

Efecto del *Selfos plus*® en la fertilidad del semen fresco y congelado en carneros Merino

Effect of Selfos plus® on fertility and semen conservation in merino rams

Fernández Abella^{1,2}, D., Presa², Y., Irabuena^{2,3}, O.,
Sterla^{2,3}, S. y Villegas^{2†}, N.

Secretariado Uruguayo de la Lana. Uruguay.
Universidad de la República. R.N. Salto. Uruguay

Resumen

Se realizaron tres ensayos para evaluar el efecto del selenio sobre la fertilidad y preservación del semen de carnero. En el ensayo I se administró una dosis de 1,5 mL de *Selfos plus*® (selenito de sodio con glicerofosfato de sodio y vitaminas A, D y E) por vía subcutánea a cinco carneros en febrero y otra en noviembre. Se evaluaron las características seminales durante los meses de abril, mayo, junio, diciembre, enero y febrero. El ensayo II se realizó inseminación artificial con semen fresco (eyaculados mezclados) pertenecientes a tres carneros tratados con 2 mL de *Selfos plus*® tres semanas antes). En el ensayo III se utilizaron tres carneros tratados con *Selfos plus*® tres semanas antes. El semen de los carneros del ensayo y los testigos fue congelado, analizándose la motilidad pre y post congelación. Se inseminaron por laparoscopia 41 ovejas con el semen del grupo de carneros tratado y 40 ovejas con el semen del grupo testigo. Mediante ultrasonografía se evaluó la fertilidad, la prolificidad y la fecundidad obtenida en los ensayos II y III. Los resultados no mostraron cambios de magnitud en la motilidad masal ni en el volumen seminal del grupo tratado. Si pudo observarse un aumento de la concentración espermática promedio lo que significa que hubo mayor producción espermática (concentración x volumen). La fertilidad y fecundidad en ovejas inseminadas con semen fresco (I.A. cervical) o congelado (I.A. laparoscopia) del grupo tratado fue significativamente superior a la obtenida en el grupo testigo. Los resultados preliminares obtenidos permiten concluir que la administración de *Selfos plus*® en carneros Merino con buen nivel nutricional, muestra un incremento significativo en la fertilidad del semen fresco o congelado.

Palabras clave: carnero, selenio, semen, fertilidad, criopreservación.

Summary

The objective of this work was to assess the effect of the administration of *Selfos plus*® (selenite of sodium glycerophosphate of sodium and vitamins A, D and E) on fertility and cryopreservation of semen in Merino rams. Three experiments were carried out: In the first one the effect of 1.5 mL of *Selfos plus*® administration to 5 rams in February and November were analysed. In this

Recibido: mayo de 2012

Aceptado: mayo de 2013

1. Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL), Rbla Baltasar Brum 3764, Montevideo 11800, Uruguay. ferabe@sul.org.uy
Dpto. de Producción Animal y Pasturas, Estación Experimental de la Facultad de Agronomía en Salto. 50009. Uruguay.
ferabe@unorte.edu.uy

2. Polo de Desarrollo Universitario en Producción y Reproducción de Rumiantes. Regional Norte. UDELAR. Salto.
Uruguay. ferabe@unorte.edu.uy

3. Laboratorio de Inmunología. Regional Norte, Salto, Universidad de la República. 50000. Uruguay

assay, several seminal characteristics (volume, sperm concentration and mobility) during April, May, June, December, January and February. In 2nd experiment, artificial insemination was performed in 184 synchronized ewes with fresh semen of rams treated group (2 ml *Selfos plus*® application 3 weeks before). The same was done to 191 ewes with fresh semen group control rams. Fertility, prolificacy and fecundity of the sheep were assessed. The 3rd experiment was carried out in a commercial farmer, where 3 rams were treated (2 ml of *Selfos plus*® application 3 weeks before) and 3 rams' control. Three weeks later sperm was frozen (pool of ejaculates of rams). Artificial insemination was performed by laparoscopy in 91 Merino sheep using frozen-thawed semen of the treated group (41 sheep) and the control group (40 sheep). Fertility prolificacy and fecundity were performed by ultrasonography. The results showed no changes in mobility neither in volume of the seminal group. However, treated group had the highest average sperm production and quality of collected semen to the control group. Fertility in ewes inseminated with fresh semen (cervical A.I.) or frozen (laparoscopy A.I.) of the treated group was significantly higher than the control group. Administration of *Selfos plus*® in Merino rams in good nutritional status shows a significant improvement fertility of both fresh and frozen semen.

Key words: ram, selenium, semen, fertility, cryopreservation.

Introducción

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 selenio (Se) mejora la fertilidad de los carneros y de las ovejas, la supervivencia neonatal y el crecimiento de los corderos (Piper et al., 1980; White et al., 1997; Van Ryssen et al., 1999; Balicka-Ramisz, 2006).

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 et al., 1998; Ungerfeld, 1998; Piaggio y Uriarte, 2005). No obstante, los microelementos como el zinc, el selenio, el yodo y el cobalto, asociados a los balances vitamínicos, presentan un contenido marginal en nuestras pasturas (Berretta, 1998; Pigurina et al., 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 selenio debido a la volatilización que sufre 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 et al., 2007).

Se ha mostrado que la administración oral (raciones o bloques) no son efectivos para el aporte de minerales a las ovejas, por la gran variabilidad en el consumo y por la falla en algunos animales al consumir el bloque (White et al., 1997). Actualmente, existen en el mercado productos inyectables que permiten asegurar una administración correcta y segura. Entre estos *Selfos plus*® (selenito de sodio con glicerofosfato de sodio y vitaminas A, D y E) presenta una concentración adecuada que permite administrar al ovino pequeños volúmenes de dosis para suplir sus requerimientos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la administración de *Selfos plus*® sobre la fertilidad del semen fresco y congelado en carneros Merino.

Materiales y Métodos

Ensayo 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 (31°25' latitud sur).

Animales

Se utilizaron 8 carneros y 2 borregos (2 dientes) de la raza Merino Australiano, que pesaban 67 y 45 kg promedio, respectivamente. La condición corporal era 3,5 en todos los machos (escala 1 a 5; Jefferies, 1961) y la circunferencia escrotal promedio 32,6 cm (rango: 28-40 cm). Los machos fueron manejados como un solo lote y pastorearon sobre campo natural. Los carneros fueron seleccionados de un grupo de 25 machos, por poseer una buena producción y calidad espermática evaluada durante tres meses.

Tratamientos

Los carneros se separaron al azar en dos lotes, uno tratado con *Selfos plus*® y el otro lote como testigo. Al lote tratado se le administró 1,5 mL de *Selfos plus*® (52 mg de selenito de sodio), por vía subcutánea, en dos ocasiones: La primera el 28 de febrero y la segunda el 27 de noviembre.

El *Selfos plus*® es elaborado por el laboratorio argentino AGROINSUMOS S.A. y su composición se detalla en el Cuadro 1.

El 18 de diciembre del 2007, se realizaron las primeras medidas que consistieron en determinar el peso, la circunferencia escrotal, la condición corporal y la edad; además se colectó semen y se realizaron pruebas macroscópicas (color, volumen y movilidad en masa). En distintos momentos del año se colectó semen (dos eyaculados por macho por sesión), realizándose pruebas macroscópicas.

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 en celo. El volumen se determinó mediante una jeringa graduada. La concentración espermática se determinó por fotocolorímetro, regulado previamente con soluciones de semen cuyas concentraciones habían sido determinadas en cámara de conteo ($r^2 = 0,96$). La movilidad masal se estimó según escala de 1 a 5.

Se realizó la prueba de reducción del azul de metileno (Evans y Maxwell, 1987) modificada (Fernández Abella, 2008). Se mezcla igual cantidad de semen y de una solución al 0,05% de azul de metileno en suero fisiológico. Luego se aspira la mezcla con una pajuela de 0,5 mL y se introduce la misma en agua a 35-37 °C. Según el tiempo que tarda la mezcla en virar del color azul al blanco es la calidad espermática: menos de 1 minuto excelente, 1 a 2 minutos muy buena, 2 a 3 minutos buena, 3 a 5 minutos regular y más de 5 minutos de mala calidad.

Cuadro 1: Composición del *Selfos plus*®.

Table 1: *Selfos plus*® composition.

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

Análisis en sangre

Se extrajeron muestras de sangre en las dos oportunidades en que se administró *Selfos plus*® y dos meses después de la última administración. En dichas muestras se determinó concentración de hemoglobina, hematocrito y concentración de Selenio (Se) en sangre entera.

Las muestras fueron obtenidas utilizando como anticoagulante EDTA y fueron conservadas refrigeradas a 4°C hasta el momento de su procesamiento. Para la determinación de la concentración de hemoglobina y el hematocrito se utilizó equipo automático PENTRA ES 60 (HORIBA ABX SAS, Francia). La concentración de Selenio en sangre se determinó en forma indirecta mediante la dosificación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GSH-Px), según Ceballos et al. (1999) utilizando un reactivo comercial (Ransel de Randox Laboratories, UK). La actividad de la GSH-Px fue expresada en U/g de hemoglobina. Se correlacionó la actividad enzimática con la concentración de Selenio utilizando la tabla proporcionada por el fabricante la cual permite categorizar a los animales en 4 niveles:

Estatus del animal	Selenio en sangre mg/L	GSH-Px U/ g Hb
Deficiente	< 0,05	<60
Bajo/marginal	0,051- 0,083	61- 100
Marginal	0,084- 0,110	101- 130
Adecuado	>0,11	>130

Ensayo 2

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).

Animales

Se utilizaron 375 ovejas de la raza Merino Australiano con condición corporal 2,5-2,75 sincronizadas con esponjas de MAP (60 mg, Syntex® Laboratorio Universal) inserta en la vagina durante 14 días. Se usaron 6 carneros

de la raza Merino Australiano de 8 dientes y de buena calidad de semen pertenecientes al mismo grupo del Ensayo 1.

Tratamientos

Se realizaron dos lotes: Inseminación artificial más repaso a 184 ovejas, con la mezcla de los eyaculados de 3 carneros tratados con *Selfos plus*® (administración de 2 mL tres semanas antes del servicio). Lo mismo se le realizó a 191 ovejas, con la mezcla de los eyaculados de los 3 carneros sin tratar (grupo testigo).

Se realizaron extracciones de sangre previo a la administración de *Selfos plus*® y al momento del servicio para determinar hematocrito, hemoglobina y Se, según metodología descrita en el Ensayo 1.

La inseminación artificial se realizó el 3 de abril del 2008 con semen fresco que se extrajo con vagina artificial, administrando una dosis de 60 millones de espermatozoides. 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 (servicio directo) se realizó desde el 17 de abril al 8 de mayo del 2008, con los mismos carneros según tratamiento. Se evaluó la fertilidad, la prolificidad y fecundidad por ultrasonografía (ALOKA SSD500) utilizando una sonda transcutánea (modelo UST-944B-3,5 Mhz).

Ensayo 3

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 y 81 ovejas de la misma raza, propiedad del Establecimiento "Saudades".

Tratamientos

El 27 de noviembre del 2008 se administró 1,5 mL de *Selfos plus*® a tres carneros y se dejaron tres carneros como testigo (sin *Selfos plus*®). El semen utilizado proveniente de 6 carneros (dos eyaculados por carnero, sin eliminación de eyaculados), fue analizado

(concentración espermática, movilidad y volumen) previa congelación. El semen se congeló según método de Salamon (1976) en base a Tris, empaquetándolo en pajuelas de 0,25 mL conteniendo 40 millones de espermatozoides totales. 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 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, Inducel, Laboratorio Universal). Se evaluó la fertilidad, la prolificidad y la fecundidad por ultrasonografía, en forma similar al ensayo II.

Análisis estadístico

Se trabajó con distintos procedimientos provistos por el paquete estadístico SAS versión 8.0 (SAS Institute Inc., 1999). Las características del semen que muestran una distribución normal y continua, se analizaron mediante el procedimiento GLM. Las características seminales de distribución discreta o porcentual, así como los parámetros reproductivos se analizaron mediante el procedimiento GENMOD. Se analizaron los datos con un grado de significancia de 0,07.

Resultados y Discusión

Ensayo 1

La movilidad masal presentó valores superiores a 3 durante el período experimental. Los valores no mostraron diferencias previas o posteriores a la administración de *Selfos plus*® entre grupos (Cuadro 2).

Según Martin et al (1990), la nutrición aparece como el factor dominante en controlar la actividad testicular. Para, las deficiencias en minerales y vitaminas afectan la producción de semen.

Antes de la aplicación de *Selfos plus*® la concentración espermática promedio del semen era similar en ambos grupos. Evaluando la misma en los períodos pos-administración de *Selfos* se encontró una mayor concentración en el grupo tratado ($p < 0,05$). Esta diferencia podría deberse a que los cambios nutricionales afectan rápidamente a nivel testicular. 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. La literatura reporta la importancia de la suplementación con minerales y vitaminas sobre la producción espermática (Sapsord, 1951; Martin et al., 1990) y más específicamente se indica 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 (Behne et al., 1996; Guzman-Marin, et al., 2000).

Cuadro 2: Efecto del selenio sobre las características seminales evaluadas.

Table 2: Effect of *Selfos plus*® on seminal characteristics evaluated.

Grupo	Movilidad masal (1-5)	Volumen (mL)	Concentración (10 ⁹)
Tratado <i>Selfos plus</i> ®			
1er Eyaculado	3,5 ± 0,54	1,1 ± 0,10	2,75 ± 0,7
2 do Eyaculado	3,5 ± 0,53	1,0 ± 0,11	2,70 ± 0,9
Testigo	n.s.	n.s.	p < 0,05
1er Eyaculado	3,5 ± 0,57	1,0 ± 0,12	2,50 ± 0,9
2 do Eyaculado	3,25 ± 0,50	1,0 ± 0,10	2,00 ± 0,5

El volumen seminal de ambos grupos de carneros mostró una evolución similar. En esta raza, Fernández Abella et al. (1993), observaron que esta característica presenta escasas variaciones frente a cambios ambientales (alimentación, fotoperiodo, temperatura).

Los cambios producidos en la concentración espermática fueron los determinantes del incremento en la producción espermática (concentración x volumen). Los carneros con mejor estatus mineral por la administración de Selenio, tuvieron mayor producción espermática colectada por sesión (5725 ± 119 millones) que los carneros sin tratar (4570 ± 204 millones) ($p < 0,05$).

Dos meses después de la primera administración de *Selfos plus*® (29 de mayo), el semen del grupo tratado necesitó 105 segundos para virar el azul de metileno contra 126 segundos observados en el grupo control. Antes de la segunda administración no se observaron diferencias entre grupos (86 versus 90 segundos respectivamente). Un mes después de la segunda administración de *Selfos plus*® se observó que el grupo tratado presentaba un semen de muy buena calidad y el grupo testigo de buena calidad (70 versus 122 segundos, respectivamente). El 3 de febrero del 2009, la calidad del semen aumentó en ambos grupos. Pero el semen del grupo tratado presentó a la prueba de azul de metileno una excelente calidad y el testigo una muy buena calidad (54 versus 80 segundos, respectivamente).

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. Su almacenamiento es de aproximadamente 60 días (Krishnamurti et al, 1989; Yu y Beynen, 2001). Por este motivo, una sola administración de *Selfos plus*® no tuvo efecto en la calidad del semen evaluada por la prueba de azul de metileno.

Los valores de hematocrito y hemoglobina (Cuadro 3) fueron levemente inferiores a los indicados como normales por la literatura (33,0-38,0% hematocrito; 12,0-13,6 g/dL de hemoglobina; Manual Merck, 2000); mientras que los valores de glutatión peroxidasa fueron marginales (Randox Laboratories: 101-130 U/g Hb). Luego de la administración de *Selfos plus*® los valores se incrementaron triplicando los valores sanguíneos observados en los carneros testigos ($p < 0,01$; 295 vs 104 U/g Hb, valores promedios considerando los animales de los ensayos 1 y 2). En los carneros del Ensayo 1, los valores eran adecuados 9 meses después de la primera administración.

Los resultados obtenidos indican que la administración de *Selfos plus*® produce un aumento de los niveles de Selenio en sangre logrando que se alcancen niveles adecuados, mayores a 130 U/g Hb.

Ensayo 2

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 testigo, las diferencias son significativas ($p < 0,01$). En cambio en el repaso no se observaron 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. Este mayor porcentaje de fertilidad en ovejas se debió al efecto del *Selfos plus*® en las características seminales del grupo tratado, que aumentaron las probabilidades de fecundación.

Según Behne et al. (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

Cuadro 3: Valores sanguíneos de hemoglobina, hematocrito y glutatión peroxidasa (GSH-Px).

Table 3: Blood values of haemoglobin, hematocrit and glutathione peroxidase (GSH-Px).

Fecha de determinación/ Tratamiento	Hemoglobina Promedio (g/dL)	Hematocrito Promedio (%)	GSH-Px (U/g Hb)
ENSAYO 1			
28 de febrero*			
Selfos plus®	10,1 ± 0,8	30,4 ± 2,6	116 ± 8,2
Testigo	10,2 ± 1,3	31,9 ± 3,0	115 ± 12,1
29 de abril			
Selfos plus®	11,9 ± 0,7	34,0 ± 1,0	315 ± 6,4
Testigo	9,8 ± 1,0	31,0 ± 0,8	113 ± 8,1
27 de noviembre*			
Selfos plus®	12,2 ± 0,7	34,0 ± 1,0	136 ± 6,2
Testigo	10,8 ± 1,0	31,0 ± 0,8	111 ± 7,0
27 de enero			
Selfos plus®	11,9 ± 0,6	33,0 ± 0,9	298 ± 13,0
Testigo	9,0 ± 1,4	29,5 ± 1,5	92 ± 8,4
ENSAYO 2			
13 de marzo*			
Selfos plus®	12,5 ± 0,8	34,0 ± 1,1	111 ± 9,5
Testigo	12,8 ± 1,0	31,0 ± 0,9	114 ± 6,9
3 de abril			
Selfos plus®	12,9 ± 0,6	35,0 ± 0,8	260 ± 17,3
Testigo	11,0 ± 1,0	32,5 ± 1,6	112 ± 7,2

*Momento de administración de Selfos Plus®.

Diferencias entre tratamientos en los niveles de GSH-Px: p<0,01

Cuadro 4: Efecto del Selfos plus® sobre la fertilidad, la prolificidad y la fecundidad en ovejas (I.A cervical con semen fresco).

Table 4: Effect of the Selfos plus® on fertility, the prolificidad and fertility in sheep (cervical I.A with fresh semen).

Grupo	Fertilidad (%)			Prolificidad	Fecundidad (%)
	I.A	repaso	total		
Tratado	51,1 _a	46,8 _a	97,9 _a	1,01	99,0 _a
Testigo	38,2 _b	53,9 _a	92,1 _b	1,01	93,7 _b

a vs b : p<0,01

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. El plasma seminal contiene elevadas cantidades de la enzima glutatión peroxidasa (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 mitad de la cola del espermatozoide (Capaul et al., 1988; Nayernia et al., 2004). En efecto la GSH-Px representa además el 75% del Selenio sanguíneo en los ovinos, estando contenido en el interior de los glóbulos rojos a los que se incorpora durante la eritropoyesis. Este hecho determina una alta correlación entre Selenio sanguíneo y GSH-Px, ($r = 0,96$) (Marti et al. 2007).

Ensayo 3

El semen del grupo tratado fue de mejor calidad que el semen del grupo testigo. Esto se debe a su mayor movilidad (3,8 vs 3,5; $p < 0,05$) y concentración espermática (3220 ± 170 vs 2900 ± 220 ; $p < 0,05$). El volumen seminal no mostró diferencias significativas ($1,3 \pm 0,1$ vs $1,0 \pm 0,15$). Al momento de la descongelación (0 h), se observó que el semen del grupo tratado tuvo mayor porcentaje de movili-

dad, aproximadamente entre 5 a 15 puntos de porcentaje más que el semen del grupo testigo (55,0 vs 40,0%; $p < 0,05$). A 2 horas la movilidad de los espermatozoides disminuyó, tanto para el semen del grupo tratado como para el grupo testigo (32,5 vs 27,5% respectivamente). Los resultados muestran que la mayor movilidad previa a la congelación del semen del grupo tratado, se reflejó en la movilidad pos-descongelado. Según Fernández et al. (1990) sin importar el método de congelación, la movilidad pos-descongelado está correlacionada positivamente con la de movilidad del semen previa congelación.

La congelación y descongelación sobre la célula espermática genera efectos desfavorables que desestabilizan su membrana celular. Según Guthrie y Welch (2006), parte de la reducción de la motilidad espermática y la fertilidad asociada a la criopreservación puede ser debidas al daño oxidativo de la excesiva o inadecuada formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Como ya fue mencionado, 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.

Los resultados obtenidos de la inseminación intrauterina son reflejo de las diferencias observadas en el semen. La fecundidad (fertilidad x prolificidad) fue mayor cuando se utilizó semen congelado del grupo tratado que del grupo testigo. Las diferencias entre los tratamientos son significativas ($p < 0,07$).

Cuadro 5: Fertilidad, prolificidad y fecundidad según tratamiento en las ovejas inseminadas con semen congelado.

Table 5: Fertility, prolificacy and fertility according to treatment in ewes inseminated with frozen-thawed semen.

Grupo	Fertilidad (%)	Prolificidad	Fecundidad (%)
Tratado	53,7 _a	1,09 _a	58,6 _a
Testigo	37,5 _b	1,07 _a	40,0 _b

a vs b : $p < 0,07$

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, y mejor calidad de semen que los carneros sin tratar.

No se observaron cambios de magnitud en la movilidad masal del grupo de carneros tratados con *Selfos plus*®. Dicho grupo se encontraba con buen nivel nutricional y con altos valores de movilidad masal durante todo el experimento.

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. 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.

Bajo nuestras condiciones de cría (Basalto), la administración de *Selfos plus*® en carneros, muestra una significativa mejora en la fertilidad del semen fresco y congelado.

Agradecimientos

Se agradece a la Profesora Ofelia Piegas y Téc. María Ofelia Preve por facilitar la infraestructura y los animales necesarios para la realización de los ensayos 2 y 3 de este trabajo.

Bibliografía

- Balicka-Ramisz, A., Pilarczyk, B., Ramisz, A. and Wiczorek, M. 2006. Effect of selenium administration on blood serum Se content and on selected reproductive characteristics of sheep. *Archiv fur Tierzucht of Animal Breeding* 49 (2): 176-180.
- Behne, D., Weiler, H. and Kriakopoulos, A. 1996. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 106:291-297.
- 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.
- Capaul, E.G., Carcagno, A.R. and Deluca, I. 1988. Alterations in the semen quality and plasma enzymes in bulls. Relation with selenium deficiency. *In: Selenium in Medicine and Biology. Proceedings of the Second International Congress on Trace Elements in Medicine and Biology, Avoriaz, France*, pp. 377-379.
- Ceballos, A., Wittwer, F.G., Contreras, P.A., Quiroz, E. y Böhmwald, H.L. 1999. Actividad de glutatión peroxidasa en bovinos a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de selenio. *Pesquisa Agropecuaria* 34:2331-2338.
- Evans, G. and Maxwell, W.M.C. 1987. *Salamon's artificial insemination in Sheep and Goat*. Butterworths, 194 pp. Sydney, Australia.
- Fernández, P.A., McCoshen, J.A., Cheang, M., Kredentserjv, P. and Wodzicki, A.M. 1990. Quantitative analysis of the effect of freezing on donor sperm motion kinetics. *Fertility and Sterility* 54:322-327.
- Fernández Abella, D., Villegas, N., Echeverría, D. y Robaina, J. 1993. Evaluación de las variaciones estacionales en la producción espermática de cuatro razas ovinas. *Boletín Técnico de Ciencias Biológicas* 3: 23-34.
- Fernández Abella, D. 2008. *Manual de inseminación por vía cervical en ovinos*. 2da edición; Montevideo. Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur. 76 pp.
- Guthrie, H.D. and 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. *Journal of Animal Science*. 84:2089-2100.
- Guzman-Marin, J., Mahan, D.C. and Pate, J.L. 2000. Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars. *Journal of Animal Science* 78:1537-1543.
- Jefferies, B. 1961. Body condition scoring and its use in management. *Tasmanian Journal of Agriculture*. 32: 19-21.
- Krishnamurti, C.R., Ramberg, C.F. and Shariff, M.A. 1989. Kinetic modeling of selenium metabolism in nonpregnant ewes. *Journal of Nutrition* 119:1146-1155.
- Manual Merck de Veterinaria. 2000. 5ed. Barcelona: Océano Centrum. 2.558p
- Marti, E., Mara, L., Marti, J.I., Muñio-Blanco, T. and Cebrián-Pérez, J. A. 2007. Seasonal variations

- in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology* 67:1446-1454.
- Martin, G.B., Ford, J.R. and Purvis, I.W. 1990. Environmental and genetic factors affecting reproductive activity in the Merino ram. *In: Reproductive physiology of Merino sheep; concepts and consequences*. Oldham, C.M.; Martin, G.B. and Purvis, I.W. Eds. Perth. University of Western Australia. pp. 109-129.
- McCoy, K.E. and Weswig, P.H. 1969. Some selenium responses in the rat not related to vitamin E. *Journal of Nutrition* 98:383-899.
- 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. y 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* 90:17-36. INIA Tacuarembó. Uruguay.
- Nayernia, K., Diaconu, M., Aumüller, G., Wenne-muth, G., Schwandt, I., Kleene, K., Kuehn, H. and Engel, W. 2004. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: expression pattern during testicular development in mouse and evolutionary conservation in spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 67:458-464.
- Piaggio, L. y Uriarte, G. 2005. Nutrición mineral de los ovinos en pastoreo en el Uruguay; revisión. *Producción Ovina (SUL)* 17:5-20.
- Pigurina, G., Soares de Lima, J.M. y Berretta, E. 1998. Contenido de minerales en pasturas naturales de basalto (especies nativas). Seminario de actualización en tecnologías para basalto. Serie Técnica INIA 102:113-122. Uruguay.
- Piper, L.R., Bindon, B.M., Wilkins, J.F., Cox, R.J., Curtis, Y.M. and Cheers, M.A. 1980. The effect of selenium treatment on the fertility of Merino sheep. *Proceedings of Australian Society of Animal Production* 13: 241-244.
- Salamon, S. 1976. Artificial insemination of sheep. 86pp. N.S.W. Publicity Press, Chippendale, Australia.
- 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.
- SAS. 1999. User's Guide. Version 8.0. SAS Institute. Cary. NC. USA.
- Todd-Sandford-Davidsohn, 1988. Diagnóstico y tratamientos clínicos por el laboratorio. 8ª Edición, 1479 pp. Salvat Editores SA. Barcelona. España.
- 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 INIA Tacuarembó 230pp.
- 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.
- 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.
- Yu, S. and Beynen, A.C. 2001. The lowering effect of high copper intake on selenium retention in weanling rats depends on the selenium concentration of the diet. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 85:29-37.