plus*®

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

Manejo del semen y análisis del semen

Una vez colectado el semen, se realizó una valoración a nivel de campo que consistió en: medir volumen del eyaculado, concentración y la motilidad de masa. El volumen (mL) se determinó mediante una pipeta graduada.

La concentración espermática mínima se estimó mediante el color utilizando Tabla N°1

La motilidad masal e individual del eyaculado se determinó utilizando Tabla N°2

La concentración espermática (spz/ mL) se determinó a través del recuento de espermatozoides en cámara de Makler.

Las muestras de semen refrigeradas fueron llevadas al laboratorio de rumiantes para su análisis en el sistema ISASv1®. Se procedió según manual del sistema para la utilización de los módulos de motilidad y concentración (Manual ISASv1®, 2015).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Diseño experimental

Se realizó un DCA (Diseño completamente aleatorizado) para probar el efecto del agregado de Se inyectado a carneros Merino Australiano. Se seleccionaron 14 carneros, homogéneos en condición corporal, CE y peso.

Se seleccionaron aleatoriamente 7 de ellos para el tratamiento y 7 quedaron como grupo testigo.

Se midieron las variables volumen de eyaculado (centímetros cúbicos), concentración (millones spz/mL), motilidad macroscópica y microscópica, tipo de movimiento (estáticos, móviles progresivos y móviles no progresivos), velocidad (estáticos, lentos, medios y rápidos) y los diferentes parámetros para velocidad (VCL, VSL y VAP).

Se utilizaron dos formas de medición a campo y CASA, siendo campo: volumen, concentración, color seminal, motilidad macro y microscópica. En casa: concentración, tipos de movimiento, velocidad y parámetros de velocidad.

Análisis de datos

La información fue analizada mediante análisis de varianza de DCA, considerando 2 tratamientos (suplementados y no suplementados) y 7 repeticiones cada uno. Cuando fue necesario se realizaron contrastes de medias por MDS (mínima diferencia significativa)

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Se incluyó el factor método de estudio en las variables concentración y volumen por concentración. Resultando en ese caso un arreglo factorial de tratamientos con 2 niveles de Se (0,1) y 2 niveles de método de evaluación (campo y casa). En este caso el modelo fue:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \gamma_j + (\tau\gamma)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Para probar el efecto de la edad de los carneros en el agregado de Se, se anido el efecto de la edad de los carneros en cada tratamiento, resultando un modelo donde fue considerado el número de carneros de 2 dientes y diente de leche en cada grupo,

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \pi_{(\tau_i)j} + \varepsilon_{ijk}$$

Se trabajó al nivel de significación del 5%, en todos los casos.

Se probó la normalidad de los errores por medio gráfico, realizando un QQplot para los errores estandarizados de las variables medidas en porcentaje.

Se realizó el test de Levene para probar la homogeneidad de varianzas entre grupos (homocedasticidad). Este test es un anova de los errores en valor absoluto que surgen el anova inicial. En el caso en que las varianzas no fueron homogéneas, se realizó un análisis de varianza considerando un modelo mixto y modelando las varianzas.

RESULTADOS

Análisis de las condiciones iniciales

Condición corporal, circunferencia escrotal y peso para ambos grupos no presentaban diferencias significativas ($p > 0.05$), siendo estos homogéneos.

Tabla N°6 Medias de la condición corporal por tratamiento.

Tratamiento	Medias	
Suplementados	3.39	a
No suplementados	3.36	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabla N°7 Medias de circunferencia escrotal por tratamientos

Tratamiento	Medias	
Suplementados	28.14 cm	a
No suplementados	28.29 cm	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabla N°8 Medias de peso por tratamientos

Tratamiento	Medias	
Suplementados	44.07	a
No suplementados	44.00	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Motilidad

Se analizó motilidad macroscópica y microscópica a nivel de campo.

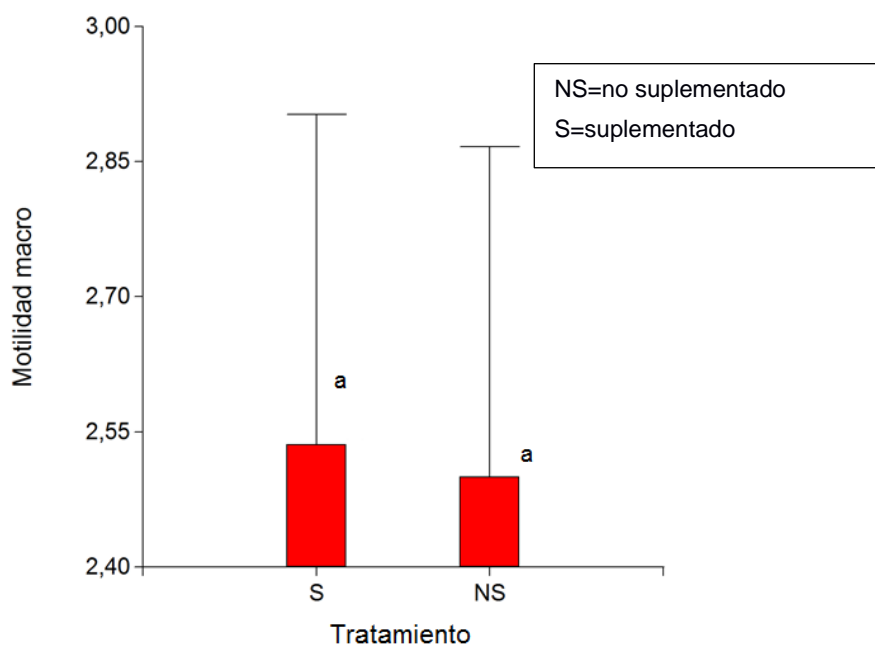
El valor medio de la motilidad macroscópica no mostro diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los tratamientos.

Tabla N°9 Motilidad macroscópica según tratamientos

Tratamiento	Media	
Suplementados	2.54	a
No suplementados	2.50	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura N°1 Motilidad macroscópica según tratamientos



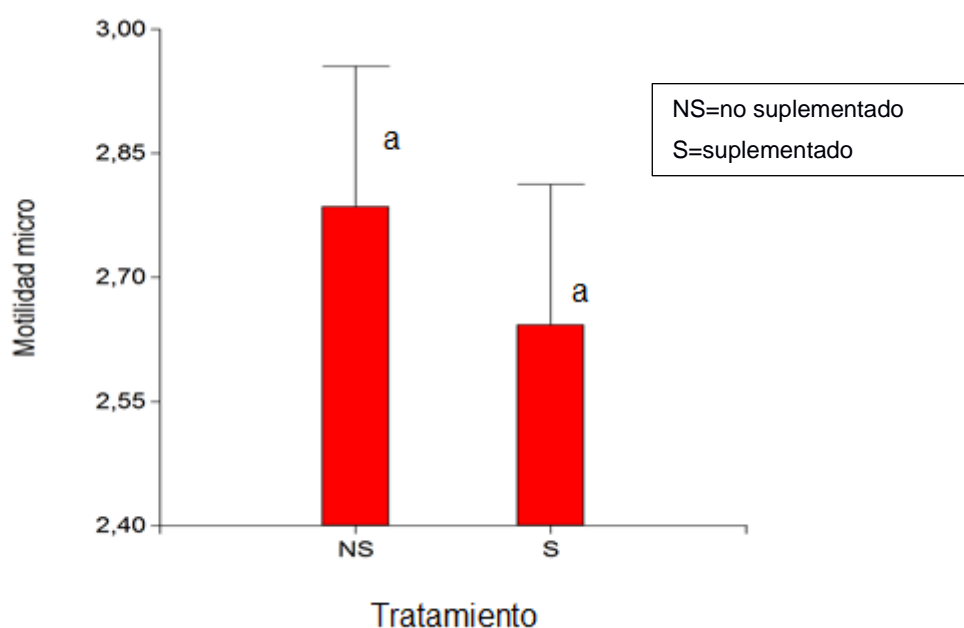
Cuando se estudió la motilidad microscópica de ambos grupos no se observó diferencias significativas entre grupo suplementado con Se y no suplementado.

Tabla N°10 Motilidad microscópica para cada tratamiento

Tratamiento	Media	
Suplementados	2.79	a
No suplementados	2.64	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura N°2 Motilidad microscópica para cada tratamiento



Color seminal

Para este parámetro se consideró una tabla de contingencia, donde las filas son los colores y las columnas son los tratamientos. Se estudió por chi cuadrado y no se observó diferencias significativas, eso resulta en que la proporción de los diferentes colores por tratamiento es equivalente.

Tabla N°11 Contingencia para color seminal, diferenciada por tratamiento.

Color seminal	No suplementado	Suplementado	Total
Crema	5	5	10
Crema claro	2	1	3
Lechoso	0	1	1
Total	7	7	14

Volumen de eyaculado

El valor medio de volumen de ambos grupos no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos.

Tabla N°12 Medias de volumen según tratamiento.

Tratamiento	Media (cc)	
Suplementado	1.64	a
No suplementado	1.32	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Concentración

Se comparó la concentración de espermatozoides (millones spz/ mL), tanto para los dos tratamientos como para cada método. Obteniéndose una diferencia significativa ($p < 0,05$) a favor del CASA.

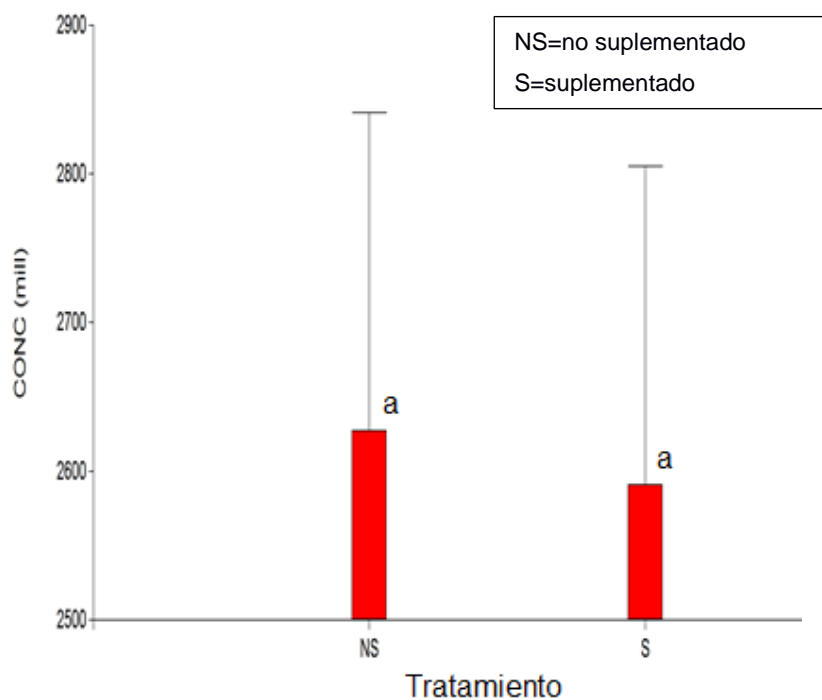
Cuando se analizó por tratamiento no se observó diferencia significativa ($p > 0,05$).

Tabla N°13 Medias para la concentración de espermatozoides de cada tratamiento.

Tratamiento	Media (millones spz/mL)	
Suplementados	2590,93	a
No suplementados	2627,29	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura N°3 Medias para concentración de espermatozoides para cada tratamiento.



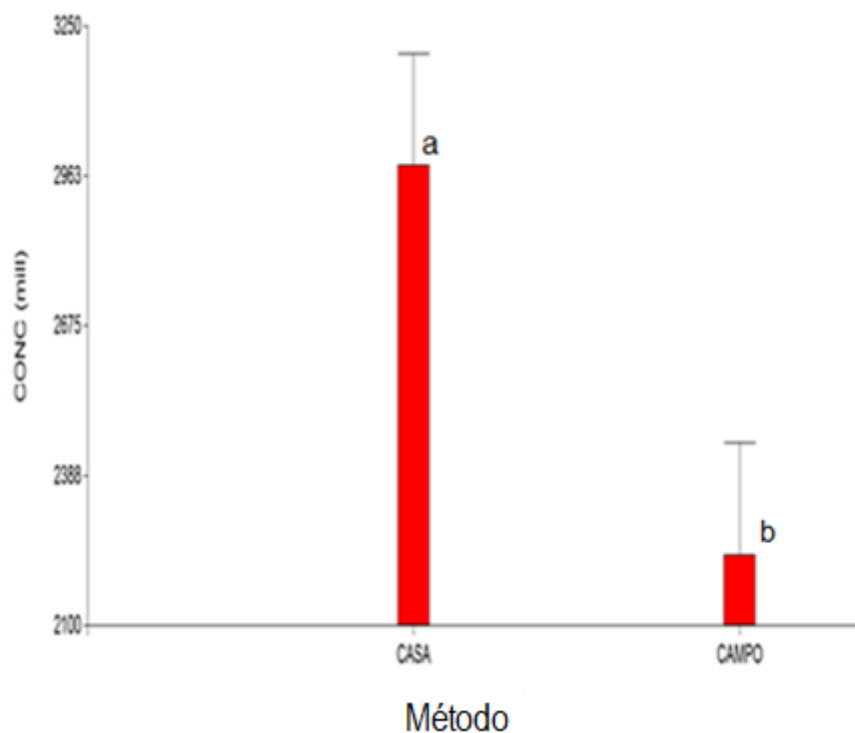
Cuando se analizó según método se observó diferencia significativa ($p < 0,05$), siendo mayor la concentración analizada mediante el sistema CASA.

Tabla N°14 Medias para la concentración de espermatozoides en los distintos métodos.

Método	Media (millones spz/mL)	
Campo	2235,71	b
CASA	2982,50	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura N°4 Medias de concentración según método



Producción total de spz (conc x vol)

En esta variable no se observó diferencia significativa ($p > 0,05$) entre tratamientos, ni métodos.

Tabla N°15 Medias, producción total de spz, en cada tratamiento y método.

Tratamiento	Método	Media	
Suplementado	CASA	4573,29	a
No suplementado	CASA	3896,14	a
Suplementado	Campo	3746,43	a
No suplementado	Campo	3067,86	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Para el estudio por categoría de los carneros que conformaban cada grupo se consideró la dentición y se utilizó un modelo con dentición anidado en tratamiento, esto quiere decir que los tratamientos fueron corregidos por los individuos de diferente dentición de cada grupo. No se observó diferencia significativa ($p > 0,05$) en la concentración respecto a la dentición.

Tabla N°16 Medias para tratamiento anidado según dentición.

Tratamiento	Dentición	Media	
No suplementado	2-dientes	2700,67	a
Suplementado	Diente de leche	2683,46	a
No suplementado	2-dientes	2489,89	a
Suplementado	Diente de leche	2507,11	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Resultados de las variables medidas con la tecnología CASA

Por medio del equipo automatizado se estudiaron los siguientes parámetros; Tipo de movimiento de los espermatozoides (estáticos, móviles progresivos y móviles no progresivos), velocidad de estos (estáticos, lentos, medios y rápidos) y los diferentes parámetros para velocidad (VCL, VSL y VAP). Para ninguna de las variables se encontró diferencia significativa ($p > 0,05$) entre carneros suplementados y sin suplementar.

Tipo de movimiento

Tabla N°17 Tipos de movimientos según tratamiento expresados en %

Tipo	suplementado	No suplementado	
Estáticos	12,99	15,77	a
Móviles progresivos	7,17	9,31	a
Móviles no progresivos	79,81	74,90	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura N°5 Tipos de movimiento según tratamiento (spz. Estáticos).

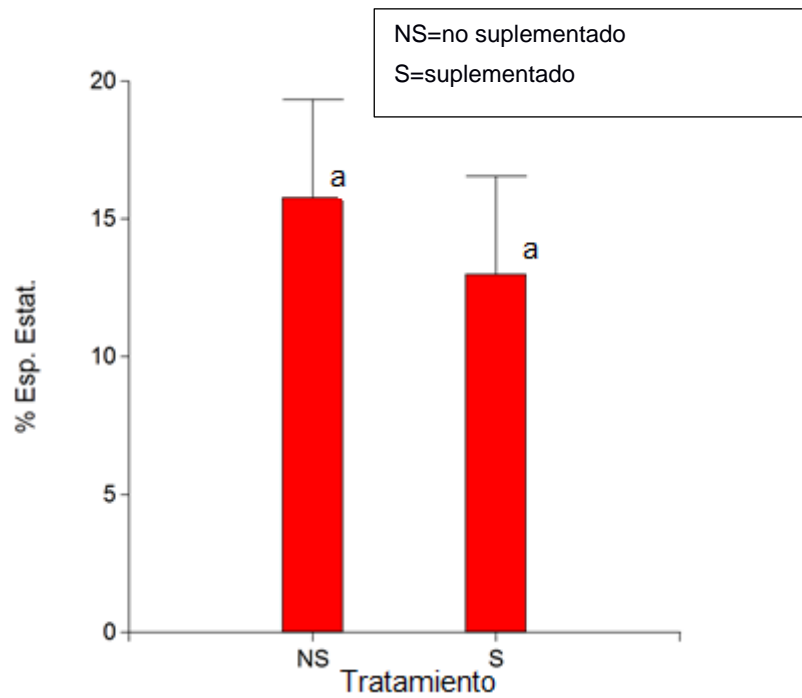


Figura N°6 Tipos de movimiento según tratamiento (esp. Móviles progresivos)

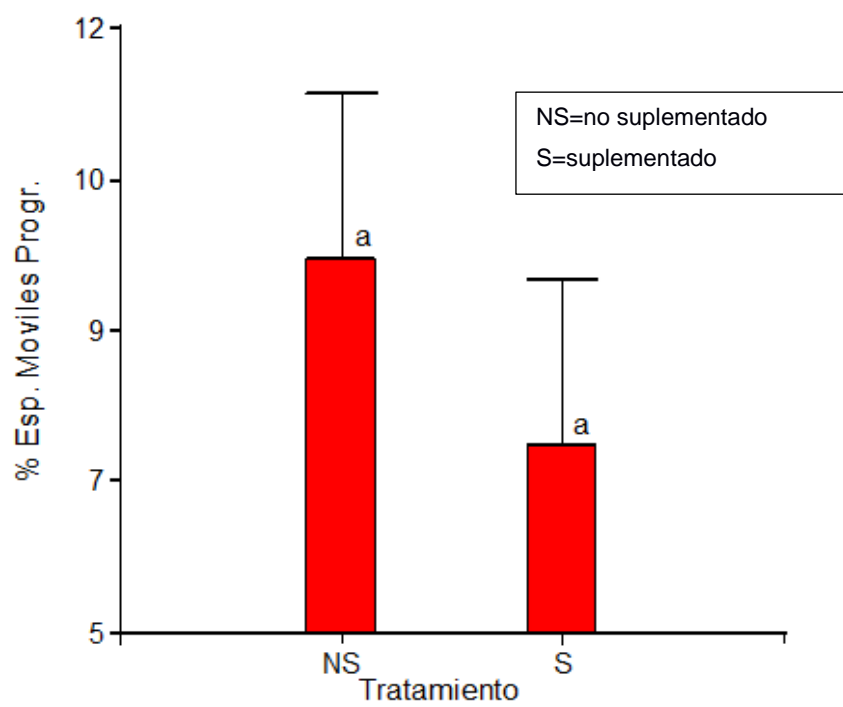
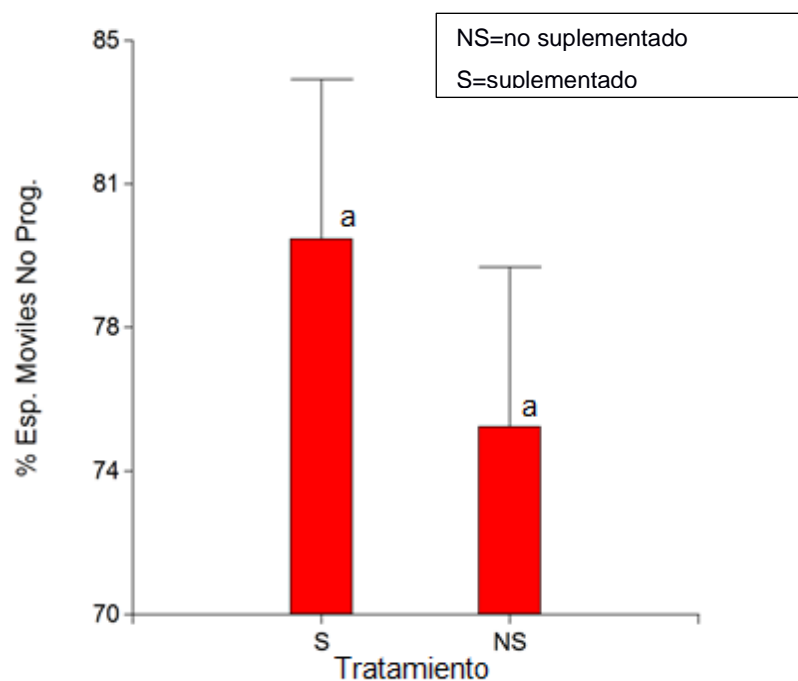


Figura N°7 Tipos de movimiento según tratamiento (esp. Móviles no progresivos)



Velocidad

Tabla N°18 tipos de velocidad según tratamiento expresada en %

Tipos de velocidad	Suplementados	No suplementados	
Rápidos	58,17	52,47	a
Medios	21,74	24,31	a
Lentos	7,07	8,09	a
Estáticos	12,99	15,77	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Para las variables medidas en porcentaje como velocidad y tipo de movimiento, se realizó un QQplot donde no se observó un alejamiento de la normal pronunciado por lo que se asume normalidad en los errores.

Se realizó el test de Levene, para probar la homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) entre tratamientos en las variables medidas en porcentaje, no resultando diferencias significativas. Se asume distribución homogénea de las varianzas de los errores.

Figura N°8 QQplot para velocidad.

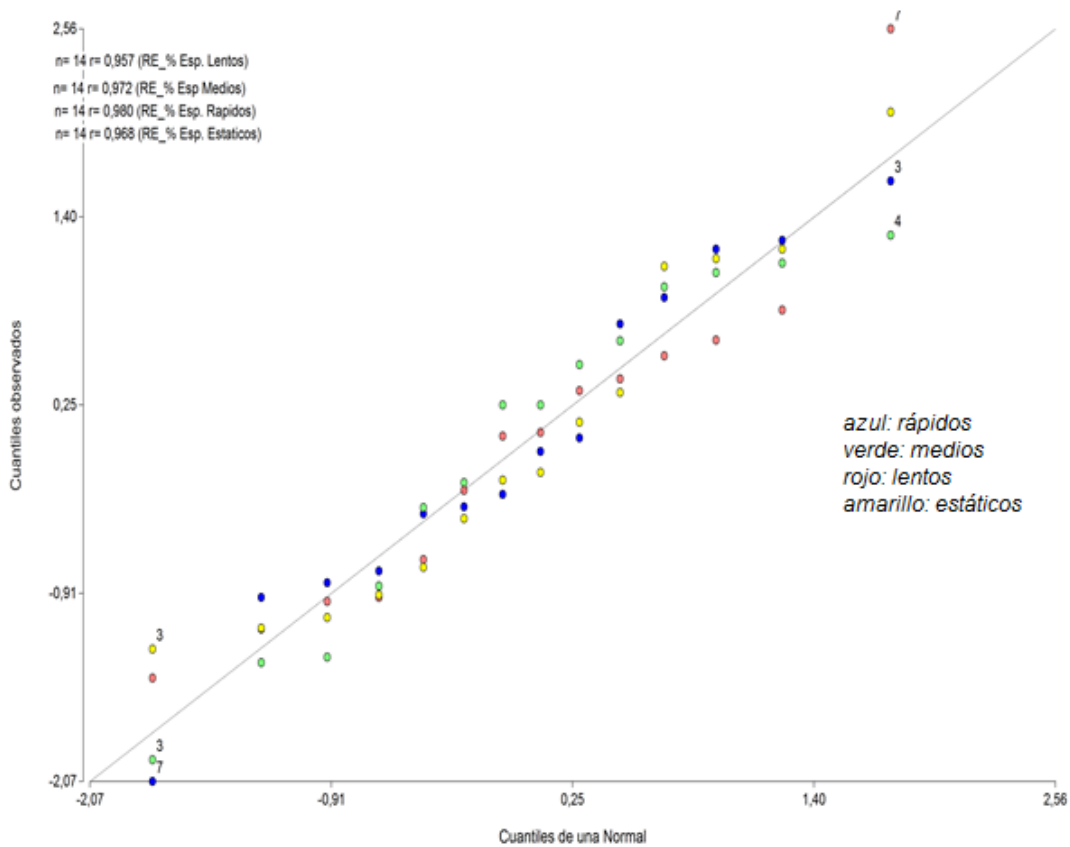
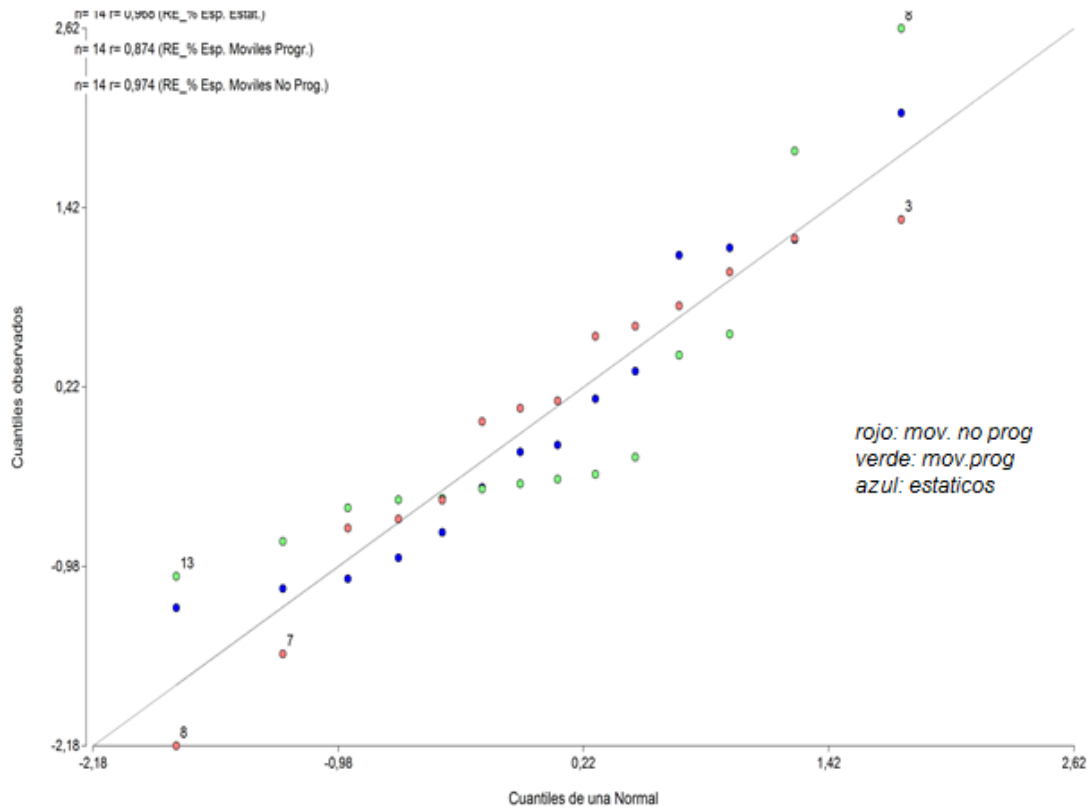


Figura N°9 QQplot para tipo de movimiento.



Parámetros de velocidad

Para este caso se evaluó la velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL) y la velocidad promedio (VAP), y dentro de cada una de ellas los lentos, medios y rápidos.

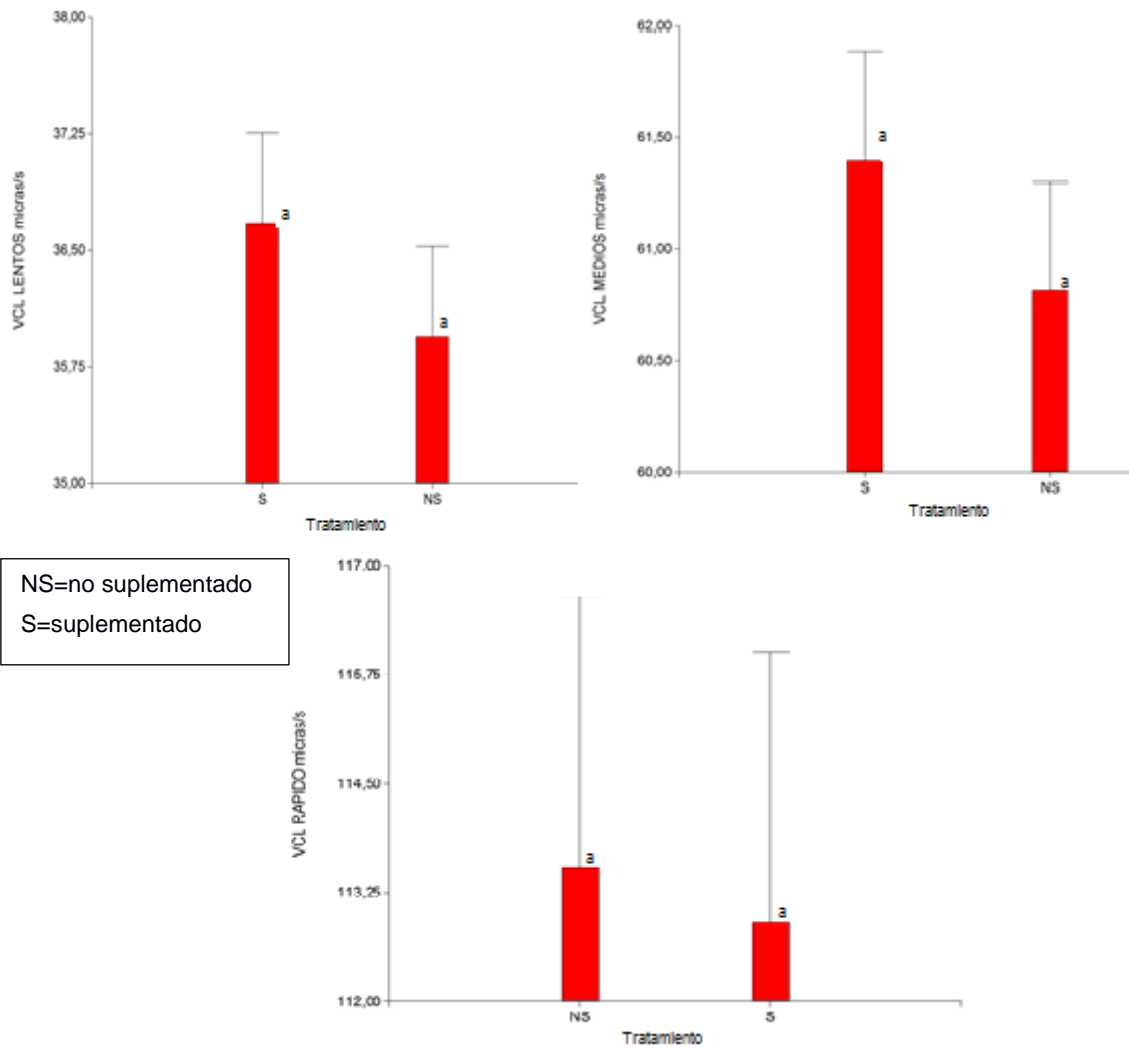
VCL

Tabla N°19 Tipos de VCL ($\mu\text{m/s}$) para cada tratamiento

VCL	Suplementados	No suplementados	
Lentos	36,67	35,94	a
Medios	61,40	60,81	a
Rápidos	112,90	113,54	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura N° 10 Tipos de VCL para cada tratamiento



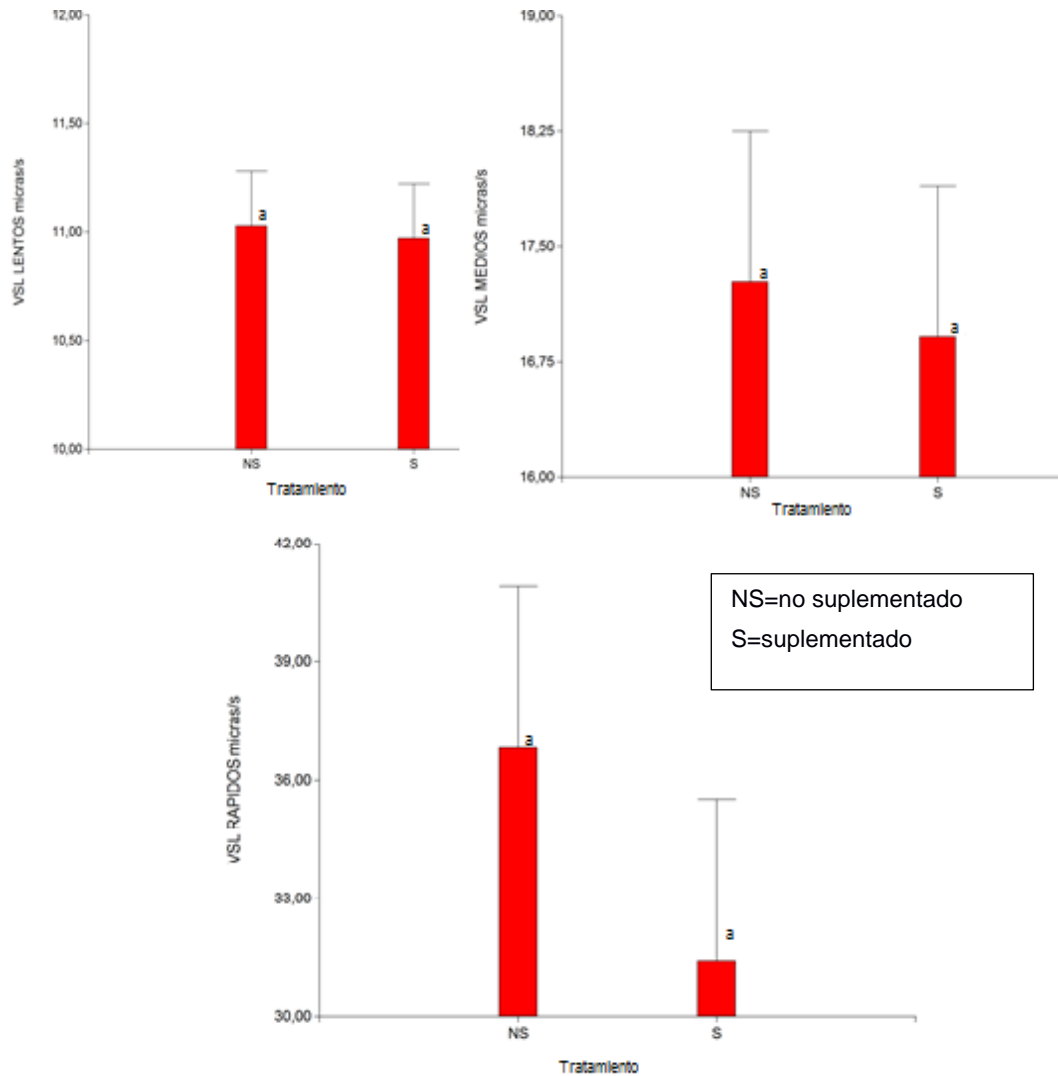
VSL

Tabla N°20 Tipos de VSL (μm/s) según tratamiento

VSL	Suplementado	No suplementado	
Lentos	10,97	11,03	a
Médios	16,91	17,27	a
Rápidos	31,43	36,84	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura N° 11 Tipos de VSL según tratamiento



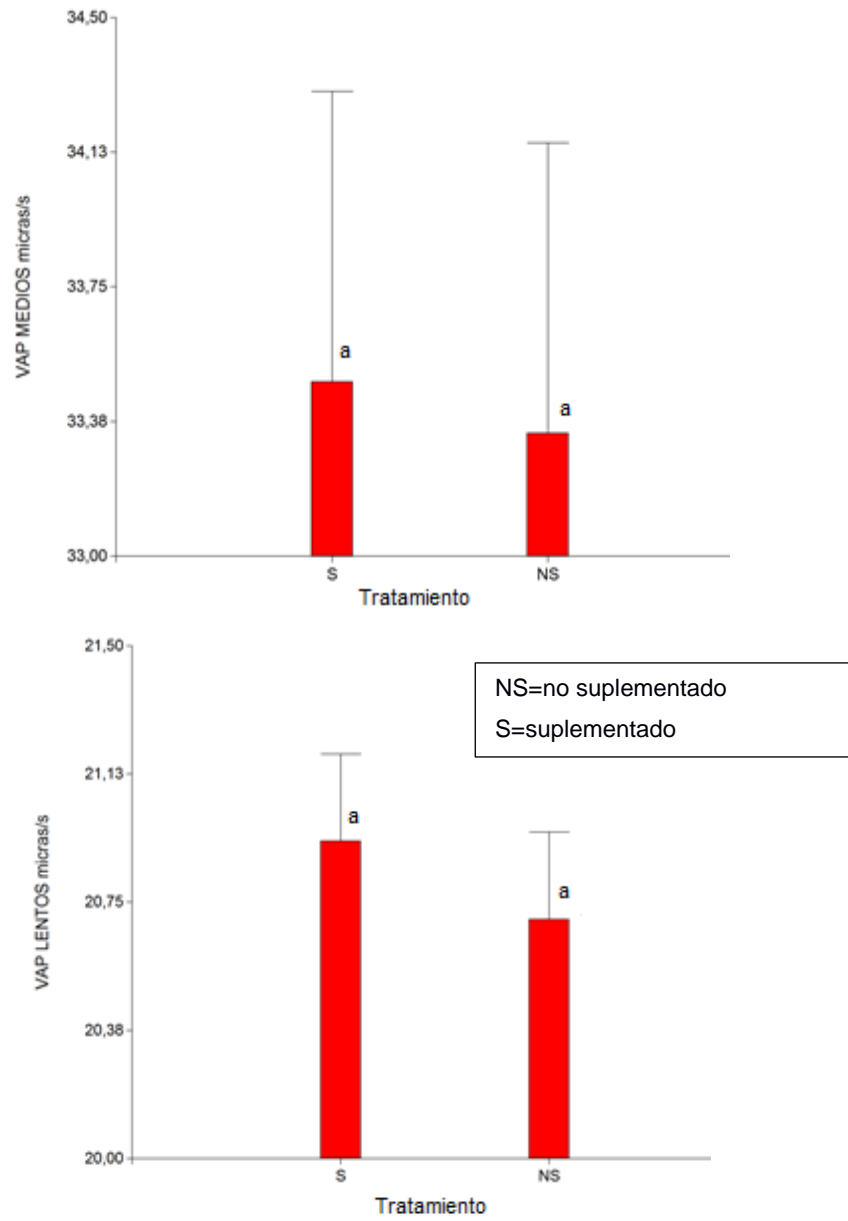
VAP

Tabla N°21 Tipos de VAP ($\mu\text{m/s}$) según tratamiento

VAP	Suplementados	No suplementados	
Lentos	20,93	20,70	a
Médios	33,49	33,34	a
Rápidos	61,70	65,60	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura N°12 Tipos de VAP según tratamiento



DISCUSIÓN

En estudios realizados en la región (Silva, M; 2015), la suplementación con Se en carneros pastoreando campo natural de basalto, resultó beneficiosa en el periodo reproductivo, obteniéndose mejor producción espermática en los animales con suplementación comparados con el grupo control. Los resultados obtenidos en nuestro ensayo no concuerdan con lo anteriormente citado, lo que podría explicarse debido a las diferencias en las condiciones en que se encontraban nuestros animales, pastoreando praderas, rastrojo de soja y campo natural. Asimismo, el predio se encuentra sobre suelos de basalto profundo (índice CONEAT 200) donde el Se no es carencial por derivar de rocas sedimentarias (Montossi y col, 2007). Según Wood y col 1991a, está demostrado que el sistema neuroendócrino reproductivo de los carneros es altamente sensible a cambios en la nutrición. Según Oldham y col, 1978; Cameron y col 1988 los alimentos que contienen alto porcentaje de proteínas logran incrementar aproximadamente un 40% la producción espermática, coincidiendo esto con el tipo de alimentación que recibieron los carneros de nuestro ensayo. Para comprobar esta hipótesis se plantea como trabajo complementario la determinación de Se en suelo y pasturas así como la determinación de glutatión peroxidasa en sangre de los carneros (medida indirecta de la concentración de Se en sangre), (Langlands y col., 1991b.)

Al considerar los métodos de evaluación, la concentración espermática mostró diferencia significativa, siendo esta superior en el sistema ISASv1®.

La diferencia significativa en la determinación de la concentración espermática a favor del sistemas ISASv1® muestra una ventaja del mismo, al momento de la utilización de carneros en programas de inseminación artificial intrauterina.

Una ventaja adicional del sistema CASA es que permite estudiar los diferentes parámetros cinéticos, reportes anteriores con semen congelado (Beriau y col., 2016) muestran que dichos parámetros son beneficiosos para definir criterios de selección de calidad seminal. Los resultados preliminares, obtenidos en las condiciones de nuestro ensayo, no muestran diferencias significativas en dichos parámetros, por lo que sería interesante continuar con estos estudios ampliando el número de animales.

CONCLUSIONES

La suplementación con selenio en carneros Merino Australiano en sistemas de pastoreo sobre praderas y campo natural no impactó en forma beneficiosa ni en la calidad espermática ni en la producción espermática total de los mismos frente al grupo control.

El método de evaluación de semen tradicional a campo y el sistema automatizado ISASv1, de ambos grupos de carneros no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre tratamientos.

Se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) en la concentración de espermatozoides medida en el sistema automatizado frente al método tradicional, siendo mayor la concentración de espermatozoides cuando las muestras fueron analizadas con el método automatizado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alkass, J. E., Bryant, M. J., Walton, J. S. (1982). Some effects of level of feeding and body condition upon sperm production and gonadotropin concentrations in the ram. *Animal Production*, 34: 265-277.
2. Amann, R. P., Schanbacher, B. D. (1983). Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science* 57(Supp 2): 380-403.
3. Balicka-Ramisz, A.; Pilarczyk, B.; Ramisz, A.; Wieczorek, M. (2006). Effect of selenium administration on blood serum Se content and on selected reproductive characteristics of sheep. *Archiv fur Tierzucht* 49:176-180.
4. Baronos, S., Mann, T., Rowson, L. E. A., Skinner, J. D. (1969). The effect of nutrition and androgens on the composition of bovine blood plasma and seminal plasma at puberty. *British Journal of Nutrition*, 23: 191-201.
5. Barth, A. D. (1990). Evaluación de semen bovino congelado. *CABIA*, 21: 28-36.
6. Beriau, Ignacio; Calvo, Emiliano; Perez, Ines. (2016). Efecto de la temperatura ambiente en el empaquetado de pajuelas sobre la calidad de semen ovino. Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, UdelaR, 63 p.
7. Bernardi, S., Allende, R., Mazzeo, R., Monti, J., Marini, P. (2011). Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. *In Vet* 13(2): 25-38.
8. Berretta, E. (1998). Contenido de minerales en pasturas naturales de Basalto. I Especies nativas Seminario de actualización en tecnologías para Basalto. Serie Técnica 102. INIA Tacuarembó. pp 99 – 111.
9. Blood, D. C.; Henderson, J. A.; Radostitis O.M. (1986). *Medicina Veterinaria*. 6º ed. Mexico, Interamericana, 918 p.
10. Bronson, F.H. (1988) Mammalian reproductive strategies: genes, photoperiod and latitude. *Reproduction, Nutrition, Development*. 28 (2B): 335-347.
11. Burk, R.; Hill, K. (2005). Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis.

- Annual Review of Nutrition 25: 215-235.
12. Cameron, A. W. N.; 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.
 13. Catena, M., Cabodevila, J. (1999). Evaluación del semen bovino congelado. *Taurus*, 1(3):18-31.
 14. Cavestany, D. (1986) Algunos Aspectos de la Fisiología Reproductiva del Toro. En: Queirolo, L.; Geymonant, D.; Gómez, G. *Aptitud Reproductiva del Toro. Calidad Seminal*. Montevideo, IICA p. 1-28.
 15. Corbellini, C. N. Y, Carrillo, B. J. (1985). Avances en Sanidad Animal y su Aplicación en el diagnóstico y control de enfermedades de bovinos; *Revista Argentina de Producción Animal*. 5 (7-8): 481-504.
 16. Courot, M. (1962). Développement du testicule chez l'agneau. Etablissement de la spermatogenèse. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 2: 25-42.
 17. Cunningham, J.; Klein, B. (2009). *Fisiología Veterinaria*. 4º ed. Barcelona, Elsevier, 700 p.
 18. Dacheux, J. L., Pisselet, C., Blanc, M. R., Hochereau-de-Reviere, M. T., Courot, M. (1981). Seasonal variations in rete testis fluid secretion and sperm production in different breeds of ram. *Journal of Reproduction and Fertility*, 61: 363-371.
 19. Davis, G. P., Hinch, G. N., Thwaites, C. J., Kinghorn, B. P. (1986). Attainment of puberty in rams selected on weaning weight. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*, 16: 175-178
 20. Desjardins, C. (1978). Endocrine regulation of reproductive development and function in the male. *Journal of Animal Science*, 47(Suppl 2): 56-79.
 21. Durán del Campo, A. (1980). *Anatomía, Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en Ovinos*. Montevideo, Hemisferio Sur, 264 p.
 22. Dyce, K.M.; Sack, W.O.; Wensing, C.J. (1999). *Anatomía veterinaria*. 2ª ed. Mexico, McGraw-Hill, 952 p.
 23. Dyrmondsson, O. R. (1973). Puberty and early reproductive performance in sheep rams lambs. *Animal Breeding Abstracts*, 41(9): 419-430.
 24. Elhordoy, D. (1998). *Curso de inseminación artificial*. (Manual técnico), Montevideo, Facultad de Veterinaria. 60 p.

25. Evans, G., Maxwell, W. M. C. (1990). Inseminación artificial de ovejas y cabras. Madrid, Acribia, 192 p.
26. Fernández Abella D., Presa Y, Irabuena O, Sterla, S. y Villegas, N. (2013). Efecto del Selfos plus® en la fertilidad del semen fresco y congelado en carneros Merino. *Revista Argentina de Producción Animal* 33 (1): 43-52
27. Fernández Abella, D. (2003). Manual de inseminación artificial por vía cervical en ovinos. Montevideo, Secretariado Uruguayo de la Lana, 71 p.
28. Fernández Abella, D. (2015). Tecnologías reproductivas bovinas y ovinas. Montevideo, Hemisferio Sur, 200 p.
29. Fernández Abella, D.H., Villegas, N., Echeverría, Robaina, J. (1993). Evaluación de las variaciones estacionales en la producción espermática de cuatro razas ovinas. *Boletín Técnico de Ciencias Biológicas*, 3: 23-34.
30. Ferrell, C. L. (1991). Nutritional influences on reproduction. En: Cole, H.H.; Cupps, P.T. *Reproduction in domestic animals*. 4ª ed. San Diego, Academic Press, pp. 577-604.
31. Foster, D. L., Mickelson, I. H., Ryan, K. D., Coon, G. A., Drongowski, R. A., Holt J. A. (1978). Ontogeny of pulsatile luteinizing hormone and testosterone secretion in male lambs. *Endocrinology*, 102:1137-1146.
32. Galloway, D. B. (1966). Some aspects of reproductive wastage in rams. *Australian Veterinary Journal* 42:79-83.
33. Georgievskii VI, Annenkov BN, Samokhin VT. (1982) Mineral nutrition. London, Butterworth, 475 p.
34. Gooneratne, S.; Buckley, W.; Christensen, D. (1989). Review of copper deficiency and metabolism in ruminants *Canadian Journal of Animal Science*, 69: 819-845.
35. Gunn, R. M. (1942). Studies in fertility of sheep. Seminal changes affecting fertility of rams. *Australian Veterinary Journal* 18:94-106.
36. Hill, F.I.; Wyeth, T.K.; Death, A. F. (1992). Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase levels of unsupplemented and supplemented alpacas in New Zealand. *Trace Elements: Roles, risks and remedies. Proceedings of the New Zealand Trace Elements Group Conference, New Zealand*. pp. 135-140.
37. Hulet, C.V.; Foote, W.C.; Blackwell, R.L. (1965). Relationship of semen

- quality and fertility in the ram to fecundity in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, 9:311-315.
38. Igarza, L. (1994). Importancia de los minerales en el rumen. Jornadas de actualización Técnica sobre minerales en nutrición y salud animal. 29 y 30 de marzo, Mar del Plata, Argentina, pp 15-19.
39. Jeffries, B. C. (1961). Body condition scoring and its use in management, *Tasmanian Journal of Agriculture*, 32: 19-21.
40. 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. *Journal of Animal Science*, 62 (4):277-83.
41. Kilgour, R. J., Pisselet, C., Dubois, M. P., Courot, M. (1998). Ram lambs need FSH for normal testicular growth, Sertoli cell numbers and onset of spermatogenesis. *Reproduction, Nutrition, Development*, 38(5): 539-550.
42. Krishnamurti, C.R., Ramberg, C.F. Jr., Shariff, M.A. (1989). Kinetic modeling of selenium metabolism in non pregnant ewes. *Journal of Nutrition* 119: 1146-1155.
43. Lafortune, E., Blanc, M. R., Pelletier, J., Perreau, C., Terqui, M., Hochereau-de Reviers, M. T. (1984). Variations in the plasma levels of gonadotrophin and testosterone and in Leydig and Sertoli cell populations between birth and adulthood in Romanov lambs born in spring or autumn. *Reproduction, Nutrition, Development*, 24: 937-946.
44. LANGLANDS, J.P.; DONALD, G.E.; BOWLES, J.E.; SMITH, A.J. 1991b. Subclinical selenium insufficiency; 2. The response in reproductive performance of grazing ewes supplemented with selenium. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 31: 33-5
45. Leathem, J. H. (1975). Nutritional influences on testicular composition and function in mammals. En: Hamilton, D.W. y Greep, D.O. *Handbook of Physiology. Endocrinology*. Bethesda, American Physiology Society, V 5, pp 225-232.
46. Lee V. W., Cumming I. A., De Kretser D. M., Findlay J. K., Hudson B., Keogh E. J. (1976). Regulation of gonadotrophin secretion in rams from birth to sexual maturity. *Journal of Reproduction and Fertility*, 46: 1-6.
47. Lindsay, D. R., Pelletier, J., Pisselet, C., Courot, M. (1984). Changes in photoperiod and nutrition and their effect on testicular growth of rams.

- Journal of Reproduction and Fertility, 71(2): 351-356.
48. Lopez Alonso, M.; Miranda, M.; Hernandez, J.; Castillo, C.; Benedito, J. L. (1997). Glutathión peroxidasa (GSH-Px) en las patologías asociadas a deficiencias de Se en rumiantes. *Archivo Médico Veterinario*.29 (2): 171-180.
 49. Manual ISASv1®. (2015), 9-50.
 50. Mapa de Uruguay. Disponible en:
<http://www2.luventicus.org/mapas/uruguay/salto.gif>. Fecha de consulta 17 de marzo de 2017.
 51. MGAP, División de contralor de semovientes (DICOSE).Disponible en:
www.mgap.gub.uy, Fecha de consulta: 6 de mayo del 2016.
 52. Montossi, F., De Barbieri, I., Ciappesoni, G., de Mattos, D., Mederos, A., Luzardo, S., Soares de Lima, J., de los Campos, G., Nolla, M., San Julian, R., Grattarola, M., Pérez Jones, J., Donagaray, F., Fros, A. (2007). Los productos logrados en los primeros 8 años (1998-2006) de existencia del proyecto Merino Fino del Uruguay: una visión con perspectiva histórica. *Boletín de Divulgación INIA Tacuarembó*, 90:17-36.
 53. Muiño, T.; Perez, R.; Cebrian, J. A. (2008). Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 18-31.
 54. NRC. (2005). *Mineral Tolerance of Animals*. 2ª ed. Washington, NRC, 510 p.
 55. Oh, S.H.; Ganther, H.E.; Hoekstra, W.G. (1974). Selenium as a component of glutathione peroxidase isolated from ovine erythrocytes. *Biochemistry* 13: 1825-1829.
 56. 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 Agricultural Research*. 29:173-179.
 57. Orth, J. M., Gunsalus, G. L., Lamperti, A. A. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, 122(3): 787-794.

58. Osorio C. (2013). Valoración computarizada de la integridad funcional de la membrana plasmática, motilidad y morfología espermática en semen criopreservado de búfalo. Programa de Maestría en Reproducción Animal. LUZ. Maracaibo. 106p.
59. Pastrana, R., McDowell, L.R., Wilkinson, N.S. (1991). Mineral status of sheep in the Paramo region of Colombia .II Trece Mineral. *Small Ruminant Research* 5(1):23-34.
60. Pelletier, J., Carrez-Camous, S., Thiery, J. C. (1981). Basic neuroendocrine events before puberty in cattle, sheep and pigs. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 30: 91.
61. Piaggio, L.; Uriarte, G. (2005). Nutrición mineral de los ovinos en pastoreo en el Uruguay. *Producción Ovina*, 17: 5-20.
62. Pigurina, G.; Soares De Lima, J.M.; Berretta, E. (1998). Contenido de minerales en pasturas naturales de Basalto (especies nativas). INIA Serie Técnica N° 102, p 113-122.
63. Piper, L. R.; Bindon, B. M.; Wilkins, J. F.; Cox, R. J.; Curtis, Y. M.; Cheers, M. A. (1980). The effect of selenium treatment on the fertility of Merino sheep. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production* 13: 241-244.
64. Pretorius, P. S., Marincowitz, G. (1968). Post-natal penis development, testes descent and puberty in Merino ram lambs on different planes of nutrition. *South African Journal of Agricultural Science*, 11: 319-334.
65. Reid, J. T. (1960). Effect of energy intake upon reproduction in farm animals. *Journal of Dairy Science*, 43(suppl): 103-122.
66. Reiter, R. J. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, 49(8): 654-664.
67. Robles, C. A. (2004). Salud Reproductiva del Carnero. Bariloche, INTA, 36 p..
68. Saacke, R.; Nadir, S.; Nebel, R. (1994). Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. *Theriogenology*, 41: 45-50.
69. Savoie S., Forest M. G., Bourel B., Saez J. M., Collu R., Bertrand J., Ducharme J. R. (1979). Perinatal activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the lamb. I. Circulating levels of LH, FSH, prolactin and

- testosterone and in vivo response to hCG in the first two months of life. *Biology of Reproduction*, 21:1051-1056.
70. Savoie, S., Polychronakos, C., Forest, M. G., Haour, F., Collu, R., Ducharme, J. R. (1981). Perinatal activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the lamb. III. LH, testosterone and prolactin secretory pattern in newborn lambs. *Hormone Research*, 15(3): 167-178.
71. Setchell, B. P., Waites, G. M. H., Lindner, H. R. (1965). Effect of undernutrition on testicular blood flow and metabolism and the output of testosterone in the ram. *Journal of Reproduction and Fertility*, 9(2): 149-162.
72. Sharpe, R. M. (1982). The hormonal regulation of the Leydig cell. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, 4: 241-317.
73. Short, R. E., Adams, D. C. (1988). Nutritional and hormonal interrelationships in beef cattle reproduction. *Canadian Journal of Animal Science*, 68(1): 29-39.
74. Silva, M. (2015). Efecto de la suplementación con Se sobre la calidad espermática y la fertilidad de semen fresco y congelado en carneros merino australiano. Tesis. Facultad de Veterinaria, UdelaR, 60p.
75. Simonetti, L., Lynch, G.M., McCormick, M. (2014). Aspectos reproductivos de los carneros. *Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental*
76. Souza, J. D., Campelo, J. E. G., Macedo, N. D., Leal, T. M., Sousa JR, A., Medeiros, R. M., Chaves, R. (2007). Biometria testicular, características seminais, libido e concentração de testosterona em ovinos da raça Santa Inês, criados a campo, na microrregião de Campo Maior, Piauí. *Ciência Veterinária Tropical*, 10(1): 1-8.
77. SUL, (2016) Producción ovina. Datos de producción 2015. Disponible en: www.sul.org.uy/sitio/publicaciones Fecha de consulta: 4 de enero de 2017.
78. Surai, P. F. (2006). Selenium in nutrition and health. *Selenium in nutrition and health* Nottingham, Nottingham University Press, 974 p.
79. Thienpont, D.; Rochette, F.; Vanparijs, O. (1986). Diagnosing helminthiasis by coprological examination. 2da ed. Beerse, Janssen Research Foundation, 205 p.

80. Ungerfeld, E. (1998). Factores que afectan el contenido de minerales en pasturas naturales y el estado nutricional de vacunos y ovinos en Uruguay. Revisión Bibliográfica; edición preliminar. Tacuarembó, INIA. 230 p.
81. Ungerfeld, R. (2002). Reproducción en los animales domésticos. Montevideo, Melibea, V1, 291 p.
82. Ursini, F.; Heim, S.; Kiess, M.; Maiorino, M.; Roveri, A.; Wissing, J.; Flohe, L. (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 277: 225–228.
83. Van Ryssen, J.B.J., Coertze, R.J. and de Villiers, J.F. (1999). Supplementation of selenium to sheep grazing kikuyu or ryegrass: I. Selenium status of unsupplemented sheep and animal performance upon supplementation. *South African Journal of Animal Science*, 29:137-144.
84. Walton J. S., Evins J. D., Hillard M. A., Waites G. M. (1980). Follicle-stimulating hormone release in hemicastrated prepubertal rams and its relationship to testicular development. *Journal of Endocrinology*, 84:141-152.
85. Whanger PD. (2002) Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *Journal of the American Collage of Nutrition*, 34(54):345-367.
86. White, C.L., Kumagai, H. and Barnes, M.J. (1997). The sulfur and selenium status of pregnant ewes grazing Mediterranean pastures. *Australian Journal of Agricultural Research*. 48:1081-1087.
87. Wilson, P. R., Lapwood, K. R. (1979). Studies of reproductive development in Romney rams: I. Basal levels and plasma profiles of LH, testosterone and prolactin. *Biology of Reproduction*, 20(4): 965-970.
88. Wood, R. I., Ebling, F. J., l'Anson, H., Foster, D. L. (1991). The timing of neuroendocrine sexual maturity in the male lamb by photoperiod. *Biology of Reproduction*, 45(1): 82-88.
89. Wright, P. L.; Bell, M.C. (1966). Comparative metabolism of selenium and tellurium in sheep and swine. *American Journal of Physiology*, 211:6-10.

