



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN GANADERÍA

EL SELENIO Y SU RELACIÓN CON LA CALIDAD ESPERMÁTICA DEL CARNERO

SAID CADENA VILLEGAS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2015

La presente tesis titulada: **El selenio y su relación con la calidad espermática del carnero**, realizada por el alumno: **Said CADENA VILLEGAS**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Jaime GALLEGOS SÁNCHEZ

ASESOR



Dr. Ponciano PÉREZ HERNÁNDEZ

ASESOR



Dr. Cesar CORTEZ ROMERO

ASESOR



Dr. Maximino HUERTA BRAVO

ASESOR



Dr. Juan SALAZAR ORTIZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 7 de septiembre de 2015

EL SELENIO Y SU RELACIÓN CON LA CALIDAD ESPERMÁTICA DEL CARNERO

**Said Cadena Villegas, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2015**

Con el objetivo de evaluar la relación de la suplementación con selenio y la calidad de semen en carneros de pelo, se llevaron a cabo tres experimentos. En el primero se determinaron las variaciones en producción y calidad de semen en ocho carneros de pelo, a los cuales se les colectó semen cada 15 días en el periodo comprendido entre marzo del 2013 y febrero del 2014, el cual se dividió en dos épocas, anestro (de marzo a julio) y época reproductiva (de agosto a febrero). Se evaluaron en el eyaculado el volumen, concentración espermática, movilidad, morfología y porcentaje de espermatozoides vivos; adicionalmente, se correlacionaron con las variables ambientales (temperatura, precipitación y fotoperiodo). Las características seminales fueron diferentes entre épocas ($p < 0.05$). En la época reproductiva fue mayor el volumen (1.4 mL), la concentración espermática (2.4×10^9), la movilidad (4.8) y el porcentaje de espermatozoides vivos (92%), en comparación con el anestro, donde disminuyeron a 0.9 mL, 1.9×10^9 , 4.0 y 88 %; respectivamente, cada una de las variables. Se encontró una correlación negativa entre la movilidad y el fotoperiodo (-0.73), lo que indica que cuando incrementan las horas luz (anestro) se disminuye la movilidad del eyaculado. En conclusión, a 19° LN, los carneros de pelo presentan un patrón de reproducción estacional, y durante la época reproductiva (agosto a febrero) se presentan las mejores características seminales en el eyaculado. En el segundo experimento, los sementales se asignaron al azar a uno de dos grupos, en el grupo 1 se adicionó a la dieta 0.4ppm de selenito de sodio y el grupo dos fue testigo (sin adición de selenio), se evaluaron cada 15 días, entre los meses de junio a octubre, los cambios en las características del eyaculado (volumen, concentración espermática, movilidad, morfología y porcentaje de espermatozoides vivos), mensualmente se tomaron muestras de sangre para determinar las concentraciones de Selenio (Se) en plasma y en octubre se tomaron muestras de sangre para determinar producción de malondialdehído como indicador de la liperoxidación y actividad de glutatión

peroxidasa. Las características seminales se correlacionaron con las concentraciones de Se en plasma. Los resultados indican diferencias ($p < 0.05$) en las concentraciones de Se en plasma de los carneros suplementados con respecto al testigo a partir del tercer mes de suplementación (23.8 y 11.7 respectivamente). Así mismo, el volumen del eyaculado fue mayor ($p < 0.05$) hasta el cuarto mes de suplementación (1.6 mL) y la concentración espermática se incrementó a partir del segundo mes (2.5×10^9) y se mantuvo hasta el final del periodo experimental. Se registraron correlaciones positivas y significativas ($p < 0.05$) entre el nivel de Se en plasma y el volumen (0.43), concentración (0.36) y movilidad (0.27) del semen. En conclusión, la administración de selenio incrementó el volumen del eyaculado y la concentración espermática. En el tercer experimento, se evaluó si la suplementación con Se a los carneros permite mejorar las características del semen conservado en fresco (37°C) durante 4 h, refrigerado (5°C) durante 96h y congelado (-196°C). Los carneros se asignaron al azar a uno de dos grupos, en el grupo uno se adicionó en la dieta 0.4 ppm de selenito de sodio y el grupo dos fue el testigo (sin adición de selenio); se evaluó por un periodo de ocho semanas, 60 días posteriores al inicio de la suplementación. . Las variables estudiadas fueron: porcentaje de espermatozoides vivos, movilidad y el porcentaje de espermatozoides con integridad de membrana. El grupo con la suplementación con Se fue diferente ($p < 0.05$) al testigo en porcentaje de vivos, movilidad e integridad de membrana a las 4 h para la conservación en fresco, en el semen refrigerado se observaron diferencias ($p < 0.05$) en porcentaje de vivos a partir de las 24 h y para la conservación en congelación no se observaron diferencias ($p > 0.05$). La suplementación con selenio mejora las características del semen conservado en fresco y refrigerado.

Palabras clave: Carnero, conservación, producción, semen, suplementación, selenio.

SELENIUM AND ITS RELATIONSHIP WITH RAM SPERM QUALITY

Said Cadena Villegas, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2015

The purpose of this study was to determine the relationship between selenium supplementation and semen quality in hair rams. Three experiments were implemented in order to accomplish the objective. In the first experiment, the annual variations in production and semen quality were determined on eight hair rams, the samples of sperm were collected every 15 days in the period between March 2013 and February 2014, this period was divided into two phases, anestrus (March to July) and breeding season (August to February). The volume, sperm concentration, motility, morphology and percentage of live sperm were evaluated on the semen samples. The semen characteristics correlated with environmental variables (temperature, precipitation and photoperiod). The seminal characteristics changed between periods ($p < 0.05$). During the breeding season it was found a higher volume (1.4 mL), sperm concentration (2.4×10^9), motility (4.8) and the percentage of live sperm (92%) compared with the anestrus, which decreased to 0.9 mL, 1.9×10^9 , 4.0 and 88%; respectively each variable. A negative correlation between motility and photoperiod (-0.73) was found, indicating that as the light hours increases (anestrus) the ejaculation motility decreases. In conclusion, at 19° North Latitude, hair sheep exhibit a seasonal pattern reproduction, and during the breeding season (August to February) shows the best seminal characteristics in the ejaculated semen. In the second experiment, the rams were randomly assigned to one of two groups, to the group 1 were added 0.4-ppm sodium selenite in diet and the group 2, were not added (control group). The changes in the characteristics of the ejaculated semen (volume, sperm concentration, motility, morphology and percentage of live sperm) were evaluated every 15 days, between June and October of 2013, monthly blood samples were taken to determine the concentrations of selenium (Se) in plasma. In October, blood samples were taken to determine malondialdehyde production as indicator of lipoperoxidation and glutathione peroxidase activity. The seminal characteristics correlated with Se concentrations in plasma. The results indicate differences ($p < 0.05$) in plasma concentrations were rams

supplemented compared with the control after the third month of supplementation (23.8 and 11.7 respectively). In addition, the volume of ejaculated semen was higher ($p < 0.05$) until the fourth month of supplementation (1.6 mL), the sperm concentration increased from the second month (2.5×10^9) until the end of the experimental period. Significant positive correlations ($p < 0.05$) between the levels of Se in plasma volume (0.43), concentration (0.36) and motility (0.27) of semen were found. In conclusion, the administration of selenium increased ejaculate volume and sperm concentration. In the third experiment, it was investigated how Se supplementation improves the sheep semen characteristics stored in a fresh (37°C) for 4 h, cooled (5°C) for 96 h and frozen (-196°C) conditions. The rams were randomly assigned to one of two groups, in the group 1 were added in the diet 0.4 ppm of sodium selenite and group two was the control (without addition of selenium). The sample units were evaluated for a period of eight weeks, 60 days after the start of supplementation. The studied variables were: percentage of live sperm, motility and percentage of functional sperm membrane integrity. The group with Se supplementation was different ($p < 0.05$) in percentage of live sperm, motility and functional sperm membrane integrity at 4 h for keeping fresh, of control treatment. In refrigerated sperm we found difference ($p < 0.05$) between treatment and control in percentage live spermatozooids, between 24 h of conserved semen and frozen semen no differences were observed ($p > 0.05$). Selenium supplementation improves semen characteristics in preserved in fresh and refrigerated semen.

Keywords: Ram, conservation, production, semen, supplementation, selenium.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Regulación de la actividad reproductiva en el macho	3
2.1.2 Eje hipotálamo-hipofisario-gonadal	4
2.1.3 Factores ambientales que afectan la producción de semen	6
2.2 Importancia del selenio en machos	12
2.3 Conservación de semen.....	13
2.3.1 Causas de la reducción de la fertilidad en el semen conservado.....	14
2.3.2 Estrés oxidativo del semen	16
2.3.3 Metabolismo energético del semen.....	16
2.3.4 Radicales libres y producción de especies reactivas del oxígeno	17
2.3.5 Efectos de ROS y estrés oxidativo en los espermatozoides	18
2.3.6 Antioxidantes en el semen	20
2.3.7 Importancia del selenio en la regulación de estrés oxidativo	22
III. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	23
IV. CALIDAD ESPERMÁTICA EN CARNEROS DE PELO DURANTE EL AÑO. 24	
4.1 Resumen	24
4.2 Introducción	24
4.3 Materiales y Métodos.....	25
4.4 Resultados.....	27
4.5 Discusión	30
4.6 Conclusiones	32
V. CAMBIOS EN LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE CARNEROS SUPLEMENTADOS CON SELENIO	33
5.1 Resumen	33
5.2 Introducción	33
5.3 Materiales y Métodos.....	35
5.4 Resultados.....	39
5.5 Discusión	43
5.6 Conclusiones	46
VI. IMPORTANCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN DE SELENIO A CARNEROS PARA LA CONSERVACIÓN DE SEMEN.....	47

6.1 Resumen	47
6.2 Introducción	47
6.3 Materiales y Métodos.....	49
6.4 Resultados.....	53
6.5 Discusión	55
6.6 Conclusión.....	57
VII. DISCUSIÓN GENERAL DE RESULTADOS	58
VIII. CONCLUSIONES GENERALES	60
IX. LITERATURA CITADA.....	61

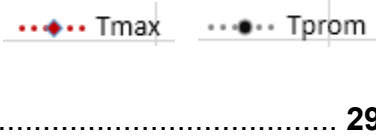
LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Variaciones en la calidad de semen de carneros de pelo durante el año en una latitud norte de 19°	29
Cuadro 2. Matriz de correlaciones observadas entre las características seminales de machos de pelo y las variables ambientales en una latitud norte de 19°	30
Cuadro 3. Adición de microelementos en la dieta de los grupos de carneros.	37
Cuadro 4. Cambios las características del eyaculado de carneros F1 Damara x Pelibuey suplementados con Se en Montecillo, Texcoco, México.	41
Cuadro 5. Correlaciones entre las concentraciones de selenio en plasma y las características del eyaculado de carneros F1 Damara X Pelibuey suplementados con Se en Montecillo, Texcoco, México.	42
Cuadro 6. Aporte de microelementos a la dieta a cada grupo de carneros.....	50
Cuadro 7. Cambios en el porcentaje de espermatozoide vivos, movilidad e integridad de membrana en el semen mantenido en fresco a 37°C de pelo suplementados con Se en Montecillo, Texcoco, México.	53
Cuadro 8. Cambios en el porcentaje de espermatozoide vivos, movilidad e integridad de membrana en el semen mantenido refrigerado a 5°C de carneros F1 Damara X Pelibuey F1 Damara X Pelibuey suplementados con Se en Montecillo, Texcoco, México.	54
Cuadro 9. Cambios en el porcentaje de espermatozoide vivos, movilidad e integridad de membrana en el semen congelado de carneros F1 Damara X Pelibuey F1 Damara x Pelibuey suplementados con Se en Montecillo, Texcoco, México.....	55

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Representación esquemática del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Modificado de Bustos y Torres-Díaz, 2012). **5**
- Figura 2.** Representación esquemática de la estimulación luminosa a la glándula pineal. NPV: Núcleo para ventricular, NSQ. Núcleo supraquiasmático; CCI: Columna celular Intermediolateral; GCS: Ganglio cervical superior y G.P: Glándula pineal (Modificado de Moore, 1996). **7**
- Figura 3.** Representación esquemática de la acción de un antioxidante (Modificado de <http://www.cic-ctic.unam.mx/unamirada>). **21**
- Figura 4.** Promedio mensual de las horas luz de marzo del 2013 a febrero del 2014 en Montecillo, Texcoco, Estado de México. **28**
- Figura 5.** Temperaturas máximas, mínimas, promedio de marzo del 2013 a febrero del 2014 en Montecillo, Texcoco, Estado de México. (). **29**
- Figura 6.** Cambios mensuales en la concentración de selenio en plasma de carneros F1 Damara X Pelibuey. **40**
- Figura 7.** Actividad de Glutación peroxidasa en plasma de carneros F1 Damara X Pelibuey suplementados con 0.4 ppm de **Se**, en Montecillo, Texcoco, México. **42**
- Figura 8.** Producción de malondialdehído en plasma de carneros F1 Damara X Pelibuey suplementados con 0.4 ppm de Se, en Montecillo, Texcoco, México. **43**
- Figura 9.** Adaptado de Freeze control® graphs by Cryologic, System Operating manual. Programa 5: semen de ovinos y caprinos. **52**

I. INTRODUCCIÓN

La calidad de semen, depende de factores genéticos, ambientales y la interacción entre ambos (Foote, 1978); sin embargo, las condiciones ambientales generan importantes cambios en el desempeño reproductivo en especies de producción como los ovinos (Bustos y Torres-Días, 2012).

La influencia de los factores ambientales en la producción de semen en especies de interés zootécnico ha sido reportada por diversos autores (Dacheux *et al.*, 1981; D'Alessandro y Martemucci, 2003). Los pequeños rumiantes muestran cambios estacionales en su actividad reproductiva, los cuales tienen la época de empadre en otoño e invierno y permanecen en anestro en primavera y verano, conducta que se encuentra regulada por el fotoperiodo (Gómez-Brunet *et al.*, 2012).

La estacionalidad reproductiva limita el desarrollo de estrategias como la inseminación artificial (IA), la cual es una técnica de reproducción por la cual el semen colectado de manera artificial, se deposita en el tracto reproductivo de las hembras para realizar la fecundación de los óvulos maduros (Cueto y Gibbons, 2005). En este sentido, la IA depende de la calidad seminal para obtener resultados satisfactorios, por lo tanto, los estudios para la conservación de semen han abordado diferentes planteamientos tales como, la reducción del metabolismo celular y/o el uso de crioprotectores (Salomon y Maxwell, 2000). Así, para la IA es necesario coleccionar el mayor volumen de semen y conservarlo de manera eficiente, manteniendo sus parámetros de movilidad y vitalidad (David *et al.*, 2007) y desde el desarrollo de esta técnica en perros utilizando semen congelado, se han llevado diversos avances en los diluyentes para su conservación, creando los medios para mantener sus características intactas y que este sea conservado con la mayor calidad (Palacios, 1994; Bencharif *et al.*, 2008).

El semen de machos usados para IA puede ser utilizado en forma fresca, refrigerada o congelada. El uso de semen fresco limita su vida útil, por el contrario, la viabilidad del semen preservado en refrigeración, permite mantener más la sobrevivencia del semen, lo que da mayor oportunidad de su uso en programas de IA en unidades de

producción distantes a los centros en donde se tienen los sementales (Martínez *et al.*, 2006) y el proceso de congelación reduce la motilidad de los espermatozoides y altera la integridad de su membrana, y estos cambios están asociados con la disminución en la capacidad fertilizante del semen (Maxwell y Watson, 1996).

Se ha descubierto que la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) producidas en el semen reducen considerablemente la capacidad fertilizante de los espermatozoides, principalmente por efecto de la lipoperoxidación que se lleva a cabo en las células y provoca la destrucción del ADN, lípidos, proteínas y en consecuencia la muerte de la célula (Partyka *et al.*, 2012).

Se considera que los lípidos son las macromoléculas más susceptibles y que están presentes en la membrana de las células espermáticas (Agargwal *et al.*, 2008) los daños en consecuencia de esta alteración están relacionados con alteraciones en la movilidad (Sundararaman y Edwin, 2008) y daño en la estructura de ADN de las células germinales y de los espermatozoides que originan bajos índices de concepción (Peris *et al.*, 2004). El semen tiene una gran capacidad para producir ROS y esta acondicionado con mecanismos enzimáticos de defensa contra estos compuestos, los más importantes son las enzimas Superóxido Dismutasa (SOD), catalasa y Glutathione Peroxidasa. Sin embargo, se ha comprobado que en los procesos de conservación de semen, la adición de antioxidantes ha demostrado beneficios en las características del semen descongelado (Ruiz *et al.*, 2007). La suplementación con oligoelementos tales como el Cobre (Cu), Zinc (Zn) y Selenio (Se) permiten que estas enzimas tengan un mejor funcionamiento en defensa de la acción de los ROS (Jaramillo *et al.*, 2005).

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue determinar los cambios estacionales en la producción de semen de carneros de pelo encastados con Damara y determinar si la suplementación con selenio permite mejorar los procesos de conservación de semen.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

La demanda de alimentos creada por el incremento en la población hace necesario el uso eficiente de los recursos genéticos, así como la innovación y mejora de los sistemas de producción ya existentes; la implementación de programas de inseminación artificial y transferencia de embriones han hecho posible mejorar los procesos de mejoramiento genético (Dattena y Mayorga, 2011).

La inseminación artificial (IA) es sin duda la herramienta biotecnológica en pequeños ruminantes que más impacto ha tenido, aunque sus inicios se consideran desde hace siglos, su importancia es mayor en los últimos 60 años, con la mejora en las técnicas de extracción, evaluación y conservación de semen, primero con el uso de semen en refrigeración con tiempos limitados y su evolución a periodos muy prolongados por medio de la congelación (De Lucas, 2012). Sin embargo, diversos autores mencionan las variaciones estacionales en la capacidad reproductiva de los carneros (D'Alessandro y Martemucci, 2003; Oberst *et al.*, 2004; Bustos y Torres-Díaz, 2012) por lo que es importante establecer las épocas más propicias de colección de semen para su conservación.

2.1 Regulación de la actividad reproductiva en el macho

En los ovinos, la estacionalidad reproductiva, constituye una limitante que impide mantener una producción continua a lo largo del año, y se piensa que existen grandes diferencias entre razas, las originarias de altas latitudes, como las de cara negra, por ejemplo, la suffolk, muestran una marcada estacionalidad reproductiva y las razas africanas y asiáticas su estacionalidad es muy corta o nula (Valencia y Arrollo, 2005).

En el carnero, la capacidad para producir semen y realizar la monta se mantiene a lo largo del año (Aguirre, 2004), sin embargo, la producción y características del semen, producido durante el período reproductivo pueden presentar importantes variaciones en cuanto a su calidad y cantidad (Pourseif y Moghaddam, 2012), lo cual, es importante para establecer períodos de empadre, que coincidan con la etapa de mayor producción de semen del carnero, ya sea para el uso de monta natural o periodos de extracción de semen para IA durante todo el año (Sepulveda *et al.*, 2002).

Los carneros, se consideran como reproductores estacionales, que muestran una libido muy alta en los días cortos (Orihuela, 2014). Oláh *et al.* (2013) al evaluar las características del eyaculado y diámetro testicular de siete razas de carneros durante un año, encontraron un incremento en el diámetro testicular, con los mayores diámetros en verano y otoño, y la reducción en invierno y primavera, adicionalmente, observaron cambios en volumen y concentración del eyaculado, habiendo diferencias marcadas entre razas, en donde la raza Suffolk mostró la menor concentración espermática en todas las estaciones del año.

Sin embargo, actualmente se han implementado estrategias de manejo en los pequeños rumiantes que permiten incrementar su actividad reproductiva en épocas que tradicionalmente se consideraban como no aptas para la reproducción, tal es el caso del control del fotoperiodo (horas luz) y estrategias de suplementación alimenticia para incrementar la respuesta sexual (Cruz-Castrejon *et al.*, 2007). Al respecto Sayed y Mohamed (2010) mencionaron que, al suplementar carneros con alfalfa en diferentes épocas del año observaron que el volumen del eyaculado fue significativamente mayor con un incremento en el consumo, la motilidad también tuvo un incremento conforme se mejoró el consumo de alimento. Por lo tanto, reportan que el nivel nutricional tiene un gran impacto en el comportamiento reproductivo de los carneros y que el consumo de proteína está relacionado con su capacidad reproductiva.

La suplementación mineral también es importante en la producción de semen de los carneros. Para el caso del selenio, Bin *et al.* (2008) mencionaron que al suministrar un suplemento con vitamina E y Selenio, observaron que la combinación de estos dos elementos, mejoró las características seminales y el desempeño reproductivo en carneros solamente después de tres meses de suplementación.

2.1.2 Eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal

La regulación de las funciones sexuales se realiza en estrecha relación de los sistemas nerviosos central y endócrino, en donde el centro de esta regulación es el sistema hipotálamo- hipofisiario- gonadal (Figura 1). Este sistema regulador a través de impulsos nerviosos neurohormonales (factores de liberación) y hormonas (gonadotropinas hipofisarias) estimulan la actividad de los órganos terminales

(testículos) que secretan sus propias hormonas. Las hormonas testiculares están representadas por los andrógenos que influyen en la estructura y función de los conductos testiculares (Velázquez *et al.*, 2007).

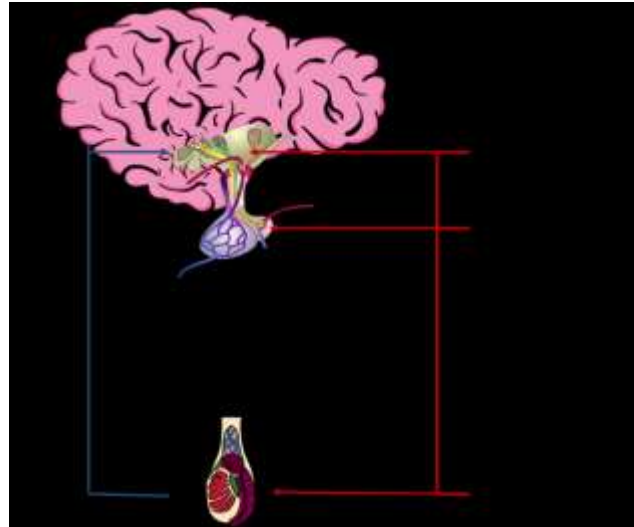


Figura 1. Representación esquemática del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal (Modificado de Bustos y Torres-Díaz, 2012).

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es liberada del hipotálamo al sistema porta hasta llegar a los gonadotropos (células productoras de gonadotropinas) presentes en la hipófisis anterior (adenohipófisis) donde estimula la secreción de la hormona folículo estimulante (FHS) y hormona luteinizante (LH). Luego de su liberación pulsátil, éstas viajan hasta los testículos, donde FSH ejerce sus efectos en los sustentocitos (células de Sertoli) mientras que LH actúa en los endocrinocitos intersticiales (células de Leydig). Las Células de Sertoli se localizan al interior de los túbulos seminíferos y su función principal es apoyar el desarrollo de los espermatozoides. Estas células además, secretan algunas proteínas (inhibina y activina) que regulan la liberación de FSH desde la hipófisis anterior y proteínas de unión a testosterona (ABP; Androgen Binding Protein). Las células de Leydig se localizan entre los túbulos seminíferos, y por la estimulación de LH, inician la síntesis y secreción de testosterona. Los niveles de testosterona controlan la liberación de GnRH y de gonadotropinas y por lo tanto, también su propia concentración a través de

un sistema de retroalimentación negativa. Cuando las concentraciones de testosterona son altas, produce una retroalimentación negativa en el hipotálamo, por el contrario, cuando los niveles son bajos, no se produce la inhibición y el sistema incrementa la secreción de GnRH, gonadotropinas y testosterona (Bustos y Torres-Díaz, 2012).

Por lo tanto, en el macho, los testículos tienen dos funciones esenciales: la gametogénesis (epitelio germinal) y esteroidogénesis (Células de Leydig y Sertoli) las cuales están reguladas por la liberación de hormonas hipofisarias (Hafez, 1993).

2.1.3 Factores ambientales que afectan la producción de semen

2.1.3.1 Fotoperiodo

Existen especies en las que la actividad reproductiva se limita a un cierto periodo en el año, lo que se conoce como estacionalidad reproductiva, cuyo objetivo es que las crías nazcan en la época más favorable del año. En las hembras permite que solo en ciertos meses existan ciclos ovulatorios y en el macho, regula el tamaño testicular, la producción de testosterona y semen, y modifica en comportamiento sexual (Gerlach y Aurich, 2000). En el caso de los carneros, la producción de semen es afectada por la época reproductiva, que es mejor cuando los días son más cortos (Foote, 1978).

Las señales de luz que llegan a los ojos viajan al área supraquiasmática del hipotálamo, estructura que controla el ritmo de las 24 h y que necesita de las señales de la luz para que este ritmo sea alineado con la aurora y el crepúsculo. En esta área, las señales ópticas entran al sistema nervioso simpático, viajan por la medula espinal al ganglio cervical superior y desde ahí, a la glándula pineal que es el sitio de producción de melatonina; de tal manera que la presencia de luz interrumpe la secreción de melatonina y las concentraciones en sangre son pocas en el día pero altas durante la noche (Martin, 2003). La secreción nocturna de melatonina refleja la duración de la noche y regula la secreción pulsátil de GnRH, la cual induce cambios en la secreción de LH, y es responsable de la presencia o ausencia de la ovulación en la hembra y del incremento en la producción de esperma en el macho. Aunque la melatonina tiene sus sitios de acción en la *par tuberalis* de la adenohipófisis, el hipotálamo contiene los sitios diana fisiológicos de la melatonina para su acción sobre la reproducción, entonces, la melatonina no parece actuar directamente sobre las

neuronas secretoras de GnRH; más bien parece implicar un complejo circuito neuronal que incluye al menos los núcleos dopaminérgico, serotoninérgico y aminoacidérgica excitatorio (Malpoux *et al.*, 1999; Figura 2).

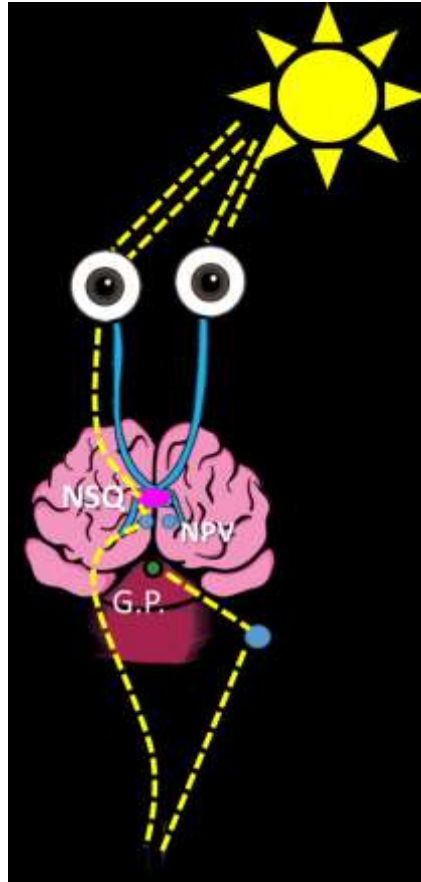


Figura 2. Representación esquemática de la estimulación luminosa a la glándula pineal. NPV: Núcleo para ventricular, NSQ. Núcleo supraquiasmático; CCI: Columna celular Intermediolateral; GCS: Ganglio cervical superior y G.P: Glándula pineal (Modificado de Moore, 1996).

En este sentido, el fotoperiodo es la señal que indica el inicio o final de la estacionalidad reproductiva, debido a los cambios en la duración del día que incrementan o reducen la secreción de melatonina (Lehman *et al.*, 2010).

Al inicio de la época reproductiva el incremento en la secreción de melatonina estimula al hipotálamo de tal forma que se incrementa su frecuencia de secreción de pulsos de

GnRH, esto incrementa la secreción de pulsos de LH y las concentraciones de FSH y la actividad gonadal, la producción de esteroides se incrementa y ejerce sus efectos secundarios y de comportamiento. Los esteroides actúan en sincronización con las gonadotropinas estimulando las gónadas para la producción de espermatozoides (Martin, 2003).

Mandiki *et al.* (1998) determinaron los niveles de hormonas circulantes en carneros Suffolk en Bélgica, encontraron que las concentraciones de FSH fueron más elevadas en verano y otoño y bajas en invierno y primavera del hemisferio norte (4.56, 3.44, 2.06 y 3.05 ng mL⁻¹ respectivamente). Las concentraciones de testosterona fueron más altas en otoño (5.33 ng mL⁻¹) y verano (2.51 ng mL⁻¹) y bajas en invierno y primavera (1.48 ng mL⁻¹, igual en las dos épocas). Las concentraciones de prolactina fueron reportadas en orden descendente en las estaciones de verano, primavera, otoño e invierno (92.07, 67.98, 49.11 y 11.26 ng mL⁻¹ respectivamente). Esto indica que las concentraciones de hormonas fluctúan drásticamente en los carneros susceptibles a la estacionalidad reproductiva y están asociados a cambios en el eje hipotálamo-hipofisiario. En general, cambios en la secreción de gonadotropinas se asocian al incremento en la producción de testosterona y el incremento en el tamaño testicular (Gerlach *et al.*, 2000).

Estos cambios en las concentraciones hormonales, también se reflejan en la circunferencia testicular como lo reporta Sarlos *et al.* (2013) quienes al evaluar los cambios en el diámetro testicular de carneros Racka en Hungría reportaron que los menores valores se observaron en invierno (22.64±0.18 cm) y el mayor tamaño en otoño (31.55±0.14 cm) además de reportar una alta correlación entre el tamaño testicular ($r=0.43$, $p<0.05$) con los días cortos.

También se han reportado cambios en las características espermáticas, Sánchez *et al.* (2013) reportaron en machos Saint Croix el mayor volumen del eyaculado en los meses de octubre y noviembre (otoño; 1.47 mL) y menor volumen en febrero (final del invierno; 0.9 mL); sin embargo, la mayor motilidad se registró en diciembre (invierno; 3.35) y la menor en enero (1.98); la concentración espermática fue más elevada en diciembre (455.57X10⁶) y la menor en mayo (primavera; 77.36 X10⁶) lo que indica la

existencia de importantes diferencias en las características del eyaculado en los carneros.

Con la finalidad de mejorar el desempeño reproductivo de los carneros fuera de la época reproductiva, se han utilizado tratamientos con fotoperiodo artificial en donde los machos son sometidos de manera alterna a 1 mes de días largos (16 h luz) y un mes de días cortos (8 h luz), lo cual mantiene una producción de semen alta de manera constante e incrementa la producción de semen hasta en un 40% al año (Chemineau *et al.*, 2008).

2.1.3.2 Nutrición

La nutrición, es un factor muy importante, que tiene influencia en el desempeño reproductivo de los sementales ya que cambios en el peso corporal están ligados a variaciones importantes en el tamaño testicular en carneros Merino, afectando directamente la producción diaria de semen por gramo de tejido testicular (Martin *et al.* 1994) y el incremento en el tejido testicular por la suplementación alimenticia aumenta la proporción de los túbulos seminíferos del tejido testicular (Martin *et al.*, 1994).

Cambios en la nutrición ejercen cambios en los patrones de secreción de hormonas en la sangre y en el fluido cerebroespinal (CSF) y estos cambios generan variaciones en el tejido cerebral que regulan el eje reproductivo. Al incrementar el consumo de nutrientes y las concentraciones de ácidos grasos volátiles y ácido linoleico se incrementa la secreción de factores homeostáticos en plasma tales como la insulina, leptina, glucosa, factor parecido a la insulina 1 (IGF-1). Sin embargo, en el CSF solo incrementan los niveles de insulina, leptina y glucosa, indicando que la nutrición es un modulador metabólico de la secreción de GnRH y gonadotropinas (Blache *et al.*, 2000).

En machos, las deficiencias nutricionales después del destete pueden afectar el crecimiento testicular y altos niveles de energía, desde el destete y por periodos muy prolongados disminuyen la calidad seminal. Por ello la importancia de balancear las dietas tomando en cuenta los niveles de proteína y energía (Mapletoft *et al.*, 1998). Adicionalmente, la nutrición tiene influencia en la edad a la pubertad, por lo tanto, si la alimentación es balanceada en energía y proteína, se logra una maduración de los

carneros en un menor plazo, esto implica que un mayor número de espermatozoides y de mejor calidad en los primeros eyaculados del macho (Mapletoft *et al.*, 1998).

Minerales

McDowell y Arthington (2005) señalaron que los minerales son nutrimentos esenciales para todos los animales e influyen en la eficiencia productiva del ganado. Se consideran como el tercer grupo de nutrientes limitantes en la producción animal y su importancia radica en que son necesarios para la transformación de la energía y proteína, en componentes del organismo o en producto animal como leche, carne, crías, piel y lana (Huerta, 1997; Salamanca, 2010).

La necesidad de minerales debe ser cubierta y controlada mediante el manejo de la alimentación, para evitar una carencia (falta) o toxicidad (exceso) de alguno de los elementos, sin embargo, si el suministro de estos nutrimentos no se lleva a cabo de manera balanceada, ocasiona que la función reproductiva tanto de machos como hembras se afecte, lo que conlleva a una disminución en la productividad y rentabilidad de la producción. Al respecto, Huerta (1999) mencionó al **P, Zn, Cu, Mn, Co, Se y I** como los minerales más importantes en las funciones reproductivas. Las investigaciones sobre fertilidad en ovinos se han enfocado principalmente en las hembras, sin embargo, Mapletoft *et al.* (1998), mencionaron que la fertilidad del macho es mucho más importante que en la hembra, porque si la hembra falla se pierde una cría, mientras que si falla el macho las pérdidas son mayores y su impacto dependerá del número de ovejas que tiene asignadas.

La suplementación con microelementos como el **Zn** y **Se** ha demostrado tener efectos positivos en la fertilidad de los carneros debido a que tienen efectos importantes como antioxidantes que mejoran las características seminales (Kendall *et al.*, 2000).

Selenio (Se)

Por el origen del suelo volcánico, la mayor parte del territorio mexicano presenta problemas de carencia de **Se**, que se traduce en la presencia de cuadros clínicos y subclínicos de la enfermedad del músculo blanco, en particular en rumiantes (Ramírez *et al.*, 2001) teniéndose que suplementar este elemento. La importancia nutricional del

selenio comenzó en los años 50 cuando se observó que la mayoría de miopatías en el ovino se podían prevenir con la suplementación de **Se** y vitamina E (McDonald *et al.*, 2002). Aunque la deficiencia ha sido señalada en todas las especies, los rumiantes parecen ser más sensibles al padecimiento y en particular la situación parece ser más grave en pequeños rumiantes (Ramírez *et al.*, 2001; Ramírez *et al.*, 2004).

Carmona-Fonseca (2010) mencionó que el **Se** ingresa a la cadena alimentaria como selenometionina y selenocisteína mediante el consumo de alimentos y es esencial debido a sus múltiples funciones como parte integral del sitio activo de las enzimas antioxidantes funcionalmente activas (selenoenzimas: glutatión peroxidasa y tiorredoxin-reductasa), induce apoptosis por mecanismo no conocido (Duntas, 2009; Carmona-Fonseca, 2010), estimula el sistema inmunológico (Spallholz, 1990; Turner y Finch, 1991), interviene en el funcionamiento de la glándula tiroidea, modula la expresión de genes que codifican las selenoproteínas (Allmang y Krol, 2006), interviene para producir energía mitocondrial junto con la vitamina E, estimula la producción de prostaglandinas y ubiquinona (coenzima Q10; Duntas, 2009; Carmona-Fonseca, 2010) y contribuye a la fertilidad de machos (Foresta *et al.*, 2002) y hembras (Kommissrud *et al.*, 2005).

La absorción de **Se** es menor en rumiantes (29-35%) que en monogástricos (77-85%), cuando se consume como selenito vía oral (Carbajal *et al.*, 2013). Las diferencias de absorción entre rumiantes y no rumiantes, se debe a la interacción del mineral ocasionada por los microorganismos del rumen, que cambian una parte en formas insolubles (**Se** elemental y selenuros) y otra porción la agregan a proteínas para formar algunos selenoaminoácidos como son la selenometionina y selenocistina (Harrison y Conrad, 1984). El principal sitio de absorción es el duodeno (Sarabia-Martínez, 2004) y se desecha a través de orina y excremento relativamente rápido (Carbajal *et al.*, 2013), cuando el consumo es alto tiende a acumularse y causa lesiones en los tejidos (Villanueva, 2011).

Los principales efectos en la deficiencia de **Se** son, el metabolismo tiroideo, que afecta seriamente los parámetros productivos de los animales (Beckett y Arthur, 2005; Köhrle *et al.*, 2007). Sin embargo, Hedao *et al.* (2008) mencionaron que las fluctuaciones de

minerales traza tiene un impacto significativo en la salud reproductiva y desarrollo del macho.

2.2 Importancia del selenio en machos

Se sabe que el **Se** influye en la morfología histológica y tamaño de los testículos (Kaur y Kaur, 2000). Se ha reportado que 0.1 ppm de selenato de sodio en la materia seca de raciones para carneros se asocia con un aumento significativo en la longitud y circunferencia escrotal, además, mejora la calidad del semen al aumentar el volumen de semen por eyaculación, motilidad de los espermatozoides, la concentración y disminuye el porcentaje de espermatozoides muertos, así como, anormalidades y daños en el acrosoma (Marai *et al.*, 2009). En otro estudio El-Sisy *et al.* (2008) observaron que los machos cabríos suplementados con 0.15 ppm de **Se** orgánico resultó en un aumento significativo en secreción de testosterona en comparación con los no suplementados.

Además de su efecto en la circunferencia escrotal, la presencia de **Se** en cantidades adecuadas en testículos es esencial para la espermatogénesis normal y tiene una función fundamental en la maduración del espermatozoide de ovinos (Ahsan *et al.*, 2014). Dado que la calidad del semen y la fertilidad dependen del proceso de maduración de los espermatozoides es necesario asegurar un adecuado suministro de este elemento en machos. Kehr *et al.* (2009) observaron por microscopia de fluorescencia la importancia del selenio en la espermatogénesis, además que la selenoproteína de plasma P es la responsable del transporte del selenio de la sangre a los testículos (Olson *et al.*, 2005; Imai *et al.*, 2009; Kehr *et al.*, 2009). El **Se** suministrado a los testículos se utiliza para la síntesis de selenoproteínas en testículo (Ahsan *et al.*, 2014).

La selenoproteína principal en el testículo, es la fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (GPx4 o PHGPx) que se expresa principalmente en el espermatozoide (Foresta *et al.*, 2002). La absorción de la selenoproteína P se produce en las células de Sertoli dentro de los túbulos seminíferos por un miembro de la familia de receptores de lipoproteínas, apolipoproteína E receptor-2 (ApoER2) la cual transporta el **Se** presente en el torrente sanguíneo a las células espermatogénicas para favorecer la espermatogénesis (Olson *et al.*, 2007).

Una deficiencia o ausencia de selenoproteína P y ApoER2 pueden dar lugar a disminución de la concentración de **Se** en las células espermatogénicas, dando lugar a defectos morfológicos en los espermatozoides producidos en la espermatogénesis (Ahsan *et al.*, 2014). La ausencia de selenoproteína P reduce la cantidad de **Se** en los testículos hasta el 77% (Kehr *et al.*, 2009).

Otra variante de GPx4 se observa en los núcleos de los espermatozoides (snGPx4 o nGPx4) al final de la espermatogénesis (Chabory *et al.*, 2010) y actúa en la estabilización de la cromatina condensada durante la maduración del espermatozoide (Conrad *et al.*, 2005). Tanto GPx1 así como GPx4 citosólica (cGPx4) se expresan en el epitelio del epidídimo y sirven para proteger a los espermatozoides contra las especies reactivas de oxígeno (ROS; Noblanc *et al.*, 2011). Dentro del lumen del epidídimo, GPX5 actúa en conjunto con GPx3 y se mueve junto con los espermatozoides en el epidídimo para protegerlos contra ROS durante el proceso de maduración (Noblanc *et al.*, 2011). Por lo tanto, el Se como componente de selenoproteínas y selenoenzimas está implicado en la espermatogénesis mediante la protección de los espermatozoides del daño oxidativo ocasionado por las ROS influyendo de manera importante en la fertilidad.

2.3 Conservación de semen

La necesidad de gestar ovejas con sementales genéticamente superiores, requiere de transportar el semen, desde los centros de colección hasta las unidades de producción, en donde se encuentran las hembras, esto implica grandes distancias y en general, periodos prolongados para la sobrevivencia del semen, además de la necesidad de extraer semen en las épocas de mayor calidad seminal (meses con menos horas luz) para su almacenamiento y uso en épocas determinadas de empadre; estas necesidades han estimulado la investigación en términos de conservación de semen (Salomon y Maxwell, 2000). Por lo tanto, la conservación de semen ofrece grandes ventajas en los programas de mejoramiento genético; sin embargo, estos procesos producen un daño celular, debido al proceso de criopreservación, que reduce la capacidad fertilizante del espermatozoide y en consecuencia, existe una disminución

en los resultados de fertilidad en programas de inseminación artificial en comparación con la monta directa (Sandoval, 2005)

2.3.1 Causas de la reducción de la fertilidad en el semen conservado.

Aunque una proporción relativamente alta de espermatozoides (40-60%) mantiene su movilidad después de la congelación, solo del 20 al 30% permanece sin daños en su estructura, no se sabe si estos cambios generados por el proceso de congelación ocurren al mismo tiempo o en diferentes fases; sin embargo, los daños por el proceso de congelación se consideran tanto físicos (ruptura de membranas) estructurales como bioquímicos funcionales (permeabilidad de la membrana; Salomon y Maxwell, 2000).

El problema de la congelación de semen no es la habilidad del semen para mantenerse vivo a -196°C , si no evitar el daño que se produce en el proceso de congelación y descongelación, al pasar la célula por una zona de temperatura crítica (entre -15 y -60°C) durante la cual se producen fenómenos tales como la formación de cristales intra y extracelulares, deshidratación y distorsión de la membrana, que se derivan del proceso de enfriamiento (Palacios, 1994). Salomon y Maxwell (1995b) mencionaron en su revisión que existen daños estructurales durante el proceso de congelación – descongelación de semen, que son acompañados por cambios bioquímicos o la pérdida de sus contenidos vitales. Algunos de los cambios y pérdidas incluyen la liberación de transaminasa glutámico oxalacético (GOT por sus siglas en inglés), pérdida de lipoproteínas y aminoácidos, reducción en la actividad de fosfatasas, disminución en el contenido de potasio, inactivación de la hialurodinasa y acrosina, pérdida de prostaglandinas E, reducción de la ATP y síntesis de ADP y disminución de la actividad proteolítica acrosomal.

La lesión celular producida por la congelación, se puede explicar, por la acción combinada de factores físicos como el estrés osmótico y la presión que sufren las membranas celulares por la expansión de hielo, la cual produce una deformación celular que a bajas temperaturas resulta letal. Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de congelación debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos (Mazur, 1984). La fluidez de la membrana, se puede alterar, por efecto de la temperatura, al bajar esta se produce un reacomodo de

las cadenas de fosfolípidos en forma de paquetes, ya sea en forma bilaminar o en forma hexagonal, formándose con esto regiones cristalinas; sin embargo, existen regiones en donde todavía hay líquidos y aquellas regiones que fueron separadas del bloque cristalino se reagrupan, de forma que se construyen brechas de comunicación en la membrana (Amman *et al.*, 1987).

Otra hipótesis plantea que al descender la temperatura abajo de 0°C, disminuye la formación de ATP, lo que afecta a la bomba sodio potasio de la membrana plasmática (ATP dependiente) causando que el potasio que atraviesa la membrana para salir sea mayor que el que entra, lo que reduce el potasio intracelular y se altera la relación Sodio/ Potasio. Esto causa una despolarización parcial de la membrana, en consecuencia, abre los canales de calcio, el cual activa las fosfolipasas y en general, se genera una desestabilización de la membrana (Fahy, 1986). Al respecto Holt y North (1994) mencionaron que los principales daños causados en la membrana celular, son en el periodo de descongelación, al tratar de restaurar el equilibrio osmótico del medio, ya que las membranas se desestabilizan al inicio del proceso de congelación, tanto por el efecto de las bajas temperaturas como de la concentración de solutos y estos factores en conjunto son los que dañan la integridad de la membrana.

Sin embargo, igual de importantes son los daños producidos en las mitocondrias del espermatozoide durante el proceso de congelación, lo que limita su movilidad y capacidad para atravesar el cérvix en inseminación pericervical, ya que las células espermáticas dependen del metabolismo respiratorio para su movilidad y los daños en estas estructuras implican una reducción en su capacidad fertilizante (Windsor y White, 1995).

Salomon y Maxwell (1995b) mencionaron que existen diferentes daños en las mitocondrias debidos al proceso de congelación- descongelación de semen, estos incluyen cambios morfológicos en la estructura del orgánulo producto de la pérdida de proteína, pero la cola del filamento y las miofibrillas no muestran cambios detectables después de la descongelación. Nath (1972) reportó que un 40-50% de los espermatozoides congelados presentan mitocondrias dañadas en el proceso de

congelación y estos cambios son debidos, probablemente a una despolimerización o deshidratación parcial y puede ser medido por el grado de movimiento del flagelo.

2.3.2 Estrés oxidativo del semen

La criopreservación de semen, permite la conservación de recursos genéticos a través de bancos de espermias, garantizando una oferta comercial constante de semen y permitiendo su inclusión en programas de selección (Holt, 1997; Evans, 1998). Sin embargo, el proceso de congelamiento-descongelamiento lleva una serie de alteraciones bioquímicas y funcionales que reducen potencialmente la movilidad, viabilidad y posteriormente la fertilidad en comparación con el semen fresco (Leboeuf *et al.*, 2000; Rodello, 2010). Valcárcel (1997) mencionó que lesiones en la membrana plasmática, acrosomal y mitocondrial son las principales causas del daño a nivel estructural y pérdida de funciones ocasionadas por la criopreservación.

Durante el proceso de criopreservación los espermatozoides dañados o defectuosos producen grandes cantidades de ROS responsables del daño oxidativo (Ball *et al.*, 2001) relacionado con la pérdida de la función espermática (Watson, 2000) aunado a una disminución de los sistemas de defensa antioxidante que el semen posee para prevenir los efectos nocivos del ROS (Bailey *et al.*, 2000; Morani, 2004).

2.3.3 Metabolismo energético del semen

Los espermatozoides, a diferencia de las células somáticas, carecen de muchos de los orgánulos que participan en los procesos metabólicos, a pesar de ser células muy simples en cuanto a su actividad metabólica, poseen las enzimas necesarias para llevar a cabo las reacciones bioquímicas que constituyen la glucólisis (Muiño-Otero, 2006). Para mantener las tasas adecuadas de generación de ATP, el espermatozoide dispone de dos mecanismos (Muiño-Otero, 2006):

1. Glucólisis anaerobia: en ausencia de oxígeno los espermatozoides degradan ciertos compuestos que son capaces de atravesar la membrana, como son glucosa, fructosa o manosa, a ácido láctico y ATP.
2. Respiración: en presencia de O₂, los espermatozoides pueden utilizar una variedad de sustratos (carbohidratos) para generar la energía.

La actividad respiratoria permite emplear el lactato o el piruvato resultantes de la glucólisis, produciendo CO₂ y H₂O como productos de desecho (Rodríguez-Gil, 2006). Esta vía oxidativa, localizada en las mitocondrias, es mucho más eficiente para producir energía que la glucólisis. Por medio de estos procesos catabólicos, los espermatozoides convierten la mayor fracción de la energía en ATP.

Aunque una gran parte del ATP se emplea en la motilidad espermática, otra parte se destina a mantener la integridad de los procesos de transporte activo de las membranas del espermatozoide. El empleo de ATP posiblemente está regulado por la concentración endógena de AMPc, dicha molécula no solo regula la hidrólisis del ATP sino que también tiene un efecto directo en la movilidad (Hoskins *et al.*, 1973).

El uso de cualquiera de las dos vías para obtener energía por parte del espermatozoide, depende de las condiciones del medio en que se encuentra (pH extracelular, presión de O₂, composición del medio) así como de la actividad que está desarrollando la célula espermática en el momento que se analiza su estatus metabólico.

Es posible que en condiciones de un consumo energético elevado, la célula espermática tiende a utilizar la ruta oxidativa (ciclo de Krebs) que es más eficiente en términos de producción de ATP que la vía glucolítica (Rodríguez-Gil, 2006).

2.3.4 Radicales libres y producción de especies reactivas del oxígeno

Los radicales libres son átomos o moléculas químicas que tienen un electrón no apareado en su órbita más externa y se comportan como moléculas altamente reactivas e inestables (Bianchi y Antunes, 1999; Hicks *et al.*, 2006; Villa-Arcila, 2007) que pueden causar daño oxidativo por reaccionar con diversas biomoléculas sustrayendo electrones para lograr su estabilidad (Fuchs *et al.*, 1997). Los sustratos moleculares frecuentes incluyen a los ácidos grasos polinsaturados de las membranas celulares, nucleótidos en el ADN, proteínas y carbohidratos (Beckman y Ames, 1998).

Los radicales libres se pueden formar a partir de moléculas estables mediante ruptura hemolítica y reacciones de transferencia de electrones (Membrillo-Ortega *et al.*, 2003). Estas reacciones se dan por 1) absorción de energía ionizante, como radiaciones

ionizantes, ultravioleta, visible y térmica; 2) reacciones redox de transferencia no enzimática de electrones en el caso de reacciones catalizadas por metales de transición; y 3) reacciones catalizadas por enzimas como la superóxido dismutasa que cataliza la formación del H_2O_2 (Hicks, 2001) y es la principal especie reactiva (ROS), aunque no es un radical libre porque no posee electrones libres, es la molécula involucrada en el daño de los espermatozoides debido a que puede ser precursora de radicales $-OH$ en presencia de metales de transición (Baumber *et al.*, 2000; Hicks, 2001; Hicks *et al.*, 2006). La interacción del radical $-OH$ con el material genético modifica el ADN, pudiendo generar mutaciones y deleciones de la molécula; los radicales libres han sido asociados a procesos tan diversos como son la inducción de apoptosis neuronal por daño oxidativo *in vitro* e *in vivo* (Al-Abdulla y Lee, 1998).

Las ROS son producidas fisiológicamente durante el metabolismo celular normal (Sanocka y Kurpisz, 2004) cumplen una importante función en la fisiología espermática normal, pero un desequilibrio entre su producción y degradación causa efectos adversos en el espermatozoide (Ball *et al.*, 2002; Marchesi y Feng, 2007). Al respecto Nordberg y Arner (2001) catalogaron al radical hidroxilo ($OH\cdot$), el anión superóxido ($O_2\cdot^-$) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) como las especies reactivas del oxígeno más importantes y que generan mayores implicaciones en la biología reproductiva y fertilidad (Maneesh y Jayalekshmi, 2006)

2.3.5 Efectos de ROS y estrés oxidativo en los espermatozoides

Dentro de un proceso fisiológico normal, las ROS tiene una función importante para la regulación de la tasa de hiperactivación, para llevar a cabo la capacitación del esperma, la reacción del acrosoma y para la fusión del espermatozoide/ovocito (Sengoku *et al.*, 1998). Un desequilibrio en la producción y eliminación de las ROS en el semen causa efectos nocivos en los espermatozoides, llamado estrés oxidativo, que se define como un desequilibrio entre el sistema de defensa antioxidante y la producción de las ROS (De Lamirande y Gagnon, 1995; Sikka, 2004) y consiste en una reacción en cadena (Maneesh y Jayalekshmi, 2006) marcada por la disfunción espermática (Zini y Libman, 2006; Marchesi y Feng, 2007).

La célula espermática es altamente sensible a daños causados por ROS, debido a la alta cantidad de ácidos grasos polinsaturados presentes en la membrana plasmática y un citoplasma reducido que mantiene bajas concentraciones de enzimas antioxidantes (De Lamirande y Gagnon, 1995). Los principales efectos nocivos de las ROS en espermatozoides incluyen la disminución de la motilidad, incremento de la peroxidación lipídica en la membrana plasmática e incremento en la fragmentación del ADN espermático. La pérdida de motilidad es el indicador más sensible de estrés oxidativo en comparación con otros parámetros seminales (Peris *et al.*, 2007).

Sharma y Agarwal (1996) refirieron que los daños producidos en las proteínas, modificaciones en el citoesqueleto y alteraciones de algunos mecanismos celulares, es debido a la alta reactividad de las ROS. El estrés causado por el H₂O₂ provoca un mal funcionamiento en la mitocondria y conduce a la apoptosis (Liu *et al.*, 2000). La interrupción de la cadena mitocondrial de transporte de electrones, o la inhibición de la misma, predispone a una formación de radicales libres (Hicks, 2001).

Según Gómez *et al.* (1998) en humanos la producción de ROS ocurre principalmente en espermatozoides anormales que poseen residuos de citoplasma. Aitken y Baker (2002) justificaron que la presencia de este residuo en células inmaduras son responsables de generar nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH) que sirve como fuente de electrones para la producción de ROS.

El estrés oxidativo se produce como resultado de la alta concentración de ROS resultante de la sobreproducción o la disminución de los mecanismos de defensa antioxidantes (Droge, 2002) donde la gran cantidad de fosfolípidos presentes en las membranas celulares se ve afectada rápidamente por la alta producción de ROS. Estos radicales reaccionan con ácidos grasos poliinsaturados de fosfolípidos para formar lipoperóxidos que componen la cascada degenerativa de las reacciones de los lípidos, causando pérdida de fluidez de la membrana del espermatozoide, dañando su fisiología y la reducción de su motilidad (De Lamirande *et al.*, 1997; Ford, 2004).

Además, el estrés oxidativo también puede estar relacionado con alteraciones en el semen, tales como oligozoospermia (pocos espermatozoides en el semen) severa y teratozoospermia (alto contenido de espermatozoides anormales en el semen). La

correlación positiva entre la morfología y la concentración de las enzimas antioxidantes sugiere que el consumo de antioxidantes es mayor cuando hay una producción excesiva de ROS en los espermatozoides (Carvalho *et al.*, 2002).

2.3.6 Antioxidantes en el semen

Estudios han demostrado que los espermatozoides de diferentes especies de mamíferos son muy sensibles al estrés oxidativo (Bucak *et al.*, 2010; Forouzanfar *et al.*, 2013; Najjian *et al.*, 2013; Tasdemir *et al.*, 2013) debido a la extrusión de su citoplasma rico en antioxidantes durante las etapas de maduración. La alta concentración de ácidos grasos polinsaturados en la membrana plasmática de los espermatozoides se considera como otro factor en la susceptibilidad al estrés oxidativo. Además, el proceso de congelación de semen produce cantidades significativas de ROS que pueden conducir a un deterioro de la morfología de los espermatozoides, la función y la fertilidad (Barbas y Mascarenhas, 2009; Topraggaleh *et al.*, 2013).

Se ha demostrado el efecto positivo de la inclusión de antioxidantes sobre el estrés oxidativo en el semen de los mamíferos (Richheimer *et al.*, 1996; Malo *et al.*, 2010; Agarwal *et al.*, 2013; Atashfaraz *et al.*, 2013; Sariozkan *et al.*, 2014). Los antioxidantes son compuestos que disminuyen o evitan la oxidación del sustrato, resultando un agente reductor potente, el cual dona electrones con la finalidad de evitar una reacción oxidación-reducción que altere moléculas como lípidos, proteínas y ADN (Hicks *et al.*, 2006). Actúan en medios hidrofílicos o hidrofóbicos, manteniendo el equilibrio prooxidante-antioxidante a favor de estos últimos, previniendo la formación de radicales libres o inhibiendo sus reacciones (Chihuailaf *et al.*, 2002; Membrillo-Ortega *et al.*, 2003).

En el semen los antioxidantes están presentes intra y extracelularmente y constituyen los sistemas de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos (Sanocka y Kurpisz, 2004) responsables de la protección de los espermatozoides contra la oxidación (Maneesh y Jayalekshmi, 2006; Chi *et al.*, 2008). Durante la maduración, los espermatozoides pierden la mayor parte del citoplasma, privándose de antioxidantes endógenos que lo dejan vulnerable a la acción de ROS (Carvalho *et al.*, 2002). De este

modo, los espermatozoides, dependen básicamente de la protección de los antioxidantes presentes en el plasma seminal contra las ROS, tal es el caso de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y el sistema glutatión peroxidasa/glutatión dismutasa (GSH-Px/GSH-Red); y los compuestos no enzimáticos como el α -tocoferol, ascorbato, urato, piruvato, glutatión, taurina e hipotaurina, reduciendo las concentraciones de oxidantes en el semen (Carvalho *et al.*, 2002; Sikka, 2004; Álvarez y Morales, 2006), manteniendo la fertilidad natural (Agarwal y Saleh, 2002; Saleh y Agarwal, 2002). En general los principales mecanismos antioxidantes son las enzimas catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa, sin embargo, el espacio disponible para estas enzimas es bastante limitado en los espermatozoides (Santiani, 2013). Además de las enzimas, existen moléculas presentes en el plasma seminal como la transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina y albúmina, las cuales se unen a metales de transición de tal forma que éstos no estimulen las reacciones de los radicales libres. Otro grupo de antioxidantes lo constituyen el ácido ascórbico y ácido úrico, los cuales rompen las cadenas de oxidación al eliminar radicales peroxilo (Santiani, 2013). El sistema de defensa antioxidante exógeno derivado de los componentes de la dieta comprende a las vitaminas E y C, el β -caroteno, el retinol y los carotenoides, que son poderosos antioxidantes (Schuneman *et al.*, 2001). Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre cediendo un electrón (Venereo, 2002; Figura 3).

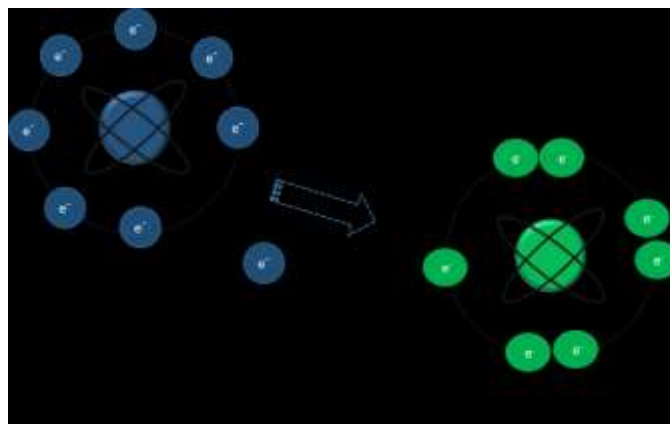


Figura 3. Representación esquemática de la acción de un antioxidante (Modificado de <http://www.cic-ctic.unam.mx/unamirada>).

2.3.7 Importancia del selenio en la regulación de estrés oxidativo

El Selenio (**Se**) es un oligoelemento esencial en la alimentación animal y ejerce múltiples acciones relacionadas con la producción animal, la fertilidad y la prevención de enfermedades (Hefnawy *et al.*, 2010; Ahsana *et al.*, 2014). Se sabe que es requerido para la biosíntesis de testosterona, así como, para la formación y desarrollo de los espermatozoides (Petrujkic *et al.*, 2014). Es componente esencial de enzimas antioxidantes que protegen del estrés oxidativo, condición donde la presencia de especies reactivas al oxígeno y nitrógeno (RONS) afectan la célula (Khera *et al.*, 2013).

La tiorredoxina reductasa (ThxRed) y glutatión peroxidasa (GSH-Px) son las selenoenzimas más importantes, en esta última se encuentra contenido la mayor parte del selenio, y son importantes en los procesos celulares de óxido reducción (Foresta *et al.*, 2002) al catalizar las reacciones que ayudan a destruir tanto al agua oxigenada como a los peróxidos de ácidos grasos (hidroperóxidos orgánicos) que se generan en el organismo. La actividad de dichas enzimas en células y tejidos depende del suministro adecuado de selenio (Foresta *et al.*, 2002). La selenoenzima glutatión peroxidasa está presente en el organismo en cuatro formas (GSH-Px 1, GSH-Px 2, GSH-Px 3 y GSH-Px 4), siendo la GSH-Px 4 responsable de la protección de los espermatozoides ovinos (Álvares y Morales, 2006) inhibiendo las ROS y consecuentemente manteniendo la motilidad espermática (Sikka, 2004).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fertilidad de los sementales es potencialmente mayor dentro del rebaño que el de una hembra, porque de este depende la fertilidad del lote de ovejas que tiene asignadas para el empadre; sin embargo, las variaciones durante el año en la producción de semen, se pueden reflejar en menor capacidad reproductiva fuera de la época de empadre, limitando la producción de corderos en las épocas de menor capacidad reproductiva. Una alternativa para evitar estas fluctuaciones es la colección y conservación de semen, donde se colectan los eyaculados en la época de mayor producción y calidad de semen para utilizarlo por medio de inseminación artificial fuera de la época reproductiva. Al respecto, han sido ampliamente reportados los cambios que sufren los espermatozoides con el proceso de conservación en refrigeración a 5°C y congelación a -196°C. Los cambios están ligados a diferentes daños como alteraciones en membrana celular, mitocondria o en el metabolismo, provocados en gran medida por la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales se producen como parte del metabolismo de las células espermáticas en contacto con el oxígeno para generar energía; sin embargo, el espermatozoide puede mantener un balance entre la producción de ROS y su funcionalidad a través de la actividad enzimática como la de la Glutación peroxidasa, la cual controla la acción del H₂O₂, la ROS más perjudicial para las células. Para que pueda generarse y mantener la actividad de esta enzima es necesario el aporte de selenio, precursor de esta y su actividad; sin embargo, se ha reportado que la gran mayoría del país tiene problemas de deficiencia y obliga a la suplementación de este mineral, principalmente por vía parenteral lo que ha permitido mejorar la sobrevivencia de los corderos, pero no se ha demostrado su efecto en la reproducción de las ovejas y carneros. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación, fue determinar si existen cambios en la producción y calidad de semen en carneros de pelo en el año y si la suplementación con selenio permite mejorar las características del eyaculado y la conservación de semen fresco, refrigerado y congelado.

IV. CALIDAD ESPERMÁTICA EN CARNEROS DE PELO DURANTE EL AÑO.

4.1 Resumen

Las ovejas, durante el año, presentan un periodo de anestro (no ovulación) y un periodo de actividad reproductiva (ciclo estral); sin embargo, en los machos no se inhibe la producción de semen, pero se menciona que existe una disminución en su producción y calidad. Con la finalidad de evaluar las características del eyaculado de los machos de pelo durante el año a 19° latitud norte (LN), se utilizaron 8 carneros de 11.5±0.5 meses de edad y peso vivo de 62 ± 6 kg, a los cuales se les colectó semen cada 15 días durante 12 meses (marzo del 2013 a febrero del 2014) los cuales fueron divididos en dos épocas, anestro (de marzo a julio) y época reproductiva (de agosto a febrero). En cada eyaculado se evaluó, el volumen, la concentración espermática, la movilidad masal y el porcentaje de espermatozoides vivos y anormales; los resultados se analizaron por época (anestro vs época reproductiva). Las características seminales fueron diferentes entre épocas ($p < 0.05$). En la época reproductiva fue mayor el volumen (1.4 mL), la concentración espermática (2.4×10^9), la movilidad (4.8) y el porcentaje de espermatozoides vivos (92%), en comparación con el anestro, donde disminuyeron a 0.9 mL, 1.9×10^9 , 4.0 y 88 %; respectivamente, cada una de las variables. Se encontró una correlación negativa entre la movilidad y la época (-0.73), lo que indica que cuando incrementan las horas luz (anestro) se disminuye la movilidad del eyaculado. En conclusión, a 19° LN, los carneros de pelo presentan un patrón de reproducción estacional, y durante la época reproductiva (agosto a febrero) se presentan las mejores características seminales en el eyaculado.

Palabras clave: Carnero, semen, estación, fotoperiodo.

4.2 Introducción

Diversos estudios realizados en México han demostrado que la actividad reproductiva, en diferentes razas de ovinos (Criolla, Pelibuey, Rambouillet, Dorset, Romney Marsh y Corriedale) disminuye durante la primavera, a pesar de que las variaciones en el fotoperiodo no son muy marcadas (2:10 h aproximadamente; Porrás *et al.*, 2003) se

han reportado variaciones en la actividad reproductiva en ovinos de lana y de pelo, presentándose una época en la que la actividad reproductiva disminuye, sin llegar a ser considerado un periodo de anestro estacional (Macedo y Alvarado, 2005); en el caso del carnero, la capacidad de producir semen y realizar montas, se mantiene durante todo el año, pero se ha reportado, que la calidad del semen es mejor durante el otoño e invierno (Bustos y Torrez-Díaz, 2012).

Estos cambios son provocados por la disminución en el fotoperiodo (horas luz), ya que al disminuir las horas luz, se estimula la producción de melatonina, hormona relacionada con la secreción pulsátil de GnRH/LH, responsables del incremento o disminución de la producción de semen (Malpaux *et al.*, 1999), se observan incrementos en el diámetro testicular y la libido, en el eyaculado, se incrementa en el volumen, la concentración espermática y la movilidad (Kafi *et al.*, 2004).

Los ovinos de pelo, son una alternativa para producir carne, por su gran capacidad reproductiva, rusticidad y adaptación, mejorando la eficiencia productiva, debido a su reducido manejo y bajo costos de producción; sin embargo, se desconoce si los machos de pelo presentan estacionalidad reproductiva a una latitud norte de 19°. Con base en lo anterior, el objetivo del estudio fue evaluar los cambios en la calidad espermática de carneros de pelo durante todo el año.

4.3 Materiales y Métodos

Ubicación

El estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción de Ovinos y Caprinos (LaROCa) del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en Texcoco Estado de México a 19° 29' de LN y 98° 53' de LO, a una altura de 2240 msnm. El clima es templado sub-húmedo, lluvias en verano y una precipitación promedio anual de 645 mm, y un porcentaje de lluvia invernal menor al 5%; la temperatura media anual es de 15°C y la temperatura media del mes más frío oscila entre -3 y 18 °C, y la temperatura del mes más caliente es mayor a 10 °C; con poca oscilación térmica, y corresponde a una formula climática Cb(w0)(w)(i') (García, 2004).

Animales utilizados y su manejo

Se utilizaron 8 carneros de pelo de 11.5 ± 0.5 meses de edad y un peso promedio de 62 ± 6 kg, los cuales se alimentaron con una mezcla de paja molida de cebada, heno de alfalfa y avena molida, sales minerales, todos los ingredientes se mezclaron y se proporcionaron en una ración de $2.0 \text{ kg animal}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Previo al inicio del experimento, se desparasitaron con Ivermectina a una dosis de 0.2 mg kg^{-1} de peso.

Los machos se entrenaron previamente para extracción de semen vía vagina artificial. Se colectaron eyaculados cada 15 días entre marzo del 2013 y febrero del 2014; cada eyaculado colectado en tubos para colección graduados se almacenó en frascos térmicos debidamente identificados, los cuales se guardaban en un termo hasta el momento de su evaluación en el laboratorio.

VARIABLES ESTUDIADAS

Se evaluaron las características del eyaculado: 1) volumen del eyaculado (mL); 2) concentración espermática en miles de millones de espermatozoides contenidos en un mililitro de eyaculado ($\times 10^9$), su determinación se hizo por el método de espectrofotometría; 3) porcentaje de espermatozoide normales en el eyaculado (normalidad); 4) porcentaje de espermatozoides vivos; para ambos casos se realizó la tinción de eosina-nigrosina descrita por Bamba (1988), y 5) movilidad masal establecida en una escala de 1 a 5 según lo descrito por Hafez (1993), en donde 1 corresponde a movimiento individual, 2 movimiento lento, 3 movimiento lento con amplitud en las ondas, 4 movimiento rápido en las ondas y 5 ondas con movimiento rápido.

Se obtuvieron los siguientes datos climatológicos de la estación meteorológica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo: fotoperiodo (h) y temperatura promedio, máxima, mínima ($^{\circ}\text{C}$), las cuales se emplearon posteriormente para correlacionarlas con los cambios en características seminales de los sementales.

Los datos se analizaron agrupando los meses en época reproductiva (de agosto a febrero) y anestro (de marzo a julio), conforme lo reportado por Robinson y Karsch (1984) quienes establecieron que el inicio de la estación reproductiva es el 3 de

septiembre \pm 3 días (comprende las estaciones de otoño e invierno) y el término de esta es el del 15 de febrero (primavera y verano).

Análisis de datos

Los cambios en la calidad de semen durante la época reproductiva y anestro se analizaron utilizando el análisis de varianza por medio del procedimiento GLM de SAS (versión, 9.3) y comparación de medias por el método de Tukey. Las correlaciones entre las variables ambientales y las características seminales se hicieron con el procedimiento CORR de SAS (versión, 9.3). El modelo estadístico utilizado fue:

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

En donde:

Y_{ij} = Es la observación de la j – ésima unidad experimental del i – ésimo mes del año

μ = Media de cada época

τ_i = *Efecto de la época del año*

ε_{ij} = Error experimental de la unidad ij

4.4 Resultados

Duración de las horas luz (fotoperiodo)

Las horas luz, en el sitio experimental, se incrementaron de marzo hasta junio, mes en el que se obtuvo la mayor duración del fotoperiodo (13 h 16 m); posteriormente disminuyó hasta tener el menor valor en diciembre (10 h 59 m) lo que se considera época reproductiva, posteriormente se incrementó nuevamente (Figura 4). La diferencia en horas luz observadas entre el días más corto y el día más largo fue de 2 h 17 m.

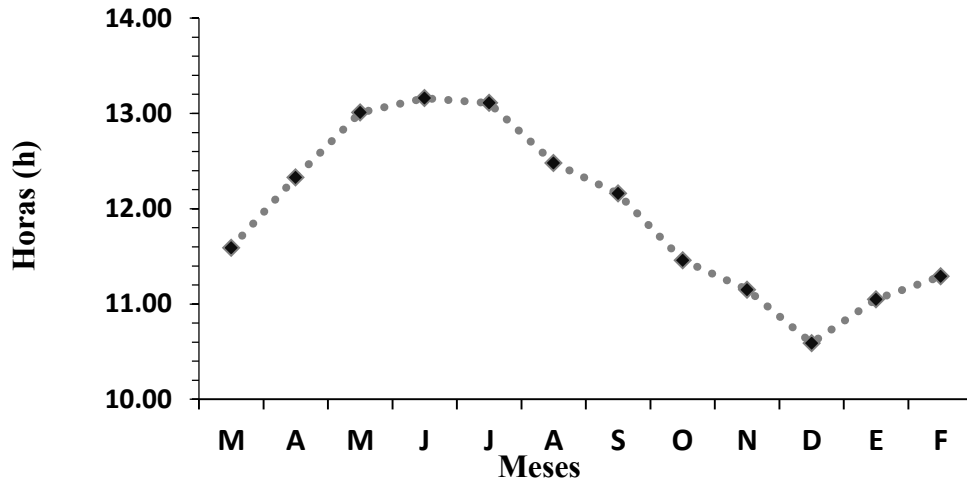


Figura 4. Promedio mensual de las horas luz de marzo del 2013 a febrero del 2014 en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

Temperaturas

La temperatura promedio más alta se registró en abril del 2013 (30°C), con poca oscilación en las temperaturas máximas mensuales; siendo enero el mes con la temperatura máxima menos elevada (21.4°C), y una diferencia entre el mes más caliente y el menos cálido de 8.6°C. Las temperaturas más bajas se registraron en los meses de marzo y abril del 2013 con 3.4 y 3.3°C, respectivamente, y en enero y febrero del 2014 con 2.2 y 4°C, respectivamente. La oscilación de las temperaturas más baja entre los valores extremos de la temperatura mínima fue de 8.2°C.

La temperatura promedio mensual registro poca oscilación a lo largo del año presentándose un descenso marcado en el mes de noviembre (13.2°C), y la temperatura promedio más cálida fue en septiembre del 2013 (17.7°C), la oscilación en la temperatura promedio mensual entre el mes más cálido y el más frío fue de 4.5°C (Figura 5).

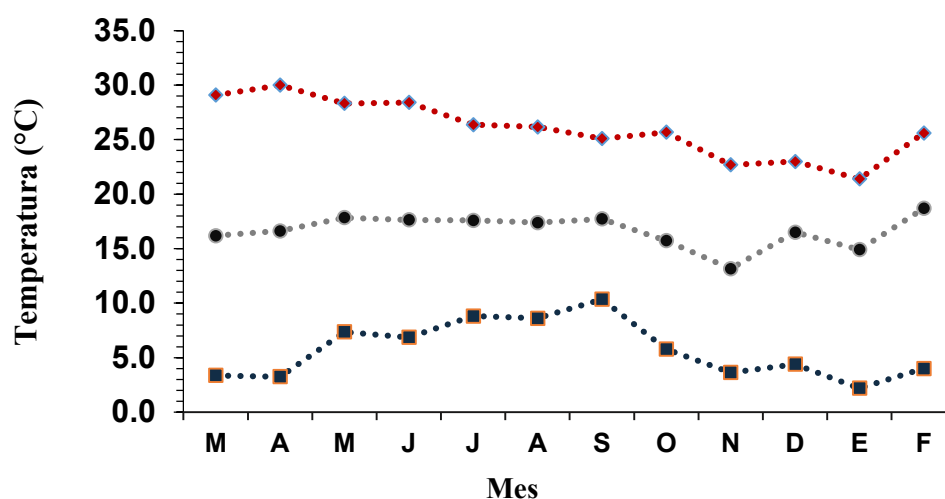


Figura 5. Temperaturas máximas, mínimas, promedio de marzo del 2013 a febrero del 2014 en Montecillo, Texcoco, Estado de México. ($\dots\diamond\dots$ Tmax $\dots\bullet\dots$ Tprom $\dots\square\dots$ Tmin).

Producción y calidad de semen

Las características seminales presentaron variaciones importantes en función de la época (Cuadro 1).

Cuadro 1. Variaciones en la calidad de semen de carneros de pelo durante el año en una latitud norte de 19°.

	EPOCA REPRODUCTIVA	ANESTRO
Volumen (mL)	1.4± 0.03 ^a	0.9 ± 0.05 ^b
Concentración (X10 ⁹ mL ⁻¹)	2.4± 0.03 ^a	1.9± 0.04 ^b
Vivos (%)	92± 0.7 ^a	88± 0.9 ^b
Normalidad (%)	90± 0.5 ^a	91± 0.6 ^a
Movilidad	4.5± 0.08 ^a	4.0± 0.05 ^b

Hileras con diferente literal son diferentes (p<0.05).

Durante la época reproductivo se observaron diferencias ($p < 0.05$), en las características seminales donde se incrementó el volumen, la concentración espermática, el porcentaje de espermatozoides vivos y la movilidad en comparación fuera de esta. Durante la época reproductiva el volumen se incrementó en 36%, la concentración en 21%, los espermatozoides vivos en 4% y la movilidad en 0.5 puntos.

Correlaciones entre producción y calidad de semen y variables ambientales

A excepción de la correlación entre el fotoperiodo y la movilidad ($p < 0.01$) no se observaron diferencias entre las variables ambientales y las características seminales (Cuadro 2).

Cuadro 2. Matriz de correlaciones observadas entre las características seminales de machos de pelo y las variables ambientales en una latitud norte de 19°.

	Fotoperiodo (h)	Temperatura (°C)
Movilidad	-0.79 **	-0.47 NS
Concentración	-0.04 NS	.001 NS
Volumen	-0.48 NS	-0.25 NS

** Significancia con $P < 0.01$

4.5 Discusión

Los resultados de las características seminales del presente estudio coinciden con lo reportado por otros autores, los cuales reportaron variaciones en las características seminales de diferentes razas de carneros tanto puros como cruzas. Al respecto Pourseif y Maghaddam (2012) al evaluar machos de las cruzas F1 Baluchi X Moghani y F1 Arkharmerino X Moghani, en Tabriz, Irán a los 38°02' LN, reportaron la menor concentración espermática durante la primavera (3.443×10^9); y lo atribuyeron al incremento en el fotoperiodo; sin embargo, las variaciones en la concentración espermática fueron menos marcadas que las obtenidas en el presente estudio, ya que

solo incremento 14.7% del mes más bajo respecto al más alto; mientras que en el presente estudio fue de 36.8%.

Maghaddam *et al.* (2012) evaluaron carneros F1 Ghezel × Baluchi y F1 Arkharmerino × Ghezel en Tabriz, Irán, donde el mayor volumen del eyaculado se registró en verano y otoño con una tendencia muy similar a la observada en el presente estudio, donde los carneros presentaron diferentes características de producción y calidad de semen dependiendo de la época del año.

Karagiannidis *et al.* (2000) evaluaron las características seminales de carneros Chios y Friesiant en Thessaloniki, Grecia a los 40°37'LN, encontraron que la menor movilidad se obtuvo en primavera y verano, principalmente en la transición de las estaciones, y sugieren que esta variación se debió a las altas temperaturas encontradas en el lugar en donde se llevó a cabo la investigación, y coincide con el presente estudio en donde estos valores se observaron en la época de anestro y su transición.

Los cambios observados en el comportamiento reproductivo de los machos en el presente estudio, pueden ser explicados por lo reportado por Korf *et al.* (1998) donde mencionaron que al incrementar el fotoperiodo (horas luz) afecta la respuesta neuroendocrina y disminuye la actividad reproductiva, además; se ha demostrado que los días largos inhiben la actividad reproductiva (Wood y Loudon, 2014).

El incremento en el volumen y concentración del eyaculado observados en los resultados del presente experimento se pueden explicar con base en lo publicado por Chimineau *et al.* (1992) quienes mencionaron que en el macho existen variaciones en el tamaño testicular durante el año y estos cambios están asociados con variaciones en la producción de semen. También, Malpaux *et al.* (1997) mencionaron que el fotoperiodo controla la actividad reproductiva en pequeños rumiantes, reportando que, durante los días cortos, se secreta una mayor cantidad de melatonina y ésta actúa para establecer el inicio o fin de la época reproductiva.

En base a lo anterior, los cambios en las características seminales al final del año, cuando los días son más cortos, pueden estar relacionados con la mayor secreción de melatonina, la cual es una de las hormonas importantes en la reproducción de

pequeños rumiantes y es un factor clave en la relación del fotoperiodo con la reproducción (Orihuela, 2014). Egerszegi *et al.* (2014) demostraron la influencia de la melatonina en el eyaculado, al mantener los niveles elevados de melatonina por un periodo (entre 30 y 60 días) observaron un incremento en la circunferencia escrotal y las características del eyaculado fuera de la época reproductiva, así mismo Gerlach y Aurich (2000) mencionaron que la secreción pulsátil de GnRH esta negativamente correlacionada con la duración del día en especies que su actividad reproductiva está ligada a los días cortos, como en los ovinos, sin embargo, la actividad reproductiva en los carneros se inhibe en menor grado que en las ovejas, ya que la espermatogénesis continua, aunque el eyaculado tendrá limitantes de oligospermia.

Cambio similares en la secreción hormonal fueron reportados por Mandiki *et al.* (1998) al evaluar sementales de diferentes razas de lana en Bélgica, donde observaron variaciones en la secreción de testosterona, FSH, LH y prolactina, en donde las concentraciones más elevadas de testosterona y LH se observaron en otoño e invierno y las concentraciones de prolactina disminuyen marcadamente a finales de septiembre, que coincide con la época reproductiva. Las concentraciones de FSH son más bajas en invierno y primavera e incrementan progresivamente hacia finales de junio hasta obtener las máximas concentraciones en verano y el inicio de la época reproductiva.

4.6 Conclusiones

Los carneros de pelo que se encuentran a 19° LN, presentan diferencias en la cantidad y calidad de semen entre la época reproductiva y la época de anestro estacional, donde las características de producción y calidad de semen se incrementan durante la época reproductiva y disminuye durante el anestro estacional, lo que sugiere un patrón estacional en su actividad reproductiva.

V. CAMBIOS EN LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE CARNEROS SUPLEMENTADOS CON SELENIO

5.1 Resumen

La nutrición mineral con microelementos, como el selenio, genera importantes cambios en su salud y producción. El estudio se realizó con el objetivo de evaluar la administración de selenio en las características seminales de carneros. Se utilizaron 8 sementales Damara x Pelibuey de 14.5 ± 5 m de edad y un peso promedio de 71.5 ± 6.0 kg, los cuales se asignaron al azar a dos tratamientos: al grupo 1 se le adicionó en la dieta 0.4 ppm y, el grupo 2 sin selenio (testigo). El periodo de evaluación comprendió de junio a octubre y mensualmente se determinaron las concentraciones de selenio en plasma. En el eyaculado se midió volumen, concentración, movilidad, porcentaje de espermatozoides vivos y anormalidades. En sangre se evaluó la actividad de glutatión peroxidasa y producción de malondialdehído. Los resultados indican diferencias ($p < 0.05$) en las concentraciones de **Se** en plasma de los carneros suplementados con respecto al testigo a partir del tercer mes de suplementación (23.8 y 11.7 respectivamente). Así mismo, el volumen del eyaculado fue mayor ($p < 0.05$) hasta el cuarto mes de suplementación (1.6 mL) y la concentración espermática se incrementó a partir del segundo mes (2.5×10^9) y se mantuvo hasta el final del periodo experimental. Se registraron correlaciones positivas y significativas ($p < 0.05$) entre el nivel de **Se** en plasma y el volumen (0.43), concentración (0.36) y movilidad (0.27) del semen. La administración de selenio incrementó el volumen del eyaculado y la concentración espermática.

Palabras Clave: Selenio, Carneros, Características seminales

5.2 Introducción

Las características seminales de los carneros son influenciadas por factores como el fotoperiodo, nutrición, edad, genética y condición corporal, entre otros (Ghorbankhani *et al.*, 2015) éstos en conjunto afectan la libido y su capacidad para la producción y

calidad de semen (Mashud *et al.*, 2013). El nivel nutricional afecta el tamaño testicular, el cual se relaciona positivamente con la producción de semen (Oldham *et al.*, 1978; Martin *et al.*, 1987). Este efecto, puede considerarse en el contexto de otros factores como el fotoperiodo y el ciclo de la espermatogénesis (estimado para carneros en 7 semanas) por lo tanto, los efectos de una suplementación serían reflejados 7 semanas después de su inicio (Lindsay *et al.*, 1993). Sin embargo, después de las deficiencias de energía y proteína, los desequilibrios minerales son el factor nutricional más limitante de la productividad de los animales; los rumiantes en pastoreo, son más vulnerables a estas carencias debido a que dependen del contenido mineral de los forrajes para satisfacer sus requerimientos (Turriza-Chan *et al.*, 2010). Los minerales se pueden clasificar como macro y microelementos de acuerdo con la cantidad en la que se encuentran en el organismo animal; se localizan en las células y tejidos en diversas combinaciones funcionales y químicas (Underwood y Suttle, 2003). La nutrición con microelementos es crítica, ya que las fluctuaciones en los niveles de estos tiene un impacto significativo en el rendimiento reproductivo y en la salud de los animales (Ahsan *et al.*, 2014) dentro de estos elementos se encuentra el Selenio (Se), el cual es esencial para diversas funciones fisiológicas (El Ghany y Tortora, 2010).

El Se participa en más de 30 selenoproteínas, muchas de ellas importantes por su actividad enzimática, como en el caso de la glutatión peroxidasa, que se encarga de regular algunos de los procesos oxidativos celulares (Brenneisen *et al.*, 2005) y su efecto está relacionado con el funcionamiento del sistema inmune, espermatogénesis, regulación y eficiencia de la mayoría de los procesos reproductivos (Tuner y Finch, 1990; Swecker *et al.*, 1995). En este sentido, el semen producido y que será utilizado para su uso por medio de inseminación artificial, debe ser conservado por periodos prolongados y en este proceso es importante la protección contra los daños oxidativos causados por el metabolismo energético del espermatozoide, donde el **Se** tiene una importante función para su protección, evitando la lipoperoxidación de la membrana celular y la acción de las especies reactivas del oxígeno (ROS) disminuyendo la producción de molondialdehído, y como consecuencia, se mejora la fertilidad en el macho (Ahsan *et al.*, 2014)

Sin embargo, la deficiencia de **Se** es un problema en el continente americano y ha sido reportado en diversos países; en México, se considera que existen áreas seleno deficientes ya que los suelos con un pH ácido dificultan la biodisponibilidad de este elemento en los forrajes y en consecuencia para los animales (Ramírez *et al.*, 2004). Se ha reportado que la mortalidad de corderos relacionada con la deficiencia de Se en el altiplano mexicano puede alcanzar arriba del 50% y en cabritos, más del 60%; además de que se ha asociado a diversos problemas reproductivos en ganado bovino (Huerta, 2010) pero se desconoce el impacto de esta deficiencia en la producción de ovinos en el altiplano Mexicano (Ramírez *et al.*, 2004). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la suplementación con selenio de carneros F1 Damara X Pelibuey en su producción y calidad de semen.

5.3 Materiales y Métodos

Ubicación

El estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Ovinos y Caprinos (LaROCa) del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en Texcoco estado de México a 19° 29' de LN y 98° 53' de LO, a una altura de 2240 msnm. El clima es templado sub-húmedo, lluvias en verano y una precipitación promedio anual de 645 mm y corresponde a una fórmula climática $Cb(w_0)(w)(i')$ (García, 2004).

Animales utilizados y su manejo

Se utilizaron 8 carneros F1 Damara x Pelibuey de 14.5 ± 5 meses de edad y un peso promedio de 71.5 ± 6.0 kg, los cuales se alimentaron con 2.0 kg animal⁻¹ día⁻¹ de una mezcla molida de paja de cebada, heno de alfalfa, avena y sales minerales. Previo al inicio del experimento, se desparasitaron con Ivermectina a una dosis de 0.2 mg kg⁻¹ de peso vivo.

Los carneros se distribuyeron al azar en dos: al grupo 1 se le adicionó en la dieta 0.4 ppm de selenito de sodio y al grupo 2 no se le adicionó (testigo).

Desde el inicio del experimento se colectaron eyaculados semanalmente durante el periodo de estudio (junio a octubre 2013). Los eyaculados colectados se almacenaron

en frascos térmicos debidamente identificados y se almacenaban en un termo hasta el momento de su evaluación en el laboratorio.

Durante el periodo de estudio, mensualmente se tomaron muestras sanguíneas en tubos Vacutainer®, las cuales se centrifugaron a 693 g por 20 min para separar la fracción sólida del plasma, el cual se congeló y almacenó a -15°C para analizar posteriormente las concentraciones de selenio de cada carnero en los diferentes meses. Adicionalmente, en octubre se tomaron muestras de sangre en tubos Vacutainer® y se almacenaron en un termo de nitrógeno líquido a -196°C para la evaluación de actividad de Glutación peroxidasa y producción de moldialdehído como indicador de la lipoperoxidación.

Tratamiento de las muestras para determinar los niveles de selenio

Las determinaciones de los niveles de selenio en plasma se realizaron en el Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Para la determinación de selenio en plasma, las muestras se sometieron a una digestión ácida. Se pesaron 0.5 g de plasma directamente en vasos de teflón del horno de microondas (asegurándose de no dejar muestra en las paredes), se le adicionaron 5mL de agua desionizada, 2.5mL de ácido nítrico concentrado y 1mL de peróxido de hidrogeno al 30%, se dejó reposar 30 min.

Posteriormente se colocó el vaso de teflón dentro del horno de microondas y se sometió a la digestión acida con el método correspondiente, previamente cargado en el horno. Una vez terminado el programa, se sacaron los tubos y se enfriaron a temperatura ambiente por 20 minutos, los vasos se enjuagaron con ácido clorhídrico 7M y se vertió el contenido del vaso en un matraz volumétrico de 25 mL, finalmente se aforó con HCl 7 M.

Cuadro 3. Adición de microelementos en la dieta de los grupos de carneros.

Mineral	Grupo 1	Grupo 2
Cobalto	0.2 ppm	0.2 ppm
Cobre	6.0 ppm	6.0 ppm
Iodo	0.8 ppm	0.8 ppm
Manganeso	15 ppm	15 ppm
Selenio	0.4 ppm	0
Zinc	50 ppm	50 ppm

Previo a la determinación se hizo una solución stock de $2\mu\text{g mL}^{-1}$ de Se para preparar una curva de calibración en un rango de 0 a $18\mu\text{g mL}^{-1}$ y una vez hecha la curva se corrieron las muestras por el método de generación de hidruros.

Tratamiento de las muestras para la determinación de actividad de glutatión peroxidasa

Los análisis de producción de Malondialdehído y actividad de glutatión peroxidasa se hicieron en el laboratorio de Nutrición de la Facultad de Medicina Veterinaria de Ciudad Universitaria, UNAM.

Para la actividad de glutatión peroxidasa se empleó la técnica de Lawrence y Burk (1976). Se tomaron por duplicado alícuotas de cada muestra con una mezcla formada por solución amortiguadora de fosfatos mM (pH 7.0) con EDTA 1mM y azida de sodio 1mM, glutatión reductasa 1U mL^{-1} , GSH (reducido) 1 mM, glutatión reductasa 1U mL^{-1} y NADPH 0.2mM. Cada prueba se acompañó de un testigo sin muestra para descartar la oxidación no enzimática del NADPH. Las pruebas y testigos se incubaron a 37°C por 5 minutos y luego se les agregó $100\mu\text{l}$ de H_2O_2 2.5 mM. La absorbancia de las muestras se leyó a 340 nm a los 0 y 5 minutos. Se empleó para los cálculos el coeficiente de absorción molar del NADPH de $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados de NADPH oxidado se presentan en $\text{nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Se determinó el contenido de proteína en las muestras por el método descrito por Bradford (1976), como referencia para la determinación de actividad de glutatión peroxidasa, para expresar el resultado en unidades por gramo de proteína.

Tratamiento de las muestras para determinación de malondialdehído.

La lipoperoxidación se midió con la prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (thiobarbituric Acid Reactive Substances Test, TBARS) de acuerdo al procedimiento descrito por Ohkawa *et al.* (1979). Se tomaron por duplicado alícuotas de 100 μ l de cada muestra y se les añadió 1 mL de una solución acuosa de ácido tiobarbiturico al 0.8% y 2 ml de HCl al 20% ajustado a pH 2.5. Las muestras se mantuvieron en ebullición 60 min y posteriormente se enfriaron con agua y hielo. A los tubos se les agregó 5 ml de n-butanol (n-butyl alcohol) y se agitaron vigorosamente para luego centrifugarse 10 min a 4000 rpm. La absorbancia de los sobrenadantes se midió a 532 nm. Los resultados se calcularon utilizando diferentes concentraciones (10-80 μ M) de malondialdehído (MDA), obtenido por hidrólisis ácida a partir de 1,1,3,3-tetraetoxipropano.

Variables estudiadas

Se evaluaron las características del eyaculado: 1) volumen del eyaculado (mL): 2) concentración espermática en miles de millones de espermatozoides contenidos en un mililitro de eyaculado ($\times 10^9$), su determinación se hizo por el método de espectrofotometría; 3) porcentaje de espermatozoides normales en el eyaculado (normalidad) y 4) porcentaje de espermatozoides vivos; para ambos casos se realizó la tinción de eosina-nigrosina descrita por Bamba (1988), y 5) movilidad masal establecida en una escala de 1 a 5 según lo descrito por Hafez (1993), en donde 1 corresponde a movimiento individual, 2 movimiento lento, 3 movimiento lento con amplitud en las ondas, 4 movimiento rápido en las ondas y 5 ondas con movimiento rápido.

En plasma se evaluaron los niveles de selenio, la actividad de Glutatión peroxidasa y producción de malondialdehído.

Análisis de datos

Los cambios en la calidad de semen y los niveles de selenio en plasma se analizaron por el procedimiento PROC MIXED de SAS (versión, 9.3). La actividad de glutatión peroxidasa y producción de malondialdehído en sangre se analizaron utilizando el análisis de varianza por medio del procedimiento GLM de SAS (versión, 9.3) y comparación de medias por el método de Tukey. Las correlaciones entre los niveles de selenio y las características seminales se hicieron con el procedimiento CORR de SAS (versión, 9.3). El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ij} = Es la observación de la j – ésima unidad experimental del i
– ésimo mes de suplementación

μ = Media del tratamiento

τ_i = Efecto de la suplementación

β_j = Efecto del mes de suplementación

$(\tau\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción del mes por la suplementación

ε_{ij} = Error experimental de la unidad ij

En donde el carnero es la unidad experimental y las variables respuesta son las observaciones.

5.4 Resultados

Concentraciones de selenio

Las concentraciones de selenio en plasma se presentan en la Figura 6. Al inicio del estudio, los animales testigo registraron mayores concentraciones de **Se** en plasma que los suplementados ($p < 0.05$), llegando a un estatus similar en el mes de julio. De

agosto a octubre se observó un incremento en la concentración de **Se** ($p<0.05$) en los animales suplementados con respecto a los testigo.

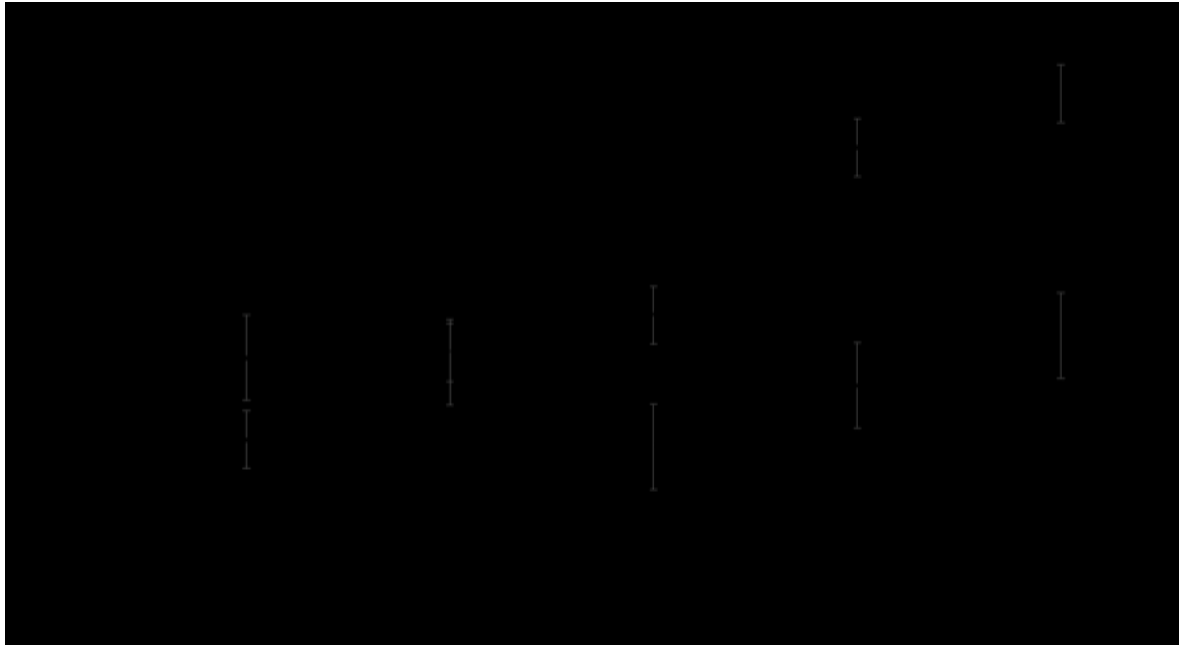


Figura 6. Cambios mensuales en la concentración de selenio en plasma de carneros F1 Damara X Pelibuey.

Características seminales.

Los cambios mensuales en las características del eyaculado se presentan en el Cuadro 4. Solo se registraron diferencias ($p<0.05$) en volumen del eyaculado al final del estudio y en concentración espermática a partir del mes de julio. Los cambios en volumen, movilidad porcentaje de vivos y normales en los diferentes meses, en ambos grupos fueron similares; sin embargo, el grupo suplementado con selenio incrementó la concentración espermática partir de julio, siendo diferente ($p<0.05$) con el testigo.

Cuadro 4. Cambios las características del eyaculado de carneros F1 Damara x Pelibuey suplementados con Se en Montecillo, Texcoco, México.

Característica	Tratamiento	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Volumen (mL)	Suplemento					
	Se	1±0.1 ^{Ba}	1.1±0.1 ^{Ba}	1.5±0.1 ^{Aa}	1.7±0.1 ^{Aa}	1.6±0.1 ^{Aa}
	Testigo	1±0.1 ^{Ba}	1±0.1 ^{Ba}	1.4±0.1 ^{Aa}	1.5±0.1 ^{Aa}	1.3±0.1 ^{Ab}
Concentración (X10 ⁹)	Suplemento					
	Se	2±0.1 ^{Ba}	2.5±0.1 ^{Aa}	2.6±0.1 ^{Aa}	2.5±0.1 ^{Aa}	2.6±0.1 ^{Aa}
	Testigo	1.9±0.1 ^{Aa}	2±0.1 ^{Ab}	2.3±0.1 ^{Ab}	2.1±0.1 ^{Ab}	2±0.1 ^{Ab}
Movilidad	Suplemento					
	Se	4.2±0.2 ^{Aa}	4.4±0.2 ^{Aa}	4.5±0.2 ^{Aa}	4.3±0.2 ^{Aa}	4.6±0.3 ^{Aa}
	Testigo	3.8±0.2 ^{Aa}	4.1±0.2 ^{Aa}	4.1±0.2 ^{Aa}	4.0±0.2 ^{Aa}	4±0.3 ^{Aa}
Vivos (%)	Suplemento					
	Se	87±2.5 ^{Aa}	90.3±4 ^{Aa}	92.3±3 ^{Aa}	93.6±3 ^{Aa}	92.8±3 ^{Aa}
	Testigo	90±2.5 ^{Aa}	90.2±3 ^{Aa}	90±3 ^{Aa}	91±2 ^{Aa}	91.3±4 ^{Aa}
Normalidad (%)	Suplemento					
	Se	92.5±1.7 ^{Aa}	91.6±1.4 ^{Aa}	94.2±1.6 ^{Aa}	88.6±1.4 ^{Ba}	90.8±1.4 ^{Ca}
	testigo	93.4±2 ^a	92.3±1.2 ^a	92.8±1.7 ^{Aa}	87.9±1.5 ^{Ba}	88.9±1.4 ^{Ba}

^{A, B} Medias con diferente literal en la misma fila son diferentes p<0.05.

^{a, b} Medias con diferente literal en la misma columna son diferentes p<0.05

Se observaron correlaciones positivas entre los niveles de **Se** en plasma y el volumen (p<0.05), la concentración (p<0.02) y la movilidad del eyaculado (p<0.08) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Correlaciones entre las concentraciones de selenio en plasma y las características del eyaculado de carneros F1 Damara X Pelibuey suplementados con Se en Montecillo, Texcoco, México.

	Volumen	Concentración	Vivos	Normalidad	Movilidad
Concentración de Selenio	0.43	0.36	0.23	0.25	0.27
<i>p</i>	0.005	0.02	0.14	0.12	0.08
Significancia	**	**	NS	NS	NS

Actividad de glutatión peroxidasa y producción de malondialdehído.

La actividad de glutatión peroxidasa no mostró diferencias ($p > 0.05$) entre los tratamientos (Figura 7).

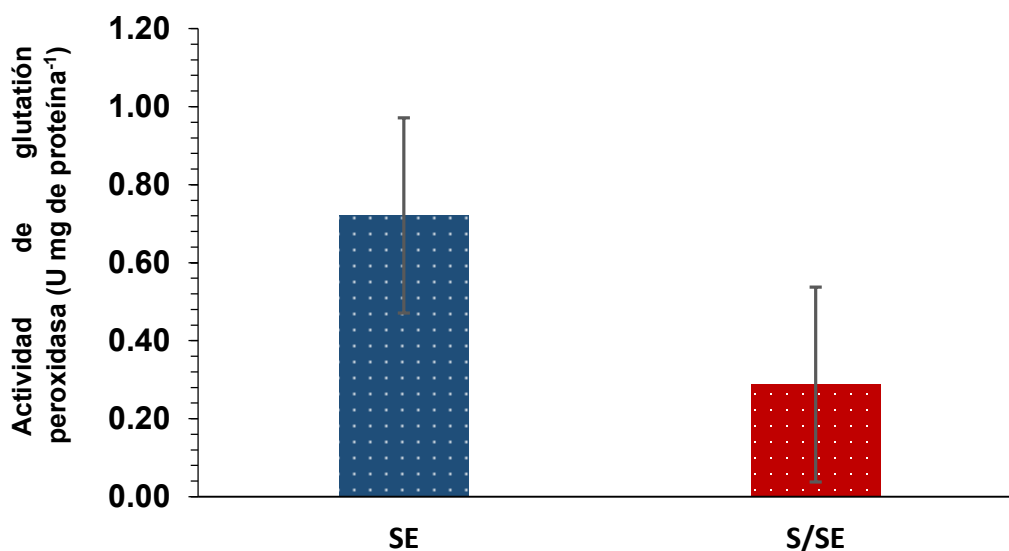


Figura 7. Actividad de Glutatión peroxidasa en plasma de carneros F1 Damara X Pelibuey suplementados con 0.4 ppm de **Se**, en Montecillo, Texcoco, México.

La producción de malondialdehído en plasma no mostró diferencias ($p > 0.05$) entre tratamientos (Figura 8).

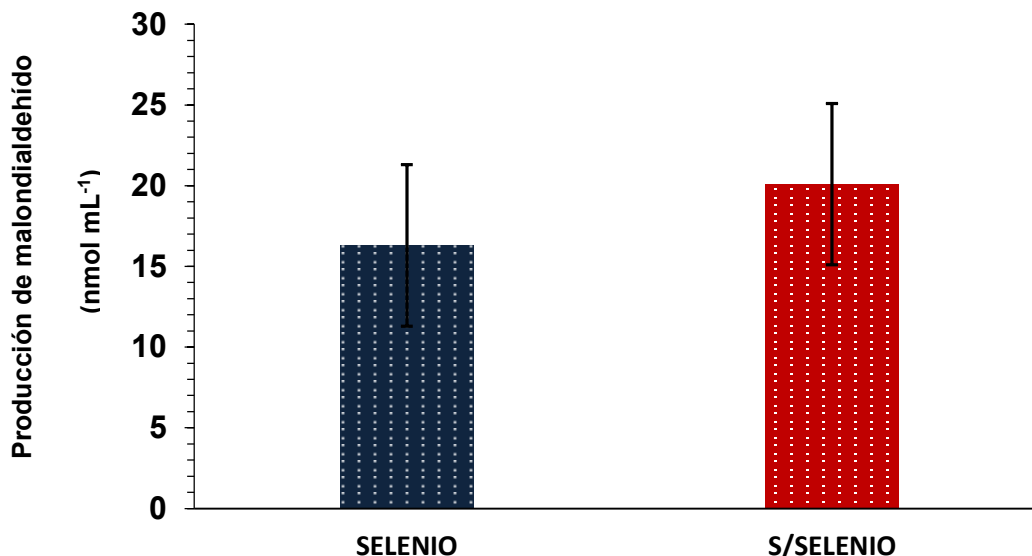


Figura 8. Producción de malondialdehído en plasma de carneros F1 Damara X Pelibuey suplementados con 0.4 ppm de Se, en Montecillo, Texcoco, México.

5.5 Discusión

Concentración de selenio en plasma

Los niveles de selenio en plasma y sangre reportados en la literatura son diversos, al respecto Berry *et al.* (1983) midieron las concentraciones de selenio en sangre y musculo en corderos a los cuales se les administro por una inyección intramuscular 3mg de Se y 41 UI de Vitamina E y el tratamiento testigo fue la administración de solución salina inyectable en donde obtuvieron incrementos en los niveles de hasta 2.66 veces los niveles de selenio en sangre con respecto a los testigo (0.03 vs 0.08 ppm) a los 120 días de edad de los corderos; sin embargo, en las concentraciones de selenio en testículo no observaron diferencias. De igual manera, Gresakova *et al.* (2013) al suplementar corderos con diferentes fuentes de selenio (selenito de sodio y levaduras con selenio) reportaron que no encontraron alteraciones en la salud de los animales y que los niveles de Se en plasma no fueron diferentes con base en el tipo de suplemento, los niveles reportados son de 0.3mg L⁻¹ después de 14 semanas y comparados con los niveles encontrados con el grupo testigo que no recibió administración de selenio se incrementa en 4.28. Humann-Ziehanck *et al.* (2013) al

muestrear durante dos años rebaños de ovinos en Alemania, reportaron que con niveles por debajo de $60 \mu\text{L}$ de Se L^{-1} los animales muestran signos de deficiencia y que por arriba de $80 \mu\text{L}$ de Se L^{-1} de plasma es el punto de referencia para los animales con buena condición de selenio.

En México, Ramírez *et al.* (2004) reportaron valores de Se en plasma de 18 a $23 \mu\text{g mL}^{-1}$ en diferentes edades de ovinos en Tlaxcala, y con la administración de 0.25mg kg^{-1} de PV a los 20 días observaron un incremento en plasma 2 veces el nivel inicial con la aplicación de $0.25 \text{mg Se kg}^{-1}$ y 5.6 veces con la aplicación de 0.5mg Se kg^{-1} , lo cual disminuyó la mortalidad de los corderos. Con base en lo anterior, los animales utilizados en el estudio se mantuvieron en las concentraciones que marca la literatura para animales sin problemas de deficiencia.

Características seminales

Diversos autores han reportado los efectos de la suplementación con selenio en la producción y calidad de semen en carneros; resultados similares a los obtenidos en el presente estudio fueron reportados por Marai *et al.* (2009) quienes al suplementar carneros con 0.1 ppm de selenato de sodio incrementaron el volumen del eyaculado, movilidad y concentración del eyaculado y disminuyeron el número de espermatozoides muertos, con anomalías o con daño acrosomal. De igual manera, Silva-Albertoni (2014), reportó que al suplementar ovinos en pastoreo con una dosis de $50 \mu\text{L kg}^{-1}$ PV de **Se**, observó diferencias a los 70 días post-aplicación en el volumen de eyaculado ($p=0.0263$) con una media de 2.3 mL para el grupo suplementado y 0.7 mL para el testigo; la concentración espermática fue diferente ($p=0.0265$) 4097 millones de espermatozoides mL^{-1} y 3960 millones de espermatozoides mL^{-1} , en carneros suplementados y no suplementados, respectivamente.

Adicionalmente, Ahangari *et al.* (2013) reportaron que al suplementar carneros con fuentes de Se orgánico (0.1, 0.2 y 0.3mg kg^{-1} Sel-Plex) se mejoró la movilidad y viabilidad espermática, el porcentaje de espermatozoides normales en diferentes tiempos de almacenamiento, en comparación con las dietas testigo deficientes en selenio, obteniendo los mejores resultados con 0.3mg kg^{-1} de Sel-Plex en alimento.

Las mejoras en las características seminales, con base en la suplementación con selenio, pueden ser explicadas con base en lo mencionado por Silva-Albertoni (2014) quien indicó que la nutrición es un factor determinante en la actividad testicular, y las deficiencias en minerales y vitaminas afectan la producción de semen, debido a alteraciones en la función de las células de Sertoli que regulan y coordinan la formación y liberación de espermatozoides. Beckett y Arthur (2005) mencionaron que una deficiencia de selenio en la dieta ocasiona baja calidad seminal. Por lo tanto, su suplementación es importante para mejorar la concentración espermática (Marín-Guzman *et al.*, 2000). Los resultados de calidad seminal obtenidos concuerdan con Marín-Guzman *et al.* (2000) y Kendall *et al.* (2000) quienes afirmaron que la suplementación con selenio mejora la concentración espermática.

Actividad de glutatión peroxidasa y producción de malondialdehído.

Los resultados obtenidos en actividad de glutatión peroxidasa y producción de malondialdehído en este experimento, coinciden con lo reportado por Gunter *et al.* (2003) y Lopez-Gutiérrez *et al.* (2012) quienes mencionaron que no encontraron diferencias en la actividad de esta enzima en sangre de ovinos al suplementar Se en la dieta. La actividad de glutatión peroxidasa se utiliza como un indicador de las concentraciones de Se en el animal (Jóhannesson *et al.*, 2004) y la reducción de esta enzima en carneros no suplementados ocasiona daños celulares, debido a que esta selenoenzima forma parte del sistema Glutatión, señalado como el principal sistema antioxidante en el organismo (Gudmundsdóttir *et al.*, 2008). El resultado obtenido en actividad de GSH-PX en el presente trabajo se puede explicar de acuerdo a lo mencionado por Juniper *et al.* (2008) quienes indicaron que el incremento del Se en sangre ocasiona una saturación de la enzima GSH-PX, por lo que en conjunto, tiende a no incrementar la actividad de la enzima y no resulta un buen indicador para diferenciar la suplementación de selenio (Lopez-Gutiérrez *et al.*, 2012).

A pesar de no presentar diferencia ($p>0.05$) en la producción de malondialdehído entre tratamientos en el presente estudio, la reducción del 19% en el tratamiento suplementado con Se pueden significar un efecto benéfico, debido a su relación con la actividad de la enzima GSH-PX que actúa como antioxidante e inhibidor de la

peroxidación lipídica, protegiendo al espermatozoide del daño oxidativo, y mejora las condiciones para la maduración de los espermatozoides (Lamirande, 1993; Vernet *et al.*, 1997).

5.6 Conclusiones

La administración de selenio en la dieta mejoró el volumen y la concentración del eyaculado de los carneros de pelo. La suplementación con selenio no incrementó la actividad de glutatión peroxidasa ni redujo la producción de malondialdehído.

VI. IMPORTANCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN DE SELENIO A CARNEROS PARA LA CONSERVACIÓN DE SEMEN

6.1 Resumen

Durante el proceso de conservación se producen cambios en el semen que reducen su capacidad fertilizante; uno de ellos, es la producción de ROS (especies reactivas del oxígeno) que deteriora la membrana del espermatozoide, por lo cual es necesario proteger las células del daño de estas moléculas. El objetivo del estudio fue evaluar si la suplementación con selenio a carneros mejora las características del semen conservado en fresco, refrigerado y congelado. Se utilizaron 8 sementales de pelo de 14.5 ± 0.5 m de edad y un peso promedio de 71.5 ± 6.0 kg de PV, los cuales se distribuyeron al azar en dos grupos: al grupo 1 se le adicionaron en la dieta 0.4ppm de **Se** y grupo 2 sin adición de **Se** (testigo). Se utilizaron tres formas de conservación de semen, en fresco (a 37°C) durante 4 h, refrigerado (a 5°C) durante 96 h y congelado (a -196°C), y se evaluaron las características del eyaculado durante un periodo de 8 semanas, 60 días después del inicio de la suplementación. Las variables estudiadas fueron: porcentaje de espermatozoides vivos, movilidad y el porcentaje de espermatozoides con integridad de membrana, las cuales se analizaron por el procedimiento GLM de SAS y comparación de medias por la prueba de Tukey. El grupo con la suplementación con **Se** fue diferente ($p < 0.05$) al testigo en porcentaje de vivos, movilidad e integridad de membrana a las 4 h para la conservación en fresco, en el semen refrigerado se observaron diferencias ($p < 0.05$) en porcentaje de vivos a partir de las 24 h y para la conservación en congelación no se observaron diferencias ($p > 0.05$). La suplementación con selenio mejora las características del semen conservado en fresco y refrigerado.

Palabras clave: Selenio, conservación de semen, características del semen

6.2 Introducción

Para hacer una propagación más eficiente de sementales genéticamente superiores, es importante coleccionar y conservar su semen para aplicarlo por medio de la

inseminación artificial (Salomon y Maxwell, 2000). La congelación de semen para su uso por vía transcervical o pericervical no ha tenido buenos resultados en fertilidad (Hegedúšova *et al.*, 2012) debido a que en el proceso de congelación/ descongelación los espermatozoides sufren una serie de daños estructurales y funcionales que reducen su movilidad y viabilidad, en consecuencia, la reducción de la fertilidad comparado con el semen fresco (Leboeuf *et al.*, 2000; Rodello, 2010). De manera general, se considera que después de la congelación solo un 40 o 50% de la población de células espermáticas sobreviven, por lo tanto, al comparar el semen descongelado con el semen fresco es muy evidente la reducida proporción de células viables (Watson, 2000) y estos cambios están relacionados con las variaciones en la temperatura, ya que al reducirla por debajo de los 20°C, se generan alteraciones en el espermatozoide, principalmente, en la membrana plasmática y al someterlo a temperaturas entre 0 y -20°C y hasta los -60°C, comienzan los efectos de descompensación iónica y de líquidos suficientemente graves para causar un choque térmico (Palacios, 1994).

Aparte de los daños físicos en la estructura de la membrana, causados por las alteraciones en los fosfolípidos que la componen, están las alteraciones en las funciones enzimáticas tales como las ATPasas, cuya actividad depende de la integridad de los lípidos anulares, y que es en parte, responsable del pobre control de las concentraciones de calcio una vez que la temperatura desciende de los 17°C (Holt, 2000), adicionalmente se han reportado los daños en las mitocondrias de los espermatozoides causados por mantener el semen en temperaturas de 5°C, los cuales pueden estar presentes hasta en el 50% de las células (Salomon y Maxwell, 1995). Uno de los principales daños causados en el semen por el proceso de conservación, es la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la reducción de la actividad enzimática que controla este proceso puede incrementar los daños en las células espermáticas y reducir la fertilidad (da Silva *et al.*, 2010) y el selenio es un elemento indispensable para la síntesis de selenoenzimas que intervienen en el control del estrés oxidativo (Ahsan *et al.*, 2014).

El selenio es un micro elemento necesario en mamíferos para mantener una buena condición reproductiva, ya que la deficiencia de este elemento se ha asociado con alteraciones en la movilidad espermática y alteraciones morfológicas en arquitectura de la pieza media y cambios en la cabeza del espermatozoide, ambos relacionados con baja fertilidad (Kehr, *et al.*, 2010) El selenio está relacionado con la actividad de la enzima Glutación peroxidasa (GPx; Zang *et al.*, 2013), la cual es importante para evitar la lipoperoxidación de los lípidos de la membrana (Kehr *et al.*, 2010). En el espermatozoide la clase GPx-4 es el más importante y se encuentra en tres isoformas: cistosólica (cGPx-4), mitocondrial (mGPx-4) y nuclear (nGPx-4; Chavory *et al.*, 2010) que en conjunto son las responsables de evitar los daños causados por la producción de ROS del espermatozoide. Las ROS son producidas fisiológicamente durante el metabolismo celular normal (Sanocka y Kurpisz, 2004) y cumplen una importante función en la fisiología espermática normal, pero un desequilibrio entre su producción y degradación causa efectos adversos en el espermatozoide (Ball *et al.*, 2002). Los principales efectos nocivos de ROS en espermatozoides incluyen la disminución de la motilidad, incremento de la peroxidación lipídica en la membrana plasmática e incremento en la fragmentación del ADN espermático (Peris *et al.*, 2007). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la suplementación con selenio de carneros F1 Damara X Pelibuey en la conservación de semen.

6.3 Materiales y Métodos

Ubicación

El estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Ovinos y Caprinos (LaROCa) del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en Texcoco estado de México a 19° 29' de LN y 98° 53' de LO, a una altura de 2240 msnm. El clima es templado sub-húmedo, lluvias en verano y una precipitación promedio anual de 645 mm que corresponde a una formula climática Cb(w0)(w)(i') (García, 2004).

Animales utilizados y su manejo

Se utilizaron 8 carneros F1 Damara x Pelibuey de 15.5 ±0.5 meses de edad y un peso promedio de 72.2 ± 6.0 kg, los cuales se alimentaron 2.0 kg animal⁻¹ dia⁻¹ con una mezcla de paja molida de cebada, heno de alfalfa, avena molida y sales minerales.

Previo al inicio del experimento, se desparasitaron con una dosis de 0.2 mg kg⁻¹ PV de Ivermectina. La suplementación con selenio se inició en junio del 2014.

Por medio de la técnica de vagina artificial se colectaron eyaculados cada 7 días en un periodo de 8 semanas comprendido entre septiembre y octubre del 2014; cada eyaculado colectado en tubos para colección graduados se almacenó en frascos térmicos debidamente identificados, los cuales se guardaban en un termo hasta el momento de su evaluación en el laboratorio.

Los carneros se asignaron al azar en uno de dos grupos, el primero fue suplementado con 0.4 ppm de selenio incluido en una premezcla que cubría el aporte de microelementos (Cuadro 6) adicionada en una proporción del 2% del total de la ración. En el segundo grupo la premezcla mineral no contenía selenio, pero cubría los otros microelementos.

Cuadro 6. Aporte de microelementos a la dieta a cada grupo de carneros.

Mineral	Grupo 1	Grupo 2
Cobalto	0.2 ppm	0.2 ppm
Cobre	6.0 ppm	6.0 ppm
Iodo	0.8 ppm	0.8 ppm
Manganeso	15 ppm	15 ppm
Selenio	0.4 ppm	0
Zinc	50 ppm	50 ppm

Variables estudiadas

Se evaluaron las características del eyaculado: 1) volumen del eyaculado (mL): 2) concentración espermática en miles de millones de espermatozoides contenidos en un mililitro de eyaculado ($\times 10^9$), su determinación se hizo por el método de espectrofotometría; 3) porcentaje de espermatozoide normales en el eyaculado (normalidad) y 4) porcentaje de espermatozoides vivos; para ambos casos se realizó la tinción de eosina-nigrosina descrita por Bamba (1988), y 5) movilidad masal establecida en una escala de 1 a 5 según lo descrito por Hafez (1993), en donde 1

corresponde a movimiento individual, 2 movimiento lento, 3 movimiento lento con amplitud en las ondas, 4 movimiento rápido en las ondas y 5 ondas con movimiento rápido.

La evaluación en fresco se realizó manteniendo la temperatura del semen a 37°C en baño María, una vez evaluado el semen se diluyó con el dilutor comercial Tryladil[®]. Las dosis contenían una concentración de 100×10^6 espermatozoides. Se registraron los valores de las características posteriores a la dilución, la cual se consideró como Tiempo cero (T0) a partir de entonces se hicieron evaluaciones a las 2 y 4 h posteriores a la dilución del semen. Los parámetros evaluados fueron motilidad masal, porcentaje de vivos e integridad de membrana.

Para la evaluación de semen refrigerado a 5°C, se colectaron eyaculados semanales durante ocho semanas, se evaluaron y diluyeron con el dilutor comercial Triladyl[®] para obtener una concentración de 100×10^6 espermatozoides. Se evaluó el semen inmediatamente después de la dilución lo que se consideró como Tiempo cero (T0), posteriormente se colocó en frascos térmicos (frascos de vidrio rellenos de algodón con el espacio para colocar el tubo con el semen) y se mantuvo en refrigeración, en donde se tomó la temperatura para que el semen se mantuviera a 5°C, las evaluaciones posteriores se realizaron tomando la muestra en refrigeración, se calentó en el portaobjetos en una platina térmica (Minitube[®]) calibrada a 37°C. Las variables usadas fueron motilidad masal, porcentaje de espermatozoides vivos e integridad de membrana.

En la evaluación para semen congelado se colectó semen a los carneros por el método de vagina artificial, el eyaculado se evaluó y diluyó con el dilutor comercial Triladyl[®] ajustando la dilución para que las dosis tuvieran una concentración de 100×10^6 espermatozoides, el semen diluido se almacenó en pajillas Cassou (IMV[®] de 0.25 mL), y selladas con alcohol polivinílico. La congelación se realizó de manera automática con la congeladora Cryobath[®] (Cryologic) modelo 2500, con capacidad para 24 pajillas dentro del módulo de congelación, se utilizó en programa determinado para congelación de semen de ovinos y caprinos con la siguiente curva de congelación (Figura 10).

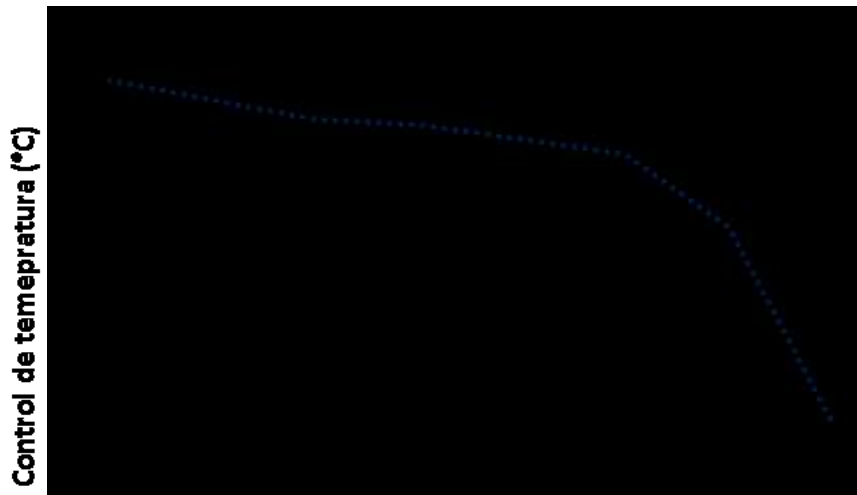


Figura 9. Adaptado de Freeze control® graphs by Cryologic, System Operating manual.
Programa 5: semen de ovinos y caprinos.

Al término de la curva de congelación en el programa, se vaciaron las pajillas directamente en el nitrógeno líquido y se colocaron en los gobelets y bastones para su almacenamiento en un termo con nitrógeno líquido hasta su evaluación. Las variables analizadas fueron: movilidad masal, porcentaje de espermatozoides vivos e integridad de membrana.

Análisis de datos

Las variables fueron analizadas en el paquete computacional SAS 9.3 con el procedimiento GLM y comparación de medias por la prueba de Tukey.

El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ij} = Es la observación de la j – ésima unidad experimental del i
– ésimo mes de suplementación

μ = Media del tratamiento

τ_i = Efecto de la suplementación

β_j = Efecto del tiempo de conservación

$(\tau\beta)_i$ = efecto de la interacción del tiempo de conservación por la suplementación

ϵ_{ij} = Error experimental de la unidad ij

En donde el carnero es la unidad experimental y las variables respuesta son las observaciones.

6.4 Resultados

Fresco

Los cambios en la proporción de células vivas en el semen mantenidas a 37°C fueron diferentes ($p < 0.05$) hasta las 4 h posteriores al inicio de la evaluación (Cuadro 7).

En la evaluación inicial y hasta dos horas después de la dilución, no se observan diferencias ($p > 0.05$) en la cantidad de espermatozoides vivos en los dos grupos; sin embargo, se obtuvo un incremento del 11% en la cantidad de espermatozoides vivos a las 4 horas posteriores a la dilución de los carneros suplementados con selenio respecto a los testigos.

Cuadro 7. Cambios en el porcentaje de espermatozoide vivos, movilidad e integridad de membrana en el semen mantenido en fresco a 37°C de pelo suplementados con Se en Montecillo, Texcoco, México.

Tratamiento	Prueba	Horas de conservación		
		0	2	4
Suplemento Se	% de vivos	88.3±2.3 ^{Aa}	79.5±2.3 ^{Ba}	64.4±2.3 ^{Ca}
S/Suplemeto Se		85.2±2.2 ^{Aa}	77.9±2.2 ^{Ba}	57.8±2.2 ^{Cb}
Suplemento Se	Movilidad	4.4±0.11 ^{Aa}	3.9±0.13 ^{Ba}	3.1±0.11 ^{Ca}
S/Suplemeto Se		4.0±0.12 ^{Aa}	3.6±0.17 ^{Ba}	2.6±0.12 ^{Cb}
Suplemento Se	Integridad de membrana (%)	91.9±1.8 ^{Aa}	75.5±2.1 ^{Ba}	64.1±1.9 ^{Ca}
S/Suplemeto Se		90.9±1.7 ^{Aa}	71.6±2.0 ^{Ba}	52.6±2.0 ^{Cb}

^{A, B} Medias con diferente literal en la misma fila son diferentes $p < 0.05$.

^{a, b} Medias con diferente literal en la misma columna son diferentes $p < 0.05$.

En la movilidad de los espermatozoides también se observan diferencias ($p < 0.05$) hasta las cuatro horas posteriores a la dilución en donde se incrementó en 19 % la movilidad del semen.

En la proporción de espermatozoides con integridad funcional de la membrana se mejora en 21 % la proporción de espermatozoides con membrana sin alteraciones en el semen de los carneros suplementados con respecto a los testigo ($p < 0.05$).

Los cambios en las características del semen en las diferentes horas fueron similares en ambos grupos.

Refrigerado

Para las características del semen refrigerado a 5°C se observan diferencias ($p < 0.05$) en la proporción de espermatozoides vivos en el eyaculado de carneros que fueron suplementados con respecto a los testigo (Cuadro 8).

El porcentaje de espermatozoides vivos 24 h después de la dilución se incrementó 3 % con respecto a los no suplementados, y se mantuvo esta tendencia durante la evaluación.

Cuadro 8. Cambios en el porcentaje de espermatozoide vivos, movilidad e integridad de membrana en el semen mantenido refrigerado a 5°C de carneros F1 Damara X Pelibuey F1 Damara X Pelibuey suplementados con Se en Montecillo, Texcoco, México.

Dilutor		Horas de conservación				
		0	24	48	72	96
Selenio	Vivos (%)	89.2±2.5 ^{Aa}	82.9±1.37 ^{Ba}	76.3±1.37 ^{Ca}	67.9±1.4 ^{Da}	60.5±1.37 ^{Ea}
S/Selenio		84.8±2.0 ^{Aa}	79.6±1.4 ^{Bb}	72.2±1.42 ^{Cb}	63.9±1.3 ^{Da}	56.6±1.4 ^{Eb}
Selenio	Movilidad	3.9±0.1 ^{Aa}	3.5±0.1 ^{Ba}	3.1±0.1 ^{Ca}	2.6±0.1 ^{Da}	2.2±0.1 ^{Ea}
S/Selenio		3.7±0.1 ^{Aa}	3.3±0.1 ^{Ba}	2.9±0.1 ^{Ca}	2.5±0.1 ^{Da}	2.2±0.1 ^{Ea}

A, B Medias con diferente literal en la misma fila son diferentes $p < 0.05$.

a, b Medias con diferente literal en la misma columna son diferentes $p < 0.05$.

En la movilidad del semen no se observaron diferencias ($p>0.05$) entre los dos tratamientos, el movimiento observado fue muy similar a lo largo de la evaluación.

Los cambios en las características seminales en las 96 h de la evaluación fueron similares en los dos grupos.

Congelado

No se observaron diferencias ($p>0.05$) en las características del semen congelado de sementales suplementados con respecto a los testigo (Cuadro 9).

Cuadro 9. Cambios en el porcentaje de espermatozoide vivos, movilidad e integridad de membrana en el semen congelado de carneros F1 Damara X Pelibuey F1 Damara x Pelibuey suplementados con Se en Montecillo, Texcoco, México.

	Inicial	% Recuperación post descongelación	
		C/Selenio	S/Selenio
Movilidad	4.5	2.3 ^a	2.0 ^a
Vivos	92	25.6 ^a	26.8 ^a
Integridad de membrana	95	22.6 ^a	21.8 ^a

^{a,b} Medias en hileras con diferente literal son diferentes $p<0.05$

6.5 Discusión

Los resultados de la investigación difieren con lo reportado por Mata-Campuzano *et al.* (2014) quienes al mantener semen de carnero en fresco pero refrigerado a 15°C en España, reportaron que con la adición de antioxidantes (Trolox 0.2, 1 y 5 mM) se reduce la movilidad, la viabilidad del semen e incrementa el daño acrosomal; sin embargo estos efectos no se observaron cuando se mantuvo el semen a 5°C. Este fenómeno, lo explicaron estos autores desde el punto de vista que el antioxidante en ausencia de otros suplementos podría interferir utilizando los radicales libres como segundos mensajeros, causando la pérdida de viabilidad de los espermatozoides, efecto que se ha observado con varios antioxidantes en semen de carneros y ciervos.

Este efecto no se observó en el presente trabajo ya que no hubo un efecto tan detrimental en el semen mantenido a 37°C.

Para el semen refrigerado, los resultados obtenidos en el presente estudio son diferentes a los reportados por Gundogan *et al.* (2010) en Turquía, quienes mencionaron que al mantener semen de carnero en refrigeración a 5°C la movilidad del semen se redujo de 79 a 10% al quinto día de conservación, la viabilidad e integridad de membrana se reducen también considerablemente en este periodo al pasar de 60 a menos de 20%, es decir se redujo en más del 50%, hay un incremento importante en las células con daños en el DNA, las concentraciones de malondialdehído se incrementaron más del doble, lo que en general indica que el efecto detrimental en la calidad de semen se relaciona con el estrés oxidativo. La diferencia puede estar relacionada con la protección que pudo haber adquirido el espermatozoide con la suplementación de selenio, el cual es precursor de selenoproteínas, en donde la GPX4 es muy importante para prevenir los daños en el espermatozoide.

Se ha demostrado que un incremento en la producción de ROS está relacionada con alteraciones en los parámetros de semen en los carneros; al respecto Numan *et al.* (2007) reportaron que la adición de antioxidantes en el semen mejora la calidad de semen congelado, ya que la movilidad, se incrementa de 50.7 a 68%, y la proporción de espermatozoides con integridad de membrana se mejora de 46 a 64.1 %. Difiere de los resultados obtenidos en el presente estudio, donde no se obtuvieron diferencias ($p>0.05$) en esas características del semen congelado.

La producción de ROS puede causar efectos adversos en el semen; sin embargo, el espermatozoide cuenta con mecanismos de defensa como las enzimas SOD y GPx. En este contexto, el selenio y la GPx tienen una función importante, ya que pueden reparar moléculas y daños por medio del NADPH, el cual funciona como una fuente de electrones; las bajas concentraciones de **Se** en testículos se relacionan con baja movilidad espermática, alteraciones en la pieza media y la forma del espermatozoide (Guerreiro *et al.*, 2014).

Los efectos negativos de los ROS en el espermatozoide y en la fertilidad de los machos han sido reportados por diferentes autores (Kasimanickam *et al.*, 2006; Sicherle *et al.*, 2011; Walczak–Jedrzejowska *et al.*, 2012) la mayoría trabajado con la adición de antioxidantes en el semen (da Silva *et al.*, 2010); sin embargo, el espermatozoide cuenta con mecanismos de defensa para evitar los daños que pueden causar las ROS en donde se incluyen las enzimas glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa, las cuales regulan el balance entre la producción y eliminación de las ROS (Soto-Bernardini y Raventós-Vorst, 2008) esto debido a la sensibilidad del espermatozoide a la acción de estas moléculas por la gran cantidad de fosfolípidos que contienen en la membrana, por lo tanto, las consecuencias son en el metabolismo, morfología y movilidad del espermatozoide (Yao-Yuan *et al.*, 2006). Se han correlacionado las diferentes características seminales con la producción de malondialdehído, compuesto producido como resultado de la lipoperoxidación, Kasimanickam *et al.* (2006) al hacer un análisis de correlación mencionaron que con el aumento de malondialdehído la movilidad y el porcentaje de espermatozoides normales se reducen (las correlaciones son -0.32 y -0.43 respectivamente) las anomalías primarias se incrementan (0.23) al igual que las secundarias (0.47). Se sugiere que la adición de selenio en la dieta provocó una mayor actividad de la protección enzimática y generó resultados superiores a los reportados en la literatura en conservación de semen de carnero.

6.6 Conclusión.

La suplementación con selenio en la dieta de los carneros mejora la movilidad del semen, porcentaje de espermatozoides con integridad de membrana y porcentaje de espermatozoides vivos en semen fresco a las cuatro horas y el porcentaje de espermatozoides vivos en refrigeración a partir de las 24 h.

VII. DISCUSIÓN GENERAL DE RESULTADOS

Los sementales de pelo mostraron cambios en la producción y calidad de semen entre las épocas de anestro y estación reproductiva; indicando que estos cambios están influenciados por la época del año, y donde el fotoperiodo es un factor ambiental determinante en la regulación de su desempeño reproductivo (Malpaux *et al.*, 1997). Cambios en el fotoperiodo, implican cambios en la secreción de melatonina, hormona que puede regular la secreción de GnRH, gonadotropinas y en consecuencia, la actividad gonadal para estimular o inhibir la producción de hormonas y gametos. Las variaciones de volumen, concentración del eyaculado y movilidad del semen, entre las épocas, pueden estar asociadas a una menor secreción de gonadotropinas como respuesta a las acción negativa de la melatonina durante los días largos (Bustos y Torres-Díaz, 2012), por lo cual tanto, se consideran reproductores estacionales y esto limita la producción de corderos a lo largo del año (Valencia y Arrollo, 2007).

La mejora en la alimentación incrementa el tamaño testicular y la producción de semen (Sayed y Mohamed, 2010). De igual manera, la suplementación mineral es importante en la producción de semen de los carneros. Para el caso del selenio, Bin *et al.* (2008), al suministrar un suplemento con vitamina E y Selenio, observaron que la combinación de estos dos elementos, mejoró las características seminales y el desempeño reproductivo en carneros después de tres meses de suplementación.

Los resultados obtenidos indican que la suplementación de los sementales con 0.4 ppm, mejoró el volumen del eyaculado 0.3 ml con respecto a los no suplementados en el cuarto mes de iniciada la suplementación y la concentración espermática en 500×10^6 espermatozoides por mL a partir del segundo mes de suplementación, estos resultados son similares a los reportados por diversos autores (Marín-Guzman *et al.*, 2000; Ahangari *et al.*, 2013 y Silva-Albertoni, 2014), al parecer, debido a que el Se mejora las condiciones para el funcionamiento de las células de Sertoli que regulan la formación y liberación de espermatozoides.

Los efectos de la suplementación con selenio no se observan de manera inmediata en las características del eyaculado, debido a que los cambios se reflejan después de un ciclo espermático, que es 7 semanas, siempre y cuando este efecto no este confundido

con la época del año (Lindsay *et al.*, 1993). Por lo anterior, la suplementación de los carneros tuvo que iniciar cuando se inicia la época reproductiva (junio).

La suplementación con Se es muy importante en la zona centro de México, debido a que se ha demostrado que los suelos son deficientes en este mineral y en consecuencia, los forrajes no tienen las concentraciones en suficiente cantidad para cubrir los requerimientos, sin embargo, no se conoce el impacto de esta deficiencia en la reproducción de los carneros (Ramírez *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos de la suplementación no mostraron un incremento en la actividad de la enzima glutatión peroxidasa, ni en la producción de malondialdehído en sangre, como indicadores de protección contra el estrés oxidativo; sin embargo, si se observó una mejora en la conservación de semen en fresco (37°C) y refrigerado (5°C). Lo anterior indica que el semen de sementales suplementados con 0.4 ppm de Se conservado en fresco tuvo mejor movilidad, porcentaje de espermatozoides vivos y con integridad de membrana a las 4 h de la dilución; y conservado en refrigeración mejoró el porcentaje de espermatozoides vivos a partir de las 24 h, con respecto a los testigo. Estos cambios, posiblemente se debieron a que los espermatozoides podrían haber tenido una mayor protección contra las ROS, ya que el selenio está ligado con la actividad de la glutatión peroxidasa (Zang *et al.*, 2013) la cual es importante para evitar la lipoperoxidación de los lípidos de la membrana (Kehr *et al.*, 2010). En el espermatozoide, la clase GPx-4 es la más importante y se encuentra en tres isoformas: cistosólica (cGPx-4), mitocondrial (mGPx-4) y nuclear (nGPx-4; Chavory *et al.*, 2010) que en conjunto, son las responsables de evitar los daños causados por la producción de ROS del espermatozoide. Las ROS son producidas fisiológicamente durante el metabolismo celular (Sanocka y Kurpysz, 2004) y cumplen una importante función en la fisiología espermática normal, pero un desequilibrio entre su producción y degradación causa efectos adversos en el espermatozoide (Ball *et al.*, 2002; Marchesi y Feng, 2007). Por lo tanto, a medida que el espermatozoide se mantiene por más tiempo, hay mayor producción de ROS y demanda de mayor protección para evitar los daños y muerte celular.

VIII. CONCLUSIONES GENERALES

Los carneros de pelo presentan una producción de semen estacional, en donde la mayor producción y calidad se tiene durante la época reproductiva.

El volumen del eyaculado, la concentración espermática el porcentaje de espermatozoides vivos en el eyaculado y la movilidad del semen de los carneros de pelo, es mejor dentro de la época reproductiva, y el fotoperiodo es la variable ambiental que está relacionado con los cambios seminales.

La administración de selenio en la dieta de carneros de pelo incrementa el volumen del eyaculado y su concentración, sin embargo, estos cambios se presentan después de cuatro y dos meses respectivamente, posterior al inicio de la suplementación.

La conservación de semen de los carneros de pelo se beneficia con la suplementación de selenio en la dieta, al incrementar la proporción de espermatozoides vivos, móviles y con integridad de membrana después de cuatro horas conservadas a 37°C, en refrigeración e incrementa el porcentaje de espermatozoides vivos a partir de las 24 h conservados a 5°C.

La suplementación de selenio a sementales no mejoró las características del semen congelado.

IX. LITERATURA CITADA

- Agarwal A. and Saleh R.A. 2002. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol. Clin of N. Amer*; 29(4): 1-12.
- Agarwal A., Aponte-Mellado A., Premkumar B.J., Shaman A, Gupta S. 2013. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review, *Rep. Biol. Endoc.* 49.
- Agarwal A., K. Makker and R. Sharma. 2008. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An Update. *Am. J. Reprod. Immunol.* 59: 2–11.
- Aguirre F.V. 2004. Efectos de la estacionalidad, frecuencia de colección y jerarquía en algunas variables reproductivas de carneros Pelibuey. Tesis Doctoral. Universidad de Colima. 86 p.
- Ahangari Y.J., B. Parizadian and M. Zamani. 2013. The impact of organic selenium supplementation on rooster semen quality in liquid condition. *Poult. Sci. J.* 1: 21-28.
- Ahsan U., Z. Kamran, I. Raza, S. Ahmad, W. Babar, M.H. Riaz and Z. Iqbal. 2014. Role of selenium in male reproduction. *Review. An. Rep. Sc.* 146:55–62.
- Aitken R.J. y Barker M. 2002. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. *Int. J of Androl*; 25: 191-194.
- Al-Abdulla A.N. and J.M Lee. 1998. Apoptosis of retrogradely degenerating neurons occurs in association with the accumulation of perikaryal mitochondria and oxidative damage to the nucleus. *Am. J. Pathol.* 153: 447-456.
- Allmang C. and A. Krol. 2006. Selenoprotein synthesis: UGA does not end the story. *Bioch.* 88: 1561-1571.
- Alvarez C.A. and G.V. Moraes. 2006. Efeitos da Selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. *Rev. de Saúde e Biol.* 1(1): 42-51.
- Amman R.P. and B.W. Pickett. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equ. Vet. Sci.* 7(3): 145-173.
- Angulo-Castañeda N.Y. 2006. Intoxicación por selenio. In: Córdoba-Palacio D, editor. *Toxicología.* 5 ed. Bogotá: El Manual Moderno. Pp. 353–6.
- Atashfaraz E., F. Farokhi and G. Najafi. 2013. Protective effect of ethyl pyruvate on epididymal sperm characteristics, oxidative stress and testosterone level in methotrexate treated mice. *J Rep. Infert.* 14:190-196.
- Bailey J.L., J.F. Bilodeau and N. Cormier. 2000. Semen, cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl.* 21: 1-6.

- Ball B.A., A.T Vo and J. Baumber. 2001. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am. J. Vet.* 62: 508-515.
- Ball B.A., J. Baumber and K. Sabeur. 2002. Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa. *Ther.* 58: 299-300.
- Bamba K. 1988. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosine stain. *Ther.* 29(6):1245-1251.
- Barbas J.P. and R.D. Mascarenhas. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tis. Bank*; 10: 49-62.
- Baumber J., B.A. Ball, C.G Gravance, V. Medina and M.C Davies-Morel. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J. Androl.* 21: 895-902.
- Beckett G.J. and J.R Arthur. 2005. Selenium and endocrine systems. *J. Endoc.* 184: 455-465.
- Beckman K.B. and B.N. Ames. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78: 547-581.
- Bencharif D., L. Amirat, M. Anton, E. Schmitt, S. Desherces, G. Delhomme, M.-L. Langlois, P. Barrie`re, M. Larrat and D. Tainturier. 2008. The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Ther.* 70:1478-1488.
- Berry E.J., E.C. Segerson and D.W. Libby. 1983. Serum and testis selenium concentrations and testis morphology in ram lambs on varying ages. *Ther.* 20(4):473-483.
- Bianchi M. de L.P. and L.M.G. Antunes. 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. de Nut.* 12(2): 123-130, 1999.
- Bin T. A., G. Bomboi and B. Floris. 2008. Does Vitamin E or Vitamin E plus Selenium improve reproductive performance of rams during hot weather? *Ital. J. An. Sci.* 8: 743-754.
- Blache D., L. M. Chagas, M. A. Blackberry, P. E. Vercoe and G. B. Martin. 2000. Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep. *Review. J. of Rep. and Fert.* 120: 1-11

- Bradford M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An. Biochem.* 72:248-254.
- Brenneisen P., H. Steinbrenner and H. Sies. 2005. Selenium, oxidative stress, and health aspects. Review. *Mol. Asp. of Med.* 26:256–267.
- Bucak M.N., P.B. Tuncer, S. Sariozkan, N. Baspinar, M. Taspinar, K. Cayan, A. Bilgili, P.P. Akalin, S. Buyukleblebici, S. Aydos, S. Ilgaz, A. Sunguroglu and D. Oztuna. 2010. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiol.* 61: 248-253.
- Bustos E. y L.Torres-Díaz. 2012. Reproducción estacional en el macho. *Int. J. Morfol.* 30(4):1266-1279.
- Carbajal H.M.A., Q.G. Aquí y G.C. Díaz. 2013. Uso de selenio en ovinos. *Abanico Veterinario.* 3(1): 44-54.
- Carmona-Fonseca J. 2010. Selenio en suero y plasma: epidemiología y valores de referencia. *Rev. Panam. Sal. Pub.* 28(5): 388-398.
- Carvalho O.F., J.D.J. Ferreira, N.A. Silveira, and G.E. Freneau. 2002 Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. *J. Bras. de Patol. e Medic. Laborat.* 38(1): 33-38.
- Chabory E., C. Damon, A. Lenoir, J. Henry-Berger, P. Vernet, R. Cadet, F. Saez and J. R. Drevet. 2010. Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *J. Anim. Sci.* 88:1321-1331.
- Chemineau P., B. Malpaux, J.A. Delgadillo, Y. Guérin, J.P. Ravault, J. Thimonier y J.Pelletier. 1992. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *An. Rep. Sci.* 30 :157-184.
- Chemineau P., D. Guillaume, M. Migaud, J.C. Thiéry, M.C. Pellicer-Rubio and B. Malpaux. 2008. Seasonality of reproduction in mammals: Intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Rep. Dom. An.* 43 (Suppl. 2): 40–47.
- Chi H.J., J.H. Kim, C.S. Ryu, J.Y. Lee, J.S. Park, D.Y. Chung, S.Y. Choi, M.H. Kim, E.K. Chun and S.I. Roh. 2008 Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Hum. Rep.* 23(5): 1023-1028.
- Chihuailaf R.H., P.A. Contreras and F.G. Wittwer. 2002 Pathogenesis of oxidative stress: consequences and evaluation in animal health. *Vet. Méx.* 33: 265-283.

- Conrad M., S.G. Moreno, F. Sinowatz, F. Ursini, S. Kolle, A. Roveri, M. Brielmeier, W. Wurst, M. Maiorino and G.W. Bornkamm. 2005. The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol. Cell. Biol.* 25: 7637-7644.
- Cruz-Castrejón U, F. G. Véliz, R. Rivas-Muñoz, J.A. Flores, H. Hernández, G. Duarte. 2007. Respuesta de la actividad sexual a la suplementación alimenticia de machos cabríos tratados con días largos, con un manejo extensivo a libre pastoreo. *45 (1): 93-100.*
- D'Alessandro A.G and G. Martemucci. 2003. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Lecce ram. *An. Rep. Sci.* 79: 93–102
- da Silva M.M., S. Dimas, C. C. Sicherle, L. Rodello and I. C. Saltaren. 2010. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *An. Rep. Sci.* 122:118–123.
- Dacheux J. L., C. Pisselet, M. R. Blanc, Marie-Thérèse –de-Reviers and M. Courot. 1981. *J. Rep. Fert.* 61:363-371.
- Dantena M. and I. Mayorga. 2011. Innovative biotechnologies of reproduction on sheep management. In: Kh ilij E. (ed.), Ben Hamou da M. (ed.), Gabiñ a D. (ed.). *Mutations des systèmes d'élevage des ovins et perspectives de leur durabilité.* Zaragoza: CIHEAM / IRESA / OEP, 2011. p. 89 -9 4 (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 9 7)
- David I., X. Druart, G.Lagriffou, E. Manfredi, C. Robert-Granié y L. Bodin. 2007. Genetic and environmental effects on semen traits in Laucane and Manech tete rousse AI rams. *Genet. Sel. Evol.* 39:405-419.
- De Lamirande E. and C. Gagnon. 1995. Capacitation-associated production of superoxido anion by human spermatozoa. *Free Radic Biol Med*; 18(3): 487-495.
- De Lamirande E., H. Jiang, A. Zini, H. Kodama and C. Gagnon. 1997. Reactive oxygen species and e sperm physiology. *Rev Rep*; 2: 48-54.
- De Lucas T.J. 2012. Alternativas biotecnológicas en la producción ovina. UNAM. 32 pp.
- Dröge W. Free radicals in the physiology control of cell function. 2002. *Phys. Review*; 82: 47-95.
- Duntas L. 2009. Selenium and inflammation: underlying anti-inflammatory mechanisms. *Horm Metab Res.* 41(6): 443-447.

- Egerszegia I., P. Sarlós, J. Rátky, L. Solti, V. Faigl, M. Kulcsár y S. Cseh. 2014. Effect of melatonin treatment on semen parameters and endocrine function in Black Racka rams out of the breeding season. *S. Rum. Res.* 116:192–198.
- El Ghany H.A. and J.L. Tórtora-Pérez. 2010. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. *Sm. Rum. Res.* 89:185–192
- El-Sisy G.A., A.M.A. Abdel-Razek, A.A. Younis, A.M. Ghallab and M.S.S. Abdou. 2008. Effect of dietary zinc or selenium supplementation on some reproductive hormone levels in male Baladi goats. *Glob. Vet.* 2: 465-450.
- Evans G. Current topics in artificial insemination of sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* 1988. 4:103-116.
- Fahy G.M. 1986. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology* 23(1): 1-13.
- Foote R. H. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J. An. Sci.* 80:1-10.
- Foote R.H. 1978. Factors influencing the quantity and quality of semen harvested from bulls, rams, boars and stallion. *J. An. Sci.* 47:1-11.
- Ford W.C.L. 2004. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum. Rep. Update.* 10: 387-399.
- Foresta C, L. Flohé, A. Garolla, A. Roveri, F. Ursini and M. Maiorino. 2002. Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biol Rep.* 67: 967-971.
- Forouzanfar M., S. F. Ershad, S.M. Hosseini, M. Hajian, S. O. Hosseini, A. Abid, M. Tavalae, A. Shahverdi, A. V. Dizaji, N. Esfahani. 2013. Can permeable superoxide dismutase mimetic agents improve the quality of frozen-thawed ram semen? *Cryobiol*; 66: 126-130.
- Fuchs J., J. Thiele and F. Ochsendorf. 1997. Oxidants, antioxidants and oxidative injury. En: Ochsendorf, F.R. and Fuchs, J (eds), *Oxidative stress in male infertility*, Michael Itschert, Gardez Verlag, Germany. Pp 21-40.
- Fuentes V., V. Sánchez, H. González, P. Fuentes, A. García and R. Rosiles. 1997. La función endócrina del testículo en el camero criollo mexicano durante las diferentes épocas del año y su control opioidérgico durante el anestro. *J. Vet. Med.* A. 44, 259-263.

- García, E. 2004. Modificaciones a la clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana) 5ª Ed. Instituto de Geografía UNAM, México. 90 p.
- Gerlach T. and J.E. Aurich. 2000. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Review. An. Rep. Sci.* 58:197–213.
- Ghorbankhani F., M. Souri, M.M. Moeini, and R. Mirmahmoudi. 2015. Effect of nutritional state on semen characteristics, testicular size and serum testosterone concentration in Sanjabi ram lambs during the natural breeding season. *An. Rep. Sci.* 153:22–28.
- Gibbons A. y M. Cueto. 2005. Manual de inseminación artificial en la especie ovina. INTA, Bariloche Argentina. 19pp
- Gomez E., D.S. Irvine and R.J. Aitken. 1998. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int. J. of Androl.* 21(2): 81-94.
- Gómez-Brunet A., J. Santiago-Moreno, A. Toledano-Diaz and A. López-Sebastián. 2012. Reproductive seasonality and its control in spanish sheep and goats. *Tropical and Subtropic. Agroecos.* 15 Sup 1: S47 – S70.
- Gresakova L., K. Cobanova and S. Faix. 2013. Selenium retention in lambs fed diets supplemented with selenium from inorganic or organic sources. *S. Rum. Res.* 111:76– 82.
- Gudmundsdóttir K.B., J. Kristinsson, S. Sigurdarson, T. Eiríksson and T. Jóhannesson. 2008. Glutathione peroxidase (GPX) activity in blood of ewes on farms in different scrapie categories in Iceland. *Ac. Vet. Scand.* 50: 1-7.
- Guerriero G., S. Trocchia, F. K. Abdel-Gawad and G. Ciarcia. 2014. Roles of reactive oxygen species in the spermatogenesis regulation. *Front. in Endocrin.* 5 (56):1-4.
- Gundogana M., D. Yeni, F. Avdatek and A.F. Fidan. 2010. Influence of sperm concentration on the motility, morphology, and membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *An. Rep. Sci.* 122:200–207
- Gunter S.A, P.A. Beck and M.J. Phillips. 2003. Effects of supplementary selenium source on the performance of blood measurements in beef cows and their calves. *J. An. Sci.* 81: 856-864.

- Hafez E.S.E and B. Hafez. 1993. *Reproduction in Farm Animals*. Ed Lippincott Williams & Wilkins, 7th Edition. USA. 365-375p.
- Harrison JH and Conrad HR. 1984. Effect of selenium intake on selenium utilization by the nonlactating dairy cow. *J. Dairy Sci.* 67: 219-223.
- Hedaoo M.K., K.P. Khillare, M.D. Meshram, S.K. Sahatpure and M.G. Patil. 2008. Study of some serum trace minerals in cyclic and non-cyclic surti buffaloes. *Vet. World* 1: 71-72.
- Hefnawy A. E. G. and J. L. Tórtora-Pérez. 2010. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. *S. Rum. Res.* 89: 185-192.
- Hegedúšova Z., L. Štolc, F. Louda, L. Čunat and J. Vejnar. 2012. Effect of different extenders on ram sperm traits during storage. *Acta Univ. Agric. et Silv. Mend. Brun.* 60(6):111-116.
- Hicks J.J. *Bioquímica*. McGraw-Hill. México. 2001. 900 pp.
- Hicks J.J, R.Y. Torres and V.M. Sierra. 2006. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Rev End. y Nut.* 14(4): 223-226.
- Holt W.V. 1997. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Rep. Fert. Dev.* 9:309–319.
- Holt W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *An. Rep. Sci.* 62:3–22.
- Holt W.V. and R.D. North. 1994. Effects of Temperature and Restoration of Osmotic Equilibrium during Thawing on the Induction of Plasma Membrane Damage in Cryopreserved Ram Spermatozoa. *Biol. of Rep.* 51: 414-424
- Hoskins D. and E. Casillas. 1973. Function of cyclic nucleotides in mammalian spermatozoa. En: *Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology, Vol. V, Male Reproductive System*. R.O. Greep y E.B. Astwood (eds.). Washington D.C., Am. Phys. Soc. Pp. 453-460.
- Huerta B.M. 1997. Nutrición mineral de rumiantes en pastoreo. En: *Memorias del curso "Alternativas de Manejo en Bovinos para carne en pastoreo"*. Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Huerta B.M., 2010, Avances en la nutrición mineral de ovinos. En: *Memorias del 10° curso bases de la cría ovina*. Guadalajara, México.
- Humann-Ziehank E., P. C. Tegtmeyer, B. Seelig, P. Roehrig and M. Ganter. 2013. Variation of serum selenium concentrations in German sheep flocks and implications for herd health management consultancy. *Ac. Vet. Scan.* 55 (82):2-8

- Imai H., N. Hakkaku, R. Iwamoto, J. Suzuki, T. Suzuki, Y. Tajima, K. Konishi, S. Minami, S. Ichinose, K. Ishizaka, S. Shioda, S. Arata, M. Nishimura, S. Naito and Y. Nakagawa. 2009. Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatocytes causes male infertility in mice. *J. Biol. Chem.* 284: 32522-32532.
- Jaramillo S., N. A. Villa, A. F. Pineda, A. B. Gallego, P. Tabares y A. Ceballos. 2005. Actividad sanguínea de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en novillas a pastoreo. *Pesq. Agropec. Bras.* 40(11):1115-1121.
- Jóhannesson T., K.B. Gudmundsdóttir, T. Eiríksson, J. Barash, J. Kristinsson and S. Sigurdarson. 2004. Selenium and GPX activity in blood samples from pregnant and non-pregnant ewes and selenium in hay on scrapie-free, scrapie-prone and scrapie-afflicted farms in Iceland. *Icel. Agr. Sci.* 16/17:3-13.
- Juniper D.T., R.H. Phipps, E. Ramos-Morales and G. Bertin. 2008. Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle. *J. An. Sci.* 86: 3100-3109.
- Kafi M., M. Safdarian and M. Hashemi. 2004. Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams. *Technical Note. S. Rum. Res.* 53: 133–139.
- Karagiannidis A., C. Varsakeli, I. Alexopoulos and Amarantidis. 2000. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *S. Rum. Res.* 37: 125-130.
- Kasimanickam R., K. D. Pelzer, V. Kasimanickam, W. S. Swecker and C. D. Thatcher. 2006. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. *Ther.* 65:1407–1421.
- Kaur R. and K. Kaur. 2000. Effects of dietary selenium (Se) on morphology of testis and cauda epididymis in rats. *Ind. J. Physiol. Pharm.* 44: 265-272.
- Kaya A., N. Baspinar, C. Yildiz, F. Kurtoglu, M.B. Ataman and S. Haliloglu. 2000. Influence of melatonin implantation on sperm quality, biochemical composition of the seminal plasma and plasma testosterone levels in rams. *Review Méd. Vét.* 151(12): 1143-1146.
- Kehr S., M. Malinouski, L. Finney, S. Vogt, V. M. Labunskyy, M. V. Kasaikina, B. A. Carlson, Y. Zhou, D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev. 2010. X-ray fluorescence microscopy reveals the role of selenium in spermatogenesis. *J. Mol. Biol.* 26; 389(5): 808–818.

- Kendall N.R., S. McMullen, A. Green and R.G. Rodway. 2000. The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. *J. of An. Sci.* 62 (4):277-83.
- Khera A., J.J. Vanderlelie and Perkins. 2013. Selenium supplementation protects trophoblast cells from mitochondrial oxidative stress. *Placent.* 34: 594-598.
- Köhrle J, F. Jakob, B. Contempré and J.E. Dumont. 2007. Selenium, the thyroid, and the endocrine system. *End. Rev.* 26: 944-984.
- Kommisrud E, O. Østerås, T. Vatn. 2005. Blood selenium associated with health and fertility in Norwegian dairy herds. *Act. Vet. Scand.* 46: 229-240.
- Korf H. W., C. Schomerus and J. H. Stehle. 1998. The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv. in Anat. Emb. and Cell Biol.* 146: 1–100.
- Lamirande E and C. Gagnon. 1993. Human sperm hyperactivation in whole semen and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. *Fert Ster.* 59:1291-5.
- Lawrence R. A. y R.F. Burk. 1976. Gluthatione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Bioch. and Biophys. Res. Com.* 71:952-958.
- Leboeuf B., B. Restall and S. Salamon. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *J. An. Rep. Sci.* 62: 113-141.
- Lehman M.N., Z. Ladha, L. M. Coolen, S. M. Hileman, J. M. Connors and R. L. Goodman. Neuronal plasticity and seasonal reproduction in sheep. *Eur. J Neurosci.* 32(12): 2152–2164.
- Lindsay D.R., G.B. Martin and I. H. Williams. 1993. Nutrition and Reproduction. In: *Reproduction in Domesticated Animals — World Animal Science Series* (Ed.: G.J. King) Chapter 17, pp.459-491.
- Liu L, J.R. Trimarchi and D.L. Keefe. 2000. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biol. Rep.* 62: 1745-1753.
- López-Gutiérrez A.G., J.E. Ramírez-Bribiesca, R. López-Arellano, A. Revilla-Vázquez, J. Tórtora-Pérez y J.R. Bárcena-Gama. 2012. Balance de selenio en corderos suplementados con selenio orgánico. *Univ. y Cien. Tróp. Húm.* 28(2):173-180.
- Macedo R. y A. Alvarado. 2005. Efecto de la época de monta sobre la productividad de ovejas Pelibuey bajo dos sistemas de alimentación en Colima, México. *Arch. Zootec.* 54: 51-62.

- Macías-Cruz U., F.D Álvarez-Valenzuela, J. Rodríguez-García, A. Correa-Calderón, N.G. Torrentera-Olivera, L. Molina-Ramírez y L. Avendaño-Reyes. 2010. Crecimiento y características de canal en corderos Pelibuey puros y cruzados F1 con razas Dorper y Katahdin en confinamiento. *Arch. Med. Vet.* 42:147-154.
- Mahsud T., H. Jamila, Z. I. Qureshia, M. N. Asib, L. A. Lodhia, M. S. Waqasa and A. Ahmadv. 2013. Semen quality parameters and selected bio-chemical constituents level in plasma of Lohi rams. *S. Rum. Res.* 113:175– 178.
- Malo C., L. Gil, N. González, F. Martínez, R. Cano, E. de Blas and E. Espinosa. 2010. Antioxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiol*; 61:142-147.
- Malpoux B., C. Viguie´, D. C. Skinner, J. C. Thiéry y P. Chemineau. 1997. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Br. Res. Bul.* 44(4):431–438.
- Malpoux B., J. C. Thiéry and P. Chemineau. 1999. Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reprod. Nutr. Dev.* 39:355-366.
- Mandiki S., G Derycke, J.L. Bister y R. Paquay. 1998. Influence of season and age on sexual maturation parameters in Texel, Suffolk and Ile-de-France rams 2: Circulating concentrations of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactine and testosterone. *S. Rum. Res.* 28: 81–88.
- Maneesh y Jayalekshmi 2006. H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Ind. J of Clinic. Bioch.* 21(2): 80-89.
- Mapletoft R.J., J.P. Kastelic and G.C. Coulter. 1998. Manejo y selección de toros de carne. *Oeste Ganadero* 1(3):10-13.
- Marai, I.F.M., A.A. El-Darawany, E.A Ismail and M.A.M. Abdel-Hafez. 2009. Reproductive and physiological traits of Egyptian Suffolk rams asaffected by selenium dietary supplementation and housing heat radiation effects during winter of the sub-tropical environment of Egypt. *Arch. Tierz.* 52: 402-409.
- Marchesi D.E. and H.L Feng. 2007. Sperm DNA integrity from sperm to egg. *J of Androl*; 28 (4): 481-489.
- Marin-Guzman J., D.C. Mahan and R. Whitmoyer. 2000. Effect of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility. *J. of An. Sci.* 78:1544-1550.

- Martin B. G. 2003. Interacción genotipo-ambiente en el control neuroendocrino del sistema reproductivo en pequeños rumiantes. I Consideraciones Generales. En: Memorias III Curso de Fisiología de la Reproducción en Rumiantes. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos 23-26 de septiembre. Pp 115-132
- Martin G.B., S. W. Walkden-Brown, R. Boukhliq, S. Tjondronegoro, D. W. Miller, J. S.Fisher, and M.J. Hötzel. 1994. Non-photoperiodic inputs into seasonal breeding in male ruminants. In: Perspectives in Comparative Endocrinology (Eds.: Davey, K.G., Peter, R.E. & Tobe, S.S.) pp. 574-585.
- Martin G.B., S.R.D. Sutherland and D.R. Lindsay. 1987. Effects of nutritional supplements on testicular size and the secretion of LH and testosterone in Merino and Booroola rams. An. Rep. Sci. 12, 267.
- Martínez R.R., I.J. Hernández, H.H. Hernández, A.A. Michel y M.J Valencia. 2006. Inseminación intrauterina en cabras criollas con semen refrigerado. Agroc. 40 (1):71-76.
- Mata-Campuzano M., M. Álvarez-Rodríguez, J. Tamayo-Canul, E. López-Urueña, P. de Paz, L. Anel, F. Martínez-Pastor and M. Álvarez. 2014. Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature, extender and storage time. An. Rep. Sci. 151:137–147.
- Maxwell W. y P.F. Watson. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. Animal Reproduction Science 42:55-65.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanism and implicatios. J. of Gen. Phis. 247: 125-142.
- McDonald P, R. Edwards, J.F.D. Greenhalgh and C.A Morgan. 2002. Animal Nutrition. 6th edition. Ed: Pearson Prentic Hall. Essex.
- McDowell L.R. and J.D. Arthington. 2005. Minerales para Rumiantes en Pastoreo en Regiones Tropicales. 4ta Ed. Universidad de Florida. Gainesville, Florida. USA. 94 p.
- Membrillo-Ortega A, I.A. Córdova, J.J. Hicks-Gómez, I.M. Olivares-Corichi, T.V.M. Martínez y M.J.J. Valencia. 2003. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. Interc. 28(12): 699-704.
- Moghaddam G. H., M. M. Pourseif and S. A. Rafat. 2012. Seasonal variation in semen quantity and quality traits of Iranian crossbred rams. Slov. J. Anim. Sci., Vol. 45(3): 67-75.

- Morani E.S.C. 2004. Quantificação dos radicais livres produzidos nas diferentes etapas do processamento de criopreservação do sêmen de touros. 2004. [Tese Doutorado]. Medicina Veterinária – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil. Pp: 79.
- Muiño-Otero R. 2006. Evaluación de la Motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas de casa y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. [Tesis Doctorado]. Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, España. Pp: 157.
- Naijian HR., H. Kohram, A.Z. Shahneh, M. Sharafi and M.N. Bucak. 2013. Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze–thaw process, *Cryobiol*; 66: 151-155.
- Nath J. 1972. Correlative biochemical and structural studies on the mechanism of freezing damage to ram semen. *Cryobiology* 9: 240-246.
- Noblanc A., A. Kocer, E. Chabory, P. Vernet, F. Saez, R. Cadet, M. Conrad and J.R. Drevet. 2011. Glutathione peroxidases at work on epididymal spermatozoa: an example of the dual effect of reactive oxygen species on mammalian male fertilizing ability. *J. Androl.* 32: 665-671.
- Nordberg J. and E.S.J Arnér. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *F. Radic. Biol. Med.* 31(11): 1287-1312.
- Numan B. M., A. Atessahin, Ö. Varis, A. Yüce, N. Tekin and A. Akcay. 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Ther.* 67:1060–1067.
- Oberst E. R., E. A. Smirdele, M. A. Brito, T. R. Marschner, L. A. Ribeiro y R. C. Mattos. 2011. Seasonal variation in semen quality of Lacaune rams in Brazil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* Vol. 48(4):319-324.
- Ohkawa H., N. Ohishi y K.Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *An. Bioch.* 95:351-358.
- Oláh J., S. Kusza, S. Harangi, J. Posta, A. Kovács, A. Pécsi, C. Budai y A. Jávör. 2013. Seasonal changes in scrotal circumference, the quantity and quality of ram semen in Hungary. Short communication. *Arch. Tierz.* 56 (10): 102-108.
- Oldham C.M., N.R. Adams, P.B Gherardi, D.R Lindsay and J.B. Mackintosh. 1978. The influence of level of feed intake on sperm producing capacity of testicular tissue in the ram. *Aust. J. of Agr. Res.* 29, 173-179.

- Olson G.E., V. P. Winfrey, S.K. Nagdas, K.E. Hill and R.F. Burk. 2007. Apolipoprotein E receptor-2 (apoER2) mediates selenium uptake from selenoprotein P by the mouse testis. *J. Biol. Chem.* 282:12290-12297.
- Olson G.E., V.P Winfrey, S.K. Nagdas, K.E. Hill and R.F. Burk. 2005. Seleno-protein P is required for mouse sperm development. *Biol. Reprod.* 73: 201-211.
- Orihuela T. A. 2014. La conducta sexual del carnero. Revisión. *Rev. Méx. Cien. Pec.* 5(1):49-89.
- Palacios A.A. 1994. Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen. *Vet. Méx.* 25(3):207-210.
- Peris S.I., A. Morrier, M. Dufour and J.L. Bailey. 2007. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J of Androl.* 25(2): 224-233.
- Petrujkic B.T., D.S. Sefera, I.B. Jovanovic, M. Jovicin, S. Jankovic, G. Jakovljevic, R.C. Beierf and R.C. Anderson. 2014. Effects of commercial selenium products on glutathioneperoxidase activity and semen quality in stud boars. *Anim. F. Sci. and Technol.* 197: 194-205.
- Porras A. A., L.A. Zarco y J. M. Valencia. 2003. Estacionalidad reproductiva en ovejas. *Cien. Vet.* 9 (4):1-34.
- Pourseif M. M. and G. H. Moghaddam. 2012. Photoperiod as a factor for studying fluctuations of seminal traits during breeding and non-breeding seasons. *J. Cell. and An. Biol.* Vol. 6(16): 241-249.
- Ramirez B. E., H. Camacho, H. Calva, y P.J. Tórtora. 2004. Efecto de un suplemento parenteral con selenito de sodio en la mortalidad de corderos y los valores hemáticos de selenio. *Agroc.* 38(1): 43-51.
- Ramírez B.J.E., J.L. Tórtora, M. Huerta, A. Aguirre and L.M. Hernández. 2001. Diagnosis of selenium status in grazing dairy goats on the Mexican plateau. *Sm. Rum. Res.* 41: 81- 85.
- Richheimer S.L., M.W. Bernart, G.A. King, M.C.Ken and D.T. Beiley. 1996. Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 507-514.
- Robinson J.E and F.J. Krasch. 1984. Refractoriness to inductive day lengths terminates the breeding season of the Suffolk ewe. *Biol. Rep.* 31: 656-663.
- Rodello L. 2010. Prevenção do estresse oxidativo pela utilização de trolox®, Catalase e glutatona no proceso De congelação de sêmen ovino. [Tese Duotorado].

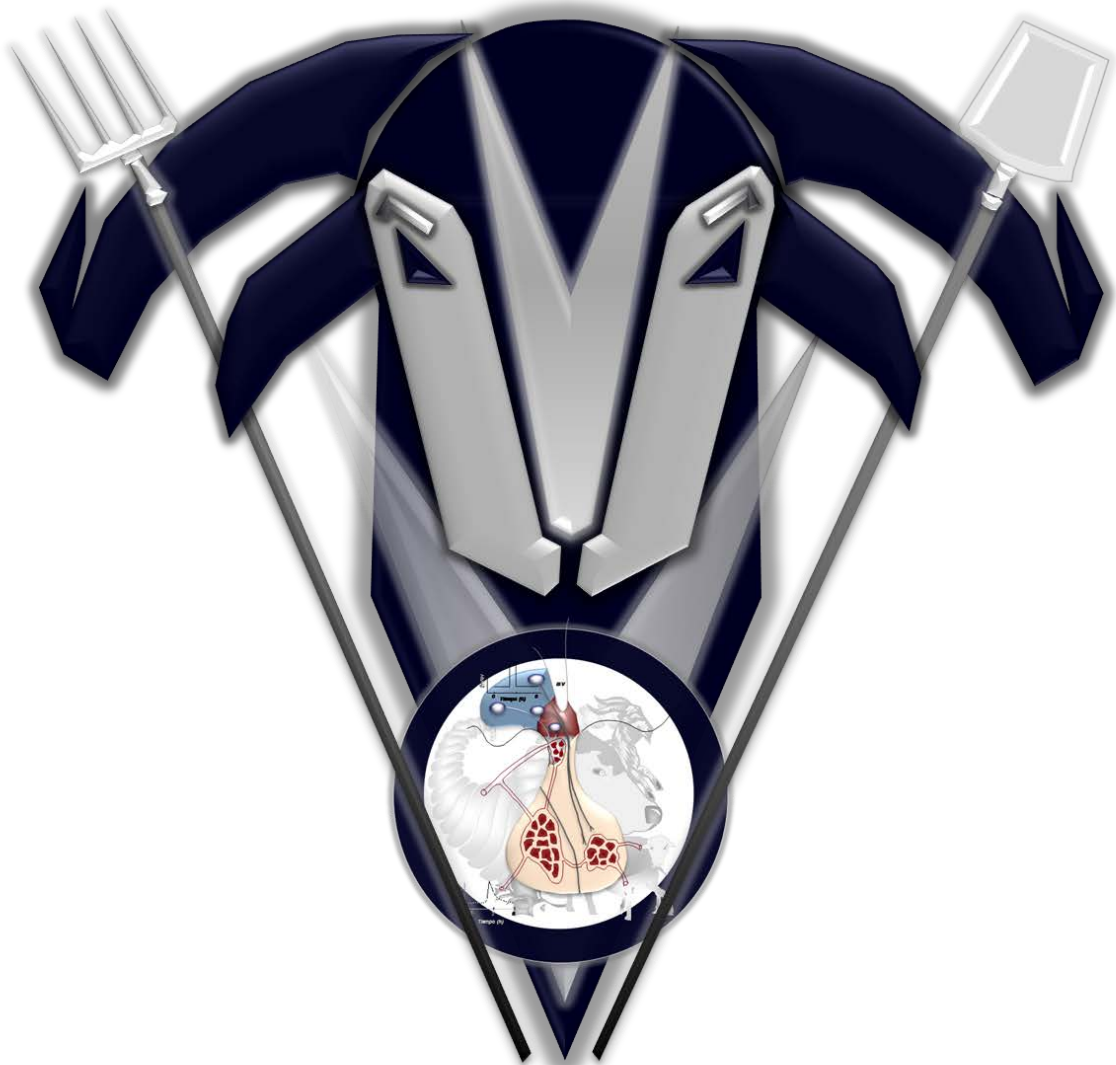
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- Universidade Estadual Paulista, Butacatu, Brasil.. Pp: 131.

- Rodriguez-Gil J.E. 2006. Mammalian Sperm Energy Resources Management and survival during conservation in refrigeration. *Rep. Dom. An.* 41(2): 11-20.
- Ruiz L. G., A. Santiani, R. M. Sandoval, W. Huanca, A. Delgado, L. Coronado y C. Alzamora. 2007. Efecto de dos antioxidantes (tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 18 (2): 99-106.
- Salamanca A.C. 2010. Mineral supplementation for cattle production. *Rev. Elec. de Vet.* 11(9): 1-10.
- Salamon S. and W.M.C. Maxwell. 1995b. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Review. . An. Rep. Sci.* 38: 1-36.
- Salamon S. and W.M.C. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *An. Rep. Sci.* 62:77–111.
- Salamon S. and W.M.C. Maxwell. 1995a. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Review. An. Rep. Sci.* 37: 185-249
- Saleh R.A. y A. Agarwal. 2002. Oxidative stress and male infertility: from reseach Bench to clinical practice. *J. of Androl.* 23(6): 737-752.
- Sánchez D.F. y R.A. Ledezma. 2013. Variación en la estacionalidad de calidad seminal en carneros de pelo Saint Croix. En: memorias de XVII Congreso internacional de ovinocultura. Acapulco, México del 23 al 25 de octubre. P 231-236.
- Sandoval R. M.S. 2005. Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de San Marcos. Perú.
- Sanocka D. and M. Kurpysz. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Rep. Biol. End.* 2: 12-18.
- Santiani A. 2013. Use of antioxidants to improve quality of cryopreserved semen. *Spermova* 3(2): 154-157.
- Sarabia-Martínez M. 2004. Desarrollo de un bolo intraruminal de liberación prolongada con Se orgánico de levaduras para bovinos productores de leche. 128 f. Tesis (Maestría.) - Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Sariozkan S., P.B. Tuncer, S. Buyukleblebici, M.N. Bucak, F. Canturk and A. Eken. 2014. Antioxidative effects of cysteamine, hyaluronan and fetuin on post-thaw semen quality, DNA integrity and oxidative stress parameters in the Brown Swiss bull. *Androl.*
- Sarlos P., I. Egerszegi, O. Balogh, A. Molnar, S. Cseh and J. Ratky. 2013. Seasonal changes of scrotal circumference, blood plasma testosterone concentration and semen characteristics in Racka rams. *Sm. Rum. Res.* 111:90– 95
- Sayed S. and A.A. Mohamed. 2010. Effects of level of feeding and season on thermoregulation and semen characteristics in desert rams (*Ovis aries*). *Global veterinary* 4(3): 207-2015.
- Schunemann H.J., B.J. Grant, J.L. Freudenheim, P. Muti, R.W. Browne, J.A. Drake, R.A. Klocke and M. Trevisan. 2001. The relation of serum levels of antioxidant vitamins C and E, retinol and carotenoids with pulmonary function in the general population. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 163: 1246-1255.
- Sengoku K., K. Tamate, T. Yoshida, Y. Takaoka, T. Miyamoto and M. Ishikawa. 1998. Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. *Fert. and Steril.* 69(3): 522-527.
- Sepúlveda N., J. Risopatrón, C. Muller, M. Herrera y E. Rodero. 2002. Características reproductivas y seminales de carneros Romney Marsh en la latitud de 38°44' sur. *SEOC.* 1108-1111.
- Sharma R.K. and A. Agarwal. 1996. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology.* 48(6): 835-850.
- Sicherle C.C., M.S. Maia, S.D. Bicudo, L. Rodello and H.C. Azevedo. 2011. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. *Sm. Rum. Res.* 95:144–149.
- Sikka S.C. 2004. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J. of And.* 25(1): 5-18.
- Soto-Bernardini M. y H. Raventós-Vorst. 2008. Papel del estrés oxidativo en la esquizofrenia. *A.M.C.* 50 (4):198-202.
- Spallholz J.E. 1990. Selenium and glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 262: 145-158.
- Sundararaman M.N. and M.J. Edwin. 2008. Changes in motility characteristics of goat spermatozoa during glycerol- equilibration and the relevance to cryopreservation. *As. J. Cell Biol.* 3(1):22-33.

- Swecker W.S., C.D. Thatcher, D.E. Eversole, J. Blodgett, and G.G. Schring. 1995. Effect of selenium supplementation on calostr al IgG concentration in cows grazing selenium-deficient pastures and on postsuckle serum IgG concentration in their calves. *Am. J. Vet. Res.* 56: 450-453.
- Tasdemir U., S. Buyukleblebici, P.B. Tuncer, E. Coskun, T. Ozgurtas, F.N. Aydın, O. Buyukleblebici and I.S. Gurcan. 2013. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters, *Cryobiol*; 66: 38-42.
- Topraggaleh T.R., A. Shahverdi, A. Rastegarnia, B. Ebrahimi, V. Shafiepour, M. Sharbatoghl, V. Esmaeili and E. Janzamin. 2013. Effect of cysteine and glutamine added to extender on post-thaw sperm functional parameters of buffalo bull. *Androlo*.
- Tuner R.J., and J.M. Finch. 1990. Immunological malfunctions associated with low selenium-vitamin E diets in lambs. *J. Comp. Path.* 102: 99-108.
- Turner R.J. and J.M. Finch. 1991. Selenium and the immune response. *Proc. Nutr. Soc.* 50: 275-285.
- Turriza-Chan J.L., Castellanos-Ruelas A.F., Rosado-Rubio G., Heredia M. y Cabrer as-Torres E., 2010, *Agroc.* 44(4):471-480.
- Underwood E.J. y N.F. Suttle. 2003. *Los Minerales en la Nutrición del Ganado*. Tercera edición. Acribia. Zaragoza, España. 495 p.
- Valcárcel A, M.A. De Las Heras, L. Pérez, D.F. Moses and H. Baldassarre. 1997. Assessment of acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. *J. Anim. Rep. Sci.* 45: 299-309.
- Valencia M.J. y J. Arroyo. 2005 ¿Existe actividad reproductiva anual continua en ovejas pelibuey? En: *Curso de fisiología de la reproducción en rumiantes*. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Velázquez M.M., V. Vidal, J.A. Ortiz, J.A. Hernández, C.G. Germán, F.E. Martínez, A. Herrera, G. Morales y J. Gallegos-Sánchez. 2007. Manejo reproductivo del macho: Una revisión en rumiantes. En: *Memorias del V curso internacional de fisiología de la reproducción*. Colegio de postgraduados Campus Montecillo.
- Venereo G. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cub. Med. Mil.* 31:126-133.
- Vernet P., J. Faure, J.P. Dufaure and J.R. Drevet. 1997. Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa

- of GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase. *Mol. Rep. Dev.* 47:87-98.
- Vigué C., A. Caraty, A. Locatelli y B. Malpoux. 1995. Regulation of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) Secretion by Melatonin in the Ewe. Simultaneous Delayed Increase in LHRH and Luteinizing Hormone Pulsatile Secretion. *Biol. of Rep.* 52:1114-1120.
- Villa-Arcila N.A. y A. Ceballos-Márquez. 2007. Radicales libres e infertilidad en el macho. *Rev. Vet. y Zoot.* 1(2):87-97.
- Villanueva C.G.J. 2011. Nutrición del ganado: selenio. *Premezclas Minerales, Zapopan, Jalisco, México.*
- Walczak–Jedrzejowska R., J. K. Wolski and J. Slowikowska–Hilczer. 2012. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cen. Europ. J. of Urol.* 60-67.
- Watson P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved. *An. Rep. Sci.* 60–61:481–492.
- Windsor D.P. and I. G. White. 1995. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. *An. Rep. Sci.* 40:43-58.
- Wood S. and A. Loudon. 2014. Clocks for all seasons: unwinding the roles and mechanisms of circadian and interval timers in the hypothalamus and pituitary. *Review. J. of End.* 222: 39–59.
- Yao-Yuan H., C. Chi-Chen and L. Chich-Sheng. 2006. Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. *Int. J. Biol. Sci.* 2:23-29.
- Zhang Q., L. Chen, K. Guo, L. Zheng, B. Liu, W. Yu, C. Guo, Z. Liu, Y. Chen and Z. Tang. 2013. Effects of Different Selenium Levels on Gene Expression of a Subset of Selenoproteins and Antioxidative Capacity in Mice. *Biol. Trace. Elem. Res.* 154:255–261.
- Zini A. and J. Libman. 2006. Sperm DNA damage: Clinical significance in the era of assisted reproduction. *Can. Med. As. J.* 175(5): 494-500.



LaROCa