



.UBA veterinaria
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



**VI Jornadas Internacionales
Instituto de Investigación y Tecnología
en Reproducción Animal
INITRA**

25, 26 y 27 de agosto 2021

Libro de Resúmenes

Resúmenes de Conferencias Plenarias	5
DIAGNÓSTICO ULTRASONOGRÁFICO DE PATOLOGÍAS GINECOLÓGICAS EN LAS VACAS LECHERAS.....	6
USO DE LA ULTRASONOGRAFÍA COMO HERRAMIENTA PARA EVALUAR EL POTENCIAL REPRODUCTIVO DEL TORO.....	7
LA INSEMINACIÓN POSTCERVICAL: PASADO, PRESENTE Y FUTURO.....	8
INFLUENCIA DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y LA FERTILIDAD DEL TORO EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO <i>IN VITRO</i>	9
Resúmenes de Simposios	10
ANTIOXIDANTES EN CRIOPRESERVACIÓN Y SU RELACIÓN CON LA FUNCIONALIDAD DEL ESPERMATOZOIDE PORCINO	11
EFFECTS OF METFORMIN AND INSULIN- TRANSFERRIN- SELENIUM ON PORCINE OOCYTE IN VITRO MATURATION	12
COMO IMPLEMENTAR LA IA POSTCERVICAL PARA NO MORIR EN EL INTENTO	13
BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS APLICADAS EN EL ASNO.....	14
CRIOPRESERVACIÓN Y SEXADO DE EMBRIONES DE EQUINOS Y ASNOS.....	15
BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS APLICADAS A LA CONSERVACIÓN DE ÉQUIDOS	16
AVANCES EN FISIOLÓGIA REPRODUCTIVA Y BIOTECNOLOGÍAS EN FELINOS.....	17
CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN CANINO.....	18
INSEMINACIÓN TRANSCERVICAL EN LA PERRA: SU APLICACIÓN EN LA CLÍNICA REPRODUCTIVA	19
Resúmenes Sesión de Reproducción Básica	20
ESTUDIO DEL ÚTERO DEL ROEDOR POLIOVULAR <i>LAGOSTOMUS MAXIMUS</i> MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y MICROSCOPIA ÓPTICA DE ALTA RESOLUCIÓN.....	21
EVALUACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN MEDIANTE LA PRUEBA DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA EN CANINOS Y FELINOS.....	22
EFEECTO DEL USO COMBINADO DE MANGANESO, SELENIO, COBRE Y ZINC SOBRE EL DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL BOVINO Y LA CALIDAD EMBRIONARIA <i>IN VITRO</i>	23
EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE CADERINA E Y N EN LA MUCOSA OVIDUCTAL Y DE LA PAPILA DE ALPACAS (<i>VICUGNA PACOS</i>) PÚBERES, PREPÚBERES Y ADULTAS PRE Y POST OVULATORIAS INDUCIDAS MEDIANTE SERVICIO NATURAL	24
EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE RECEPTORES DE LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINA Y ESTRÓGENO EN LA MUCOSA OVIDUCTAL Y LA PAPILA DE ALPACAS (<i>VICUGNA PACOS</i>) PÚBERES, PREPÚBERES Y ADULTAS PRE Y POST OVULATORIAS INDUCIDAS MEDIANTE SERVICIO NATURAL	25
EXPRESIÓN DEL RECEPTOR A OXITOCINA Y DE LA CICLOOXIGENASA-2 EN CARCINOMAS MAMARIOS CANINOS	26
EFEECTO DE LA OXITOCINA SOBRE LA FUNCIONALIDAD DEL CUERPO LÚTEO EN LLAMAS.....	27
COMPARISON OF ULTRASTRUCTURE DAMAGE IN FELINE SPERM USING VITRIFICATION AND CONVENTIONAL FREEZING TECHNIQUES	28
INFLUENCIA DE LA AUTOFAGIA Y LA APOPTOSIS EN EL CONTROL DE LA MUERTE/SOBREVIVENCIA DE LAS CÉLULAS GERMINALES, FOLICULARES Y LUTEALES EN EL OVARIO ADULTO DE <i>LAGOSTOMUS MAXIMUS</i> (MAMMALIA-RODENTIA) A LO LARGO DE LA PREÑEZ.	29
PERFIL PROTEÓMICO DE CUERNO UTERINO IZQUIERDO Y DERECHO DE ALPACAS	30
EFEECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL Y EL GLUTATIÓN TOTAL DE OVOCITOS PORCINOS MADURADOS <i>IN VITRO</i>	31
PRINCIPALES ASPECTOS HISTOLÓGICOS DE LA PLACENTA BRANQUIAL EN EL TELEÓSTEO VIVÍPARO <i>JENYNSIA LINEATA</i>	32
CAPACITACIÓN CON ÁCIDO HIALURÓNICO EN ESPERMATOZOIDES BOVINOS: CAMBIOS EN LA MOTILIDAD Y ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO OXIDATIVO.....	33

DETECCIÓN DE PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS MEDIANTE LA SONDA FLUORESCENTE C11-BODIPY581/591 EN ESPERMATOZOIDES DE PERROS	34
EFEECTO MODULADOR DE MORIN (3,5,7,2',4'-PENTAHIDROXIFLAVONA) SOBRE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO DURANTE LA MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> DE OVOCITOS PORCINOS.....	35
EFEECTO DE BENZNIDAZOL Y NIFURTIMOX EN CÉLULAS TM4 Y SOBRE PARÁMETROS DE MOVILIDAD ESPERMÁTICA EMPLEANDO SEMEN BOVINO	36
CIRUGÍA TESTICULAR EN EL ARMADILLO <i>CHAETOPHRACTUS VILLOSUS</i> (DASYPODIDAE, XENARTHRA)	37
USE OF COMBINED OXIDATIVE SUBSTRATES IN PORCINE OOCYTE <i>IN VITRO</i> MATURATION.....	38
EFEECTO DEL COCULTIVO CON CÉLULAS EPITELIALES OVIDUCTALES PORCINAS SOBRE LOS NIVELES DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN LOS EMBRIONES PORCINOS	39
INACTIVACIÓN DE LA FUNCIÓN TESTICULAR EN EL ARMADILLO <i>CHAETOPHRACTUS VILLOSUS</i> EN BIOTERIO	40
PRIMEROS ENSAYOS SOBRE LA OBTENCIÓN DE GAMETAS, INCUBACIÓN DE EMBRIONES Y CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMA DEL PEZ <i>BETTA SPLENDENS</i> (TELEOSTEI, OSPHRONEMIDAE)	41
LIPID AND AMINO ACID METABOLISM DURING BOVINE OOCYTE <i>IN VITRO</i> MATURATION.	42
EVALUACIÓN DE LA REEXPANSIÓN DE BLASTOCISTOS BOVINOS POST-BLASTOCENTESIS POR MICROMANIPULACIÓN. RESULTADOS PRELIMINARES.	43
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GLUTATIÓN EN EL LÍQUIDO BLASTOCÉLICO Y EN BLASTOCISTOS BOVINOS PRODUCIDOS <i>IN VITRO</i> : RESULTADOS PRELIMINARES.	44
DESARROLLO TESTICULAR DE <i>GYMNOTUS CARAPO</i>	45
EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ACROSOMAL CON COOMASSIE BLUE EN ESPERMATOZOIDES DE CONEJO	46
FOLICULOGÉNESIS EN <i>MIMUS SATURNINUS</i> (PASERIFORMES: MIMIDAE)	47
ESTUDIO HISTOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO PRELIMINAR DEL DESARROLLO OVÁRICO PRE Y POST NATAL EN ALPACAS (<i>VICUGNA PACOS</i>).....	48
DIMORFISMO SEXUAL DE LAS ALETAS PÉLVICAS EN <i>POTAMOTRYGON spp.</i> (CONDRICTIES: POTAMOTRIGONIDAE)	49
AMINO ACIDS AS UNIQUE OXIDATIVE SUBSTRATES DURING PORCINE OOCYTE <i>IN VITRO</i> MATURATION	50
ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE ENDOTELIOS VASCULARES (VEGF) EN ENDOMETRIO CANINO NORMAL Y CON ENDOMETRITIS. RESULTADOS PRELIMINARES	51
MIGRACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES (CGP) EN OVARIOS DE <i>EUMOPS PATAGONICUS</i> (CHIROPTERA MOLOSSIDAE)	52
PARTICIPATION OF AMINOACIDS IN CAPACITATION AND ACROSOME REACTION OF CRYOPRESERVED BOVINE SPERMATOZOA.....	53
EFEECTO DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA EN CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS ENDOMETRIALES INFECTADOS CON EL GAMMAHERPESVIRUS BOVINO TIPO 4: MODELO <i>IN VITRO</i> DE COINFECCIÓN VIRAL	54
GRANDES CUERPOS LAMELARES Y SU PAPEL EN LOS OVOCITOS DEL ARMADILLO <i>CHAETOPHRACTUS VILLOSUS</i> (XENARTHRA)	55
ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE ESPERMATOZOIDES DE PECES AUTÓCTONOS DE LA CUENCA DEL PLATA.....	56
EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE ENDOTELIOS VASCULARES Y SU RECEPTOR FTL-1 EN EL CUERPO LÚTEO DE PERRAS DURANTE EL DIESTRO: ESTUDIOS PRELIMINARES.....	57
EVALUACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LA VITALIDAD E INTEGRIDAD ACROSOMAL DEL ESPERMATOZOIDE DE LLAMA (<i>LAMA GLAMA</i>)	58
EFFECT OF THE COCULTURE OF PORCINE LUTEAL CELLS DURING <i>IN VITRO</i> MATURATION ON THE DNA METHYLATION PATTERN OF PORCINE BLASTOCYSTS.....	59
EFEECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON MIOINOSITOL SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO	60
Resúmenes Sesión de Reproducción Aplicada.....	61
OBTENCIÓN DE OVOCITOS MEDIANTE ASPIRACIÓN FOLICULAR TRANSVAGINAL ECOGUIADA EN YEGUAS CON FOLÍCULOS DE 10 a 20 MM	62
EFEECTO DE LA ÉPOCA Y LA EDAD SOBRE LA CIRCUNFERENCIA ESCROTAL Y LA CALIDAD DEL EYACULADO EN CARNEROS.	63

EFFECTO DEL AGREGADO DE YEMA DE HUEVO A UN DILUYENTE COMERCIAL PARA LA REFRIGERACIÓN DE SEMEN DE LLAMA.....	64
COMPARACIÓN ENTRE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA DEFINIR EL GRADO DE DESARROLLO REPRODUCTIVO EN VAQUILLONAS DE RAZAS CÁRNICAS	65
INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN MÚLTIPLE UTILIZANDO eCG DE ORIGEN RECOMBINANTE EN OVINOS	66
EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS CRIOPROTECTORES UTILIZADOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE ASNOS RAZA REMONTA ARGENTINO	67
DETERMINACIÓN DEL LARGO FETAL A LOS 35 DÍAS DE GESTACIÓN EN OVINOS DE RAZA FRISONA MEDIANTE ECOGRAFÍA ABDOMINAL.....	68
¿EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA PUEDE MEJORAR LA CALIDAD DE SEMEN PORCINO?.....	69
EFFECTO DEL PLASMA SEMINAL EQUINO SOBRE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA	70
ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA UTILIZANDO MARCADORES SNP VINCULADOS A LA FERTILIDAD EN TOROS DE RAZA CRIOLLO URUGUAYO	71
ENDOMETRIS CLÍNICA Y SUBCLÍNICA EN VACAS LECHERAS EN SISTEMAS A PASTOREO.....	72
IMPLICANCIA DE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA EN LA EVALUACIÓN SEMINAL DEL GATO DOMÉSTICO (<i>FELIS SILVESTRIS CATUS</i>).....	73
PREDICCIÓN DE LA FERTILIDAD DE TOROS MEDIANTE LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL NÚCLEO ESPERMÁTICO. RESULTADOS PRELIMINARES.....	74
¿LA INMUNOMODULACIÓN AFECTA LA CONCENTRACIÓN DE COLÁGENO DE ENDOMETRIO DE YEGUAS SUSCEPTIBLES A ENDOMETRITIS?.....	75
EFFECTO DE LA REFRIGERACIÓN EN LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO DE LLAMA (<i>LAMA GLAMA</i>)	76
NUEVOS PARÁMETROS DE ECOTEXTURA PARA EVALUAR EL PARÉNQUIMA TESTICULAR EN TOROS DE RAZAS CARNICERAS DADORES DE SEMEN	77
EFFECTOS DE LOS ESTRÓGENOS Y LA PROGESTERONA EN OVARIOS Y PLACENTAS PORCINAS DE 70 DÍAS DE GESTACIÓN.....	78
RESPUESTA DEL SEMEN DE CONEJO CRIOCONSERVADO PRE-TRATADO CON DIFERENTES DILUYENTES	79
EFFECTO DE LA ADICIÓN DE PLASMA SEMINAL A ESPERMATOZOIDES EQUINOS EPIDIDIMARIOS POS-DESCONGELADOS	80
USO DE DOS PROTOCOLOS DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE LLAMA Y SU TRANSFERENCIA EN DOS ÉPOCAS DEL AÑO	81
EVALUACIÓN BACTERIOLÓGICA DE SEMEN DE LLAMAS REPRODUCTORES OBTENIDOS MEDIANTE VAGINA ARTIFICIAL Y ELECTROEYACULACION	82
EFFECTO DEL AGREGADO DE EDTA AL DILUYENTE DE KENNEY PARA LA REFRIGERACIÓN DE SEMEN ASNAL.....	83
EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SALUD REPRODUCTIVA EN PERROS MESTIZOS ENTEROS	84
ASSESSMENT OF CRYOTOLERANCE OF IVF BOVINE BLASTOCYSTS AFTER VITRIFICATION AND ONE STEP-WARMING USING AN ECONOMICAL DEVICE	85
EVENTOS REPRODUCTIVOS EN BIOTIPOS BROWN SWISS Y MESTIZO EN CONDICIONES AMBIENTALES Y DE MANEJO DE TRÓPICO HÚMEDO	86
EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS DE IATF SOBRE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE RECEPTORES ENDOMETRIALES EN VACAS DE CARNE.....	87
COMPARACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE SUPERESTIMULACIÓN OVÁRICA A TIEMPO FIJO EN LLAMAS USANDO GnRH y PGF2 α . RESULTADOS PRELIMINARES.....	88



.UBAveterinaria
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



Resúmenes de Conferencias Plenarias

Diagnóstico ultrasonográfico de patologías ginecológicas en las vacas lecheras

G.GNEMMI¹, C.V.A.MARABOLI²

¹Facultad de Veterinaria Universidad Católica San Vicente Martir Valencia. ²BOVINEVET INTERNACIONAL Bovine Ultrasound Services & Herd Management.

Incluso hoy, se discute la necesidad/utilidad real de la ecografía para el manejo reproductivo del ganado lechero y de carne. Aunque el uso rutinario de la ecografía en ginecología buiátrica cumple 30 años, el 40% de los ginecólogos bovinos solo palpan, considerando que el uso del sistema de ultrasonido es obsoleto, a veces una pérdida de tiempo inútil. Desafortunadamente, la mayoría de los que usan ultrasonido en ginecología bovina se limitan a usarlo en el diagnóstico temprano de gestación. Esta premisa confirma el enorme trabajo que aún queda por hacer en términos de educación, no del criador, que ha entendido el enorme potencial de esta técnica, sino del veterinario y los técnicos que en diversas capacidades se ocupan de la reproducción bovina. ¿Por qué por esta técnica es tan difícil en afirmarse en buiatría? ¿Existen razones “científicas” que desaconsejan su uso? ¿Todavía es posible lidiar con la ginecología bovina, sin recurrir a esta técnica? ¿Cuáles son los servicios que “deberían” ofrecer a los clientes? Un excelente “palpador” con más de 20 años de experiencia en este sector y no menos de 50,000 vacas examinadas manualmente/año, tiene un margen de error de 45-55% en la definición de imágenes fisiopatológicas de los ovarios y 70-80% en la evaluación de imágenes fisiopatológicas del útero (excluyendo el diagnóstico de gestación). Este error implica una pérdida económica significativa, en términos de costos terapéuticos, mano de obra y especialmente en términos de días abiertos, todas condiciones inaceptables en una era en la que el foco está en la transparencia de la producción, la seguridad alimentaria y el bienestar de las vacas. La evaluación ecográfica de rutina del ovario y el útero, con el objetivo de evaluar su condición fisiopatológica, representa uno de los servicios que es más capaz de aumentar los ingresos del criador. Ciertamente, otras aplicaciones como el diagnóstico de gestación, el diagnóstico de gestación gemelar, el diagnóstico de vitalidad embrionaria, el diagnóstico de muerte embrionaria tardía y/o fetal temprana y el diagnóstico de sexo fetal, son servicios que nos permiten hoy apoyar esta técnica para quienes se ocupan o quieren tratar con ginecología bovina. Económicamente, la técnica ofrece enormes ventajas tanto para el técnico como para el criador: el veterinario amortiza el instrumento con 2-3 horas de trabajo mensual, mientras que el criador, ya en los primeros seis meses de trabajo de ultrasonido, ha mejorado enormemente sus parámetros reproductivos y se calcula en lechería, una ganancia neta per-cabeza en producción de \$ 45-55. El futuro nos brinda oportunidades fantásticas con esta técnica: unidades cada vez más compactas, livianas y de rendimiento a precios bajos. Unidades que incorporarán software que puede administrar toda la sesión ginecológica, incorporando toda la información también con comando de voz. El Doppler color, cuyo potencial podemos ver hoy, se podrá utilizar, gracias al soporte de la máquina, que será capaz de calcular el porcentaje de vascularización periférica y central del cuerpo lúteo, lo que nos da una idea de la cantidad de progesterona producida y, por lo tanto, podemos decir si la vaca no está preñada. La ecografía no es la solución de los problemas reproductivos, pero es un examen complementario que hoy es esencial si desea aumentar el rendimiento productivo-reproductivo del rebaño. Definitivamente: el ultrasonido no convierte al técnico en un ginecólogo, sin embargo, ¡hoy todos los ginecólogos trabajan con un ultrasonido!

Uso de la ultrasonografía como herramienta para evaluar el potencial reproductivo del toro

G.GNEMMI¹, C.V.A.MARABOLI²

¹Facultad de Veterinaria Universidad Católica San Vicente Martir Valencia. ²BOVINEVET INTERNACIONAL Bovine Ultrasound Services & Herd Management

La ultrasonografía del aparato reproductor del toro es una técnica mínimamente invasiva y no traumática que se recomienda utilizar junto a las valoraciones habituales de la BBSE, cuando nos encontremos ante un semen con alta presencia de espermatozoides anormales, baja concentración espermática, presencia de leucocitosis y/o piospermia, ante alteraciones anatómicas evidenciadas en la explotación clínica o en presencia de dolor a la palpación del sistema reproductivo, no asociado con una causa aparente. El gran aporte de esta técnica está en su contribución al diagnóstico de las anomalías encontradas, y al pronóstico de su posible evolución. Independientemente de la edad, el tamaño y el temperamento del toro, la ecografía debe realizarse en unas condiciones que garanticen el desarrollo óptimo de la técnica en unas condiciones de seguridad para el técnico y ausencia de estrés para el toro. Para ello, es esencial que se tengan en cuenta las siguientes consideraciones: 1. Una manga de manejo apropiada. 2. Lograr que el toro acepte nuestro acceso a la zona de exploración. La palpación de los testículos debe servir para advertir al toro de nuestra presencia, a la vez que permitir su examen clínico. 3. Si a la palpación se comprobara una agresividad excesiva del toro, proceder a una ligera sedación (xilazina, 0,02 mg/kg/im, o diazepam 0,05 mg/kg/iv). En animales muy nerviosos o bravos como el toro de lidia, las dosis recomendadas se pueden aumentar en un 50-100%. 4. En caso de hiperqueratosis y/o esclerodermia, presente en los toros viejos sobre todo en el invierno, antes del examen de ultrasonido es bueno desengrasar con alcohol la superficie de la piel de la zona a ecografiar. Antes de aplicar el gel, es bueno mojar la superficie a examinar con agua a 35-38°C, con el fin de suavizarla y mejorar su adherencia. El aceite vegetal también da muy buen resultado, como agente acoplante, mientras que el aceite mineral no se recomienda. La ecografía del aparato reproductor del toro se realiza con el mismo equipo utilizado en el diagnóstico ginecológico bovino. Se utilizan escáneres de ultrasonido portátiles (2.850-6.500 gr) o ultraportátiles (650-1.850 gr). Todos los instrumentos portátiles y las nuevas generaciones de ultraportátiles también ofrecen la posibilidad de Doppler. Este examen puede ser útil en el diagnóstico diferencial de la fibrosis y la pseudo fibrosis de los testículos y en el diagnóstico de varicosis. Se recomienda utilizar un transductor lineal de 5.0-7.5 MHz que permite analizar con precisión el testículo en todas sus partes (parénquima, cabeza, cola y cuerpo del epidídimo) y el cordón espermático. También permite el análisis de las ampollas deferentes, la próstata (cuerpo y parte diseminada), las glándulas vesiculares y las glándulas bulbouretrales. También puede utilizarse una sonda de 8-11 MHz (T-Line), empleada normalmente para la exploración de tendones y ligamentos en la clínica equina. Esta sonda permite realizar una evaluación más precisa en las lesiones pequeñas. Incluso la sonda lineal o convexa 2,0-3,5 MHz es de gran utilidad, permitiendo realizar una evaluación simultánea del parénquima testicular de ambos testículos en toros adultos. Es una técnica simple, rápida, indolora y muy precisa, que solo puede aumentar y mejorar la calidad del diagnóstico clínico, que siempre debe preceder al examen de ultrasonido. Definitivamente: debe entenderse que la ecografía integra el examen clínico y no quiere reemplazarlo. No aprovechar esta oportunidad sería imprudente, negándonos una posibilidad extraordinaria.

La inseminación postcervical: pasado, presente y futuro

CARMEN DE ALBA ROMERO, VETERINARIAN DVM, MSC, PHD

Minitube International calba@minitub-iberica.com

¿Desde cuándo se practica la inseminación artificial (IA) porcina? Desde hace más de 50 años.

El objetivo de la IA ha sido y sigue siendo producir más con la mejor calidad, para ello utilizamos la mejor genética, queremos conseguir la mejor carne y por supuesto producir con la mayor eficiencia. Para lograr este objetivo es imprescindible utilizar la tecnología para maximizar la productividad y hacerla rentable. Actualmente se reconocen 3 técnicas principales para la aplicación del semen: la IA tradicional donde el semen se deposita en el cuello uterino de la hembra, la IA intrauterina profunda donde el semen se deposita cerca del lugar de fecundación, y finalmente la IA postcervical (IAPC) donde el semen se coloca en el cuerpo uterino. La tradicional y la IAPC son las más utilizadas.

Atravesar los pliegues cervicales para alcanzar el cuerpo uterino son las principales barreras que hay que superar durante la IAPC. Esta técnica deposita el semen directamente en el cuerpo del útero. Para ello es necesario pasar el cervix con una cánula o catéter más fino y largo que el tradicional. Es lógico que, si el semen se deposita en el cuerpo uterino, el volumen de la dosis y la concentración espermática sean menores. Este es un punto muy importante cuando empezamos a implementar la IAPC en nuestra granja, hay que ser muy estrictos con la calidad seminal que se utiliza para la IAPC ya que sólo el esperma de calidad será capaz de fecundar el óvulo.

Antes de empezar a utilizar la IAPC, hay que hacer un buen planteamiento, conseguir que todo el equipo (técnicos de IA) lo acepten y paso a paso empezar la implementación. Siguiendo este modelo, seremos capaces de implementar la IAPC con éxito asegurado. Mantendremos una producción consistente y ganaremos más horas de trabajo para utilizar en otra parte de la granja.

Al igual que la IA convencional, la IAPC no despegó de la noche a la mañana. La técnica empezó con “mal pié” hace ya 20 años, pero va ganando terreno día a día y cada vez es más común entre los productores porcinos. Los datos y resultados que muchas granjas en diferentes países del mundo avalan su implementación en las granjas modernas. España, pionera y líder en el uso de esta técnica, y que ocupa el cuarto puesto como productor mundial de cerdos, supera el 80% de las cerdas inseminadas con IAPC.

La IAPC es una tecnología probada que sólo necesita un buen programa para implementarla con éxito en nuestra granja.

Influencia de la calidad espermática y la fertilidad del toro en el desarrollo embrionario *in vitro*

CAROLINA HERRERA, IULIAN IBANESCU, ANTONIO GONZALEZ, HEINRICH BOLLWEIN

Clinic of Reproductive Medicine, Vetsuisse - Faculty, University of Zurich, Switzerland

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) juegan un papel preponderante en la infertilidad masculina. Los espermatozoides son particularmente susceptibles a las ROS ya que contienen altos niveles de ácidos grasos polisaturados, no poseen un sistema antioxidante y presentan una capacidad baja de reparación del ADN. Aun así, los espermatozoides que presentan daño en el ADN pueden ser utilizados para fertilizar ovocitos y producir embriones. ¿Es posible que el ovocito posea un sistema que le permita reparar los daños en el ADN del espermatozoide? Las técnicas de reproducción asistida (ART) son ampliamente utilizadas para producir embriones de diferentes especies. El semen congelado es utilizado con frecuencia en ARTs y el congelamiento-descongelamiento daña los espermatozoides al inducir el estrés osmótico. Estas alteraciones afectan la membrana plasmática, el acrosoma, las mitocondrias, las ROS y la integridad del ADN. En nuestro laboratorio estudiamos el efecto de las alteraciones del espermatozoide en el epigenoma del embrión, en el desarrollo embrionario temprano y en la participación del ovocito para reparar los daños del espermatozoide. Para esto, utilizamos la producción *in vitro* de embriones bovinos a partir de ovocitos recolectados de ovarios de matadero y semen bovino fresco o congelado. Durante nuestros estudios, demostramos que los daños en el ADN de los espermatozoides afectan la fertilización *in vitro* y la tasa de desarrollo embrionario *in vitro*. Al utilizar ovocitos de alta calidad, estos no fueron capaces de reparar el daño acarreado por el espermatozoide, ni de revertir los efectos en la fertilización ni en el desarrollo embrionario. También demostramos que el estrés oxidativo no sólo afecta la integridad del ADN del espermatozoide sino también la integridad del epigenoma.



.UBA *veterinaria*
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



Resúmenes de Simposios

Antioxidantes en criopreservación y su relación con la funcionalidad del espermatozoide porcino

ELIZABETH BREININGER

Universidad de Buenos Aires. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Investigaciones en Producción Animal (INPA)

Actualmente en la especie porcina se realizan más de 25 millones de inseminaciones cada año alrededor del mundo; de estas, más del 99% se llevan a cabo con semen refrigerado. El 1% restante, realizadas con semen congelado, resultan en menores índices de concepción, menor tamaño de camada y un bajo número de dosis por eyaculado. No obstante, en algunos aspectos el uso de semen congelado puede resultar ventajoso, como ser: el transporte a largas distancias, la conservación durante un tiempo muy prolongado, el control sanitario, genético y/o productivo; el autoabastecimiento de dosis seminales en la propia granja y la creación de bancos genéticos. Otra ventaja importante es que, al aumentar el tiempo de almacenamiento, se pueden optimizar los procesos de comercialización (importación y exportación) de semen, lo que permitiría crear nuevas unidades de negocio dentro de las explotaciones porcinas. La baja capacidad fecundante del semen congelado puede estar relacionada con el gran daño que se produce en el ADN y en las membranas espermáticas a nivel estructural y funcional durante su procesamiento. Estos resultados podrían mejorarse incrementado el conocimiento de las variables metabólicas involucradas en estos procesos. En tal sentido nuestro grupo de trabajo se focalizó en establecer indicadores de funcionalidad celular aplicables a la mejora de los procesos de criopreservación y adquisición de la capacidad fecundante en el espermatozoide porcino. Nuestros resultados han permitido determinar la actividad de enzimas relacionadas con la obtención de energía y el estado de óxido reducción, como ser enzimas claves de las vías glucolítica y el ciclo de Krebs (fosfofructoquinasa, malato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, NAD y NADP dependientes, y succinato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa) También se evaluó en espermatozoides porcinos frescos y/o criopreservados con y sin el antioxidante alfa tocoferol, parámetros funcionales (inducción *in vitro* de la capacitación y de la reacción acrosomal) y de la calidad espermática (motilidad y viabilidad) y se determinó la vinculación entre estos parámetros y las actividades enzimáticas. Con referencia a las enzimas estudiadas, todas las enzimas mostraron diferencias significativas entre individuos, de esta manera la actividad enzimática podría ser utilizada como un marcador de la congelabilidad del espermatozoide. También se observó que el agregado de alfa tocoferol durante la criopreservación incrementó el porcentaje de espermatozoides móviles y disminuyó la peroxidación lipídica. La adición de alfa tocoferol al diluyente de congelamiento, al preservar a la célula espermática del estrés oxidativo generado por la criopreservación, conduce a mejorar la capacidad fecundante del espermatozoide porcino criopreservado. Los resultados obtenidos por nuestro grupo han generado conocimientos que pueden ser aplicados a nivel productivo, posibilitando que la producción porcina pueda enfrentar con mejores herramientas el enorme desafío que implica lograr mejoras productivas con un desarrollo económico sustentable y eficiente.

Effects of metformin and insulin- transferrin- selenium on porcine oocyte *in vitro* maturation

LUCHETTI C.G.^{1,3}, LORENZO M.S.^{1,3}, ELIA E.M.^{2, 4}, TEPLITZ G.M.^{1,3}, CRUZANS P.R.¹, LOMBARDO D.M.^{1,3}

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). ²Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental. ³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET). ⁴ CONICET-UBA-Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE).

In vitro maturation (IVM) generates oxidative stress in oocytes and embryos that triggers apoptosis, necrosis and/ or permanent arrest of the cell cycle in early embryo stages. This is reflected in a decrease in blastocyst rates and has also long- term consequences on implantation and foetal development. The supplementation of the IVM media with antioxidants has beneficial effects on embryo development. In pigs, the supplementation of the media with insulin- transferrin- selenium (ITS) improves oocyte IVM and embryonic development. The insulin-sensitizing drug metformin (M) has antioxidant and antiapoptotic properties in a variety of models. This drug is used for the treatment of type 2 diabetes mellitus and is a non- hormonal treatment for polycystic ovary syndrome. During porcine oocyte IVM, the supplementation with M plus insulin significantly increases the blastocyst rate. The objective of the present study was to assess the effects of ITS and/ or M during porcine IVM on the oocyte quality and cumulus cells viability. Porcine *cumulus*- oocyte complexes (COC) were obtained from slaughterhouse ovaries by follicular aspiration and subjected to IVM during 44-46 h in supplemented Tissue Culture Medium 199. The COC were incubated in four well plates at 38.5° C and 5% CO₂ in a humidified chamber. Experimental groups were M (10⁻⁴ M), ITS (0.1% v/v), ITS+M and control (without supplement). After IVM, oocytes were denuded with hyaluronidase and nuclear maturation rate was determined by Hoechst. It was increased with ITS+M (*Chi* square and Fisher: $p < 0.01$). Glucose consumption by COC was increased by ITS and ITS+M (Kruskal-Wallis and Dunn: $p < 0.05$). Protein concentration and superoxide dismutase activity were similar in all groups. However, total glutathione was increased, and lipid peroxidation was decreased in the supplemented groups compared to control (ANOVA and Bonferroni: $p < 0.005$). Redox balance parameters were measured using 96-well plates and a microplate reader. The viability of *cumulus* cells using annexin-V and propidium iodide by flow cytometry (cells categorized as viable, necrotic, early or late apoptotic) showed that M increased and ITS decreased viability (ANOVA and Bonferroni: $p < 0.0001$). In conclusion, the supplementation with ITS+M has beneficial effects on porcine COC during IVM increasing nuclear maturation rate, glucose consumption, glutathione levels and decreasing lipid peroxidation. This could be beneficial in the *in vitro* development of pig embryos.

Cómo implementar la IA postcervical para no morir en el intento

CARMEN DE ALBA ROMERO, VETERINARIAN DVM, MSC, PHD

Minitube International calba@minitub-iberica.com

Son muchos los productores porcinos que conocen las ventajas de la técnica de inseminación artificial postcervical (IAPC) y, sin embargo, son reacios a adoptarla. ¿Por qué? Porque todo lo que no se conoce en profundidad nos da miedo o por no tocar “lo que ha funcionado desde siempre”.

En un futuro, todos acabarán implementando la metodología, unos por voluntad propia, como apuesta y para competir en mejores condiciones; y otros simplemente porque no les va a quedar otra cuando el resto ya use mayoritariamente esta tecnología.

Ya sea por una razón u otra lo que está claro es que el adaptar nuevos protocolos o técnicas al equipo de trabajo (en este caso los operarios que realizan las inseminaciones) no se hace de un día para otro, sino de manera lenta pero segura.

¿Cuál es el primer paso para implementar la IAPC o cualquier otra técnica? La respuesta es simple, formación. Preferiblemente con un profesional dentro de la empresa que enseñe de manera personalizada. Y una vez que el personal se defiende con la nueva herramienta ¿cuál sería el siguiente paso? Hacer el seguimiento del proceso. Es decir, tiene que haber alguien, que vaya guiando al equipo poco a poco a la hora de empezar a implementar la técnica en la granja.

Las dudas que surgen desde que se acaba la formación y se inicia la implementación de la técnica en la granja hacen necesario que el responsable del proyecto siga de cerca los detalles para marcar pautas, resolver dudas y “no morir en el intento”.

Al principio puede que no veamos todas las ventajas que la IAPC. La primera vez puede que no veamos las ventajas que la técnica nos brinda respecto a la metodología tradicional, pero a medida que la técnica se afiance y el equipo de inseminación adquiera experiencia suficiente, todas las ventajas de la técnica serán una realidad.

Biotecnologías reproductivas aplicadas en el asno

PLAZA J., NIETO E., BRUNO S., OLIVIERI G., GOMEZ M., FERRANTE A., MIRAGAYA M.

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, INITRA, Cátedra de Teriogenología.

Los asnos han sido muy utilizados por el hombre porque se los considera animales multipropósito. Se destacan por su rusticidad y capacidad de adaptación a zonas marginales, siendo utilizados como medio de transporte en regiones de difícil acceso. Dentro de las características principales de esta especie se destaca la producción de leche, considerada hipoalergénica y la más parecida a la leche materna, pudiendo utilizarse en lactantes con intolerancia a la leche bovina. La demanda mundial de la leche es muy alta y su precio es muy elevado, dada la reducción mundial de las poblaciones de asnos. Además, los asnos son útiles para terapias asistidas (zooterapias) y para la producción de mulares para su uso en la montaña. En los últimos años ha crecido el interés por aumentar el número de estos animales debido a que están en riesgo de extinción. Las biotecnológicas reproductivas son esenciales para aumentar la eficiencia de esta especie. El propósito de la exposición será mostrar los resultados de las distintas técnicas de criopreservación de semen e inseminación artificial en asnos de la raza Asnal Remonta Argentino. El grupo de investigación de la cátedra de Teriogenología ha venido formando estudiantes de posgrado en esta temática y el resultado de sus trabajos en semen fresco refrigerado y congelado serán discutidos en la presentación.

Criopreservación y sexado de embriones de equinos y asnos

CAROLINA HERRERA ¹, DIANA FANELLI ², DUCCIO PANZANI ², HEINRICH BOLLWEIN ¹,
FRANCESCO CAMILLO ²

¹ Clinic of Reproductive Medicine, Vetsuisse - Faculty, University of Zurich, Switzerland ² Veterinary Sciences Department, Pisa University, Via Livornese, 56124 San Piero a Grado, Pisa, Italy

La criopreservación de embriones ha sido utilizada en diferentes especies hace aproximadamente 25 años, pero, en el equino, sólo han sido publicados resultados exitosos recién en el 2011. ¿Cuál es la razón para este retraso con respecto a otras especies? Los embriones equinos obtenidos por lavado uterino 7 a 8 días post ovulación, se encuentran en el estadio de blastocisto expandido y presentan un diámetro entre 300 y 1200 μ . Este tamaño es considerablemente mayor al que presentan otras especies, como por ejemplo los bovinos. Los embriones equinos mayores a 300 μ presentan una particularidad: la presencia de una cápsula que los rodea, impermeable a los crioprotectores. Por lo tanto, la gran cantidad de líquido contenido en la cavidad blastocélica y la presencia de la cápsula impiden que estos embriones puedan ser deshidratados y criopreservados con éxito, utilizando técnicas convencionales de criopreservación. Los embriones equinos de menor tamaño (<300 μ) han sido criopreservados en forma exitosa, produciendo índices aceptables de preñez. Estos embriones son obtenidos por lavado uterino 6 días post ovulación. La mayoría de los programas comerciales evitan este procedimiento ya que, al adelantar el día del lavado uterino, los índices de recuperación embrionaria disminuyen considerablemente. De todas formas, existen kits comerciales que permiten vitrificar embriones de ese tamaño. En el año 2011, Choi y col. fueron capaces de criopreservar embriones equinos mayores a 300 μ de diámetro, logrando porcentajes aceptables de preñez (71%). Los embriones criopreservados, fueron biopsiados antes del congelamiento, provocando su colapso. Asimismo, es posible determinar el sexo de los embriones equinos colectando una biopsia embrionaria y analizandola por PCR. Durante cientos de años, los asnos han sido utilizados como animales de trabajo en agricultura, ayudando al desarrollo de zonas rurales. En países industrializados, la introducción de maquinaria agrícola trajo consigo un creciente desinterés en la cría de asnos provocando que ciertos genotipos se encuentren en peligro de extinción (Camillo et al., 2018). Los asnos siguen siendo fundamentales para la economía familiar en países pobres. La criopreservación de embriones puede ser utilizada también para preservar la biodiversidad de ciertas especies. Los embriones de asnos son similares a los equinos: al ser colectados por lavado uterino al día 7 post ovulación, su tamaño es >300 μ y presentan una cápsula impermeable a los crioprotectores. Es por esto que nuestro objetivo fue estudiar la viabilidad de los embriones de asnos luego de utilizar la misma metodología con la que se logró criopreservar y determinar el sexo de embriones equinos.

Biotecnologías reproductivas aplicadas a la conservación de équidos

ANDRÉS GAMBINI

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Cátedra de Producción Equina. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Los caballos domésticos pertenecen al género *Equus*, compuestos por mamíferos perisodáctilos de la familia Equidae. Es el único Género que logró sobrevivir, de una familia muy próspera y diversa ya que unos 35 otros géneros que pertenecían a esta familia están extintos al día de hoy. En la actualidad, el género *Equus* consiste en cuatro subgéneros: *Equus* (caballo Przewalski y domésticos), *Asinus* (burros y asnos salvajes), *Dolichohippus* (cebra de Grevy) y *Hippotigris* (Cebra de llanura). Además, este género posee la inusual característica de poder generar híbridos viables (aunque usualmente infértiles), mediante el cruzamiento de individuos de especies con características fenotípicas y cariotípicas diferentes. La mula es un híbrido que resulta del cruzamiento entre una yegua (*Equus ferus caballus*) y un burro o asno (*Equus africanus asinus*). Otros híbridos équidos menos conocidos son el burdégano (cruza entre burra y caballo), híbridos de caballo-cebra, de cebra-asnos y de caballos domésticos con Przewalski. La lista roja de especies animales en peligro de extinción de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (<http://www.iucnredlist.org>), pone de manifiesto que muchos de los équidos salvajes se encuentran en peligro o amenazados en el medio silvestre: *Equus africanus* (Estado crítico), *Equus hemionus* (Asiatic Wild Ass, pronto a considerarse vulnerable), *Equus grevyi* (Cebra de Somalia, en peligro), *Equus zebra* (Cebra de la Montaña, vulnerable). La cría en cautividad no siempre puede prevenir la extinción y es necesario incurrir a nuevas alternativas que permitan garantizar la conservación de las especies amenazadas como el empleo de biotecnologías reproductivas, como la producción *in vitro* de embriones, para la conservación de genética y de individuos. En caballos domésticos, la implementación de biotecnologías reproductivas como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y la clonación ha incrementado notablemente en la última década. La ICSI resulta el único método en equinos para producir embriones *in vitro* por medio de fecundación, ya que la fecundación *in vitro* tradicional en equinos aun no es eficiente. El empleo de espermatozoides de diferentes especies del género *Equus* para fecundar ovocitos de yegua, permitiría generar embriones híbridos y estudiar el desarrollo embrionario preimplantacional que aún no ha sido reportado. La clonación surge como otra herramienta fundamental para rescatar genética que se considere valiosa justamente debido a los pocos ejemplares que existen en esas especies, o incluso para intentar recuperar animales ya extintos. En el género de los équidos podemos citar el caso de la Cebra Quagga (*Equus quagga quagga*) que es una subespecie extinta de cebra común. En este trabajo reportamos por primera vez la producción *in vitro* de embriones clones de cebra y de híbridos cebrillos, evaluando marcadores para determinar su calidad.

Avances en fisiología reproductiva y biotecnologías en felinos

MV. EDU. DR. EN CS. VET. MARÍA ALEJANDRA, STORNELLI. PROFESOR ASOCIADO.

Reproducción Animal. FCV. UNLP. E-mail: astornel@fcv.unlp.edu.ar.

Si bien la estacionalidad reproductiva de las gatas es ampliamente conocida, en los machos se ha documentado no hace más de una década. En 2006, Reyna y col. sugieren la estacionalidad reproductiva de gatos mantenidos con fotoperiodo natural, al encontrar mayor concentración de espermatozoides testiculares en gatos orquiectomizados en primavera en comparación con el invierno. Un estudio posterior reveló un mayor porcentaje de células epididimales PAS + durante la primavera-verano en comparación con el otoño-invierno. Más tarde, un estudio mostró un mayor porcentaje de células epididimarias claras durante los días con luz creciente en comparación con los días con luz decreciente. Estos hallazgos sugieren una mayor actividad del epidídimo durante la temporada reproductiva de la gata. La estacionalidad en la producción espermática se reafirmó en un estudio de morfología de células testiculares de 240 gatos, mostrando que los gatos orquiectomizados en primavera y verano tenían un mayor porcentaje de túbulos con espermátides con cola y espermátides maduras en comparación con los testículos de machos orquiectomizados durante el otoño y el invierno. Sin embargo, las concentraciones séricas de testosterona no mostraron variación estacional. El fenómeno de fotorrefractoriedad fue descrito en el gato doméstico, demostrándose que origina una producción espermática reducida y pobre calidad seminal. La relación entre la fisiología reproductiva y el fotoperiodo en felinos ha llevado a la administración exógena de melatonina para el control reproductivo. El uso de implantes de melatonina de 18 mg logró suprimir de forma reversible la ocurrencia de celo en la gata, no afectando la fertilidad posterior. En machos un implante subcutáneo de melatonina de 18 mg, produjo disminución de los parámetros seminales, no observándose diferencias en la concentración sérica de testosterona. Se redujo la producción espermática, en forma similar a la disminución en la producción y calidad espermática durante la temporada no reproductiva. En los últimos años, los implantes de deslorelina (4,7 mg) han sido probados para el control reproductivo de gatos machos, logrando reducir la libido, el comportamiento de apareamiento, la marcación urinaria, la concentración de testosterona en suero y el volumen testicular. Impulsados por los estudios realizados sobre calidad seminal y fotoperiodo, recientemente se han realizados trabajos que han mostrado que las concentraciones de colesterol y triglicéridos del plasma seminal se correlacionan con la calidad del semen. Asimismo, se ha identificado una proteína de 14,4 kDa en el plasma seminal de eyaculados de buena calidad no presente en el plasma seminal de eyaculados de mala calidad lo cual podría ser un valioso marcador de calidad seminal. Por otra parte, la proteína de 14.4 kDa podría estar relacionada con la presencia de β -NGF en plasma seminal de gato, factor ya descrito en otras especies de ovuladores inducidos. En relación con estos hallazgos se comunicó el efecto ovulatorio del plasma seminal felino administrado por vía parenteral.

Criopreservación de semen canino

MG. NORMA ESTELA MONACHESI

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, INITRA

En las últimas décadas la reproducción de los animales de compañía ha alcanzado un importante desarrollo en todo el mundo. La inseminación artificial y la criopreservación de semen consisten en biotecnologías que han aportado grandes ventajas a la reproducción en caninos. Esta última tecnología tiene como objetivo la producción de espermatozoides móviles, viables, capaces de fecundar los ovocitos caninos y producir embriones que conduzcan al nacimiento de camadas vivas y sanas en número esperable para la raza. La recolección de semen en caninos se obtiene por manipulación digital, respetando la cadena de reflejos que se ponen de manifiesto en el coito canino. Cuando la fuente de espermatozoides proviene de animales muertos la obtención de los mismos es realizada de la cola del epidídimo. El semen que no va a ser utilizado inmediatamente después de su obtención debe ser sometido a un proceso de dilución y posterior enfriamiento con el fin de prolongar su longevidad. Los diluyentes de semen utilizados para refrigeración protegen las membranas espermáticas de los daños causados por los cambios de temperatura, proveen energía, estabilizan el pH y la presión osmótica. Los períodos de tiempo en los cuales los diluyentes actúan manteniendo la capacidad fecundante son cortos, 4 a 7 días. La temperatura de refrigeración de 4° C ha sido considerada como la elegida para prolongar la longevidad espermática en el semen canino. El proceso de congelado de semen permite su conservación a largo plazo, aunque presenta ciertos inconvenientes. Esta técnica involucra distintas etapas (disminución de temperatura, deshidratación, congelación y descongelación) en cada una de las cuales se producen diferentes daños celulares, viéndose las células sometidas a stress térmico, mecánico, osmótico y oxidativo. Así, en el transcurso del proceso de congelación se produce una pérdida de la movilidad y viabilidad de los espermatozoides, asociada a alteraciones en la composición y permeabilidad de la membrana plasmática y acrosomal y daño mitocondrial. Durante la criopreservación se produce la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Las mismas no sólo son nocivas para la supervivencia celular; sino que también inducen, junto a otros factores, la criocapacitación. Todos estos eventos reducen la sobrevivencia del espermatozoide y su capacidad para interactuar con el tracto reproductivo femenino registrándose bajas tasas de preñez. Es por ello que en la criopreservación se utilizan distintos protocolos de congelación y diluyentes, que tienen como propósito proteger a los espermatozoides de los posibles daños y evitar o reducir la criocapacitación. El congelamiento puede realizarse en congeladores programables o colocando las pajuelas a diferentes distancias del nitrógeno líquido.

Inseminación transcervical en la perra: su aplicación en la clínica reproductiva

TORIGGIA PAULA

Clínica Veterinaria Mapanis. Buenos Aires. Argentina.

En las últimas décadas se han desarrollado nuevas biotecnologías reproductivas de aplicación en caninos domésticos y a su vez, se han investigado y mejorado los protocolos para ampliar su aplicación comercial en esta especie a fin de mejorar la eficiencia de los mismos. La inseminación artificial es una herramienta ampliamente utilizada en la reproducción de hembras de criadero de diversas razas y existen diferentes metodologías para realizar la misma. Algunas de ellas prácticamente utilizadas con fines de investigación por ser más complejas e invasivas como la inseminación intratubárica quirúrgica o la inseminación intrauterina mediante laparotomía. En la clínica reproductiva diaria de caninos, la inseminación intravaginal es el método mayormente utilizado por su practicidad y su fácil implementación. Por otro lado, la inseminación intrauterina no quirúrgica o inseminación transcervical (TCI) es otra técnica utilizada en esta especie en menor medida debido a la necesidad de equipamiento de elevado costo y a la limitante de contar con un profesional con experiencia y habilidad para realizar la misma. Mediante la inseminación transcervical el semen es depositado dentro del útero y es un método utilizado con semen fresco en perras con antecedentes de infertilidad previa, en casos de mala calidad espermática y como técnica de elección con semen criopreservado. El objetivo de esta charla es hablar sobre los distintos usos que se le puede dar a la TCI endoscópica en la clínica reproductiva diaria, así como las diferencias y ventajas de ella con respecto a otros tipos de inseminación artificial en la perra.



.UBA veterinaria
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



Resúmenes Sesión de Reproducción Básica

Estudio del útero del roedor poliovular *Lagostomus maximus* mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía óptica de alta resolución

ACUÑA, F.^{1,2}, CRISTOFOLINI, A.^{2,3}, BARBEITO, C.G.^{1,2}, PORTIANSKY, E.L.^{2,4}, MERKIS, C.^{2,3}, MIGLINO, M.A.⁵ Y FLAMINI, M.A.¹

¹ Laboratorio de Histología y Embriología Descriptiva, Experimental y Comparada, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina; ² CONICET; ³ Área de Microscopía Electrónica, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina; ⁴ Laboratorio de Análisis de Imágenes, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina; ⁵ Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Pablo, Brasil.

La vizcacha de llanura, *Lagostomus maximus*, es un roedor histricomorfo que posee la mayor tasa ovulatoria (200-800 ovocitos/estro) dentro de los mamíferos. Otra característica de la biología reproductiva de esta especie es la poli-implantación de 10-12 blastocistos, de los cuales se resorben aquellos con localización craneal y media en los cuernos uterinos, mientras que los caudales crecen y se desarrollan. Tanto la poliovulación como la poli-implantación y muerte embrionaria han generado el interés por su análisis. En los estudios iniciales, no se observaron diferencias morfológicas a partir de las cuales se pudiera inferir la causa de la muerte embrionaria, la que se inicia a los 26 y extiende hasta los 70 días post-coito, ni agentes etiológicos exógenos. Recientemente, se determinó que los cuernos uterinos presentan variaciones estructurales en sentido craneocaudal, debido a diferencias en el espesor de la pared uterina y sus tunicas, y las áreas glandular y vascular, mediante estudios ultrasonográficos, morfológicos y morfométricos. En este trabajo evaluamos las características de cuernos uterinos de vizcachas sin preñez con microscopía electrónica de barrido (MEB) y óptica de alta resolución (MOAR). Se utilizaron ambos cuernos de una hembra sin gestación. Secciones transversales al eje mayor de los cuernos uterinos (izquierdo=MEB; derecho=MOAR) en las regiones craneal, media, y caudal, fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5% en solución tamponada pH 7,2-7,4, deshidratadas y tratadas según el protocolo de cada microscopía. Para SEM, se realizó punto crítico, metalizado y observación con diferentes magnificaciones. En cambio, para MOAR, se obtuvieron cortes semifinos de 0,25 µm de espesor que fueron coloreados con azul de toluidina y observados con 1000 aumentos. En cada sección y mediante MEB, se observaron las tres tunicas y sus características histológicas. La comparación entre las tres secciones evidenció diferencias en el espesor de la pared uterina, las glándulas endometriales y los vasos sanguíneos miometriales en sentido craneocaudal. Además, se encontraron linfocitos endometriales e histotrofo en el lumen glandular. Con MOAR se observaron detalles de los diferentes tejidos del útero, como así también diferencias entre los segmentos analizados. Estos resultados, corroboran los reportados en estudios previos, y refuerzan la hipótesis de la heterogeneidad uterina y su relación con el origen de la muerte diferencial de la especie. Estas conclusiones, junto a las obtenidas previamente por nuestro grupo de investigación y combinadas a las de otros, permitirán profundizar estudios y comprender la muerte embrionaria temprana y fisiológica de la especie. Si bien este tipo de muerte presenta características similares a la de otros mamíferos, debido a que es un proceso conservado, y a la de modelos experimentales como la rata y ratona, la masividad y sectorización son exclusivas de la especie; por lo tanto, hacen de ella un modelo no convencional único para estudiar muerte embrionaria.

Evaluación de la fragmentación del ADN mediante la prueba de dispersión de la cromatina espermática en caninos y felinos

ALLERA, C.¹, MONACHESI, N.¹, GALLELLI, M.F.^{1,2}, MONCALVO, E.¹ Y CARRETERO, M.I.^{1,2}

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Cs. Veterinarias, INITRA, Cátedra de Teriogenología. ² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina.

Existe un creciente interés en incluir la evaluación del ADN espermático dentro del análisis de rutina de calidad seminal, ya que se ha reportado que el grado de daño del material genético está relacionado con la fertilidad. Si bien existen kits comerciales para realizar la Prueba de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD: Sperm Chromatin Dispersion assay) en perros y gatos, los mismos no se encuentran disponibles en todos los países y su costo es elevado. La prueba original de SCD consiste en el armado de diferentes soluciones de lisis a partir de insumos de laboratorio, siendo efectiva para evaluar la fragmentación del ADN espermático en equino, llama y humano. El objetivo de este estudio fue evaluar si el protocolo original de SCD utilizado en otras especies es de utilidad para evaluar la fragmentación del ADN en espermatozoides de perro y gato.

Para este fin, se utilizaron perros (n=7, r=2) y gatos (n=10, r=1) machos, de $3,9 \pm 0,7$ años, de diferentes razas, clínica y reproductivamente sanos. En los perros las muestras de semen fueron obtenidas mediante masaje manual, y en los gatos mediante eyaculación farmacológica (CICUAL N°2014/24). Se evaluaron los siguientes parámetros seminales de rutina: volumen, motilidad progresiva, concentración y morfología espermática. La prueba de SCD se realizó en base al protocolo implementado previamente en otras especies, modificado para su uso en llamas. Teniendo en cuenta estudios previos se utilizó una concentración distinta de 2-mercaptoetanol (ME) para la solución de lisis: 2,5% en gatos y 5% en perros. La concentración de 2ME elegida en cada caso fue aquella que permitió una mejor visualización de la dispersión del ADN, preservando el "core" (núcleo residual). Como control de fragmentación del ADN se utilizó la incubación de una alícuota de semen con NaOH 0.3 M durante 15 minutos. Se evaluaron 200 espermatozoides por muestra utilizando microscopio óptico (1000X). Se realizó un análisis descriptivo de los datos para determinar los porcentajes de los diferentes patrones de dispersión del ADN; considerando lo reportado previamente en otras especies. Tanto en perros como en gatos el análisis de los parámetros de rutina fue normal de acuerdo a lo descrito para cada especie. Los patrones de dispersión del ADN observados en ambas especies fueron: 1) núcleos con halos grandes de dispersión de la cromatina, 2) núcleos con halos medianos, 3) núcleos con halos pequeños y 4) núcleos sin halo; considerándose normales (ADN intacto) sólo los dos primeros patrones. Los porcentajes de espermatozoides con ADN intacto en las muestras fueron $97,4 \pm 2,7$ % y $92,2 \pm 9,3$ % para perros y gatos, respectivamente. En ambas especies, la incubación de las muestras con NaOH produjo un 100% de espermatozoides con ADN fragmentado. En conclusión, el protocolo de SCD implementado previamente en otras especies es de utilidad para evaluar la fragmentación del ADN en perros y gatos. Por lo tanto, este método sería una alternativa al uso de kits comerciales y además aporta el beneficio de trabajar con un control de fragmentación.

Efecto del uso combinado de manganeso, selenio, cobre y zinc sobre el desarrollo preimplantacional bovino y la calidad embrionaria *in vitro*

ANCHORDOQUY, J.M.; FARNETANO, N.; CARRANZA, A.; NIKOLOFF, N.; FABRA, M.; FURNUS, C Y ANCHORDOQUY, J.P.

Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N Dulout", IGEVET (UNLP-CONICET), Facultad de Ciencias Veterinarias - UNLP, Calle 60 118, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Previamente hemos demostrado que el agregado de cobre (Cu), manganeso (Mn), selenio (Se) o zinc (Zn) durante la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos bovinos incrementa su capacidad de desarrollo posterior hasta el estadio de blastocisto. Sin embargo, aún no se ha estudiado cuál es el efecto de la suplementación combinada de estos minerales durante la MIV. El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar el efecto de la suplementación con Cu, Mn, Se y Zn durante la MIV sobre la tasa de clivaje y de blastocisto y el número de células, el contenido de lípido y de especies reactivas del oxígeno (ERO) en el blastocisto bovino. Para tal fin, se utilizaron complejos ovocito-cúmulus (COC) obtenidos a partir de ovarios de frigorífico. Los COC se maduraron *in vitro* durante 24 hs a 39°C en atmósfera gaseada al 5% de CO₂ en medio TCM 199 suplementado con 10 % de SFB. En cada réplica (n=4), los COC fueron madurados en dos condiciones; 1) medio de MIV sin el agregado de minerales (grupo control), y 2) medio de MIV suplementado con 600 ng/mL Cu + 6 ng/mL Mn + 100 ng/mL Se + 400 ng/mL Zn (grupo minerales). Luego de la MIV los ovocitos fueron fecundados *in vitro* en medio Fert-Talp. Los presuntos cigotos se cultivaron en medio SOF modificado durante 8 días. La tasa de clivaje se evaluó a las 48 horas luego de la fecundación *in vitro* y la tasa de blastocistos en el día 8 de cultivo. El número total de células por embrión se evaluó mediante la tinción de Hoechst 33342. El contenido de lípidos y ERO se realizó mediante la técnica de Nile Red y H₂DCFDA, respectivamente. En todos los casos se utilizaron blastocistos expandidos. La tasa de clivaje y blastocisto fue analizada mediante regresión logística. El número de células y el contenido de lípidos y ERO (ambos estimados como unidades de intensidad de fluorescencia) se analizaron mediante un modelo lineal. Se consideró significativa a un valor de $p \leq 0,05$. Los resultados demostraron que el agregado combinado de Mn, Se, Cu y Zn al medio de MIV: a) no modificó la tasa de clivaje (90,61 vs 94,30% para control y minerales, respectivamente); b) incrementó la tasa de blastocistos (34,25 vs 50,60% para control y minerales, respectivamente), c) incrementó el número de células por embrión ($110,8 \pm 9,7$ vs $187,5 \pm 10,5$ para control y minerales, respectivamente); d) disminuyó el contenido de lípidos ($54,72 \pm 2,9$ vs $45,17 \pm 3,0$ para control y minerales, respectivamente) y e) redujo las ERO del embrión ($48,63 \pm 5,3$ vs $23,83 \pm 4,1$ para control y minerales, respectivamente). En conclusión, la suplementación con Cu, Mn, Se y Zn durante la MIV mejoró el desarrollo preimplantacional y la calidad embrionaria en el bovino.

Expresión y distribución de caderina E y N en la mucosa oviductal y de la papila de alpacas (*Vicugna pacos*) púberes, prepúberes y adultas pre y post ovulatorias inducidas mediante servicio natural

ANGIONO, G.M.^{1,2}; REATEGUI, J.E.⁴; PACHECO, V.⁴; CHIRINOS, J.⁴; PINTOS, R.⁴; BOVIEZ, J.D.^{1,2,3}; APICHELA, S.A.^{5,6}; FERNANDEZ FERNANDEZ F.⁴; OLIVERA MOROCHO, L.⁷ Y LOMBARDO, D.M.^{1,2,3}

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Histología y Embriología; ² Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Buenos Aires, Argentina; Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Buenos Aires, Argentina; ³ Consejo Nacional de Investigaciones científicas y Técnicas (CONICET) Argentina; ⁴ Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú; ⁵ INSIBIO CONICET-UNT; ⁶ UNT, Facultad de Agronomía y Zootecnia. Tucumán, Argentina. ⁷ Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia y distribución de caderina E y N en la mucosa oviductal y de la papila de alpacas (*Vicugna pacos*) prepúberes, púberes, y de hembras adultas pre y post ovulatorias inducidas mediante servicio natural. Los muestreos se realizaron en hembras de alpaca no preñadas, ni en lactancia, de mataderos habilitados de las localidades de Ayaviri y Nuñoa y del centro experimental de la Universidad del Altiplano, Puno, Perú. Se tomaron muestras de oviducto y papila de hembras menores de 2 años, sin signos de haber estado preñadas: prepúberes (PreP; ovarios pequeños con escasos folículos observables macroscópicamente, sin cuerpo lúteo; n=2) y púberes (Pub; ovarios pequeños con gran cantidad de folículos observables macroscópicamente, presencia de cuerpo lúteo; n=2). Por otro lado se realizó seguimiento ecográfico de hembras de alpaca adultas (ecografía transrectal en tiempo real; ecógrafo con escáner modo B; transductor lineal de 5 MHz). Se seleccionaron hembras con folículo de 7-10 mm en crecimiento o meseta, se indujo la ovulación mediante servicio natural con machos probados y luego se realizó la toma de muestra: preovulatorias (Preov; 12 y 24 horas de la inducción; n=2) y postovulatoria (Postov; 36 a 48 horas de la inducción, con ovulación confirmada; n=2). Las muestras fueron fijadas en formol al 10% bufferado, luego se seccionaron y procesaron para inmunohistoquímica (IHQ): ampolla, istmo, unión útero-tubal y papila. Se realizó la técnica de inmunohistoquímica indirecta mediante el método estrepto-avidina-biotina (LSAB), kit de DAKO revelado por el cromógeno diaminobencidina (DAB). Se utilizaron anticuerpos policlonales anti caderina E (sc-7870) y anti caderina N (sc-7939) Santa Cruz; dilución de trabajo de ambas: 1:25. Se realizó un análisis histológico descriptivo de las marcaciones (microscopio de campo claro Leica DM 4000B; captura digital de imágenes con cámara C380X y software LASZ-Leica Co). Durante el análisis, se observó marca positiva para caderinas E y N en todos los segmentos y en todos los grupos en estudio, evidenciando diferencias en el patrón de marcación entre hembras prepúberes, púberes y adultas (pre y postovulación). En estas se observó predominio en la marcación de grupos celulares en los sacos ciegos y en el epitelio de revestimiento, con variaciones en la uniformidad de marcación entre los grupos estudiados. Dichas variaciones podrían estar relacionadas a cambios funcionales de la mucosa oviductal y de la papila durante el desarrollo y entre estadios reproductivos. Sería necesario profundizar los estudios ampliando el tamaño muestral y las repeticiones para un mejor análisis.

Expresión y distribución de receptores de la hormona liberadora de gonadotropina y estrógeno en la mucosa oviductal y la papila de alpacas (*Vicugna pacos*) púberes, prepúberes y adultas pre y post ovulatorias inducidas mediante servicio natural

ANGIONO, G.M.^{1,2}; REATEGUI, J.E.⁴; PACHECO, V.⁴; CHIRINOS, J.⁴; PINTOS, R.⁴; BOVIEZ, J.D.^{1,2,3}; APICHELA, S.A.⁵ Y FERNANDEZ FERNANDEZ F.⁴; OLIVERA MOROCHO, L.⁷ Y LOMBARDO, D.M.^{1,2,3}

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Histología y Embriología; ² Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Buenos Aires, Argentina; Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Buenos Aires, Argentina; ³ Consejo Nacional de Investigaciones científicas y Técnicas (CONICET) Argentina; ⁴ Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú; ⁵ INSIBIO CONICET-UNT; ⁶ UNT, Facultad de Agronomía y Zootecnia. Tucumán, Argentina; ⁷ Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la expresión y distribución de receptores de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRHr) y de estrógeno (ER) en la mucosa oviductal y la papila de alpacas (*Vicugna pacos*) prepúberes, púberes y adultas pre y post ovulatorias inducidas mediante servicio natural. Los muestreos se realizaron en hembras de alpaca no preñadas, ni en lactancia, de mataderos habilitados de las localidades de Ayaviri y Nuñoa y del centro experimental de la Universidad del Altiplano, Puno, Perú. Se tomaron muestras de oviducto y papila de hembras menores de 2 años, sin signos de haber estado preñadas: prepúberes (PreP; ovarios pequeños con escasos folículos observables macroscópicamente, sin cuerpo lúteo; n=2) y púberes (Pu; ovarios pequeños con gran cantidad de folículos observables macroscópicamente, presencia de cuerpo lúteo; n=2). A su vez, se realizó seguimiento ecográfico de alpacas adultas (ecografía transrectal en tiempo real; ecógrafo con escáner modo B; transductor lineal de 5 MHz). Se seleccionaron hembras con folículo de 7-10 mm en crecimiento o meseta, a las cuales se indujo la ovulación mediante servicio natural con machos probados y luego se realizó la toma de muestra: preovulatorias (Preov; 12 y 24 horas de la inducción; n=2) y postovulatoria (Postov; 36 a 48 horas de la inducción, con ovulación confirmada; n=2). Las muestras fueron fijadas en formol al 10% bufferado, luego se seccionaron y procesaron para inmunohistoquímica (IHQ): ampolla, istmo, unión útero-tubárica y papila. Se realizó la técnica de inmunohistoquímica indirecta mediante el método estrepto-avidina-biotina (LSAB), kit de DAKO revelado por el cromógeno diaminobencidina (DAB). Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-GnRHr (Abcam, ab220196, dilución de trabajo:1:125) y anti-ER α (Dako, IR084, dilución de trabajo 1:300). Se realizó un análisis histológico descriptivo de las marcaciones (microscopio de campo claro Leica DM 4000B; captura digital de imágenes con cámara C380X y software LASZ-Leica Co). En el análisis se observó marca positiva para ambos anticuerpos en los 4 segmentos y en todos los grupos estudiados, siendo frecuente la marcación a nivel de los sacos ciegos. En el epitelio de revestimiento predominó la marca en grupos celulares y células aisladas. Respecto a ER α , se observó marcación a nivel de los núcleos de la muscular en todos los segmentos, así como en el tejido muscular presente en las trabéculas de la papila y la unión útero-tubárica. Dichos resultados podrían estar relacionados a funciones regulatorias de las hormonas GnRH y estrógenos sobre el oviducto y la papila de alpacas en desarrollo y adultas, sin embargo, sería necesario profundizar los estudios para corroborar las variaciones mencionadas.

Expresión del receptor a oxitocina y de la ciclooxygenasa-2 en carcinomas mamarios caninos

BENAVENTE, M.A.¹, HERRERA, M.F.², ABA, M.A.¹ Y BIANCHI, C.P.¹.

¹ Área de Endocrinología, Facultad de Ciencias Veterinarias, CIVETAN, UNCPBA, Tandil.² Área de Histología, Facultad de Ciencias Veterinarias, CIVETAN, UNCPBA, Tandil.

Los tumores mamarios son frecuentemente diagnosticados en perras enteras. Las principales hormonas involucradas en su desarrollo son los estrógenos y la progesterona, y la expresión de sus receptores en el tejido mamario tumoral está bien documentada. La demostración de la presencia del Receptor a Oxitocina (ROT) en líneas celulares de cáncer mamario y en carcinomas primarios de mama humanos sugiere que esta hormona, mediante la interacción con su receptor, estaría involucrada en la génesis y/o la progresión de esta neoplasia. La expresión del ROT se reportó recientemente en tumores mamarios caninos (TMC) benignos y malignos. Por otro lado, se sabe que la Ciclooxygenasa-2 (COX-2), enzima clave en la síntesis de prostaglandinas, está altamente expresada en varios tumores malignos. Las prostaglandinas participan en varias etapas de la progresión del cáncer estimulando la angiogénesis, la proliferación y la resistencia a la apoptosis en las células tumorales. En la perra, está demostrado que una alta expresión de la COX-2 en el cáncer mamario se relaciona con una mayor agresividad del tumor, mayor probabilidad de metástasis y peor pronóstico. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión del ROT en TMC malignos y analizar su asociación con el tipo histológico, el Grado Histológico de Malignidad (GHM) y la expresión de COX-2. Se analizaron 18 muestras de tejido mamario neoplásico maligno, de los siguientes tipos histológicos: carcinomas túbulo-papilares (n=7), carcinomas sólidos (n=5) y carcinomas complejos (n=6). Las muestras fueron procesadas usando la técnica de inmunohistoquímica avidina-biotina-peroxidasa, y se utilizó un anticuerpo primario específico para el ROT (policlonal, A-16, Santa Cruz Biotech) y uno para COX-2 (monoclonal, Clone 229, Zymed Laboratories, Inc). El análisis de imagen se realizó por dos observadores independientes y se analizaron 10 campos por muestra con un aumento de 1000X. Se utilizó el Score de Allred (escala de 0 a 8), que tiene en cuenta el porcentaje de células positivas y la intensidad de tinción. Las muestras con un Total Score (TS) > 3 se consideraron positivas. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Infostat y se realizó un ANOVA y post Test de Tukey. Todas las neoplasias malignas analizadas fueron positivas para la expresión del ROT (100%), y se observó un mayor TS en los carcinomas complejos comparado con los carcinomas túbulo-papilares y los carcinomas sólidos ($P = 0.01$). Asimismo, aquellos tumores de GHM I presentaron un mayor TS en comparación con los de GHM III ($P = 0.02$). Con respecto a la COX-2, 17 de las 18 muestras fueron positivas para su expresión (94,4%) y no se observaron diferencias significativas según el tipo histológico o el GHM. Dado que el 100% de las muestras fueron positivas para el ROT, no se pudo establecer una asociación entre este receptor y la expresión de COX-2. La mayor expresión del ROT en los carcinomas complejos y en tumores de GHM I indicaría que su expresión está asociada a una menor malignidad tumoral.

Efecto de la oxitocina sobre la funcionalidad del cuerpo lúteo en llamas

BIANCHI, C.P.^{1,2}; GALLELLI, M.F.³; BENAVENTE, M.A.^{1,2} Y ABA, M.A.^{1,2}

¹UNCPBA, Facultad de Ciencias Veterinarias, Tandil, Buenos Aires, Argentina. ²CONICET, CIVETAN. ³Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal.

La oxitocina es la hormona clave para inducir la liberación pulsátil de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) hacia el final del ciclo estral en varias especies de animales domésticos, ocurriendo pulsos de oxitocina en forma concomitante con la liberación de $PGF_{2\alpha}$. Un estudio realizado en camellos ha reportado que la administración de una inyección de oxitocina al momento de la luteólisis no es eficaz para provocar una mayor liberación de $PGF_{2\alpha}$. Por otro lado, en llamas no se han observado cambios en la expresión endometrial del receptor a oxitocina durante la fase luteal. Sin embargo, no se han realizado estudios que evalúen si inyecciones repetidas de oxitocina logran adelantar el proceso de luteólisis en llamas. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la administración endovenosa de oxitocina durante la fase luteal tardía en esta especie. Se utilizaron 10 hembras, las cuales fueron ecografiadas diariamente hasta la detección de un folículo ≥ 8 mm, momento en que se les indujo la ovulación con una dosis de Buserelina (8,4 μ g, Receptal®, Intervet, Argentina). Posteriormente, se dividieron aleatoriamente en dos grupos: un grupo control (GC; n=5), que no recibió ningún tratamiento adicional y un grupo tratado (GT; n=5) el cual recibió una inyección endovenosa de oxitocina (40 UI, Oxitocina, Tecnofarm®, Argentina) cada 12 h desde el día 6 hasta el día 8 post inducción de la ovulación. Diariamente, se obtuvieron muestras de sangre desde el día 0 hasta el día 12 post inyección de Buserelina para la posterior determinación de las concentraciones plasmáticas de progesterona por RIA. El análisis estadístico se realizó a través del programa InfoStat, el tamaño folicular al inicio del tratamiento se comparó a través de un Test t de Student y las concentraciones plasmáticas de progesterona entre ambos grupos a través del Test Kruskal-Wallis. El diámetro promedio del folículo mayor al momento de la inyección de Buserelina fue similar entre los grupos (GC: $8,9 \pm 0,2$ y GT: $8,9 \pm 0,3$ mm; $P = 0,23$). La ovulación se registró en el 100 % de los animales. En los animales del GC, las concentraciones plasmáticas de progesterona comenzaron a elevarse al día 4, alcanzaron un pico entre los días 8 y 9 y se observaron nuevamente concentraciones basales entre los días 11 y 12 post inducción de la ovulación. En el grupo tratado el patrón de concentraciones plasmáticas de progesterona fue similar al del grupo control, no evidenciándose un efecto del tratamiento ($P = 0,64$). Se concluyó que inyecciones de oxitocina cada 12 horas desde el día 6 al día 8 post inducción de la ovulación no es capaces de inducir una luteólisis prematura o una disminución en las concentraciones plasmáticas de progesterona, no pudiéndose establecer el rol de dicha hormona en el inicio de la descarga de $PGF_{2\alpha}$ durante el proceso de luteólisis.

Comparison of ultrastructure damage in feline sperm using vitrification and conventional freezing techniques

BONAURA, M.C.¹; JURADO, S.³ Y WILLIAMS, S.I.¹

¹ Department and Service of Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Sciences, National University of La Plata, La Plata, Argentina; ³ Department and Service of Microscopy Electronic, Faculty of Veterinary Sciences, National University of La Plata, La Plata, Argentina.

Reproductive research in the domestic cat may be used as a model for wild felids and to improve the tools for assisted reproductive techniques involved in conservation programs of endangered animals. Traditional cryopreservation is not the only method used to preserve spermatozoa for a long-term. Vitrification is an ultra-rapid cryopreservation that may be an alternative to preserve spermatozoa. Moreover, spermatozoa have a particular morphology, function and metabolic characteristics that need of special conditions to cryopreservation. Sperm ultrastructure evaluation allows estimate the efficacy of the techniques used to cryopreserve semen. The aim of this study was to compare the damages to sperm caused by vitrification and the conventional freezing with nitrogen vapors. Seventy-four (n=74) cats short-hair mixed breed male cats, aged between 2 and 3 years, and weighing between 3 and 5kg were used. After bilateral orchiectomy, sperm samples were processed and cryopreserved by conventional freezing (CF) or vitrification (V). The epididymal sperm (ES) raw and cryopreserved were processed and observed in a transmission electron microscope. The results were analyzed with SAS®. The experiment was approved of the IACUC of FCV UNLP. A significantly higher percentage of ES cryopreserved showed alterations than raw ES samples for both techniques (79.1 ± 7.4 vs. 52.43 ± 2.94; 78.1 ± 6.25 vs. 62.69 ± 2.87 V; 58.8 ± 5.66 vs. 19.11 ± 3.44; 83.5 ± 7.83 vs. 57.75 ± 3.09 CF; heads and tails respectively; P < 0,05). The percentage of normal heads was greater after V than CF (52.43 ± 2.94 vs. 19.11 ± 3.44, p < 0.05). Our results show the vitrification technique returned a greater number of normal sperm compared to CF. This study complements other works carried out in feline sperm for this research group. This is the first research to evaluate the ultrastructure in ES vitrified in domestic cat.

Influencia de la autofagia y la apoptosis en el control de la muerte/sobrevida de las células germinales, foliculares y luteales en el ovario adulto de *Lagostomus maximus* (mammalia-rodentia) a lo largo de la preñez.

CARAM, D.¹; INSERRA, P.^{1,2}; VITULLO, A.^{1,2} Y LEOPARDO, N.^{1,2}

¹ Centro de Estudios Biomédicos Básicos, Aplicados y Desarrollo (CEBBAD) - Universidad Miamónides. ² CONICET

La pérdida de células germinales (atresia folicular) y la regresión del cuerpo lúteo (CL) (luteólisis) se han asociado principalmente a la apoptosis, aunque otros mecanismos de muerte celular, como la autofagia, también están involucrados. La vizcacha de las llanuras, *Lagostomus maximus* (*L.m.*), presenta disminuida o suprimida la atresia folicular mediada por apoptosis, tanto en el ovario fetal como en el adulto, y mantiene un número de células germinales casi constante desde el nacimiento hasta la pubertad. Recientemente hemos demostrado que en el ovario adulto de hembras no preñadas los folículos alterados y los cuerpos lúteos remanentes son eliminados por autofagia, proporcionando de esa manera el espacio necesario para la maduración de los folículos primordiales que ingresan continuamente al conjunto folicular en crecimiento para sostener la poliovulación. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue analizar las bases celulares que median la autofagia y la apoptosis en el oocito de los folículos en diferentes estadios de maduración y en los cuerpos lúteos, tanto funcionales como en regresión, en el ovario adulto de *L.m.* durante la gestación. Para ello, se analizó la expresión de las proteínas autofágicas BECLINA1, LC3BI-II, LAMP1 y apoptótica CASPASA 3-ACTIVA por medio de inmunohistoquímica y microscopía confocal. Se cuantificó el número de folículos en los distintos estadios foliculares y cuerpos lúteos que expresan los marcadores autofágicos mencionados. Los niveles de expresión proteica de BECLINA1, LC3BI/II, LAMP1 y CASPASA 3-ACTIVA fueron evaluados por western blot. Se utilizó el programa GradhPad Prism. Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar. Para comparar las medias de más de dos grupos de datos se empleó un análisis de la varianza de (ANOVA) con un post test de Neuman-Keuls para comparaciones múltiples. En todos los casos, valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Se utilizaron ovarios de hembras preñadas al inicio ($n=7$), a la mitad ($n=7$) y al final ($n=7$) de la gestación. Los resultados indicaron expresión de BECLINA ($<18 \pm 2\%$, $p < 0,05$), LC3BI-II ($>60 \pm 4\%$, $p < 0,05$), LAMP1 ($<72 \pm 3\%$, $p < 0,05$) y CASPASA 3-ACTIVA ($>40 \pm 5\%$, $p < 0,05$) en los folículos atrésicos a lo largo de toda la preñez. Por otro lado, los folículos normales e inmaduros mostraron expresión en menor proporción de BECLINA ($<18 \pm 2\%$, $p < 0,05$), LC3BI-II ($>60 \pm 4\%$, $p < 0,05$), LAMP1 ($<72 \pm 3\%$, $p < 0,05$) y CASPASA 3-ACTIVA ($<30 \pm 5\%$, $p < 0,05$) en todos los estadios analizados, tanto en el oocito como en las células de la granulosa y tecales. En cuanto a los cuerpos lúteos sanos y en regresión, se observó expresión de BECLINA1 ($>90 \pm 0,7\%$, $p < 0,05$), LC3BI/II ($>93 \pm 0,9\%$, $p < 0,05$) y LAMP1 ($>92 \pm 0,6\%$, $p < 0,05$) durante la fase tardía de la preñez, aunque fueron positivas durante toda la gestación. Por el contrario, la expresión de CASPASA 3-ACTIVA fue leve/nula ($<10 \pm 0,6\%$) en todas las estructuras analizadas y sin diferencias significativas entre los grupos. Los niveles proteicos de BECLINA1, LC3B I-II y LAMP1 evaluados por WB aumentaron significativamente desde la mitad hasta el final de gestación, mientras que los niveles de CASPASA 3-ACTIVA fueron significativamente menores a lo largo de toda la preñez. Estos resultados sugieren un mecanismo dual de la autofagia. Por un lado, actuaría como un mecanismo de muerte celular, que junto con la apoptosis se induciría principalmente en folículos atrésicos. A su vez, la autofagia contribuiría a la homeostasis del tejido, a la descomposición y eventual reciclado de las macromoléculas para otorgar la energía necesaria a los folículos en desarrollo y a los cuerpos lúteos hasta finales de la gestación, para luego contribuir a la luteólisis hacia finales de la misma.

Perfil proteómico de cuerno uterino izquierdo y derecho de alpacas

CASTRO-GONZÁLEZ, X.A.¹; APICHELA, S.A.^{1,2} Y ARGANARAZ, M.E.^{1,2}

¹ Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (CONICET-UNT), ² Universidad Nacional de Tucumán (UNT)

Una particularidad reproductiva de los camélidos sudamericanos es que más del 90% de las gestaciones se establecen en el cuerno uterino izquierdo (CUI), por lo que los embriones que se originan a partir de la ovulación del ovario derecho tienen que migrar al cuerno uterino contralateral (CUI) para implantarse y sobrevivir. Aún se desconoce el mecanismo molecular de este patrón de implantación embrionaria único. Por lo tanto, nuestro objetivo fue caracterizar el proteoma de CUI y CUD de alpaca mediante espectrometría de masa y la cuantificación "label free" de la abundancia relativa de las proteínas identificadas. Se realizó una disrupción física del endometrio de CUI (n=3) y CUD (n=3); 25 µg de la fracción soluble (SDS 4%) se separaron en PAGE al 5-15%, cada calle se dividió en 10 fragmentos, los cuales se digirieron con tripsina. Las digestiones se acidificaron y se purificaron con resina POROS 20 R2 y acetonitrilo. Finalmente, se desecaron, se re-suspendieron en ácido fórmico al 0,1%, y se analizaron en un equipo Q Exactive Plus Orbitrap Mass Spectrometer. Los datos se convirtieron al formato Mascot y se analizaron con el software MS Data Miner. La abundancia relativa de las proteínas se calculó empleando el índice emPAI (exponentially modified protein abundance index). La diferencia estadística de la abundancia de cada proteína entre CUI y CUD se analizó con el test de Student apareado ($p < 0,05$). Mediante la base de datos "Gene Ontology", se les asignó a las proteínas diferenciales su función, localización celular y procesos biológicos. También se usó el software "Cytoscape" para realizar redes de interacción de proteínas. En ambos CUs se identificó un total de 2840 proteínas. De ese total, se seleccionaron 1364 proteínas, las cuales se detectaron por triplicado en al menos uno de los CUs. De ese total, 381 proteínas se expresaron sólo en el CUI. Las proteínas mayoritarias se clasificaron como enzimas (39%), proteínas del citoesqueleto (12%), transportadores de membrana (7,2%), proteínas del metabolismo de ácidos nucleicos (7,2%) y factores de la traducción (7,2%). En el caso del CUD, se expresaron 143 proteínas únicas, el grupo más abundante también corresponde a proteínas con actividad enzimática (29,5%), seguido por proteínas que intervienen en la traducción (10,3%), proteínas del metabolismo de ácidos nucleicos (9%) y reguladores de proteínas de unión (9%). Estos resultados sugieren que existen diferencias a nivel molecular entre CUI y CUD de alpacas y sientan las bases para estudios más exhaustivos que ayuden a desentrañar el proceso de implantación embrionaria diferencial durante la preñez temprana de los camélidos.

Efecto de la L-carnitina sobre la actividad mitocondrial y el glutatión total de ovocitos porcinos madurados *in vitro*

CRUZANS, P.R.²; LORENZO, M.S.^{1,2}; LUCHETTI, C.G.^{1,2}; TEPLITZ, G.M.^{1,2}; CAROU, M.C.² Y LOMBARDO, D.M.^{1,2}

¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Buenos Aires, Argentina. ² Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Cátedra de Histología y Embriología. Buenos Aires, Argentina

La L-carnitina (LC) desempeña un papel importante en el catabolismo de los lípidos y posee actividad antioxidante. Resultados previos concluyeron que bajas concentraciones de LC en el medio de maduración *in vitro* disminuye el nivel intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la cantidad intracelular de lípidos de los ovocitos porcinos respecto al control, sin afectar el porcentaje de maduración nuclear. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del agregado de distintas concentraciones de LC al medio de maduración *in vitro* sobre la actividad mitocondrial y el glutatión total de los ovocitos. Los complejos *cumulus*-ovocito (COC) se obtuvieron por aspiración folicular de ovarios de cerdas de faena. Los COC se maduraron *in vitro* sin LC (control) o con distintas concentraciones de LC (0,6, 1,25 y 2,5 mg/mL) en el medio de maduración (TCM-199 suplementado) por 44 h a 39°C y 5% de CO₂. Además, durante las primeras 22 h se agregó AMPc y hMG. Para medir la actividad mitocondrial los ovocitos fueron denudados y teñidos con Mitotraker Green por 45 min. Se tomaron imágenes por microscopio de fluorescencia y se midió la intensidad de fluorescencia de Mitotraker usando la escala media de grises en el software Image J. Los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias (UA) como el promedio de la intensidad de fluorescencia de todas las muestras dentro de un grupo. Para la medición del glutatión total, se colocaron entre 25 y 30 ovocitos por tubo (10 tubos por grupo), se homogeneizaron en PBS sobre hielo y se centrifugaron a 4500 g. Los sobrenadantes se almacenaron a -80 °C hasta su uso. El glutatión total se midió mediante un ensayo colorimétrico adaptado a microplacas de 96 pocillos. Se observó una diferencia significativa en la actividad mitocondrial entre el control (UA=18,28 ± 0,09, n= 199) y la concentración de 0,6 mg/mL de LC (UA=16,53 ± 0,09, n=206). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de 1,25 y 2,5 mg/mL de LC (UA= 16,73 ± 0,09, n= 202; UA= 19,01 ± 0,11, n= 191 respectivamente) y los grupos restantes (test de Kruskal-Wallis, $p= 0,0032$). No se observaron diferencias significativas en el glutatión total entre el control y las distintas concentraciones de LC (Control= 0,93 ± 0,04 pmol/ovocito; LC 0,6= 0,88 ± 0,03 pmol/ovocito; LC 1,25= 0,78 ± 0,05 pmol/ovocito; LC 2,5= 0,76 ± 0,04 pmol/ovocito; ANOVA). Concluimos que el agregado de 0,6 mg/mL de LC en el medio de maduración *in vitro* disminuye la actividad mitocondrial y la cantidad intracelular de lípidos de los ovocitos respecto al control, manteniendo los porcentajes de maduración nuclear y el glutatión total, disminuyendo el nivel de especies reactivas de oxígeno. Las mitocondrias de los ovocitos son necesarias para mantener el desarrollo embrionario siendo la mayor fuente de ATP durante el periodo embrionario preimplantacional, por lo que un menor desgaste mitocondrial podría favorecer el desarrollo embrionario.

Principales aspectos histológicos de la placenta branquial en el teleósteo vivíparo *Jenynsia lineata*

DI CESARE, L.^{1,3}; MONTES, M.M.^{2,3}; PLAUL, S.E.¹ Y BARBEITO, C.G.^{1,3}

¹Laboratorio de Histología y Embriología Descriptiva, Experimental y Comparada (LHYEDEC), Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata (UNLP). ²Centro de Estudios Parasitológicos y Vectores (CEPAVE), UNLP. ³CONICET

En los teleósteos vivíparos una de las formas de proporcionar nutrientes a los embriones es la matrotrofia, dentro de la cual existen diferentes especializaciones en la formación del contacto materno-embrionario. Una de las características de estos peces es la ausencia de oviductos, por lo tanto, la gestación es intraovárica. *Jenynsia lineata* (Cyprinodontiformes, Anablepidae) es un pez autóctono que presenta gestación intraovárica intraluminal; esta especie dulceaquícola es de amplia distribución en todo el país. El objetivo de este trabajo fue analizar y describir el contacto materno-embrionario involucrado en la formación de la placenta branquial. Para ello, diez ovarios de *J. lineata*, 5 en gestación temprana y 5 en gestación avanzada, fueron fijados en formol bufferado al 10% y procesados mediante la técnica histológica tradicional de inclusión en parafina. Se efectuaron cortes de 3-4 μm , que posteriormente se colorearon con Hematoxilina-Eosina, tricrómico de Masson, ácido peryódico de Schiff (PAS) y azul alcian pH 2,5/PAS (AA/PAS). El ovario de *J. lineata* es un órgano hueco, impar, histológicamente formado por una túnica mucosa-submucosa, una túnica muscular delgada y una túnica serosa. La túnica mucosa se caracterizó por presentar hacia el lumen del órgano numerosos pliegues irregulares denominados laminillas ováricas. Estos pliegues se hallaban revestidos por un epitelio cúbico simple que varió en altura según las distintas regiones del ovario y resultó negativo a la coloración de AA/PAS. En este epitelio se pudo identificar dos tipos celulares, las células secretoras y las células germinales. En la porción craneal del ovario, en ambas etapas gestacionales, se observaron inmersos en la lámina propia de la túnica mucosa folículos ováricos en diferentes estadios de maduración además de una gran cantidad de vasos sanguíneos. Durante la gestación temprana se observó una sustancia eosinófila en cercanía a las laminillas ováricas, posiblemente para la nutrición de los embriones. En las etapas avanzadas de gestación, las laminillas ováricas ingresaban por las hendiduras operculares de los embriones y se encontraban en estrecho contacto con el epitelio cúbico simple de los procesos branquiales en formación. En el epitelio embrionario de la cavidad faríngea se observaron células mucosas PAS positivas, para glicoconjugados neutros y ácidos, intercaladas entre las células cúbicas. Ambos epitelios, materno y embrionario, forman una estrecha conexión. Este tipo de contacto materno-embrionario, se denomina placenta branquial debido a que favorecería la nutrición y la eliminación de desechos en los embriones.

Capacitación con ácido hialurónico en espermatozoides bovinos: cambios en la motilidad y enzimas involucradas en el metabolismo oxidativo

FERNÁNDEZ, S.^{1,3} Y CÓRDOBA, M.^{1,2,3}

¹ Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Buenos Aires, Argentina. ² CONICET-Universidad de Buenos Aires. Unidad Ejecutora de Investigaciones en Producción Animal (INPA). Buenos Aires, Argentina.

³ Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Química Biológica. Buenos Aires, Argentina.

Durante la capacitación la motilidad espermática se incrementa permitiendo que el espermatozoide interactúe con la zona pelúcida del ovocito y desencadene la reacción acrosomal. El espermatozoide es una célula metabólicamente activa que mediante enzimas clave asegura la oxidación de metabolitos energéticos para la obtención de energía requerida en la motilidad. El objetivo de este trabajo fue determinar la motilidad y la actividad de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH), creatina quinasa (CK) e isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP (IDH-NADP) pertenecientes a lanzaderas mitocondriales y citosólicas, en espermatozoides criopreservados bovinos capacitados con ácido hialurónico (AH). Se utilizaron pajuelas (0,25 ml) de toros Holando Argentino de probada fertilidad formando un pool. El AH fue utilizado como inductor de la capacitación (1000 µg/ml). La motilidad espermática fue analizada por medio del software ISAS-Prosier. La actividad de las enzimas fue determinada por espectrofotometría. La capacitación fue evaluada por la técnica epifluorescente de clorotetraciclina y la viabilidad e integridad de membranas por la tinción vital de azul tripán con contraste diferencial interferencial. Los datos fueron analizados por ANOVA y test de Tukey ($P < 0,05$; $n=5$). El porcentaje de espermatozoides capacitados con AH fue significativamente mayor que el control. El AH incrementó significativamente la motilidad total ($27,54 \pm 7,78$ %), la motilidad progresiva ($24,02 \pm 6,95$ %) y la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza ($3,57 \pm 0,11$ µm) respecto a su control. Las actividades enzimáticas de LDH ($1,04 \pm 0,60$ U/ 10^8 esp), CK ($36,87 \pm 6,78$ U/ 10^8 esp $\times 10^2$) e IDH-NADP ($0,63 \pm 0,18$ U/ 10^8 esp $\times 10^{-2}$) se incrementaron significativamente al capacitar con AH respecto a sus controles. El AH incrementa la motilidad espermática y un transporte de energía y de equivalentes de reducción de las mitocondrias hacia el citosol dado por la variación de las enzimas determinadas, manteniendo de esta manera la energía y el estado redox celular requeridos para la capacitación *in vitro*.

Detección de peroxidación de lípidos mediante la sonda fluorescente C11-BODIPY581/591 en espermatozoides de perros

GALLELLI, M.F.^{1,2}; ALLERA, C.²; MONCALVO, E.²; CALDEVILLA, M.²; MIRAGAYA, M.² Y MONACHESI, N.²

¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina ² Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, INITRA, Cátedra de Teriogenología

La elevada cantidad de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana plasmática de los espermatozoides incrementa su susceptibilidad al daño oxidativo, conduciendo a alteraciones en su función y en la motilidad espermática, entre otros. Los métodos disponibles actualmente para evaluar peroxidación de lípidos son laboriosos, por lo que en distintas especies se ha implementado el uso de la sonda fluorescente C11-BODIPY con este fin. Sin embargo, su uso no ha sido descrito en perros. Por lo tanto, en este trabajo se propone evaluar la peroxidación de lípidos de membrana de espermatozoides de perro, mediante el uso de dicha sonda. Para este fin, se utilizaron siete perros machos, de distintas razas, clínicamente sanos, de $4,8 \pm 0,8$ años de edad. Se obtuvieron eyaculados mediante masaje manual ($n= 7$, $r= 3$). Se realizó un análisis de calidad seminal incluyendo los siguientes parámetros: volumen, PH, color, motilidad progresiva (CASA, Androvision™, MinitÜb Alemania), concentración, funcionalidad de membrana (HOS Test), y morfología. La peroxidación de lípidos se evaluó mediante la sonda C11-BODIPY, en base a lo descrito para otras especies. Brevemente, las muestras de semen fueron diluidas en medio Tyrodes a una concentración final de 40×10^6 células/ml y luego fueron divididas en dos alícuotas iguales. A cada una de ellas, se agregó la sonda C11-BODIPY a una concentración $10 \mu\text{M}$, incubándose durante 30 min a 38°C . Luego las muestras fueron centrifugadas (600g, 5 min) y rediluidas en Tyrodes. Una de las alícuotas de cada perro fue expuesta a radiación UV durante 30 min ("Grupo Tratamiento"), mientras que la otra se conservó a 38°C , sin ningún tratamiento adicional ("Grupo Control"). Se evaluó un mínimo de 10000 espermatozoides/muestra mediante citometría de flujo (BD FACSCanto II, Alemania). Los datos fueron analizados mediante la prueba de Mann-Whitney (Infostat, Argentina). Los valores se expresan como mediana \pm DS y el nivel de significación se fijó en $P < 0,05$. Los parámetros del análisis de calidad seminal evaluados fueron normales de acuerdo a lo descrito para la especie. Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de peroxidación lipídica entre el "Grupo tratamiento" y el "grupo control" ($P = 0,002$), siendo este parámetro mayor en el primer grupo ($91 \pm 6 \%$ vs. $8,3 \pm 3,5 \%$). En base a estos resultados, puede concluirse que la sonda C11-BODIPY es de utilidad para evaluar peroxidación de membrana en semen de perros. Asimismo, se pudo determinar que la radiación UV es un inductor de peroxidación lipídica apropiado, por lo que puede utilizarse como control positivo al implementar esta técnica.

Efecto modulador de Morin (3,5,7,2',4'-pentahidroxi flavona) sobre las especies reactivas de oxígeno durante la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos

GHERSA, J.²; LORENZO, M.S.^{1,2}; CAROU, M.C.¹; LOMBARDO, D.M.^{1,2}

¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Buenos Aires, Argentina. ² Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Cátedra de Histología y Embriología. Buenos Aires, Argentina.

El balance redox intra y extracelular en los ovocitos porcinos modula la eficacia de la maduración *in vitro* (MIV). Morin (3,5,7,2',4'-pentahidroxi flavona) es un flavonoide de la familia de las flavonas que tienen efecto sobre la producción de radicales libres. Estudios recientes demostraron que, a altas concentraciones, Morín estimula la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células tumorales, mientras que a bajas concentraciones y en células bien diferenciadas, las elimina. Trabajos previos, demostraron que altas concentraciones de Morin (50 y 100 μM) disminuyen la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del agregado de distintas concentraciones de Morin en el medio de maduración *in vitro* sobre la producción de ERO en ovocitos porcinos. Se obtuvieron complejos *cumulus* ovocito (COC) por aspiración folicular de ovarios a 30-37°C provenientes de cerdas faenadas en frigorífico. Se realizaron sucesivos lavados de los COC en PBS con 10% de fluido folicular porcino (FFp). Se maduraron los COC (50 COC por pocillo en 500 μL de medio) en medio 199 (M5017 Sigma®) con 10 % FFp y durante las primeras 22 h suplementado con hMG y AMPc (a 39°C en una atmósfera saturada de humedad, con 5 % de CO_2). Se aplicaron 3 tratamientos: al medio base de maduración se agregó 50 μM , 10 μM y 5 μM de Morín. Luego de la MIV se desnudaron los ovocitos con hialuronidasa y se incubaron con 153 μM de 2'7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCH-FDA) a 37°C. Se observaron los ovocitos bajo microscopio de fluorescencia y se determinó la intensidad de la emisión del fluoróforo por la variable transmitancia. Se comparó la transmitancia promedio para cada uno de los grupos experimentales y se realizó un ANOVA no paramétrico (Kruskal- Wallis) seguido por una prueba de Dunn. Se utilizó un p-valor < 0,05. El agregado de Morín al medio base disminuyó significativamente los niveles de ERO en los ovocitos con respecto al control ($82,56 \pm 4,8$, n=107 en el control; $57,94 \pm 4,09$, n=85; $62,72 \pm 4,06$, n=109 y $63,7 \pm 3,78$ n=111 en los tratamientos con 5, 10 y 50 μM de Morin, respectivamente). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Si bien Morin generó una disminución en la producción de ERO en los ovocitos durante la MIV, las concentraciones más altas demostraron previamente un efecto deletéreo sobre la maduración *in vitro*. Considerando estos resultados y los obtenidos en experimentos previos, se deberá continuar analizando los efectos del Morín para comprender su real mecanismo de acción.

Efecto de benznidazol y nifurtimox en células TM4 y sobre parámetros de movilidad espermática empleando semen bovino

GULIN, E.^{1,2,3}; TORRES, P.¹, MARURI, A.¹, JACOBO, P.^{2,3}, THEAS, M.S.^{2,3} Y LOMBARDO, D.M.^{1,3}

¹ Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Investigación y Biotecnología en Reproducción Animal (INITRA-UBA). Buenos Aires, Argentina. ² Universidad de Buenos Aires. Facultad de Medicina. Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED). Buenos Aires, Argentina. ³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Las opciones terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas se limitan al Nifurtimox (NFX) y el Benznidazol (BZ). Existe escasa información de los potenciales efectos tóxicos de dichas drogas sobre las gametas y el desarrollo embrionario. Bajo un enfoque 3Rs (reemplazo, reducción y refinamiento), se estableció una plataforma de ensayos *in vitro* para evaluar la toxicidad reproductiva. El objetivo de este trabajo es determinar el efecto citotóxico de BZ y NFX en la línea TM4 derivada de células de Sertoli murinas y sobre los parámetros de viabilidad y motilidad espermática utilizando como modelo espermatozoides (Zs) bovinos criopreservados. Las células TM4 fueron sembradas en placas de 96 pocillos en medio DMEM, con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomina y expuestas a concentraciones crecientes (0 – 500 μM) de NFX ó BZ durante 24 h en estufa de cultivo a 37 °C y 5% de CO_2 . Posteriormente, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) en lector de placa a 570 nm, para posteriormente calcular mediante análisis de regresión no lineal la concentración citotóxica 50 (CC_{50}), que indica la concentración de fármaco capaz de reducir la viabilidad celular en un 50% respecto al control sin tratar. Para el estudio del efecto citotóxico de NFX y BZ sobre Zs bovinos, se realizaron alícuotas de 30 x 10⁶ Zs/mL a partir de pajuelas comerciales de semen de toro almacenadas en nitrógeno, las que fueron expuestas a concentraciones crecientes (0 – 600 μM) de NFX ó BZ durante 1 h en baño térmico a 37°C. Luego, se evaluaron los parámetros de movilidad y velocidad mediante análisis de semen asistido por computadora (*Computer Assisted Semen Analysis*, CASA), así como también se confeccionaron frotis para determinar la vitalidad con la coloración de eosina Y. La exposición a BZ durante 24 h no modificó significativamente la viabilidad de las células TM4 a ninguna de las concentraciones empleadas, por lo que la CC_{50} se encuentra por encima de 500 μM mientras que para NFX se obtuvo un efecto dependiente de la concentración, siendo la CC_{50} = 335,9 μM ($\text{IC}_{95\%}$ = 227,2 – 496,6). Por su parte, ningún parámetro de análisis seminal se vio alterado significativamente con respecto al control (ANOVA de una vía), excepto el porcentaje de Zs móviles progresivos lentos expuestos a 600 μM (p = 0,0374), mientras que el porcentaje de vitalidad de los Zs expuestos a distintas concentraciones de BZ ó NFX no varió significativamente respecto de los valores obtenidos en aquellos sin tratamiento ($49,21 \pm 6,32$ %). Estos resultados indican que tanto NFX como BZ no afectan la viabilidad de células TM4 ni los parámetros de motilidad y viabilidad espermática de semen bovino criopreservado, aun en concentraciones que superan ampliamente la concentración plasmática de los fármacos alcanzada en pacientes.

Cirugía testicular en el armadillo *Chaetophractus villosus* (dasypodidae, xenarthra).

IODICE, O.H.^{1,2}; LUACES, J.P.^{2,3}; CERVINO, C.O.¹

¹Instituto de Ciencias Básicas y Experimentales (ICByE-SeCyT). Universidad de Morón. ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). ³Centro de Altos Estudios en Ciencias Humanas y de la Salud (CAECIHS), Universidad Abierta Interamericana (UAI).

El Peludo *Chaetophractus villosus* es un mamífero euterio perteneciente al grupo de los armadillos (Xenarthra). Es utilizado como Modelo Biológico No Tradicional (MBNT) en numerosas áreas biomédicas. *C. villosus* presenta ciclos testiculares estacionales en estado silvestre y para su estudio es necesario la obtención de material testicular. Este grupo posee testículos intraabdominales por lo que se requiere un procedimiento quirúrgico para abordarlos y realizar estudios histoquímicos y anatómicos necesarios. Se describe una técnica de abordaje quirúrgico a la cavidad abdominal (laparotomía) en *C. villosus* para acceder a dichos órganos. Los animales, procedentes de la localidad de Monteverde provincia de Buenos Aires (35°30'00"S 59°59'00"O), fueron alojados en el Bioterio de la Universidad de Morón, en una sala con macro y microambientes especialmente acondicionados para estos modelos cuyas características hemos publicado. El fotoperiodo fue acorde a la zona de origen de los animales. Se utilizaron 15 ejemplares adultos, sus pesos oscilaron entre 3,0 kg y 5,0 kg., adaptados por más de 6 meses a las condiciones de bioterio. Se utilizó una anestesia balanceada compuesta por: Clorhidrato de Ketamina 60 mg/kgPV, Xilacina 3 mg/kgPV, Diazepan 1mg/kgPV y Atropina 0,05 mg/kgPV. Las drogas se administraron en la misma jeringa por vía intramuscular. Los tiempos quirúrgicos fueron: a) incisión de piel, paramedial, de 2 cm de longitud, a un lado de la bolsa prepucial, homolateral al testículo en estudio; b) divulsión del tejido subcutáneo; c) divulsión del plano muscular; d) en la cavidad peritoneal se visualiza el testículo; e) procedimiento requerido (inciso-punción, extirpación, etc.); f) síntesis en masa del peritoneo y plano muscular con sutura continua con aguja atraumática curva 3/8 con nylon monofilamento 2/0; g) síntesis de piel con sutura discontinua de puntos en "U" horizontal con mismo tipo de aguja e hilo. Antes y después del acto quirúrgico se desinfectó la zona quirúrgica con iodopovidona al 10%. Tratamiento postquirúrgico: Penicilina-Estreptomicina 25 a 30 UI/kgPV, Triamcinolona 0,2 mg/kgPV cada 48 horas y Tramadol 5 mg/kgPV diariamente durante 8 días por vía intramuscular. Limpieza diaria de la herida con iodopovidona al 10%. Puntos de sutura de piel retirados pasados 8 a 10 días de la intervención. No se observaron accidentes anestésicos ni efectos indeseables. Este protocolo anestésico y otros similares ya fueron utilizados con éxito en otros procedimientos quirúrgicos. Fue necesario reparar la sutura de piel por dehiscencia dentro de las 48 horas posteriores a la cirugía en 4 ocasiones. La etiología de este inconveniente fue atribuida a dos motivos: a) conductual: algunos animales muy reactivos se auto-infringieron lesiones con sus largas uñas y b) anatómico: la ocasional acumulación de tejido graso en el plano subcutáneo y su escasa vascularización favorecen la desvitalización y necrosado del tejido manipulado. Se propone esta técnica para abordar quirúrgicamente el testículo y otros procedimientos quirúrgicos similares.

Use of combined oxidative substrates in porcine oocyte *in vitro* maturation

IRIARTE, F.^{1,2}; LETO, C.¹, MADRID GAVIRIA, S.³, GADZE, T.^{1,2}, BREININGER, E.^{1,2,3}, CETICA, P.^{1,2,3} Y MORADO, S.^{1,2,3}

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Química Biológica. ² Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, INITRA. ³ CONICET-Universidad de Buenos Aires, INPA. Buenos Aires, Argentina.

The aim of this work was to study the implication of endogenous lipids, amino acids (Aa) or their combination as oxidative substrates for porcine oocyte nuclear and cytoplasmic maturation *in vitro*. Immature cumulus-oocyte complexes (COCs) were obtained by aspiration of ovarian antral follicles from slaughtered gilts and they were randomly distributed into 6 groups according to their maturation medium: NCSU-37 without pyruvate or glucose, NCSU-37 + glucose, NCSU-37 + L-carnitine (fatty acid β -oxidation activator), NCSU-37 + Aa, NCSU-37 + L-carnitine + Aa, NCSU-37 + L-carnitine + Aa + glucose. All the groups were matured for 44 h at 39°C, 5% CO₂ and 100% humidity. In each group, oocyte endogenous lipids consumption was determined using Nile Red assay and the meiotic maturation percentage was evaluated by epifluorescence microscopy using Hoechst 33342 solution. To analyze cytoplasmic maturation, boar semen was centrifuged and resuspended in modified Tris Buffer medium (mTBM) to reach a 1x10⁶ motile sperm/ml final concentration. Sperm and COCs were co-incubated for 3h in mTBM + bovine serum albumin and then putative zygotes were cultured in NCSU-23 supplemented with essential and non-essential Aa under mineral oil at 39°C, 5% CO₂ and 100% humidity. Blastocyst percentages were determined at day 7 after *in vitro* fertilization. Meiotic maturation and blastocyst percentages were compared using a Chi-square analysis for non-parametric data. Endogenous lipids levels were expressed as mean \pm standard error mean and interactions were analyzed by two-way ANOVA, using post-hoc general contrasts for comparison among treatments. The addition of L-carnitine, alone or in combination with glucose or Aa, to the maturation media increased oocyte endogenous lipid consumption respect to oocytes matured in the presence of glucose or Aa as unique oxidative substrates ($p < 0.05$). Meiotic maturation percentage was higher in oocytes matured with Aa as unique oxidative substrates compared with those matured with glucose ($p < 0.1$), but no difference was detected in comparison with those matured with L-carnitine alone. Oocytes matured in the presence of L-carnitine + Aa or L-carnitine + Aa + glucose presented higher metaphase II percentages compared with all the other groups ($p < 0.1$). Blastocyst percentage increased when adding L-carnitine + Aa + glucose ($p < 0.1$), while no differences were detected among the other groups which contained different oxidative substrates. These results suggest that endogenous lipids and Aa may be used as unique oxidative substrates during porcine oocyte *in vitro* maturation and that their combination contributes to improve nuclear and cytoplasmic maturation rates.

Efecto del cocultivo con células epiteliales oviductales porcinas sobre los niveles de especies reactivas del oxígeno en los embriones porcinos

LORENZO, M.S.^{1,2}; CRUZANS, P.R.²; FERNANDEZ, B.² Y LOMBARDO, D.M.^{1,2}

¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Buenos Aires, Argentina. ² Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Cátedra de Histología y Embriología. Buenos Aires, Argentina.

Las células que revisten la luz del oviducto producen fluido oviductal y generan un ambiente óptimo para el desarrollo embrionario temprano. El cocultivo de embriones con células somáticas es una herramienta para mejorar las condiciones de cultivo; estas células pueden proteger a gametas y embriones del estrés oxidativo. Previamente en nuestro laboratorio se ha demostrado que el cocultivo de embriones porcinos producidos *in vitro* con células epiteliales oviductales porcinas (CEOP) durante los primeros dos días de desarrollo, favorece el porcentaje de blastocistos y la eclosión. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del cocultivo con CEOP sobre los niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO) en embriones porcinos. Las CEOP se obtuvieron de oviductos de cerdas en diestro, por presión externa del istmo con portaobjetos y posterior disgregación mecánica en vortex. Para estos experimentos se utilizó el pasaje 1 (CEOP-1). Los ovocitos se obtuvieron de ovarios de faena por aspiración folicular y se maduraron *in vitro* durante 44 h en medio 199, 39°C, 5% CO₂ y atmósfera saturada de humedad, las primeras 22 h el medio se suplementó con hMG y AMPc. Para la fecundación *in vitro* (FIV) se desnudaron y coincubaron en grupos de 20, con semen refrigerado a 17°C de machos de fertilidad probada, a una concentración de 1x10⁶ espermatozoides/mL en gotas de 100 µL de medio 199 modificado para FIV, durante 4 h a 39°C, 5% CO₂, 7% O₂ y atmósfera saturada de humedad. Los presuntos cigotos se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes grupos: control (gotas de 50 µL de medio NCSU 23 con piruvato y lactato de sodio) y CEOP-1 (gotas de 50 µL del mismo medio conteniendo CEOP-1 a 50000 cel/mL). Se cultivaron en las mismas condiciones durante 48 h. Para la evaluación de los niveles de ERO, se incubaron con 153 µM de 2'7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína a 37°C y oscuridad. Los embriones se observaron bajo microscopio de fluorescencia (λ excitación 450-490 nm y λ emisión y 515-565 nm) obteniendo imágenes a x100 y se determinó la intensidad de la emisión del fluoróforo por la variable transmitancia. La producción de ERO está relacionada con el metabolismo celular, por eso para el análisis estadístico se dividió a los embriones en dos grupos según su desarrollo: 2 células y más de 2 células. Se utilizó un ANOVA no paramétrico, considerando significativo un p < 0,05. En los embriones de 2 células no se observaron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, en los embriones de más de 2 células, las CEOP-1 disminuyeron los niveles de ERO (control: 73,7 ± 5,8 y n= 94; CEOP-1: 64,1 ± 4,1 y n= 119). En conclusión, el cocultivo con CEOP-1 durante los primeros días de desarrollo embrionario, mejora la calidad embrionaria disminuyendo los niveles de ERO. Los resultados obtenidos podrían deberse a la presencia de algún factor producido por las CEOP o a un efecto de contacto célula-célula.

Inactivación de la función testicular en el armadillo *Chaetophractus villosus* en bioterio

LUACES, J.P.^{1,2}; SAIZ, M.Y.³; CONTRERA PRIETO, M.J.³; IODICE, O.H.^{2,3} Y CAPANI, F.^{1,2}

¹ Centro de Altos Estudios en Ciencias Humanas y de la Salud, Universidad Abierta Interamericana. ² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). ³ Instituto de Ciencias Básicas y Experimentales (ICByE-SeCyT). Universidad de Morón

El peludo (*Chaetophractus villosus*) es un mamífero que alcanza grandes densidades en zonas agrícola-ganaderas de Argentina. Como demostramos previamente *C. villosus* presenta ciclos testiculares estacionales en estado silvestre pero no se han realizado estudios en condiciones de bioterio. A fin de estudiar la variación de la función testicular en condiciones de bioterio se capturaron ejemplares macho de *C. villosus* en la localidad de Monteverde (Pcia. de Buenos Aires, Argentina) en dos camadas una en 2015 (n=7) y otra en 2017 (n=15). En la primera camada se realizó un estudio continuo de la función testicular a lo largo de 180 días mediante estudios anatómicos por ultrasonografía, estudios hormonales serológicos, y comprobación histológica con biopsias en determinados momentos. En la segunda camada se realizaron cirugías programadas para obtener material testicular tanto por biopsias como por hemicastración. Se analizaron los datos utilizando ANOVA (test de comparación de Tukey, con una significancia de $p < 0,05$). Los ejemplares fueron alojados en el bioterio de la Universidad de Morón. La intensidad lumínica fue 300 lux, la temperatura 20°C y se alimentó *ad-libitum* (con balanceado para cachorros premium). Desde la captura el fotoperiodo fue regulado variando acorde al natural correspondiente a la zona de captura. En la primera camada se observó que los testículos presentaron un volumen de $5,63 \pm 2,05 \text{ cm}^3$ y un parénquima involucionado durante los meses de abril y mayo, con niveles de testosterona de $0,20 \pm 0,03 \text{ ng/mL}$. En el mes de julio el volumen incrementó a $9,91 \pm 1,43 \text{ cm}^3$ al igual que el nivel de testosterona ($1,14 \pm 0,45 \text{ ng/mL}$). Nuevamente, en septiembre los testículos aumentaron ($14,68 \pm 3,01 \text{ cm}^3$) y la testosterona alcanzó $15,71 \pm 6,79 \text{ ng/mL}$, presentando un parénquima histológicamente activo. En la segunda camada se obtuvieron muestras de testículos inactivos durante los meses de abril y mayo (n=8) y de testículos activos los meses de junio (n=2), septiembre (n=2), diciembre (n=1) y febrero (n=2). El volumen testicular en los individuos inactivos fue de $6,16 \pm 1,08 \text{ cm}^3$ y de $12,78 \pm 3,57 \text{ cm}^3$ en los individuos activos. Registramos una variación de la función testicular en condiciones de bioterio, con un aumento del desarrollo gonadal ($p < 0,05$) y de la producción de testosterona ($p < 0,05$) de individuos histológicamente activos respecto a los individuos inactivos. En condiciones de bioterio se observó el fenómeno de inactivación testicular registrado en estado silvestre que fue corroborado histológicamente. El estudio de la reproducción de *C. villosus* en condición de bioterio resulta fundamental para la comprensión de la biología de esta especie ya que permitirá una obtención precisa y sistemática de datos, así como la medición de parámetros asociados en un ambiente controlado. Futuros estudios serán realizados para delimitar el periodo de inactivación testicular en condiciones de bioterio, evaluar el grado de sincronía entre los individuos estudiados y nuevos parámetros que afecten la función testicular de esta especie en bioterio.

Primeros ensayos sobre la obtención de gametas, incubación de embriones y criopreservación de espermatozoides del pez *Betta splendens* (teleostei, osphronemidae)

MACORETTA, C.L Y MIRANDA, L.A.

Laboratorio de Ictiofisiología y Acuicultura, Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH, CONICET-UNSAM), Chascomús, Buenos Aires, Argentina

El pez *Betta splendens* es una especie de agua dulce, nativa del sudeste asiático, que se caracteriza por su dimorfismo sexual, comportamiento territorial, cortejo nupcial, y construcción de un nido de burbujas y cuidado de los embriones por parte del macho. Posee gran importancia económica y científica por su valor ornamental y como especie modelo de laboratorio para la realización de estudios de comportamiento y ensayos de toxicidad. Los objetivos de este trabajo fueron: (1) evaluar la posibilidad de incubar a los embriones sin cuidado parental; (2) obtener oocitos y espermatozoides para realizar fecundaciones *in vitro*; y, (3) criopreservar espermatozoides. En primer lugar, se recolectaron los desoves de distintas parejas y se incubaron sin la presencia del macho en cajas de Petri en tres condiciones distintas: (a) sin desarmar el nido de burbujas, (b) evitando la adherencia de los embriones empleando una solución de PBS:leche 2,5% p/v, y (c) disminuyendo la tensión superficial empleando soluciones de *Tween 20* (0,1 y 0,05% v/v). Se evaluó la supervivencia embrionaria, la eclosión y la presencia de malformaciones. El mejor resultado se obtuvo empleando *Tween 20* 0,05 % v/v en combinación con una agitación suave para disgregar el nido y liberar a los embriones. Estos fueron incubados en agua esterilizada con el agregado de azul de metileno 0,01% v/v, sin agitación, en una incubadora programable a 28 °C, 12 h L: 12 h O. Se obtuvo una eclosión del 77 ± 15% y una prevalencia de malformaciones del 26 ± 9%. En segundo lugar, se intentó extraer las gametas mediante masaje abdominal de los peces maduros y listos para desovar, pero solo fue exitoso en el caso de las hembras. Para el caso de los machos, se procedió a obtener el espermatozoides mediante la disección y disgregado de cada uno de los testículos en 25 µl de dos diluyentes distintos (A: NaCl 94mM, KCl 27mM, Tris-HCl 15mM, Glicina 50mM; B: NaCl 128mM, CaCl₂ 18mM, KCl 27mM, NaHCO₃ 24mM), respectivamente. Por último, dichas muestras fueron diluidas a la mitad con el agregado de DMSO (concentración final 10% v/v) y criopreservadas empleando una curva de descenso de temperatura controlada (4°C 20 m, -10 °C/m, -60 °C 5 m, -196 °C 10 m). En ambos casos, se obtuvieron espermatozoides móviles luego del descongelamiento, observándose mayor cantidad de los mismos cuando se empleó el diluyente A. Estos resultados muestran que es posible realizar la incubación de los embriones fuera del nido de burbujas y sin cuidado parental. Asimismo, sientan las bases para futuros trabajos en esta área, como evaluar las muestras de espermatozoides pre- y post-congelamiento empleando el sistema CASA, y estudiar su capacidad fecundante, a fin de obtener embriones *in vitro*.

Lipid and amino acid metabolism during bovine oocyte *in vitro* maturation.

MARTINEZ, S¹; GAGNETEN, P¹; BREININGER, E^{1,2,3}; CETICA, P^{1,2,3} AND GUTNISKY, C.^{1,2,3}

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Química Biológica. ² Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, INITRA. ³ CONICET-Universidad de Buenos Aires, INPA. Buenos Aires, Argentina.

Most metabolic studies carried out in cumulus oocytes-complexes (COCs) refer to carbohydrates as they are the main substrates in the culture media. There is limited information about the use of endogen lipids (EL) or amino acid (AA) as oxidative substrates. The aim of this work was to evaluate the endogen lipid consumption and amino acid utilization by COCs during bovine oocyte maturation in a media lacking other oxidative substrates. Maturation was performed in a defined media (SOFm -without pyruvate and lactate supplemented with FSH, LH, EGF, insulin, gentamicin and PVA) to which were added different supplementations. For the EL study COCs were randomly divided in 5 groups: a) without supplementation, b) glucose, c) L-carnitine (β -oxidation fatty acid stimulator), d) L-carnitine + glucose y e) etomoxir (β -oxidation fatty acid inhibitor). For the AA as oxidative substrates study COCs were randomly divided in 5 groups: a) without supplementation b) glucose, c) AA, d) AA + glucose y e) AA + salicilate (glutamate dehydrogenase inhibitor). The proportion of nuclear maturation was evaluated by the presence of metaphase II after Hoechst 33342 staining. The COCs EL content was determined by Nile Red staining (n=35-45 per group). For the AA study the ammonia concentration of the media after maturation was measured using a spectrophotometric assay (n=8-10 per group). The proportion of nuclear maturation was compared using a Chi-squared test for non-parametric data (n=65-99 per group). The EL content and ammonia production were compared by analysis of variance (ANOVA). $P < 0.05$ was considered significant. Significant increases in nuclear maturation rates were observed in presence of glucose, L-carnitine and the combination of both, with respect to the group without any supplementation and the group supplemented with etomoxir ($p < 0,05$). The addition of glucose and L-Carnitine had an additive effect on nuclear maturation ($p < 0,05$). It was observed that in media supplemented with glucose the EL content was higher than in the media without supplementation or supplemented with β -oxidation fatty acid modulators ($p < 0,05$). For the AA metabolism study a significant increase in nuclear maturation was observed in the group supplemented with AA compared with the group without supplementation or in presence of the oxidative deamination inhibitor ($p < 0,05$); however, it did not reach the maturation rates for glucose + AA ($p < 0,05$). In ammonia production, a significant increase was observed in the media supplemented with AA compared with the other groups ($p < 0,05$). From these results it can be concluded that both the EL and the AA supplemented in the maturation media can be used as an energy source to hold bovine oocyte *in vitro* maturation.

Evaluación de la reexpansión de blastocistos bovinos post-blastocentesis por micromanipulación.

Resultados preliminares.

MARURI, A.¹, MENDIZABAL, I.¹, LOMBARDO, D.M.^{1,2} Y ARRAZTOA, C.C.¹

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal. ² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Buenos Aires, Argentina.

El blastocele representa el medio interno embrionario y la composición del líquido blastocélico (LB) es influenciada directamente por el metabolismo de las células embrionarias. La identificación y cuantificación de compuestos traslocados que indiquen estrés embrionario en el LB, obtenido mediante blastocentesis, es una alternativa válida para la evaluación de la calidad embrionaria. Si se correlaciona la presencia y/o cantidad de marcadores con la evaluación morfológica, se podría disponer de una metodología objetiva para la selección de embriones con mayor competencia para el desarrollo. El objetivo del presente trabajo fue aspirar el LB de embriones bovinos producidos *in vitro* y evaluar su reexpansión, con el fin de evidenciar si la blastocentesis es nociva o no para el embrión. Se obtuvieron complejos cúmulus-ovocito (COC) por punción de folículos de ovarios de frigoríficos. Se maduraron *in vitro* durante 22 h a 39 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad. Se realizó la fecundación *in vitro* (FIV) empleando medio 199 modificado, para el lavado y capacitación de los espermatozoides, lavado de COC y FIV. Se utilizó semen de un mismo toro con fertilidad probada. Para cada FIV, 1 pajuela de 0,5 mL de semen congelado se descongeló y diluyó a 15 x 10⁶ espermatozoides/mL en medio de FIV con cafeína, heparina y albúmina sérica bovina. Grupos de 10 COC se coinubaron en gotas de 100 µL de semen diluido, bajo aceite mineral, en las mismas condiciones que la MIV. Posteriormente, los presuntos embriones se desnudaron, lavaron, transfirieron a gotas de 50 µL de medio SOF bajo aceite mineral y se incubaron 7-8 días en las mismas condiciones. La blastocentesis se realizó en un microscopio invertido digital motorizado Leica DMIL LED® con micromanipuladores Narishige®, utilizando una pipeta de sujeción embrionaria (posicionando al macizo celular interno a las 12 ó 6 horas reloj para evitar dañarlo durante la inyección) y una micropipeta de inyección para la blastocentesis hasta su colapso. Los embriones colapsados (n = 25) fueron cultivados en medio SOF, 2 h y se evaluó su reexpansión. La totalidad de los embriones colapsados recuperaron su tamaño original, dentro de la hora de cultivo *in vitro*. Los resultados obtenidos hasta el momento, indicarían que la técnica blastocentesis mediante micromanipulador, no afectaría la viabilidad embrionaria en bovinos a corto plazo ya que la formación del LB es un proceso activo que se produce únicamente en embriones viables. La reexpansión embrionaria no sólo permite demostrar la viabilidad de embriones de manera no invasiva, sino que además, los conserva en un estadio capaz de ser transferido al útero de una hembra.

Detección y cuantificación de glutatión en el líquido blastocélico y en blastocistos bovinos producidos *in vitro*: resultados preliminares.

MARURI, A¹; LUCHETTI, C.G.^{1,2}; MENDIZABAL, I¹; LOMBARDO, D.M.^{1,2} Y ARRAZTOA, C.C.¹

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal. ² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Buenos Aires, Argentina.

Durante el desarrollo embrionario, se produce un rápido crecimiento y diferenciación celular, procesos que requieren energía mediante la utilización de ATP y NADPH junto a moléculas de oxígeno, generando especies reactivas del oxígeno (ERO). La producción de ERO es controlada por procesos enzimáticos y no enzimáticos. El glutatión (GSH) es un importante agente antioxidante no enzimático presente en las células. El objetivo fue detectar y cuantificar la presencia de GSH en líquido blastocélico y en embriones bovinos enteros producidos *in vitro*. Se obtuvieron complejos cúmulus-ovocito (COC) por punción aspiración de folículos ováricos bovinos de frigoríficos. Se maduraron 22 h *in vitro* bajo las condiciones de cultivo (CC): 39 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad. Se realizó la fecundación *in vitro* (FIV) empleando medio 199 modificado, con semen congelado-descongelado a 15 x 10⁶/mL, en gotas de 100 µL bajo aceite mineral durante 5 h en CC. Los presuntos embriones se transfirieron a gotas de 50 µL de medio SOF bajo aceite mineral, y se incubaron 7-8 días en CC. La aspiración del líquido blastocélico (LB) se realizó en un microscopio invertido digital motorizado Leica DMIL LED[®] equipado con micromanipuladores Narishige[®], con pipeta de sujeción para inmovilizar al embrión (macizo celular interno a las 12 ó 6 horas reloj) y micropipeta de inyección para aspirar el líquido blastocélico hasta su colapso. Los embriones enteros, se sometieron a ruptura celular, con 4 ciclos sucesivos de cambios térmicos (20 °C y -198 °C), con el fin de liberar el contenido celular y con este el GSH. Se evidenció la presencia del mismo mediante su cuantificación, utilizando la reacción de Ellman (DTNB) adaptada a microplaca. El GSH al reaccionar con el DNTB, forma un compuesto coloreado medible en un lector con 405 nm. Se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de glutatión oxidado. Se analizaron 3 grupos: grupo 1 (n = 5), pool del LB de blastocistos no expandidos; grupo 2 (n = 6), pool del LB de blastocistos expandidos y grupo 3 (n = 5), blastocistos expandidos enteros. Los resultados se expresaron como pmoles de GSH relativizados a un embrión entero o al líquido blastocélico de un embrión. Se detectó y cuantificó GSH en los tres grupos, obteniendo: 1,12 pmoles/embrión (grupo 1), 4,01 pmoles/embrión (grupo 2) y 3,3 pmoles/embrión (grupo 3). Es posible detectar y cuantificar GSH tanto en el LB como en embriones bovinos enteros. Son necesarios sucesivos experimentos, para evaluar si existe relación entre grados de calidad morfológica embrionaria y niveles de GSH en LB y en embriones bovinos enteros producidos *in vitro*.

Desarrollo testicular de *Gymnotus carapo*

MENDEZ GALARZA, S.¹; BLANCO COHENE, T.¹; OLEA, G.^{1,2}; FLORES QUINTANA, C.^{1,2}

¹ Cátedra de Histología y Embriología. Departamento de Ciencias Básicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Nordeste. ² Cátedra de Histología y Embriología. Departamento de Ciencias Básicas. Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Chaco Austral.

Los peces del orden Gymnotiformes al cual pertenece la especie en estudio *Gymnotus carapo*, conocida comúnmente como “morena”, son ejemplares que tienen una forma cilíndrica y alargada, poseen ojos pequeños y cubiertos por una piel fina. Son animales utilizados frecuentemente como carnada viva para la captura de peces de mayor porte. El objetivo de este trabajo es caracterizar el desarrollo testicular de *Gymnotus carapo*. Se recolectaron 10 ejemplares machos (4 juveniles y 6 adultos) de ambientes naturales próximos a la Ciudad de Corrientes. Posterior a la captura fueron anestesiados con solución de benzocaína al 2 % y sacrificados por sección medular. Se registraron los siguientes parámetros biométricos: peso total, peso testicular y longitud total a fin de calcular el índice gonadosomático (IGS= peso total del testículo / peso total del pez x 100). Los testículos fueron fijados en formol al 10 % y procesados con técnica histológica convencional. Los preparados histológicos fueron analizados a través del microscopio óptico. Macroscópicamente son órganos pares de tipo lobular posee una forma piramidal pudiéndose encontrar en estadio inmaduro con un color blanquecino en tanto que en el estadio maduro posee un color amarillo ámbar. Las machos juveniles considerados inmaduros presentaron una longitud promedio de 15,45 cm y un IGS promedio de $0,05 \pm 0,003\%$. Mientras que en los individuos adultos con longitud promedio de 38,46 cm el IGS fue de $(0,10 \pm 0,005\%)$. A nivel microscópico, la gónada posee una delgada túnica albugínea que lo rodea y envía proyecciones hacia el parénquima que delimita compartimientos tubulares e intersticiales. Los túbulos seminíferos están conformados por un epitelio que asienta sobre una membrana basal, constituido por células somáticas y germinales en diferentes estadios. El intersticio se encuentra compuesto por células de Leydig, fibroblastos y tejido conectivo. En machos juveniles se observó histológicamente túbulos seminíferos con predominio de espermatogonias, algunos espermatozoides de forma aislada y células de Sertoli. En machos maduros los túbulos seminíferos presentaron predominio de espermatozoides y en menor proporción espermatogonias. El desarrollo testicular de la especie en estudio exhibe una ontogenia semejante a la de los teleósteos en general, pero cambia en cuanto a la morfología ya que la mayoría de los teleósteos poseen gónadas alargadas y tubulares que presentan tubos ciegos. Estos datos sirven de base para futuros estudios comparados con otras especies de peces a fin de ampliar la información sobre la biología reproductiva de esta taxa.

Evaluación de la integridad de la membrana acrosomal con Coomassie Blue en espermatozoides de conejo

MESTRE, J.¹; MALCERVELLI, D.^{2,3}; GONZALEZ, L.^{2,3}; FISCHMAN, M.L.^{2,3}; CISALE, H.^{2,3,4} Y SUHEVIC, J.^{2,3}

¹ Comisión Nacional de Energía Atómica. ² Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Física Biológica. Buenos Aires, Argentina. ³ Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Buenos Aires, Argentina. ⁴ Universidad de Buenos Aires - CONICET. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Investigaciones en Producción Animal (INPA). Buenos Aires, Argentina.

La integridad de la membrana acrosomal (IMA) es de gran importancia para determinar la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Z). A su vez, durante el proceso de criopreservación, los Z son sometidos a bajas temperaturas y a cambios osmóticos que inducen la formación de cristales de hielo que producen daños en dicha membrana y afectan la calidad espermática al descongelado. En la especie cunícula, la evaluación de la IMA se realiza mediante microscopía de contraste de fase (CF) una vez que los Z son fijados en solución salina formolada al 0,9%. Esta técnica presenta como desventajas la necesidad de contar con este tipo de microscopios y la subjetividad del operador. Los objetivos de este trabajo fueron poner a punto la técnica de Coomassie Blue (CB) para la evaluación de la integridad acrosómica en Z de conejo y determinar la existencia de diferencias significativas con la evaluación con CF (gold standard) para esta especie. Se utilizaron 24 eyaculados (n=6; r=4). Para determinar la IMA por CF se colocó una gota (8 µl) de semen diluido en solución salina formolada (1/200) entre porta y cubreobjetos. Se utilizó microscopio de contraste de fase (Axiostar Plus®, Carl Zeiss) y se evaluó a x1000. Para la determinación de la IMA con la tinción de CB se realizó un extendido de Z y se fijó con paraformaldehído en solución salina buffer fosfato (PBS; 4%) durante 15 min. Luego se lavó con PBS. Se tiñó con solución acuosa de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich) durante 5 min. Se enjuagó con agua, se dejó secar al aire y se cubrió con cubreobjetos. Se utilizó microscopio de campo claro a x1000. Los Z que presentaron su acrosoma teñido de azul se consideraron intactos y aquellos que se observaron sin teñir como acrosomas reaccionados. En ambas técnicas se evaluaron un mínimo de 200 Z/muestra. Las evaluaciones de la IMA se realizaron en semen fresco (37°C), refrigerado (5°C) y pos descongelado. Los resultados, expresados como medias ± desvío estándar (%) fueron: Semen fresco (CF: 88,92 ± 4,80; CB: 88,50 ± 3,55), refrigerado (CF: 83,58 ± 7,65; CB: 84,01 ± 8,34) y descongelado (CF: 50,75 ± 14,44; CB: 51,08 ± 15,89). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides con membrana acrosomal íntegra al comparar las muestras solo fijadas en solución salina formolada (CF) y las muestras teñidas con CB, durante las diferentes temperaturas de evaluación (Prueba de Wilcoxon; p>0,05). Los resultados del presente estudio muestran que el uso de la técnica de tinción con Coomassie Blue permite la correcta evaluación de la integridad de la membrana acrosomal en los espermatozoides de conejo, presentando como ventaja que es una técnica objetiva y fácil de evaluar. A su vez, al poder fijarse la muestra, no es necesaria su evaluación de manera inmediata y solo se necesita contar con un microscopio de campo claro que son los que generalmente se utilizan para a trabajo a campo y/o en los establecimientos que se dedican a la reproducción, cría y engorde de conejos.

Foliculogénesis en *Mimus saturninus* (paseriformes: mimidae)

OLEA, G.B.^{1,2} Y LOMBARDO, D.M.^{3,4}

¹ Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Ciencias Básicas. Cátedra de Histología y Embriología. ² Universidad Nacional del Chaco Austral. Facultad Ciencias Veterinarias. Departamento de Ciencias Básicas. Cátedra de Histología y Embriología. ³ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Argentina; ⁴ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) Argentina

Durante la ontogenia ovárica de las aves se pueden reconocer 5 eventos fundamentales: migración y colonización de las células germinales primordiales, diferenciación y proliferación de ovogonias, organización de nidos germinales, inicio del proceso meiótico y foliculogénesis. El conocimiento de dichos eventos resulta fundamental para la interpretación de los procesos involucrados con la diferenciación de las gametas femeninas. En el presente trabajo se describen los cambios y sucesos celulares implicados en la formación de los folículos de *Mimus saturninus*, un ave paseriforme con desarrollo altricial. Para ello, en un total de 26 ejemplares, se analizó la histología ovárica de embriones a partir del estadio 42 (N= 10) y neonatos de 2, 5, 14 y 25 días post eclosión (N= 4 por estadio). Se procesaron las muestras según técnicas convencionales para inclusión en parafina y coloración con hematoxilina eosina y se realizó la observación en microscopía de campo claro utilizando un sistema de Microscopio Leica DM4000B LED® con cámara DCC-380X® y software de captura de imágenes Leica LASZ. Las observaciones realizadas permitieron identificar 4 estadios de la foliculogénesis. En el estadio I las ovogonias se encuentran agrupadas en nidos rodeadas por una capa de células pre foliculares. El estadio II se caracteriza por el inicio de la profase y arresto meiótico de los ovocitos primarios. A partir del estadio III se inicia el reordenamiento de las células foliculares alrededor de cada ovocito que culmina con la organización del folículo primordial (estadio IV). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que en *Mimus saturninus*, a diferencia de las otras especies estudiadas, la foliculogénesis se inicia luego de la eclosión, y plantean nuevos interrogantes sobre los mecanismos de control de la foliculogénesis en especies con patrón de desarrollo altricial. Futuros estudios se focalizarán en el análisis de los eventos de diferenciación de las células foliculares y el control endocrino en dicho proceso.

Estudio histológico y morfométrico preliminar del desarrollo ovárico pre y post natal en alpacas (*Vicugna pacos*)

PACHECO CURIE, JOEL ¹ Y LOMBARDO, D.M ^{2,3}

¹ Estación Marangani del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA) - Facultad de Medicina Veterinaria-Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. ² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Buenos Aires, Argentina. ³ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Cátedra de Histología y Embriología. Buenos Aires, Argentina.

Los camélidos sudamericanos son especies propias de nuestro continente, las cuales presentan características reproductivas particulares, tanto anatómicas como fisiológicas, destacándose entre ellas la de ser una especie de ovulación inducida. Conocer la fisiología reproductiva es vital, así como la anatomía y la histología ovárica del individuo adulto, también es importante conocer aspectos sobre el desarrollo folicular ovárico en estadios pre y post natales. Con el objetivo de describir la histología ovárica pre y post natal de la alpaca se utilizaron 16 ovarios, provenientes de 2 fetos de 7 y 8 meses de gestación (grupo 1), 3 neonatos (grupo 2) y 3 crías pre-púberes (1-5 meses de edad) (grupo 3). Los ovarios fetales fueron obtenidos en el matadero, los neonatos y crías murieron de causas fortuitas. Todos los ovarios fueron fijados en formol tamponado al 10 %, procesados de acuerdo con la técnica histológica estándar y teñidos con Hematoxilina-Eosina. Posteriormente se realizó la identificación de los folículos primordiales, de transición, primarios y secundarios de acuerdo con sus características morfológicas y se realizaron las mediciones foliculares utilizando el software Q-Win®. Los datos cuantitativos fueron analizados bajo estadística descriptiva. Los resultados de la evaluación histológica en ovarios fetales permitieron observar la presencia de nidos ovígeros ubicados en la zona de la corteza ovárica, de los cuales surgen las ovogonias, y que posteriormente se rodean de células de núcleo redondeado dando como resultado una estructura compatible con la de folículos primarios. Se describe entonces una mayor cantidad de folículos primarios en relación con los otros tipos foliculares. En ovarios neonatales es posible diferenciar claramente las regiones cortical y medular, en esta última se observan vasos sanguíneos y tejido parenquimatoso más denso que en la zona cortical. En ella, se observa gran cantidad de folículos, siendo los más abundantes los folículos primordiales. En algunos folículos primarios, se evidencia la presencia de la zona pelúcida, aún muy delgada pero completa, rodeando a todo el ovocito. En los ovarios de edades prepuberales, la mayor cantidad de folículos corresponden a folículos primarios, sin embargo, ya es posible observar folículos con más de dos capas celulares, correspondiendo a folículos secundarios. También se observan folículos con presencia de antro, existe una clara demarcación entre la corteza y la médula, en la cual es posible observar vasos sanguíneos y la *rete ovarii*. Los valores promedios de los diámetros foliculares primordiales y de transición se incrementan en cada edad evaluada, mientras que en primarios y secundarios disminuyen, siendo para primordiales: 34,04; 40,73 y 41,88 μm ; de transición: 44,46; 44,41 y 46,54 μm ; primarios: 51,56; 53,06 y 50,21 μm y secundarios: 118,85; 113,5 y 106,2 μm para los grupos 1, 2 y 3, respectivamente. Se pudo observar diferentes poblaciones foliculares de acuerdo con las edades evaluadas, así como diferencias en su aspecto y morfometría, es necesario continuar con las investigaciones en histología y morfometría ovárica, foliculogénesis y carga folicular en los camélidos sudamericanos.

Dimorfismo sexual de las aletas pélvicas en *Potamotrygon spp.* (condricties: potamotrygonidae)

PÉREZ, D.¹; OLEA, G.²; RODRÍGUEZ, F.²; BLANCO COHENE, T.¹ Y FLORES QUINTANA, C.¹

¹ Histología y Embriología, Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Ciencias Veterinarias. ² Histología Animal, Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura.

Los peces han evolucionado de forma anatómica especialmente compleja, especializaciones fisiológicas, bioquímicas y conductuales como parte de su estrategia reproductiva exitosa. Algunos se caracterizan por presentar fertilización interna, esto se efectúa principalmente por estructuras copuladoras que representan modificaciones de las aletas pélvicas (los claspers en condrictios) o las anales (gonopodios en algunos peces teleósteos). Los claspers en los condrictios son alargamientos especializados en el lado posterior de las aletas pélvicas masculinas que se utilizan para la transferencia de esperma en lo profundo de los genitales femeninos durante la cópula. El objetivo del presente estudio es evidenciar el dimorfismo sexual en *Potamotrygon spp.* durante los primeros meses de desarrollo a partir de la comparación de las aletas pélvicas en machos y hembras. Se trabajó con 3 ejemplares juveniles de ambos sexos (2 machos y 1 hembra) provenientes del Río Paraná. Las muestras se fijaron en formol al 10%, y se procedió a realizar la técnica de diafanización. Se retiró piel y órganos internos sin afectar el material, se sometieron a los ejemplares a una solución de Alcian blue por dos días para la coloración de los elementos cartilagosos, luego se realiza un baño de alcohol al 96% con un mínimo de 4 hs, posteriormente se coloreo por dos días con una solución de rojo de alizarina para evidenciar los elementos óseos, para la transparentación se dejó los ejemplares en una solución de hidróxido de potasio hasta observar las estructuras óseas y cartilagosas, finalmente el material fue conservado en glicerol para su observación. Macroscópicamente se observa que los ejemplares poseen aletas pélvicas, el dimorfismo sexual se hace evidente al observar en el macho una estructura en la región posterior denominado clasper, estos poseen una forma cónica ligeramente ahusada, dorsal y ventralmente visibles. Al observar las muestras diafanizadas mediante una lupa estereoscópica se pueden distinguir mediante la tinción con el azul de alcian los elementos cartilagosos posteriores diferenciándose en un propterigio o también denominado primer radial agrandado, basipterigio que unidos a este se localizan los segmentos basales (1 y 2) y los cartílagos radiales de las aletas pélvicas; sin embargo sólo los machos desarrollan un clasper, o mixopterigio. En las hembras, las únicas estructuras esqueléticas posteriores al basipterigio son pequeños elementos nodulares conocidos como cartílagos terminales. Mediante este trabajo se observó que estos ejemplares en sus primeros días de vida ya se pueden diferenciar a nivel morfológico machos y hembras, también se evidencia la falta de desarrollo total del mixopterigio que forma el clasper en el macho. Este trabajo también permitirá realizar un análisis comparativo con ejemplares en edades reproductivas y así determinar el grado de osificación en la región de los claspers.

Amino acids as unique oxidative substrates during porcine oocyte *in vitro* maturation

PORTILLO, F.^{1,2}; IRIARTE, F.^{1,2}; LETO, C.¹; TRICERRI, G.¹; BREININGER, E.^{1,2,3}; CETICA, P.^{1,2,3} Y MORADO, S.^{1,2,3}

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Química Biológica. ² Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, INITRA. ³ CONICET-Universidad de Buenos Aires, INPA. Buenos Aires, Argentina.

It has been postulated that porcine cumulus oocyte complexes (COCs) use amino acids as oxidative substrates during *in vitro* maturation. However, those reports have been developed in media which contain diverse energetic substrates, so the use of each of them could have been overlapped. The aim of this work was to study the implication of amino acids (Aa) as unique oxidative substrates during porcine oocyte maturation *in vitro*. Immature cumulus-oocyte complexes (COCs) were obtained by aspiration of antral follicles from slaughtered gilts and then classified under a stereomicroscope according to the characteristics of their cumulus. Only oocytes surrounded by a dense and integer cumulus were selected and then randomly distributed into 5 groups: NCSU-37 without pyruvate or glucose, NCSU-37 + glucose, NCSU-37 + Aa, NCSU-37 + Aa + glucose and NCSU-37 + Aa + salicylate (Aa catabolism inhibitor). All the groups were matured for 44h at 39°C, 5% CO₂ and 100% humidity. To determine meiotic maturation percentages oocytes were denuded and then stained with Hoechst 33342 solution. The nuclear status of each oocyte was analyzed using an epifluorescence microscope with 330-380 (excitation) and 420 (emission) filters at x125 and x400. To evaluate Aa catabolism we used a spectrophotometric assay based on NADPH oxidation by glutamate dehydrogenase, quantifying the residual ammonia in each maturation medium. These data were expressed as ammonia production/COC/minute. Meiotic maturation percentages were compared using a Chi-square analysis for non-parametric data. The levels of residual ammonia in the maturation media were expressed as mean ± standard error mean and their interactions were analyzed by two-way ANOVA, using post-hoc general contrasts for comparison among treatments. Values with a p<0.05 were considered significant. Oocytes matured in media supplemented with Aa as unique oxidative substrates or in combination with glucose presented higher maturation rates than those incubated with glucose or without supplementation (p<0.05). In coincidence, the medium containing Aa as unique oxidative substrates resulted in a higher level of residual ammonia respect to the other groups (p<0.05). On the other hand, the addition of salicylate generated a reduction in the maturation percentage and in the residual ammonia in the maturation medium (p<0.05). In conclusion, our results suggest that amino acids could be used as unique oxidative substrates for porcine oocyte meiotic maturation *in vitro*.

Estudio inmunohistoquímico del factor de crecimiento de endotelios vasculares (VEGF) en endometrio canino normal y con endometritis. Resultados preliminares

PRADERIO, R.G.^{1,2}, STORNELLI, M.C.¹; GILEAD, T.¹; DE LA SOTA, R.L.^{1,2} Y STORNELLI, M.A.¹

¹ Cátedra y Servicio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP), Calle 60 y 118, La Plata; ² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290, CABA, Argentina.

El objetivo fue estudiar la inmunolocalización del VEGF y su receptor FLT-1 (VEGFR1) en endometrio normal y con endometritis (END) de perras clínicamente sanas (CS). Se utilizaron 20 perras mestizas, CS, en diestro, que asistieron al centro de Zoonosis de la Municipalidad de La Plata para su castración. Luego de la ovariectomía los úteros y ovarios fueron transportados al laboratorio en donde se realizó una biopsia uterina. Las muestras obtenidas fueron fijadas en solución formolada bufferada, procesadas para tinción de H&E y evaluadas al microscopio óptico. Se formaron cuatro grupos (normal [n=5]; END aguda [n=5]; END subaguda [n=5]; END crónica [n=5]). Para el estudio inmunohistoquímico, se obtuvieron cortes histológicos, se montaron en portaobjetos de adhesión Deltalab para inmunohistoquímica, se desparafinaron, hidrataron, lavaron con PBS y luego se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena. Posteriormente, se realizó la recuperación antigénica y la inmunotinción del VEGF y del VEGFR1, de acuerdo con las especificaciones de fábrica para cada anticuerpo. Para la evaluación de las muestras, se clasificó la intensidad de la marca de acuerdo con una escala de valores arbitrario fijada por el investigador (0: sin marca, 1: marca leve, 2: marca moderada, y 3: marca fuerte). Se observó marcación en las células del epitelio luminal y glandular del endometrio normal y con END. Se observó inmunomarcación del VEGF y del VEGFR1 tanto en las células luminales y glandulares de glándulas superficiales y profundas en ambos grupos. En END crónica sólo una muestra mostró marcación y la misma fue leve, mientras que en END aguda y subaguda, en cada grupo, 4 muestras mostraron marcación. La marcación incluyó inmunotinción leve, moderada y fuerte. Se observó, además, que cuando se expresó el factor también se expresó el receptor. Según nuestro conocimiento, no existen estudios de VEGF y VEGFR1 en endometrio de perras con END. Las marcaciones observadas en el tejido normal concuerdan con descripciones realizadas por Sagsoy y col., en endometrio canino en diestro. Aunque se desconoce la fisiopatología de la END en perras CS, esta afección probablemente esté asociada a una alteración del endometrio que involucra a la implantación por producir cambios en el ambiente uterino. Futuros estudios de expresión génica de VEGF y VEGFR1 son necesarios para dilucidar su rol en END en perras CS. Si bien en nuestro estudio la inmunolocalización endometrial de VEGF y de VEGFR1 fue la misma para el grupo normal y el grupo END, los resultados obtenidos aportan nuevos datos para avanzar en el conocimiento de la etiopatogenia de END subclínica en las diferentes especies, y más específicamente en la perra.

Migración y proliferación de células germinales primordiales (CGP) en ovarios de *Eumops patagonicus* (chiroptera molossidae)

RODRÍGUEZ, F.E.^{1,4}; OLEA, G.², AGUIRRE, M.V.^{1,2} Y LOMBARDO, D.M.^{3,4}

¹Instituto de Química Básica y Aplicada del Nordeste Argentino (IQUIBA-NEA); (CONICET - UNNE). ²Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Medicina. Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas (LIBIM). ³Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). ⁴Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)

Los mecanismos de migración de las CGP, la colonización de las crestas genitales por parte de estas y el desarrollo gonadal fueron muy estudiados en modelos roedores como *Mus musculus* y *Rattus sp.*, siendo escaso el conocimiento en otras especies silvestres. En mamíferos del orden Chiroptera se han llevado a cabo estudios en *Sturnira lilium* un microquiróptero perteneciente a la familia Phyllostomidae, demostrando la migración de las CGP a través del intestino posterior hasta llegar a la gónada indiferenciada en el estadio 13 de desarrollo y que el inicio de la diferenciación de las gónadas se observa en el estadio 17. La familia *Molossidae* se encuentra bien representada en la región Nordeste de Argentina, siendo *Eumops patagonicus* una especie de hábitos urbanos. Este trabajo tiene como objeto describir el desarrollo ovárico, así como también determinar e identificar el proceso de migración y proliferación de las CGP en *Eumops patagonicus* relacionando los eventos de diferenciación en relación con los estadios embrionarios. Se tomaron 4 embriones en diferentes estadios embrionarios (13, 17, 23, 25 según tabla de desarrollo de Rodríguez *et al.*) y se los procesó siguiendo la técnica histológica convencional con cortes de secciones de 3-4 µm de espesor para posteriormente ser coloreados con hematoxilina-eosina. Algunas secciones se sometieron a inmunomarcación de PCNA y OCT4. Se observaron en microscopio óptico de campo claro y se tomaron fotografías. Analizando la expresión de OCT4, se observó que en el estadio 13 de desarrollo embrionario las CGP se localizan a lo largo del mesenterio dorsal y en la cresta gonadal indiferenciada. En el estadio 17 se observó que la gónada, comienza a diferenciarse en ovario y puede observarse el conducto de Müller. Se observa positividad para PCNA en el tejido. En el estadio 23 se observa gran cantidad de nidos de ovogonia en los ovarios, los que están delimitados por una membrana basal, sin observarse células foliculares. En estadio 25, las ovogonias comienzan a ser rodeados por las futuras células foliculares, algunos con más de una ovogonia y positivas para PCNA. Estos resultados nos ayudan a comprender el proceso de migración y proliferación de las CGP en las gónadas de hembras de *Eumops patagonicus*. Estos resultados constituyen el primer aporte acerca del proceso de migración de las CGP y colonización de la gónada, así como el desarrollo del ovario de *Eumops patagonicus*.

Participation of aminoacids in capacitation and acrosome reaction of cryopreserved bovine spermatozoa

RODRIGUEZ, P¹; SATORRE, M.M.¹, CETICA, P.^{1,2} AND BREININGER, E.^{1,2}

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, INITRA, Química Biológica. ² CONICET-Universidad de Buenos Aires, INPA. Buenos Aires, Argentina.

Studies on *in vitro* capacitation and acrosome reaction (AR) in cryopreserved bovine spermatozoa are, mostly, performed in media containing pyruvate and lactate as oxidative substrates. There is not enough evidence about the role of aminoacids (Aa) as oxidative substrates in those processes. The aim of this work was to study the role of Aa in *in vitro* capacitation and AR of cryopreserved bovine spermatozoa. Frozen samples (n=5) were incubated in capacitating conditions in different media: TALP (pyruvate and lactate), TA (TALP without either pyruvate nor lactate), TALP + Aa, TA + Aa, TA + Aa + sodium salicylate (1, 5 o 10 uM, glutamate dehydrogenase inhibitor). After capacitation and AR, progressive motility (using light microscopy), viability (using trypan blue stain), capacitation (using chlortetracycline fluorescent technique), true acrosome reaction (using differential interferential contrast with trypan blue stain) and ammonia production (measured spectrophotometrically) were evaluated. Data of five replicates were evaluated for normality distribution with the Shapiro-Wilk test, analyzed by ANOVA and compared with the Bonferroni test. A $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. In TA medium, spermatozoa preserved progressive motility but failed to capacitate or respond to AR induction (*versus* TALP, $p < 0.05$). The addition of Aa (TA + Aa) did not improve the percentage of capacitated spermatozoa but it significantly diminished progressive motility and sperm viability (*versus* TALP, $p < 0.05$). The presence of 5 and 10 uM sodium salicylate reduced progressive motility even more ($p < 0.05$). The addition of Aa to TALP medium (TALP + Aa) did not modify any of the studied parameters (*versus* TALP $p > 0.05$). Ammonia production was higher in the treatments containing Aa and showed a significant decrease with all the concentrations of the inhibitor ($p < 0.05$). These results indicate that during the incubation of cryopreserved bovine spermatozoa in a capacitating medium, Aa are deaminated but they do not participate as oxidative substrates in capacitation or AR. Future studies on the utilization of other exogenous or endogenous oxidative substrates would complement these results and will contribute to elucidate the metabolic pathways used by cryopreserved bovine spermatozoa to obtain the energy required for those processes.

Efecto del virus de la diarrea viral bovina en cultivo primario de células endometriales infectados con el gammaherpesvirus bovino tipo 4: modelo *in vitro* de coinfección viral

ROMEO, F^{1,3}; GONZÁLEZ-ALTAMIRANDA, E^{1,2}; LOUGE URIARTE, E²; DELGADO S.G.³; PÉREZ, S^{1,4}; VERNA, A^{1,2*}

¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) Buenos Aires, Argentina. ² Grupo de Sanidad Animal, IPADS Balcarce Instituto de innovación para la Producción Agropecuaria y el Desarrollo Sostenible, Balcarce, Argentina. ³ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina. ⁴ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA)/CIVETAN, Sede Tandil, Buenos Aires, Argentina.

El virus de la diarrea viral bovina (DVB) y el gammaherpesvirus bovino 4 (BoHV-4) infectan el útero del ganado siendo responsables de importantes pérdidas económicas. La patogenia del BoHV-4 en el tracto reproductivo bovino se ha dilucidado en parte mediante pruebas en cultivos primarios. Es importante contar con condiciones *in vitro* óptimas, evitando la presencia de otros patógenos que puedan alterar los resultados. El DVB es uno de los contaminantes virales más frecuentes de los cultivos celulares. El biotipo del DVB no citopático (NCP) puede generar ganado infectado persistentemente (PI), siendo la principal fuente de transmisión del virus en rebaños susceptibles. El objetivo del presente trabajo fue evaluar cómo la infección natural de células endometriales bovinas (CEB) con una cepa NCP de DVB (CEB + DVB) afecta la replicación de BoHV-4. Los cultivos primarios de células BEC y BEC infectadas naturalmente con BVDV (BEC + BVDV) se cultivaron en placas de 24 pocillos, a una concentración de $2,2 \times 10^5$ células / ml. Se inocularon las monocapas confluentes con la cepa 10/154 de BoHV-4 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,5. Se recolectaron células y sobrenadantes a los tiempos post-inoculación (24, 48, 72 y 96 hpi) y se conservaron a -80 °C. Se extrajo el ARN de las células para amplificar los genes que codifican el transcripto 2 (IE2) y las glicoproteínas B (gB), H (gH) y L (gL) mediante RT-PCR y se evaluó la cinética de replicación viral por el método de titulación de punto final, utilizando las células MDBK, BEC y BEC + BVDV en placas de microtitulación. Bajo un diseño aleatorizado con tres repeticiones, los factores puestos a prueba fueron: medio de cultivo (con dos niveles: CEB libres de DVB y CEB + DVB) y tiempo de lectura (con 4 niveles: 24, 48, 72 y 96 hs). Se realizó el análisis de la varianza y el test Bonferroni. Los resultados de RT-PCR mostraron un retraso en la expresión génica del BoHV-4 para el gen IE2 y la glicoproteína gB; no habiendo diferencias en la cinética de expresión de las glicoproteínas gH y gL. En cuanto a los títulos virales se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los cultivos celulares en todos los tiempos, siendo siempre más bajos en células CEB + DVB. Se demostró cómo la infección natural de CEB con una cepa NCP de DVB afecta la expresión génica y la cinética de replicación de BoHV-4. El retraso en la expresión génica en las células CEB + DVB se puede atribuir a alteraciones producidas por el DVB en la célula huésped, lo que generaría la falta de factores celulares necesarios para que BoHV-4 pueda llevar a cabo su ciclo replicativo de forma eficiente. La comparación de los títulos de BoHV-4 en cultivos celulares mostró que la concentración viral en el medio extracelular se vio afectada por una infección previa con DVB. Este hallazgo destaca la importancia de detección de infección por DVB en cultivos de células primarias bovinas, para evitar interferencias biológicas o malas interpretaciones de los resultados a la hora de realizar estudios *in vitro* con BoHV-4.

Grandes cuerpos lamelares y su papel en los ovocitos del armadillo *Chaetophractus Villosus* (Xenarthra)

ROSSI, L.F.^{1,2} Y SOLARI, A.J.^{2,3}

¹Laboratorio de Biología Cromosómica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina. ³2da. Unidad Académica de Biología Celular, Histología, Embriología y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Con el objetivo de identificar y caracterizar una nueva estructura presente y no descripta en los ovocitos de algunas especies de armadillos, se estudió la ovogénesis de *Chaetophractus villosus* (Xenarthra) mediante microscopía óptica, microscopía electrónica (ME) e inmunohistoquímica para citoqueratina tipo 5/6. Las muestras de ovarios fueron obtenidas de colecciones realizadas para otros estudios (n=50), y de cuatro hembras que fueron biopsiadas con el fin de obtener material fijado en glutaraldehído para microscopía electrónica. Los ovocitos, al comienzo de la fase de crecimiento de los folículos muestran uno, dos y algunas veces tres grandes organelas visibles acidófilamente en microscopía óptica. La ME evidenció que estas organelas presentan laminillas que atrapan otras estructuras citoplasmáticas. Estas laminillas tienen un diámetro de 36-38 nm en secciones transversales, 48-52 nm en secciones tangenciales y presentan una periodicidad de 12-14nm. Esta organela (Cuerpo Multilamelar, CM) se encuentra más frecuentemente del lado del núcleo, opuesto a la región donde se encuentra el cuerpo multivesicular de Balbiani. El CM crece rápidamente en tamaño con los primeros signos de aumento de las células de la granulosa, hasta llegar a su desarrollo pleno en las primeras etapas de crecimiento folicular; luego decrece a medida que las células de las granulosa son altas y finalmente se reduce a pequeños remanentes cuando comienza a formarse el antro folicular. Entre las laminillas del CM se encuentran diferentes organelos citoplasmáticos: cuerpos vesiculares (63,23%), mitocondrias (26,45%), lisosomas (7,88%), gránulos de lipofuscina (0,94%) y cuerpos mielínicos (1,50%). Estos organelos están frecuentemente atrapados entre las lamelas, dejando una región citoplásmica, orientada hacia el núcleo, libre de organelos. La técnica de inmunohistoquímica fue positiva en el CM revelando la presencia de citoqueratina tipo 5. Se sugiere que esta organela ayuda en la formación de compartimentos citoplasmáticos en el ovocito temprano, favoreciendo la localización periférica de diferentes organelos como mitocondrias y cuerpos vesiculares. Cuando los ovocitos están bien desarrollados y se forma la zona pelúcida, el CM se reduce a pequeños restos detectados solo por microscopía electrónica de transmisión. El CM se desintegra cuando se desarrolla un antro. Este conjunto de citoqueratinas podría estar involucrado en la formación de filamentos y desmosomas que se encuentran en la periferia de los ovocitos tardíos.

Análisis morfométrico de espermatozoides de peces autóctonos de la Cuenca del Plata

SCHULMAN, E. ¹; TORRES, P. ^{1,2}; RIVOLTA, M.A. ^{1,2}; CARTELLE, J. ^{1,2} CISALE, H. ^{1,2,3} Y FISCHMAN, M.L. ^{1,2}

¹ Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Física Biológica. Buenos Aires, Argentina. ² Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Buenos Aires, Argentina. ³ Universidad de Buenos Aires - CONICET. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Investigaciones en Producción Animal (INPA). Buenos Aires, Argentina.

La morfología normal de los espermatozoides, junto con la movilidad, viabilidad, concentración e integridad de las membranas son indicadores de la calidad seminal. En peces autóctonos, la evaluación morfológica y morfométrica de los espermatozoides no se realiza rutinariamente, dado que no existe suficiente información acerca de los valores normales. Los sistemas computarizados para el análisis de semen (CASA) permiten determinar la longitud, ancho, área y perímetro de cada espermatozoide. Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio -en peces- mostraron que la Tinción 15[®] (T15[®]) es adecuada para estas determinaciones. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la morfometría de espermatozoides de especies autóctonas de la Cuenca del Plata. Se obtuvieron muestras de sabalito (*Cyphocharax voga*; n=12), dientudo (*Oligosarcus jenynsii*; n=6) y pejerrey (*Odontesthes bonariensis*; n=6) de lagunas de la Pcia de Buenos Aires. La extracción de semen se realizó mediante masaje abdominal. Con las muestras de cada especie se conformó un pool, que fue conservado en solución salina hiperosmolar hasta la realización de los frotis y su coloración con T15[®]. La morfometría espermática se determinó con un CASA (ISAS[®] Proiser, v1.2), evaluando la longitud, ancho, área y perímetro. Las variables en estudio no presentaron distribución normal (Prueba de Shapiro-Wilks modificada; p<0,05). Se analizó la existencia de diferencias inter especie en los parámetros estudiados mediante la prueba de Kruskal-Wallis (p<0,05). A su vez, para cada especie se evaluó la existencia de subpoblaciones espermáticas con diferentes características morfométricas, conformándose tres conglomerados (método de agrupamiento no jerárquico K-means). Se observaron diferencias significativas en todos los parámetros de tamaño evaluados entre los espermatozoides de sabalito (n=200), dientudo (n=250) y pejerrey (n=179). Para el pejerrey y el dientudo se obtuvo un conglomerado formado por aproximadamente el 50% de la población, y otros dos que abarcaron aproximadamente el 25% cada uno. En el caso del sabalito se encontró un conglomerado formado por el 98% de los espermatozoides. Al analizar los conglomerados más numerosos, se obtuvieron diferencias significativas en longitud, ancho, perímetro y área entre todas las especies (p<0,05). Intra-especie, se encontró un conglomerado de espermatozoides de mayor tamaño que presentó diferencias significativas (p<0,05) en todos los parámetros evaluados en pejerrey y dientudo. En sabalito, el conglomerado más numeroso correspondió al de menor tamaño espermático. El parámetro con menos variación entre especies fue el ancho. Si bien para determinar el tamaño espermático normal de cada especie, o la existencia de subpoblaciones espermáticas normales, se debería evaluar un mayor número de espermatozoides y considerar las diferentes etapas del ciclo reproductivo, el presente trabajo constituye una etapa inicial en el análisis de la morfometría de espermatozoides de peces de especies autóctonas.

Expresión del factor de crecimiento de endotelios vasculares y su receptor FTL-1 en el cuerpo lúteo de perras durante el diestro: estudios preliminares

STORNELLI, M.C.¹; PRADERIO, R.G.^{1,2}; GARCÍA, M.F.^{1,2}; NUÑEZ FAVRE, R.^{1,2}; GARCÍA MITACEK, M.C.^{1,2} Y STORNELLI, MA¹

¹ Cátedra y Servicio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP), Calle 60 y 118, La Plata; ² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290, CABA, Argentina.

En la perra, el cuerpo lúteo es la única fuente de progesterona en hembras preñadas y vacías, considerándose central en la regulación del ciclo reproductivo. La angiogénesis es un proceso esencial en la formación del cuerpo lúteo y está regulada por diversos factores, siendo el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) uno de los más importantes. El VEGF, actúa a través de dos receptores de tirosina quinasa (VEGFR1-VEGFR2), modula la migración y proliferación de células endoteliales e induce la permeabilidad vascular. La expresión lútea del VEGF y el VEGFR1 es de particular importancia en la neo angiogénesis y se correlaciona con el desarrollo y la funcionalidad del cuerpo lúteo. El objetivo fue evaluar la expresión de VEGF y su receptor VEGFR1 en el cuerpo lúteo de perras durante el diestro. Se incluyeron nueve perras mestizas, enteras, clínicamente sanas, en diestro, con un peso de entre ocho y 20 kg y entre nueve meses y seis años de edad. Todos los animales fueron incluidos en un programa voluntario para el control de la reproducción. Después de ser ovariectomizadas (OVH), las hembras se dividieron en tres grupos de tres hembras cada uno (n=3). Grupo (G)I hembras OVH 20 días después del primer día de diestro citológico (PDD), n=3; GII, hembras OVH entre 21 y 40 días después de la PDD, n=3; GIII, hembras OVH entre 41 y 60 días después de la PDD, n=3). El momento del diestro se determinó en base a la fecha del celo anterior y se confirmó en cada perra en relación a la citología vaginal y a la presencia de cuerpos lúteos (CL) en los ovarios. Luego de realizar la ovariectomía se colectaron los ovarios y se fijaron en solución formolada bufferada. Para el estudio inmunohistoquímico, se obtuvieron cortes histológicos, se montaron en portaobjetos con carga positiva, se desparafinaron, hidrataron, lavaron con PBS y luego se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena. Posteriormente, se realizó la recuperación antigénica y la inmunotinción del VEGF y del VEGFR1, de acuerdo con las especificaciones del inserto para cada anticuerpo. Se evaluaron los CL presentes en cada muestra a 400X y se valoró la intensidad de la inmunotinción como: ausente, débil, moderada, fuerte y muy fuerte. La inmunotinción de VEGF, se observó en las células lúteas y la misma fue muy fuerte en GI, fuerte en GII, y débil en GIII. Por otra parte, para el VEGFR1 la intensidad de la inmunotinción fue débil en GI, fuerte en GII y ausente en GIII. Nuestros resultados concuerdan con los hallazgos obtenidos por Gram y col en gestación temprana, media y tardía. Así mismo, Mariani y col comunicaron inmunotinción fuerte en diestro medio. Sin embargo, no observaron variación en la inmunotinción del VEGFR1 en los distintos momentos del diestro. Nuestros resultados para el VEGFR1 en el diestro medio, concuerdan con los comunicados por Papa y col. El grado de inmunotinción estaría relacionado con la funcionalidad del cuerpo lúteo a través del diestro. Más estudios posibilitarán comprender mejor la expresión del VEGF y del VEGFR1 y su relación con la funcionalidad del CL.

Evaluación de tres protocolos de criopreservación sobre la vitalidad e integridad acrosomal del espermatozoide de llama (*Lama glama*)

TARIFA, N.¹; MEZA, A.¹; AMPUERO, E.¹; ORDOÑEZ, C.¹; BECERRA, J.¹; HUAYLLANI, F.¹; CUTIRE, U.¹; KUAQUIRA, R.¹ Y CUCHO, H.¹

¹ Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS) La Raya; Escuela Profesional de Zootecnia; Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

La aplicación de biotecnologías reproductivas en la producción de llamas es limitada por la viscosidad del semen, por lo que no se tiene un protocolo de congelación efectivo. El objetivo del trabajo de investigación fue evaluar 3 curvas de criopreservación rápida, utilizando un equipo de congelación automática de semen; para ello se utilizaron 4 machos llamas del CICAS La Raya, Perú, con una edad de $6 \pm 0,82$ años y un peso de $143,6 \pm 9,95$ kg. Las muestras seminales fueron obtenidas por el método de electroeyacuación (EE), previa sedación con xilacina y ketamina en función al peso. Se realizaron 4 colectas por animal, con intervalos de una semana, durante la época reproductiva (enero-marzo). Se consideraron muestras adecuadas aquellas con concentración mayor a 50×10^6 espermatozoides/ml y una motilidad espermática superior a 50%, determinadas con un Spermtrack y un sistema CASA respectivamente. Las muestras fueron degelificadas con papaína ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$, 20 min, 37°C) e inhibidor E-64 (10 uM , 37°C , 5 min), en relación al volumen; luego fueron diluidas con dilutor base Tris, yema de huevo de codorniz, más glicerol al 7%, con una concentración final de 20×10^6 espermatozoides/mL. La refrigeración se hizo por 2,5 horas hasta que la temperatura descienda de 37°C a 5°C . Las curvas planteadas fueron P1: 13 minutos (inicio -5°C ; final -122°C), P2: 15 minutos (inicio -5°C ; final -95°C), y P3: 18 minutos (inicio 5°C ; final -122°C). El descenso de temperatura promedio fue de $-15,7$, $-10,3$ y $-11,2$ $^\circ\text{C}/\text{minuto}$, para P1, P2 y P3 respectivamente. El descongelado de las pajuelas se realizó luego de 7 días, en agua a 37°C por 30 segundos. Se realizó la evaluación de las características microscópicas: vitalidad (eosina-nigrosina) e integridad acrosomal (Coomassie Blue), las que consideramos son las más importantes cuando se criopreserva semen de camélidos. Se empleó un diseño de bloques al azar para evaluar estas variables. Al descongelado la vitalidad para P1, P2 y P3 fueron de $29,92 \pm 8,20$; $29,98 \pm 8,14$; $29,46 \pm 6,96$ % respectivamente, no existiendo diferencias significativas ($p > 0,05$). La integridad acrosomal para P1, P2 y P3 fueron de $76,81 \pm 9,93$; $74,73 \pm 9,54$; $73,18 \pm 8,63$ %, siendo P1 y P2 superiores a P3 ($p < 0,05$). Se concluye que P1 y P2 son ligeramente superiores en comparación a P3, recomendándose analizar la fragmentación del ADN espermático y evaluar protocolos de criopreservación de menos de 15 minutos.

Effect of the coculture of porcine luteal cells during *in vitro* maturation on the dna methylation pattern of porcine blastocysts

TEPLITZ, G.M.^{1,2}; SIRARD, M.A.³ Y LOMBARDO, D.M.^{1,2}

¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Buenos Aires, Argentina. ² Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Cátedra de Histología y Embriología. Buenos Aires, Argentina. ³ Département des Sciences Animales, Centre de Recherche en Reproduction, Développement et Santé Inter-générationnelle (CRDSI), Université Laval, Quebec, Canada.

In pigs, the *in vitro* embryo development is still an inefficient biotechnology. The coculture with somatic cells is an alternative to improve suboptimal *in vitro* culture conditions. Aberrant DNA methylation patterns of genes required for development are common in *in vitro* produced embryos and may indicate carryover effects of suboptimal culture conditions on epigenetic signatures. In the present study, we investigated the potential effect of a coculture system of porcine luteal cells during *in vitro* maturation (IVM) on blastocyst development and DNA methylation of embryos using the EmbryoGENE DNA Methylation Array (EDMA). The *cumulus*-oocyte complexes were matured *in vitro* in TCM199 supplemented with human menopausal gonadotrophin (control) or in coculture with porcine luteal cells from passage 1 (PLC-1). The coculture with PLC-1 significantly increased the blastocyst rate (blastocyst/cleavage) (control: 14.4%; PLC-1 21.2%; Fisher's test $p < 0.05$). DNA methylome array was used to identify differentially methylated regions between the control and the coculture. Among the over 180000 probes on the DNA microarray, the signal intensities of 57075 probes were found to be higher than the background signal in all four arrays of a given condition, and 49936 were commonly detected in the two sample groups. Differential methylated regions (DMRs) analysis indicated that the coculture with PLC-1 during IVM has a very mild global impact on the DNA methylation profile; a similar number of hypermethylated probes were significant in each condition (245 in control vs 268 in treatment). In the coculture group, more regions classified as hypermethylated were present in distal promoters, promoters, exonic and intronic than in the control. Also, a similar number of hypermethylated regions were present in repetitive elements, but low-complexity repetitive elements were more hypermethylated in the coculture. More hypermethylated regions in the control were located in CpG shore, CpG shelf, and open sea. On the other hand, the coculture exhibited more hypermethylated regions in CpGs islands. Therefore, this finding indicates that the culture condition during IVM induces changes in the DNA methylation landscape of the resulting blastocysts and affects embryo development.

Efecto de la suplementación con mioinositol sobre la calidad espermática de semen bovino criopreservado

VERÓN, G.L.¹; PALADEA, R.¹; BELLO²; MANJON, A.A.¹; MONTI, J.I.³ Y VAZQUEZ-LEVIN, M.H.¹

¹Laboratorio de Estudios de Interacción Celular en Reproducción y Cáncer. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET, Buenos Aires, Argentina. ²Dpto. de Metodología, Estadística y Matemática, Universidad de Tres de Febrero, Caseros, Buenos Aires, Argentina. ³ CIAVT, Venado Tuerto, Santa Fe, Argentina

Pese a la estandarización de la criopreservación de semen bovino, la calidad espermática de las muestras descongeladas es subóptima en muchos casos. Diversos grupos de investigación han evaluado la suplementación del semen bovino criopreservado con diferentes compuestos para aminorar el efecto deletéreo de la criopreservación. En particular, hay estudios que reportan una mejora en la calidad espermática de muestras humanas luego de la suplementación con mioinositol (MI), pero la bibliografía es escasa para muestras de semen bovino. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación con MI de semen bovino previamente criopreservado sobre la motilidad y cinemática espermática, vitalidad, competencia osmótica, estado del acrosoma, compactación de la cromatina y fragmentación del ADN. Se suplementaron 27 muestras de semen previamente criopreservado de 9 toros (CIAVT) con MI (2mg/ml) durante 1h. La motilidad y cinemática espermática (velocidad, progresión, desplazamiento de la cabeza) se evaluaron usando un sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis; ISAS v1, Proiser). Se calcularon índices de respuesta considerando la motilidad pre- y post-suplementación. La vitalidad espermática y la competencia osmótica se determinaron mediante tinción con Eosina y el ensayo de hinchazón hipo-osmótica (HOS), respectivamente. El estado del acrosoma se determinó mediante tinción con azul de Coomassie. La compactación de la cromatina y la fragmentación del ADN se evaluaron empleando la tinción con azul de anilina o el ensayo de TUNEL, respectivamente. La suplementación con MI resultó en un incremento significativo ($P < 0,05$) de diversos parámetros cinemáticos de velocidad (VSL, VCL, VAP), progresión (LIN, STR, WOB), desplazamiento de la cabeza (ALH, WOB) y frecuencia (BCF). Considerando los índices de respuesta, las muestras de 3/9 toros mostraron un incremento $>60\%$ en la motilidad progresiva, y las restantes mostraron un incremento $>30\%$. Más aún, la suplementación con MI no condujo a ningún efecto deletéreo sobre la vitalidad, competencia osmótica, estado del acrosoma, compactación de la cromatina ni fragmentación del ADN espermático. En conclusión, la suplementación con MI de muestras de semen bovino criopreservado condujo a un incremento en la motilidad y cinemática espermáticas, parámetros asociados al potencial fecundante, sin ejercer un efecto negativo sobre la vitalidad, competencia osmótica, estado del acrosoma, compactación de la cromatina o fragmentación del ADN.



.UBA veterinaria
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



Resúmenes Sesión de Reproducción Aplicada

Obtención de ovocitos mediante aspiración folicular transvaginal ecoguiada en yeguas con folículos de 10 a 20 mm

ANDRUET M.¹; FERRANTE A.^{1,2}; SANTA CRUZ R.¹; MERTIAN J.¹; ANAYA M.¹; IVANISSEVICH S.¹; VON MEYEREN M.¹; MUTTO A.¹

¹ Crest View Genetics, Luján, Buenos Aires, Argentina. ² Área de Teriogenología, INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

La capacidad de recuperar ovocitos mediante la aspiración folicular transvaginal ecoguiada (OPU) en yeguas y su posterior maduración *in-vitro*, ha permitido utilizar estas gametas en biotecnologías como la transferencia *in vivo* de ovocitos, la ICSI (*Intracytoplasmatic Sperm Injection*) y la Clonación por transferencia nuclear de células somáticas. Si bien esta técnica se ha desarrollado ampliamente para la obtención de ovocitos de folículos preovulatorios (diámetro ≥ 35 mm), quedan aspectos por evaluar en lo que respecta al diámetro de los folículos aspirados con respecto a la eficiencia de la recuperación ovocitaria. Por lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el porcentaje de recuperación de ovocitos obtenidos de folículos ≤ 20 mm. El estudio se realizó entre los meses de noviembre a junio, en 20 yeguas mestizas de entre 5-12 años, que presentaron al menos tres folículos de entre 10 y 20 mm de diámetro al momento de la OPU. Las yeguas fueron sedadas con una combinación de detomidina (2,2 μ g/kg) y xilacina (0,3 mg/kg) vía EV, seguida de una anestesia epidural con lidocaína 2% (5-6 ml totales). Además, se aplicó butilbromuro de hioscina EV (35-40 mg totales) para una mejor relajación del recto. Se utilizó un dispositivo de Aspiración Folicular (Watanabe, Tecnologia Aplicada Ltda, Cravinhos, Brasil) con transductor microconvexo de 6,5 - 7,5 MHz y aguja de doble vía 12G (V-EOAD-1260L, Cook, Australia) conectada a una bomba de vacío y a una jeringa de 20 ml desde la que se inyectó el medio de lavaje folicular. Cada uno de los folículos se lavó entre 6-10 veces, independientemente de la yegua y fue clasificado según el diámetro, tomando dos mediciones por folículo, en 3 grupos: folículos de 20mm, 15mm y 10mm. Los resultados se analizaron mediante una prueba de chi cuadrado, con una significancia del 5% ($p < 0,05$). No se observaron diferencias significativas ($p = 0,7154$) entre el porcentaje de ovocitos recuperados de folículos de 20 (50%), 15 (46,51%) y 10 mm (55,88%). Es factible seleccionar cualquiera de estos 3 diámetros foliculares con las mismas probabilidades de obtener un ovocito.

Efecto de la época y la edad sobre la circunferencia escrotal y la calidad del eyaculado en carneros.

ARELLANO ZAMORA A¹, GARCÍA RODRIGUEZ R² Y HERNÁNDEZ GAMBOA JF².

¹ Universidad Nacional Autónoma de México. ² Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala.

Algunos de los factores que afectan la fertilidad en el ovino son la edad del animal, la época del año y el fotoperiodo. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue analizar los efectos de la edad y la época sobre la calidad del eyaculado que presentan los carneros a lo largo del año. Se realizó en el rancho "Marfil" ubicado en la localidad Río Frío, Ixtapaluca, México. Para el desarrollo de la investigación se muestrearon doce sementales ovinos con edades de uno a tres años, incluyendo 5 animales de un año y 7 animales de más de dos años de edad. Los parámetros de circunferencia escrotal, volumen del eyaculado, concentración espermática y motilidad masal se registraron mensualmente; durante un año. Se empleó un análisis de varianza, para observar el efecto de edad y temporada y para la comparación de las medias se aplicó la prueba Tukey ($P \leq 0.05$) con el paquete estadístico IBM SPSS Statics 20. La circunferencia escrotal y el volumen del eyaculado no presentaron diferencias estadísticas significativas entre los grupos de edad (registrando como jóvenes los ovinos de un año ($n=5$) y como adultos los carneros de dos y tres años de edad ($n=7$)). En contraste, la edad tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la motilidad masal entre los dos grupos de edad, siendo superior la motilidad en los ovinos jóvenes con un valor de 3,52 e inferior para los adultos con 2,74 en una escala de valoración de 1 a 5. Por otro lado, al respecto de la concentración espermática el grupo de sementales de un año de edad mostró ser significativamente inferior con un valor promedio de 1.497,69 millones de espermatozoides/ml, y el grupo de los adultos fue superior con 2,106.14 millones de espermatozoides/ml. Cabe resaltar que los grupos de edad con menor motilidad presentaron mayor concentración y viceversa, los grupos de edad con mayor motilidad presentaron menor concentración espermática. La Circunferencia Escrotal no presentó diferencias estadísticas significativas para el efecto de la temporada, presentando valores de 35,29 cm para la T1 (junio, julio y agosto), 34,60 cm para la T3 (diciembre, enero y febrero), 34,45 cm para la T2 (septiembre, octubre y noviembre) y 34,24 cm en la T4 (marzo, abril y mayo), promediando un valor de 34,64 cm durante todo el año. El efecto que tuvo la época del año sobre el volumen del eyaculado no fue estadísticamente significativo fluctuando entre 0,9 y 1,16 ml. La motilidad masal exhibió valores diferentes estadísticamente significativos bajo el efecto de la temporada. Presentando valores superiores la T2 con 3,63, con valores intermedios en T1 y T4 de 3,49 y 2,62 respectivamente e inferiores en T3 con 2,29. Existe una diferencia estadística significativa en el efecto de la temporada sobre la concentración espermática presentándose el mayor valor en la T4 con 2.158,14 millones de espermatozoides por ml y el menor valor en la T2 con 1.414,35 millones de espermatozoides por ml. Se concluye entonces que los sementales ovinos evaluados presentan un comportamiento reproductivo estacional debido a que, si existen diferencias estadísticas en la calidad del eyaculado entre las diferentes temporadas del año.

Efecto del agregado de yema de huevo a un diluyente comercial para la refrigeración de semen de llama

BERTUZZI ML^{1,2}, FUMUSO FG^{1,2}, VELASQUEZ GONZALEZ N¹, CARRETERO MI^{1,2}

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Cátedra de Teriogenología. ² CONICET.

La refrigeración de semen es una biotecnología útil para la que pueden utilizarse diluyentes caseros o comerciales, presentando estos últimos ciertas ventajas sobre los primeros. Si bien no existen diluyentes comerciales diseñados específicamente para los camélidos sudamericanos (CSA), existen reportes del uso de algunos de ellos tanto en alpacas como en llamas. Aunque formulado para rumiantes, el diluyente Andromed® (AM) ha sido utilizado para refrigerar espermatozoides de CSA con resultados variables. De acuerdo al fabricante, este diluyente no requiere la adición de yema de huevo (YH), sin embargo, se conoce que la adición de la misma a algunos diluyentes mejora la criopreservación de los espermatozoides. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del agregado de YH al diluyente AM en la refrigeración de semen de llama. La experiencia se realizó en la FCV-UBA. Se colectaron 16 eyaculados de 4 llamas que se evaluaron, dividieron en 2 alícuotas y se diluyeron con AM y AM con 20% de YH (AMYH) (0 hs), alcanzando una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/ml. Las muestras fueron refrigeradas a 5°C en Equitainer® y se evaluaron las siguientes características seminales luego de 24 y 48 hs de conservación: movilidad, funcionalidad de membrana, viabilidad, integridad acrosomal y morfologías espermáticas. Los resultados fueron analizados utilizando un diseño factorial y un test de Kruskal-Wallis. Al diluir las muestras con AMYH (0 h) se observó una modificación en los patrones de movilidad, aumentando la movilidad progresiva y disminuyendo la movilidad oscilatoria ($p < 0.05$), sin observarse diferencias en la movilidad total (MT) respecto al semen fresco ni a las muestras diluidas con AM ($p > 0.05$). Se observó una disminución de la MT en las muestras refrigeradas con AM, tanto a las 24 como a las 48 hs, con respecto al semen fresco (SF) (SF $58,6 \pm 11,5\%$; AM24 $25,1 \pm 25,0\%$ y AM48 $21,0 \pm 21,4\%$; $p < 0.05$). Aunque la MT disminuyó en las muestras refrigeradas con AMYH a las 48 hs de conservación respecto al SF, no se observaron diferencias a las 24 hs respecto al SF ni a las muestras diluidas (0 hs), ni tampoco entre las 0 hs y las 48 hs de refrigeración (AMYH0 $53,0 \pm 13,1\%$; AMYH24 $39,8 \pm 12,8\%$ y AMYH48 $30,8 \pm 17,6\%$). El porcentaje de espermatozoides vivos intactos disminuyó en las muestras refrigeradas con AM y con AMYH a las 24 y 48 hs con respecto al SF (SF $64,0 \pm 13,2\%$; AM24 $37,0 \pm 23,4\%$; AMYH24 $42,4 \pm 18,0\%$; AM48 $30,1 \pm 23,2\%$ y AMYH48 $41,6 \pm 16,3\%$; $p < 0.05$). Se observó un aumento del porcentaje de espermatozoides muertos reaccionados en las muestras refrigeradas con AM a las 24 y 48 hs con respecto al SF (SF $15,9 \pm 8,1\%$; AM24 $30,4 \pm 14,0\%$ y AM48 $37,0 \pm 22,0\%$, $p < 0.05$). Aunque la funcionalidad de membrana y el porcentaje de espermatozoides con morfología normal se conservó en las muestras refrigeradas, se observó una disminución del porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática en las muestras refrigeradas con AMYH (24 y 48 hs) con respecto al SF ($p < 0.05$). El agregado de YH al diluyente AM posee un impacto positivo en la refrigeración de espermatozoides de llama.

Comparación entre técnicas diagnósticas para definir el grado de desarrollo reproductivo en vaquillonas de razas cárnicas

BILBAO MG^{1,2}, MORAN KD^{1,2}, ZAPATA LO², PICCO R³, MASSOLA L³, BARTOLOMÉ JA².

¹ CONICET; ² FCV, UNLPam; ³ Actividad privada.

La inseminación artificial (IA) es una herramienta clave en el servicio de vaquillonas (Vq) para carne ya que permite incorporar genética y mejorar la eficiencia reproductiva. El diagnóstico del grado de desarrollo reproductivo (GDR) previo al servicio es fundamental para el empleo de IA dado que posibilita predecir los resultados de preñez. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue comparar el valor predictivo de la palpación transrectal (PT) del tracto genital versus la PT acompañada de ultrasonografía (PT+US) en la identificación de Vq cíclicas mediante el diagnóstico de GDR. Para ello, un mes antes de la IA a tiempo fijo se llevó a cabo la evaluación pre-servicio sobre un grupo de Vq británicas de 13 a 14 meses en sistema feed-lot. El diagnóstico de GDR (de 1 a 5, según la escala de Anderson, 1987) se realizó por una de las siguientes técnicas: PT (n = 48) o PT+US (n = 46). Se seleccionaron Vq con GDR \geq 3. Al mismo tiempo, se recolectaron muestras de sangre para cuantificación de progesterona (P4, ng/mL) por Radioinmunoanálisis. Se consideró variable respuesta a la concentración de P4. Se estudió la asociación entre GDR, obtenido por PT o PT+US, y P4 por medio de la Correlación de Spearman. La comparación entre técnicas se realizó mediante la prueba de ANOVA con un diseño de bloques, luego de una transformación de P4 para garantizar el cumplimiento de los supuestos (normalidad, homogeneidad de varianzas y no interacción entre bloques). El tamaño del efecto se estimó con η^2 . Los valores se expresan como $\bar{x} \pm$ SEM. Se consideraron diferencias cuando $P < 0.05$, y tendencias cuando $0.05 \leq P < 0.10$. Los datos se procesaron con Microsoft Excel 2010, R (ver. 4.1.0) y RStudio (ver1.4.1717). Los valores de GDR, diagnosticados por PT o PT+US, y la concentración de P4 correlacionaron positivamente ($\rho = 0,62$, $P < 0,001$; y $\rho = 0,69$, $P < 0,001$, respectivamente). Por PT, se diagnosticaron: 6 Vq con GDR = 3, 18 Vq con GDR = 4, y 24 Vq con GDR = 5. La concentración de P4 para cada valor de GDR fue: $(2,11 \pm 0,50)$ ng/mL, $(3,39 \pm 0,78)$ ng/mL, y $(9,42 \pm 0,97)$ ng/mL, respectivamente. Por PT+US, se diagnosticaron: 8 Vq con GDR = 3, 4 Vq con GDR = 4, y 34 Vq con GDR = 5. La concentración de P4 para cada valor de GDR fue: $(1,26 \pm 0,36)$ ng/mL, $(3,21 \pm 0,87)$ ng/mL y $(13,99 \pm 1,27)$ ng/mL, respectivamente. Se detectó un efecto de la técnica ($P < 0,001$), con $\eta^2 = 0,07$. Estos resultados sugieren que, si bien PT o PT+US permiten distinguir Vq con GDR diferentes, la US empleada para determinar la presencia de cuerpos lúteos (CL) acompañando al PT en el diagnóstico de GDR otorga mayor precisión en la identificación de Vq con GDR = 3 y baja P4, es decir que no estén ciclando. Asimismo, los valores de P4 para Vq con GDR = 4 reflejan la presencia de animales en estro y metaestro, mientras que para GDR = 5, los valores de P4 son más elevados por tratarse de Vq en diestro.

Inducción de la ovulación múltiple utilizando eCG de origen recombinante en ovinos

BRUNO GALARRAGA M¹, FERNANDEZ J¹, CATTANEO L², BO G³, GIBBONS A¹, CUETO M¹.

¹INTA EEA Bariloche. ²UNL-FCV y Zoovet. ³IRAC y UNVM

La gonadotropina coriónica equina (eCG) es una hormona glicoproteica producida a partir de la extracción del suero sanguíneo de yeguas preñadas que se ha utilizado para inducir ovulación múltiple asociada a FSHp o sola a dosis única en ovinos. Recientemente se ha producido esta hormona de forma recombinante (reCG) siendo comprobada su bioactividad en el ganado ovino en protocolos de sincronización de la ovulación. El objetivo de estos trabajos fue evaluar la respuesta multiovulatoria en ovinos utilizando distintas dosis de reCG en comparación con eCG de origen sérico. Para ello, durante la estación reproductiva, se realizaron 2 ensayos utilizando 48 y 24 ovejas Merino adultas. Las ovejas fueron sincronizadas en sus estros mediante esponjas intravaginales (60 mg MAP, Progespon®, Syntex, Arg) por 14 días. En el ensayo 1, al momento del retiro de la esponja, las ovejas fueron divididas aleatoriamente en 4 grupos experimentales: Grupo eCG sérica (n=12): recibieron 1000 UI de eCG i.m (Novormon®, Zoetis, Arg) y los Grupos reCG700, reCG1000 y reCG1300 (n=12 cada uno): recibieron una dosis única de 700, 1000 y 1300 UI de reCG i.m (FOLIREC®, Zoovet, Arg), respectivamente. Asimismo, en el ensayo 2, las ovejas fueron divididas aleatoriamente en 2 grupos: Grupos reCG280 (n=12) y reCG420 (n=12), recibiendo una dosis única de 280 y 420 UI de reCG i.m (FOLIREC®, Zoovet, Arg), respectivamente. A los 7 días luego del retiro de las esponjas, mediante observación laparoscópica, se evaluó el número de cuerpos lúteos (CL) y la presencia de folículos anovulatorios por hembra. Los resultados de cada ensayo se analizaron mediante un test ANOVA. El nivel de significancia se definió para un valor de $P < 0,05$. En ambos ensayos, se evidenció que la administración a dosis única de reCG al finalizar el tratamiento progestacional puede provocar la inducción de ovulaciones múltiples. En el ensayo 1, el grupo reCG700 presentó una mayor respuesta ovulatoria ($8,2 \pm 1,0$) en comparación con las respuestas ovulatorias obtenidas en los grupos de eCG sérica, reCG1000 y reCG1300 ($5,3 \pm 1,0$; $4,2 \pm 1,0$ y $2,4 \pm 1,0$ CL, respectivamente, $P < 0,05$). Sin embargo, los grupos reCG manifestaron una considerable presencia de folículos anovulatorios ($4,8 \pm 0,9$ reCG700; $5,9 \pm 0,9$ reCG1000 y $8,5 \pm 0,9$ reCG1300) en comparación con el grupo eCG sérica ($2,0 \pm 0,9$, $P < 0,05$). En el ensayo 2, los grupos reCG420 y reCG280 manifestaron una respuesta multiovulatoria elevada ($10,1 \pm 1,2$ y $9,2 \pm 1,4$ CL, respectivamente), con una baja presentación de folículos anovulatorios ($0,3 \pm 0,8$ reCG280 y $0,7 \pm 0,8$ reCG420), no evidenciándose diferencias entre las dosis utilizadas ($P > 0,05$). En conclusión, la utilización de reCG en protocolos de ovulación múltiple en ovinos se presenta como una opción atrayente para la producción de embriones, considerando que las dosis de reCG280 y reCG420 permitieron alcanzar una buena respuesta ovulatoria con baja presencia de folículos anovulatorios. Se destaca además que la producción de eCG recombinante constituye una alternativa al uso de animales para la obtención de eCG sérica.

Evaluación del efecto de dos crioprotectores utilizados a diferentes concentraciones en la criopreservación de semen de asnos raza remonta argentino

BRUNO, S², PLAZA, J¹, OLIVIERI, G², FERRANTE, A¹, NIETO, E¹, MIRAGAYA, M¹

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Teriogenología, INITRA. ² Haras Militar "General Lavalle", Dirección de Remonta y Veterinaria, Ejército Argentino.

Los asnos han sido domesticados durante los últimos 5000 años y a lo largo de la historia fue particularmente interesante la importancia económica que estos animales tuvieron. Como consecuencia del desarrollo industrial, los asnos perdieron relevancia y quedaron ligados únicamente a algunas áreas subdesarrolladas. Lamentablemente, la rápida retracción del tamaño de las poblaciones llevó a esta especie a estar en riesgo de extinción. Por lo tanto, es indispensable la preservación de un pool genético. La inseminación artificial es el instrumento de mayor impacto sobre el mejoramiento genético y la producción animal, pues permite que un reproductor pueda dejar centenares de descendientes a lo largo de su vida e incluso después de su muerte, si se criopreservó su semen. En esta especie son escasas las investigaciones en biotecnologías y el congelamiento de semen ha sido poco empleado y con escasa eficacia. Informes recientes han mostrado resultados alentadores que respaldan el uso de las amidas como crioprotectores en semen de équidos. El objeto del presente trabajo fue evaluar los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* al criopreservar semen de asnos utilizando Metilformamida (MF) y Dimetilformamida (DMF) al 5 y 7% como crioprotectores penetrantes y sometiendo a los espermatozoides a una curva rápida de congelamiento dentro de un termo nitrógeno líquido. Se utilizaron tres eyaculados procedentes de OCHO (8) asnos de raza Remonta Argentino, de 3 a 8 años de edad. Las muestras fueron diluidas en un medio comercial BotuSemen Gold ® (con Caseinato y Colesterol). Se dividió el volumen final en cuatro alícuotas y se centrifugó durante 15 minutos a 1900 rpm. Luego se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en cuatro medios de congelamiento: MF y DMF al 5 y 7 %, con el agregado de yema de huevo, lactosa al 11%, *ovus es paste* y el diluyente BotuSemen Gold ®. Para congelar se utilizó una curva de descenso rápido de temperatura dentro de un termo de nitrógeno líquido. Post descongelamiento, se evaluaron: parámetros cinemáticos (movilidad total, progresiva, progresiva rápida, lenta, circular, inmóviles) mediante un Sistema de Análisis Computarizado (AndroVision®; Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany), morfología espermática, funcionalidad de membrana y presencia de acrosoma mediante la técnica combinada de HOS Coomassie. Finalmente, se inseminaron dos grupos de 15 hembras equinas cada uno, con el semen procedente de dos asnos que evidenciaron las mejores respuestas *in vitro*, empleando los medios compuestos por DMF al 5 y DMF al 7%. Los parámetros *in vitro* evaluados demostraron que no existen diferencias significativas entre los cuatro medios empleados. Se evidenció la existencia de un elevado efecto individuo, que categorizó a los asnos en 3 grupos significativamente diferentes ($p < 0,05$). Al inseminar las hembras equinas se obtuvo un 46% de preñez (7/15) al emplear DMF al 5% y 0% preñez (0/15) al utilizar las muestras procesadas con DMF al 7%. Es factible obtener preñeces mulares al emplear la técnica rápida de congelamiento de semen en un termo de nitrógeno y utilizando como crioprotector penetrante 5% DMF. Son necesarias investigaciones de mayor profundidad para hallar la causa por la cual al incrementar la concentración del crioprotector no se obtuvieron preñeces.

Determinación del largo fetal a los 35 días de gestación en ovinos de raza frisona mediante ecografía abdominal

CARANCCI P¹.; PEDREIRA KANTER M.¹.; SCHUH A.¹.; SESTO I.¹.; VEKSLER HESS J.¹.; COPPOLA M¹.

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Producción Ovina.

La imposibilidad de realizar tacto rectal para la determinación de preñez en ovinos, convierte a la ecografía en la técnica de elección para tal fin. Por medio de ella, se puede diagnosticar preñez temprana de modo práctico y eficiente. Este diagnóstico facilita el descarte oportuno de aquellas hembras infértiles del plantel, como así también, permite diferenciar hembras con preñeces simples de múltiples y, de ese modo, favorecer la toma de decisiones acerca del manejo nutricional de los animales. Además, al poder determinar la edad gestacional, permite diferenciar a los lotes en “cabeza” y “cola” de parición para ordenar las tareas zootécnicas posteriores. En los ovinos, cuando se utiliza la ecografía por vía transabdominal, la misma debe realizarse a partir de los 30 días de gestación para lograr una certeza de más del 95%. Teniendo en cuenta la diferencia de tamaño adulto entre las distintas razas ovinas, el objetivo de este trabajo fue determinar el largo fetal a los 35 días de gestación en ovinos de raza Frisona mediante ecografía transabdominal. Para tal fin, en el Tambo ovino de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, durante los años 2013, 2017, 2018 y 2020 se llevó a cabo el diagnóstico ecográfico a los 35 días de gestación de un total de 24 ovejas Frisonas de diferentes edades y diferentes antecedentes de gestación, pero similares condiciones de sanidad y nutrición. Todas las ovejas fueron alimentadas a base de heno de alfalfa y pellets de alfalfa y suplementadas con granos de maíz, ajustando su ración a los requerimientos nutricionales de las distintas etapas fisiológicas. El manejo sanitario implementado consistió en la vacunación contra enfermedades clostridiales (en preservicio y parto) y la desparasitación en los mismos momentos según resultados de HPG. A fin de determinar la edad gestacional se marcaron los carneros con el objetivo de identificar el día de la monta. Para la realización de las ecografías se utilizó un equipo de ultrasonido de modo B en tiempo real con sonda microconvexa de 5 Mhz. La longitud fetal promedio obtenida a raíz de esos diagnósticos fue de 2,394 cm con un desvío estándar de 0,37 cm. De los resultados obtenidos, se desprende que existe una diferencia de tamaño con respecto a las longitudes fetales promedio registradas en la bibliografía para otras razas como, por ejemplo, la Corriedale, en la que el promedio del largo fetal para el día 35 de gestación es de 1,20 cm. En base a los resultados obtenidos, se concluye que, para estimar la edad gestacional de ovejas de raza Frisona por ecografía abdominal, se deben considerar valores diferentes a los que existen en otras razas en la bibliografía actual.

¿El aceite de oliva virgen extra puede mejorar la calidad de semen porcino?

COMPAGNONI M., FAGES S., TITTARELLI C., DE LA SOTA R. L., WILLIAMS S.

Instituto de Investigaciones en Reproducción Animal (INIRA). FCV, UNLP. Calle 60 y 118 B1900AVW, La Plata.

En la producción porcina el verraco es quien determina, entre otros factores, muchos de los índices productivos del establecimiento, como la ganancia diaria de peso, la conversión alimenticia, % de cortes nobles. Desde hace años las diferentes empresas de genética trabajan para lograr animales que den un producto final comercializable y buscado por el consumidor. Es por esto que, en machos reproductores genéticamente superiores, se busca una excelente calidad de semen. Cuando se trata de mejorar los parámetros seminales de reproductores, productos como las semillas de lino, aceite de pescado, aceite de oliva virgen extra (AOV) entre otros; han sido utilizados como suplementos dietarios para intentar optimizar dichos parámetros. El objetivo de este estudio fue determinar si la suplementación oral con AOV modifica la calidad del semen porcino. Para esto se utilizaron machos (N=8) de genética definida, alojados bajo condiciones ambientales controladas en un centro de inseminación artificial (Córdoba, Argentina). Los mismos se distribuyeron al azar en dos grupos iguales. Al grupo tratado (TRT) se le suministró durante 7 semanas AOV 5% v/p con la ración de balanceado, no así en el grupo control (CON). La calidad de los eyaculados se determinó a través de los análisis microscópicos realizados por el sistema computarizado de análisis seminal (AndroVision®, sistema CASA de Minitube), una vez por semana durante un total de 19 semanas; 6 previas al tratamiento (PRE), 7 durante el mismo (INTRA) y 6 luego de finalizado el tratamiento (POS), en los meses de abril a julio. Los parámetros evaluados fueron % de la motilidad total (MT), % de motilidad progresiva (MP) y % total de morfoanomalías (TOTMORF) detectadas por el sistema CASA: gota citoplasmática proximal (GCP), gota citoplasmática distal (GCD) y cola en látigo (CL). Se compararon los parámetros de ambos grupos entre sí. Los datos se analizaron mediante ANOVA de mediciones repetidas en el tiempo utilizando el procedimiento GLM de SAS®. Los resultados mostraron mayor dispersión de MT en los eyaculados del periodo POS del grupo CON, observando valores entre 73,32-95,19%, mientras que en el grupo TRT para el mismo período, dichos valores se hallaron más concentrados alrededor de la media, entre 86,49-96,09%. La MP de los eyaculados del grupo TRT POS tratamiento se encontró entre 69-80,85%; mientras que en el grupo CON ningún eyaculado alcanzó el 80%. Las GCD y CL no mostraron valores numéricamente llamativos en ningún periodo o grupo; pero cuando observamos las GCP en el grupo CON tanto en el periodo PRE como en el POS se distribuyeron entre el 2 y 11%, mientras que el mismo parámetro en el grupo TRT se mantuvo en ambos periodos entre el 0 y 7%. A pesar de lo evidenciado, ninguno de los parámetros analizados mostró diferencias estadísticamente significativas cuando fueron comparados los grupos entre sí. Posiblemente con un mayor número de animales o bien en una época del año donde se observe un descenso de la calidad seminal, podríamos hallar diferencias significativas entre los grupos.

Efecto del plasma seminal equino sobre la capacitación espermática

FERRANTE A.^{1,2}, CALDEVILLA M.¹, MIRAGAYA M.^{1*}, VAZQUEZ LEVIN M.H.^{2*}

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Cátedra de Teriogenología.² Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET-FIBYME. Buenos Aires, Argentina. *Igual contribución.

Evidencias sugieren que el plasma seminal contiene componentes que modulan la capacitación y la reacción acrosomal (RA) de los espermatozoides. El objetivo fue evaluar el efecto del agregado de 5 y 10 % de plasma seminal autólogo (PS) sobre espermatozoides equinos incubados en condiciones que promueven la capacitación espermática y luego incubados con progesterona (Prg) para inducir la RA. Se obtuvieron 15 eyaculados de 5 padrillos fértiles (n= 5; r= 3). El semen fue centrifugado a 800 xg por 10 min seguido de 1000 xg por 20 min para separar el PS de espermatozoides y detritos. El PS se almacenó a -20 °C hasta su uso. El semen fue diluido (100×10^6 espermatozoides/ml) con extender a base de leche descremada y centrifugado a 300 xg por 20 min sobre columnas de Androcoll-E™ para seleccionar suspensiones de espermatozoides móviles, las que se resuspendieron en: a) medio "Whittens modified" con 25 mM HCO₃Na; 2,4mM CaCl₂ y 6 mg/ml de sero-albúmina bovina (BSA) para inducir la capacitación (MW-BSA), b) MW-BSA con 5 % PS y c) MW-BSA con 10 % PS. Las suspensiones se incubaron durante 3 h a 38 °C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ en aire, seguido de 30 min adicionales con el agregado de Prg 3,2 μM, como agente inductor de la RA. Se evaluaron los parámetros cinemáticos utilizando un sistema CASA (ISASV1), la viabilidad y el estado del acrosoma de los espermatozoides con la tinción FITC-PNA/PI en muestras a tiempo 0 y a las 3,5 h de incubación, y eventos tempranos de la capacitación espermática mediante la detección de proteínas fosforiladas en residuos tirosina (proteínas Tyr-P) por inmunocitoquímica en espermatozoides con membrana funcional a tiempo 0 y 3 h de incubación. Los datos se analizaron con un diseño de parcelas divididas en el tiempo tomando al macho como bloque, considerando los factores: tratamiento (0; 5 y 10% PS) y tiempo (0; 3 y 3,5 h), con una significancia del 5% (p<0,05). Como resultado, se determinó que la incubación de los espermatozoides por 3,5 h con o sin PS no mostró diferencias significativas en los valores de los parámetros cinemáticos evaluados. Por otra parte, el agregado de 5 y 10% de PS se asoció a una inhibición de los eventos tempranos de la capacitación, evidenciado por un menor (p<0,05) porcentaje de espermatozoides con patrones de las proteínas Tyr-P característicos de células capacitadas. Mas aún, el agregado del PS al 5 y 10% condujo a una inhibición (p<0,05) de la RA de espermatozoides capacitados inducida por Prg (Prg-RA). En conclusión, el agregado de PS autólogo tuvo un efecto protector sobre los eventos tempranos (Tyr-P proteínas) y tardíos (Prg-RA) de la capacitación de espermatozoides equinos.

Análisis de variabilidad genética utilizando marcadores SNP vinculados a la fertilidad en toros de raza Criollo Uruguayo

FILIPIAK, Y.; ARMSTRONG, E.M.; FILA, D.E.; ARAGUNDE, R.; BOGGIO DEVINCENZI, J.C.; LLAMBÍ M.S.

Facultad de Veterinaria, Udelar, Montevideo, Uruguay

El Bovino Criollo Uruguayo (BCU) ha persistido en Uruguay en la reserva de San Miguel del Ministerio de Defensa (~600 animales) concentrados en un mismo lugar, lo que supone un riesgo de extinción en el caso de emergencia sanitaria o ambiental. Si bien se han realizado diversas investigaciones de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en BC, no se han encontrado antecedentes en cuanto al estudio de SNPs asociados a fertilidad. Este tipo de polimorfismos distribuidos a lo largo del genoma es una de las fuentes más importantes de variación (1 cada 1000 pares de bases del ADN en promedio). Se estudió la variabilidad genética de los 26 toros de la reserva para SNPs identificados en genes vinculados a la calidad seminal y fertilidad. Se aisló ADN de folículo piloso utilizando un kit comercial de extracción de ácidos nucleicos (MagMAX™ -96DNA Multi-Sample Kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Se cuantificó y valoró la integridad del ADN extraído en geles de agarosa al 1% y equipo NanoDrop™ ND-1000 UV-vis spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE). El ADN se conservó congelado a -20 °C. Las muestras se enviaron a genotipar a la empresa Genexa (Uruguay), con el panel de genotipado masivo Axiom Bovine v3 de Affymetrix (ThermoFisher Scientific). Los SNPs analizados se seleccionaron en base a su ubicación en genes candidatos correlacionados estadísticamente a parámetros reproductivos: IGF1, IGFR1, SEPT12, CCT6A, 7SK, HS6ST2, SFMBT1, SOX5 y a las bases de datos genómicas (ENSEMBL, <http://www.ensembl.org>). Se calculó las frecuencias alélicas y genotípicas, equilibrio Hardy-Weinberg (H&W) y coeficiente de endogamia. El 75% de los genes seleccionados presentaron variaciones del tipo SNP, salvo IGF1 y 7SK. 14 de 26 SNPs (54%) se encuentran fijados con una frecuencia del alelo minoritario menor a 0,05, de los cuales 10 presentaron frecuencia =1. Esto podría responder a que los animales provienen de una población cerrada, que ha permanecido aislada durante varias décadas, así como a características propias de los BCU. El coeficiente de endogamia arrojó un valor positivo y alto de 0.123, debido en gran parte a los SNPs fijados, lo que se podría relacionar con elevada consanguinidad. Siendo una muestra reducida, no representativa de la población y que los SNPs estudiados fueron detectados en otras razas, no se pueden extraer conclusiones con respecto a toda la población. De todas formas, es esperable que en una población cerrada exista un alto porcentaje de marcadores fijados. 11 de los 12 marcadores no fijados se encuentran en equilibrio H&W ($p > 0.05$), lo cual sugiere ausencia de selección. Si bien no es posible mediante este análisis determinar el impacto de estos SNPs en la fertilidad o características seminales, debido al tamaño de la muestra, es interesante conocer estos aspectos genéticos ya que los 26 toros constituyen la totalidad de progenitores y propagadores de genes para las próximas generaciones de BCU.

Endometris clínica y subclínica en vacas lecheras en sistemas a pastoreo

FRANA, E.^{1,3}; VÁZQUEZ, M.I.^{2,5}, MARINI, P.R.^{1,3,4}

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias - UNR. ² Dpto. Reproducción Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC. ³ Centro Latinoamericano de Estudios de Problemáticas Lecheras (CLEPL). ⁴ CIC-UNR. ⁵ INCIVET UNRC-CONICET.

Las enfermedades uterinas como metritis, endometritis clínica y endometritis subclínica están asociadas a una disminución de la fertilidad y a un incremento del descarte por causas reproductivas de las vacas lecheras. El objetivo de este trabajo fue evaluar la prevalencia de endometritis clínica y subclínica y realizar un seguimiento de las vacas con endometritis subclínica desde el parto hasta su liberación a servicio en sistemas a pastoreo. Se realizaron 479 revisiones ginecológicas posparto, a 338 vacas Holstein primíparas y multíparas, pertenecientes a un establecimiento lechero de la cuenca sur de la pcia. de Santa Fe, Argentina. Se distribuyeron las vacas en tres períodos: 15-20, 21-28 y 29-60 días de paridas tras la primera revisión. El período de espera voluntaria fue de 60 días. Se obtuvieron muestras de flujo cérvico vaginal mediante tacto vaginal, tras lo cual se dividió a las vacas en dos grupos: Vacas Sanas (VS), moco cristalino y Vacas con Endometritis Clínica. Se tomaron muestras de citología endometrial con la técnica de cytobrush a las VS. Se diagnosticó endometritis subclínica cuando la citología resultó en ≥ 5 polimorfonucleares neutrófilos (NPM N). Las variables analizadas fueron: días de leche, VS, Vacas con endometritis clínica, Vacas con endometritis subclínica. La dependencia entre estado de salud uterina (sanas o enfermas) y período posparto (15-20, 21-28 y 29-60 días posparto), se evaluó con una prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado ($P < 0,05$) y t-Student ($P < 0,05$). Se utilizó el Test t-Student para muestras apareadas. Los resultados tras la primera revisión demostraron que el 48,8% (165/338) vacas estuvieron sanas y el 51,2% (173/338) presentaron algún grado de endometritis clínica. Se observó una diferencia significativa respecto a la dependencia entre estado de salud uterina (sanas o enfermas) y período de posparto a la primera evaluación ($p > 0,0001$). Se realizó citología endometrial en la 1° revisión a 140 VS. de las cuales, el 25,7% (36/140) presentaron endometritis subclínica (ES). No hubo diferencias significativas respecto a la dependencia entre estado de salud uterina (vacas con ≥ 5 o sin presencia de NPN N) y período posparto. La evolución de la ES se estudió en 27 vacas que recibieron una 2° revisión (52 ± 1 días posparto). Se encontró que el 74% (20/27) de vacas remitieron espontáneamente la ES, el 7,4% (2/27) mantuvieron ES y el 18,5% (5/27) presentaron endometritis clínica. En promedio, las vacas con ES disminuyeron los valores de NPN N a la 2° revisión ($p > 0,0001$). Se concluye que la prevalencia de endometritis clínica es elevada en vacas en los sistemas a pastoreo estudiados. Por otro lado, la prevalencia de la ES en estos sistemas se ubicó en valores intermedios comparado con otros sistemas de vacas lecheras en pastoreo. La remisión espontánea en vacas con ES, valorada en la disminución de NPN N, alcanzó un porcentaje elevado antes de terminar el periodo de espera voluntaria, lo cual nos plantea nuevas hipótesis para seguir investigando en el tema a fin de mejorar la fertilidad en vacas a pastoreo.

Implicancia de la morfología espermática en la evaluación seminal del gato doméstico (*Felis silvestris catus*)

GARCÍA MF ^{1,2}, NUÑEZ FAVRE R ^{1,2}, GARCÍA MITACEK MC ^{1,2}, STORNELLI MC², STORNELLI MA²

¹ CONICET, Godoy Cruz 2290, CABA, C1425FQB, Argentina. ² Instituto de Investigaciones en Reproducción Animal (INIRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Calle 60 y 118, La Plata, B1900AVW, Buenos Aires, Argentina

El semen del gato doméstico se caracteriza por presentar una alta proporción de espermatozoides anómalos en el eyaculado, es considerado teratospérmico. Algunos autores consideran que la cantidad de espermatozoides morfológicamente normales sería de aproximadamente 40%, mientras que otros más de 60%. Existen consideraciones realizadas a partir del uso de microscopía óptica (MO) como indicador importante de fertilidad en varias especies. Con la implementación de microscopía electrónica (ME) de transferencia podemos identificar estructuras intracelulares y defectos estructurales que interfieren en el proceso de fecundación y no pueden ser detectados con microscopía óptica. El objetivo fue evaluar las anomalías observadas en eyaculados de gatos mediante MO y ME. Se utilizaron 5 gatos mestizos clínicamente sanos de 2 a 5 años y 3 a 5 kg. Los gatos se mantuvieron con régimen de ciclos lumínicos alternos para mantener la calidad seminal e inhibir el efecto fotorrefractario. Las muestras seminales (n=11) se obtuvieron mediante electroeyaculación. Las anomalías espermáticas al MO se clasificaron según su localización en anomalías de cabeza, pieza intermedia o cola contando 200 células por muestra bajo objetivo de inmersión, utilizando Tinción 15[®] (Biopur, Argentina). Una vez concluida la evaluación seminal, el semen se centrifugó y las muestras para ME se fijaron en glutaraldehído 2%, tetróxido de osmio 1% y se incluyeron en resina Epoxi. Los cortes ultrafinos (90 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se evaluaron 100 cabezas y 100 colas por cada muestra utilizando un microscopio Jeol JEM 1200 EX II (JEOL Ltd., Tokio, Japón). Los espermogramas presentaron valores dentro de los parámetros normales para la especie, observándose 62 ± 8% de espermatozoides morfológicamente normales. La evaluación de las anomalías mediante MO reveló que el 5,3% se localizaron en la cabeza, el 12,5 % en la pieza intermedia y el 20,2 % en la cola. Siendo las más frecuentes las cabezas sueltas y las cabezas con forma irregular, las piezas intermedias dobladas, y las colas dobladas y enrolladas. La evaluación ultramicroscópica de esas muestras permitió observar que las anomalías más frecuentes fueron las cabezas redondeadas, e inmaduras, las gotas citoplasmáticas distales y colas enrolladas, dobladas y dobles. Si bien los gatos utilizados poseen un porcentaje de anomalías espermáticas en los eyaculados esperable para la especie, nuestros resultados muestran una gran diversidad de anomalías tanto al MO como al ME. Ciertas afecciones ultraestructurales están directamente relacionadas con el potencial fecundante de ese semen, y con la capacidad para resistir los procesos de criopreservación seminal. Es así que el estudio de la morfología espermática nos permite realizar una estimación de la aptitud reproductiva de un animal, aproximar el diagnóstico de afecciones que afectan la fertilidad, así como identificar alteraciones que podrían comprometer la aplicación de biotecnologías reproductivas.

Predicción de la fertilidad de toros mediante la evaluación de la calidad del núcleo espermático.

Resultados preliminares.

GHIRARDOSI, MS^{1;2}; GONZÁLEZ, L^{1;2}; LÓPEZ, M^{1;2}; MALCERVELLI, D^{1;2}; FISCHMAN, ML^{1;2}; CISALE, H^{1;2;3}

¹ Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Física Biológica. Buenos Aires, Argentina. ² Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Buenos Aires, Argentina. ³ Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Investigaciones en Producción Animal (INPA). Buenos Aires, Argentina.

La evaluación *in vitro* de la calidad seminal se usa en la práctica para predecir la capacidad fecundante de las dosis para inseminación artificial. Los espermogramas estándar permiten detectar muestras que presentan espermatozoides (Z) con anomalías compensables, mientras que la evaluación de la calidad del núcleo espermático permite encontrar anomalías no compensables que podrían estar asociadas a fallas en el comportamiento a campo de las dosis. El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de alteraciones en la calidad del núcleo espermático para detectar individuos subfértiles en toros de biotipo carnívoros de distinto nivel de fertilidad (NF), clasificados en los Centros de Colecta y Procesamiento de Semen por su tasa de concepción (TC) en alta (n=20), media (n=10) y baja (n=25). Las dosis comerciales se descongelaron a 37°C durante 30s. Se realizó el espermograma tradicional y se evaluó movilidad espermática total, movilidad progresiva (MP) y concentración -CASA-; viabilidad (V)-CFDA/Pi-, integridad funcional de la membrana plasmática -HOST-, integridad acrosomal (IA) -contraste de fase- y morfología normal (MN) -Rosa de Bengala-. Según su calidad espermática (CE) las muestras se clasificaron en alta (MP y HOST>50%; V>MP; IA y MN>80%), media (MP y HOST=40-50%; V>MP; IA y MN=70-80%) y baja (MP y HOST<40%; IA y MN<70%). Se evaluó la morfología nuclear espermática a través de la reacción de Feulgen, la maduración y compactación de la cromatina con azul de anilina (AB) y azul de toluidina (TB), respectivamente y su respuesta al agente decondensante ditioneol (NCDt). Se realizó estadística descriptiva. Los resultados fueron expresados como media y error estándar (%) según TC alta, media y baja respectivamente: macronúcleos (0,35±0,14; 0,45±0,13; 0,39±0,11); micronúcleos (1,82±0,51; 2,27±0,56; 1,51±0,30); piriformes (3,01±0,49; 3,17±0,56; 2,67±0,44); vacuolados (2,32±0,72; 8,05±1,26; 3,41±1,10); diploides putativos (0,02±0,01; 0,07±0,07; 0,02±0,01); crestados (0,06±0,03; 0,03±0,03; 0,20±0,07); AB+ (0,18±0,06; 0,20±0,10; 0,41±0,15); TB+ (0,14±0,07; 0,17±0,09; 0,04±0,02) y NCDt+ (44,41±8,68; 63,22±8,82; 38,35±7,53). Para determinar diferencias de las anomalías morfológicas nucleares entre los grupos de distinto NF se aplicó el test de Kruskal Wallis ($\alpha \leq 0,05$). Para determinar asociación entre CE y TC se aplicó el test de correlación de Spearman. Se evidenció un mayor porcentaje de núcleos vacuolados en los toros de TC media y una débil asociación significativa entre CE y TC ($R_s = 0,39$). El mayor porcentaje de núcleos vacuolados en toros de TC media podría estar asociado a problemas de subfertilidad en este grupo. La débil asociación significativa entre CE y TC destaca la importancia de incluir análisis que permitan detectar anomalías no compensables ya que la aplicación de estas evaluaciones en programas de IATF posibilitaría descartar a los individuos subfértiles, teniendo en cuenta que las alteraciones morfológicas nucleares comprometerían el proceso de fertilización o producirían pérdidas embrionarias tempranas.

¿La inmunomodulación afecta la concentración de colágeno de endometrio de yeguas susceptibles a endometritis?

HERRERA, MF^{1,2}; HERRERA, JM^{1,2}; MASSA, J³; AGUILAR, J⁴; BIANCHI, C^{5,6}

¹ Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Laboratorio de Histología y Embriología. Cátedra de Histología. Tandil, Argentina. ² Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). Tandil, Argentina. ³ Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas. Instituto de Investigación en Tecnología Informática Avanzada (INTIA). Tandil, Argentina. ⁴ Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Producción Equina. Río Cuarto, Argentina. ⁵ Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Laboratorio de Endocrinología. Tandil, Argentina. ⁶ CONICET - Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN). Tandil, Argentina.

La endometritis aguda post-servicio es una respuesta fisiológica endometrial de yegua a la entrada de elementos exógenos. Cuando persiste más de 48 h, se considera una condición patológica, llamada endometritis persistente post-servicio (EPPS). Los tratamientos para revertirla son variados. La fracción de pared celular de *Mycobacterium* (FPCM) es un inmunoestimulante biológico utilizado terapéuticamente para EPPS. El colágeno es una de las macromoléculas más importantes de la matriz extracelular del endometrio, con un rol significativo en la integridad del tejido. El objetivo de este estudio fue cuantificar y comparar los valores de colágeno en endometrio de yeguas susceptibles a EPPS luego de un tratamiento con inmunomodulador comercial (Settle®, NovaVive Inc., Canadá). A las 48 h post-estro, todas las yeguas se sometieron a inoculación experimental intrauterina de *Streptococcus zooepidemicus* (estímulo antigénico), y luego se les administró placebo (Grupo A, n=6) o inmunomodulador (Grupo B, n=6). Se realizaron biopsias uterinas en estro (pre-estímulo) y diestro (post-estímulo y tratamiento). Estas fueron procesadas histológicamente y coloreadas con picrosirius red para tinción de colágeno. Se tomaron fotomicrografías a 10× de 4 campos y a 40× de 4 campos periglandulares y 4 subepiteliales en cada muestra. Se desarrolló una herramienta en lenguaje Python, que funciona en el entorno del software FIJI, para la cuantificación relativa del colágeno. Los datos fueron analizados mediante test t para muestras independientes para comparar los grupos en cada momento, y test t o Wilcoxon para muestras pareadas para comparar entre momentos. Las medias de colágeno en campo total fueron: GA 20,1% (±5) en estro y 15,1% (±10,6) en diestro, y GB 21,7% (±5,8) y 20,9% (±8,9) para estro y diestro, respectivamente. En estro, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre grupos, sin embargo, se observó diferencia significativa en diestro ($p < 0,05$), teniendo el GA una menor concentración de colágeno. No se observaron diferencias significativas en cada grupo entre los dos momentos. En cuanto al colágeno periglandular, las medias fueron: GA 18,1% (±6,7) en estro y 11,1% (±6,5) en diestro y GB 18,5% (±8,8) y 15,2% (±7,8) para estro y diestro, respectivamente. Sólo se observó diferencias significativas en GA entre estro y diestro ($p < 0,05$). Las medias de colágeno subepitelial fueron: GA 11,5% (±5) en estro y 5,3% (±3,2) en diestro y GB 10,5% (±7,7) y 11,1% (±7,6) para estro y diestro respectivamente. En estro, no se observaron diferencias significativas entre grupos, sin embargo, el GB presentó mayor colágeno que GA en el diestro ($p < 0,05$). Asimismo, se observó mayor colágeno en estro que en diestro en GA ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que la reacción post-inoculación reduce la concentración de colágeno en la matriz extracelular del endometrio, mientras que la inmunomodulación a base de FPCM mantendría los niveles de colágeno y, así, la composición tisular fisiológica al disminuir el estímulo generador de cambios histológicos endometriales post-estímulo.

Efecto de la refrigeración en la fragmentación del ADN espermático de llama (*Lama glama*)

HUAYLLANI, F.¹; AMPUERO, E.¹; ORDOÑEZ, C.¹; BECERRA, J.¹; MEZA, A.¹; TARIFA, N.¹; CUCHO, H.¹

¹ Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS) La Raya; Escuela Profesional de Zootecnia; Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

La fragmentación del ADN espermático en todas las especies está relacionada con la fertilidad y las probables causas de daños que presentan el embrión o feto dependiendo del nivel de fragmentación; la investigación de la integridad del ADN no es simple, por lo que agregar estas pruebas a la evaluación rutinaria del espermatozoides no ha sido generalizado pese a su gran importancia. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la refrigeración en la fragmentación del ADN espermático en relación al semen fresco, para lo cual se usaron 5 llamas machos del Centro Experimental La Raya, Perú, con una edad de $5 \pm 0,71$ años y un peso de $135,94 \pm 8,65$ kg. El método de recolección de la muestra seminal fue el de electroeyaculación (EE), previa anestesia con xilacina y ketamina en función al peso. Se realizaron 4 colectas por animal, con intervalos de una semana durante la época reproductiva (enero-marzo). Las muestras obtenidas fueron degelificadas con papaína ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$, 20 min, 37°C) e inhibidor E-64 (10 uM , 37°C , 5 min), en este momento se realizó la evaluación del semen en fresco. Luego se diluyó con dilutor base Tris, yema de huevo de gallina más glicerol al 5%, hasta una concentración de 20×10^6 espermatozoides/mL; la refrigeración se realizó por 2,5 horas hasta que alcanzó la temperatura de 5°C , momento en que se evaluó el semen refrigerado. La fragmentación del ADN espermático en semen fresco y refrigerado se realizó con el kit Sperm-Halomax®, según indicaciones del producto que emplea la técnica de la dispersión de la cromatina espermática (SCD). Las áreas del núcleo y halo se determinaron con el objetivo de 100X, de un microscopio BA310 y el software Motic Imagen Plus 2,0. Los datos se analizaron con un diseño aleatorizado en bloques (animales). Los espermatozoides con fragmentación del ADN mostraron halos grandes de $65,50 \pm 8,51 \mu\text{m}^2$ y medianos de $52,66 \pm 4,66 \mu\text{m}^2$; mientras los espermatozoides no fragmentados presentaron halos pequeños $40,68 \pm 3,53 \mu\text{m}^2$, o no lo tenían. En semen fresco la fragmentación fue de $4,37 \pm 5,33\%$, con un área de núcleo de $29,37 \pm 3,84 \mu\text{m}^2$, y un halo de $50,92 \pm 7,65 \mu\text{m}^2$. El semen refrigerado presentó una fragmentación de $6,21 \pm 6,65 \%$, con un área de núcleo de $29,71 \pm 3,91 \mu\text{m}^2$, y un halo de $51,13 \pm 6,34 \mu\text{m}^2$. No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en el porcentaje de fragmentación, área de núcleo y halo entre el semen fresco y refrigerado, lo que indica que el proceso de refrigeración usado no afectó este parámetro microscópico. Sería necesario evaluar otros parámetros microscópicos para tener una información certera de la calidad del semen refrigerado de llama.

Nuevos parámetros de ecotextura para evaluar el parénquima testicular en toros de razas carniceras dadores de semen

MARCANTONIO, S.¹; ECHEGARAY, A.²; GNEMMI, G.³; QUIROGA, H.⁴; CAPDEVIELLE, E.F.⁵; ALZA, G.⁴; SARA, R.C.⁴ Y MIRAGAYA, M.¹

¹ Cátedra de Teriogenología, INITRA, Facultad de Cs. Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. ²HUMECO, Huesca, España. ³ Bovinevet, Cressa, Italia. ⁴CRB (Centro de Reproducción Bovina). ⁵ Actividad privada.

La ultrasonografía (US) es una técnica no invasiva y atraumática que permite evaluar la estructura y funcionalidad del aparato reproductor del toro. El análisis computarizado de la imagen ultrasonográfica obtenida revela diferencias en la ecotextura testicular imperceptibles al ojo humano. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar las imágenes testiculares de toros de razas carniceras dadores de semen a través de tres nuevos parámetros de microestructura de alta resolución que aportan datos relacionados con la densidad y diámetro de los túbulos seminíferos y las características del contenido de los mismos. Fueron incorporados al estudio 57 toros dadores en régimen de extracción, de entre 1,5 y 10 años de edad, de las razas Angus, Brangus, Braford, Limangus y Polled Hereford, residentes del CRB (Centro de Colecta y Procesamiento Bovino ubicado en cercanías a San Antonio de Areco, provincia de Buenos Aires, Argentina). Las imágenes ultrasonográficas fueron tomadas con un ecógrafo (modelo EXAGO®, ECM Angulemme, Francia) con un transductor lineal multifrecuencia, configurado en 7,5 MHz. Se tomaron 3 imágenes por testículo, en forma transversal en 3 posiciones: dorsal, media y ventral. Las imágenes fueron analizadas con el software ECOTEXT (análisis computarizado de imágenes). El programa utiliza distintos algoritmos desarrollados para el análisis de los ultrasonogramas testiculares en base a la distribución de píxeles negros, blancos y grises y en función del tamaño y densidad de áreas hipocogénicas (AH) dentro de un área de parénquima de 2,64 cm². Aplica varios filtros a la imagen del parénquima testicular y sobre la imagen modificada, evalúa la densidad (AH/cm²), área total (% AH) y diámetro medio (µm) de áreas hipocogénicas.

Se realizó un ANOVA de dos vías, seguido de análisis post-hoc mediante test de Duncan. La distribución de datos de microestructura testicular (media ± D.E.) obtenidos en la población de toros dadores fue la siguiente: Densidad AH: 137,54 ± 17,67; % AH: 11,86±3,40 y Diámetro AH: 126,08 ± 23,73 µm. No hubo diferencias significativas entre razas ni edades para los parámetros ultrasonográficos considerados (p>0,05). La caracterización de las imágenes testiculares de toros dadores de semen a través de parámetros ultrasonográficos de alta resolución que permiten estimar la densidad y diámetros de los túbulos seminíferos es el inicio para relacionar dichos parámetros con la producción seminal.

Efectos de los estrógenos y la progesterona en ovarios y placentas porcinas de 70 días de gestación

MARRÓN Y¹, CANOVAS M¹, ROTH K¹, SIGNORELLI L¹, GARCÍA M¹, VÉLEZ C¹, VIGLIERCHIO M¹, WILLIAMSON D¹, YAFUL G².

¹ Universidad Nacional de La Pampa, Facultad de Ciencias Veterinarias. ² Universidad Nacional de Rio Negro, CIT Rio Negro.

Las hormonas esteroideas, estrógenos (Es) y progesterona (P4), regulan la expresión génica al interactuar con receptores nucleares que actúan como factor de transcripción activados por ligando (RE α , RE β , RPA y RPB). Se estudió la expresión de receptores de estrógenos y de progesterona en ovarios y placentas porcinas de 70 días de gestación y su relación con la concentración de estrógenos y progesterona en suero, homogenatos de placenta materna (HoPM) y fetal (HoPF). La expresión de receptores de Estrógenos (α y β) y de Progesterona (isoformas A y B) se realizó por inmunohistoquímica y la determinación de sus ligandos mediante quimioluminiscencia. La concentración de Es fue de $50 \pm 3,61$ pg/ml en suero, $571,94 \pm 55,94$ pg/ml en HoPM y $2632,25 \pm 480,72$ pg/ml en HoPF, con una diferencia significativa entre HoPF vs HoPM ($P < 0,05$). Mientras que la concentración de P4 fue de $25,72 \pm 2,40$ ng/ml en suero, $2,25 \pm 0,17$ ng/ml en HoPM y $73,14 \pm 5,78$ ng/ml en HoPF, con una diferencia significativa entre HoPF vs HoPM ($P < 0,05$). En la placenta materna se observó inmunexpresión de RPA en epitelio glandular y tejido conectivo, y en la placenta fetal RE β en células trofoblásticas. Respecto a los ovarios solo se observó inmunomarcación de RE α en células luteales. Los resultados obtenidos sugieren que los Es fetales interactúan con los RE β en el trofoblasto mientras que los Es maternos, sintetizados por el cuerpo lúteo, se unen a los RE α luteales. La P4 se liga a los RPA en el tejido conectivo endometrial para modular la expresión de moléculas de señalización y sus receptores relacionados con el mantenimiento de la gestación y con la remodelación placentaria. Se postula que la relación temporal entre las concentraciones séricas y tisulares de Es y P4, y la expresión de sus receptores es determinante para promover la comunicación entre la hembra porcina y los *conceptus* y que los Es a través de una señalización autocrina y paracrina podrían sostener la producción de progesterona imprescindible para mantener la gestación, además de habilitar la expresión génica necesaria para explicar la remodelación placentaria representada por la formación de vellosidades secundarias y terciarias de la interfase materno fetal que se observa en esta etapa de la gestación.

Respuesta del semen de conejo crioconservado pre-tratado con diferentes diluyentes

MESTRE, J¹; GONZALEZ, L^{2,3}; MALCERVELLI, D^{2,3}; FISCHMAN, ML^{2,3}; CISALE, H^{2,3,4}; SUHEVIC, J^{2,3}

¹ Comisión Nacional de Energía Atómica. ² Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Física Biológica. Buenos Aires, Argentina. ³ Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Buenos Aires, Argentina. ⁴ Universidad de Buenos Aires - CONICET. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Investigaciones en Producción Animal (INPA). Buenos Aires, Argentina.

El uso de la inseminación artificial, como herramienta para la difusión de animales genéticamente superiores, se ha convertido en un proceso de rutina en las explotaciones cunícolas intensivas. La refrigeración o congelación de semen de mamíferos permite prolongar la supervivencia de los espermatozoides (Z). Los diluyentes de congelación, protegen las membranas espermáticas de los daños causados por los cambios de temperatura, proveen energía y estabilizan el pH y la presión osmótica. Si bien se realizaron grandes avances en la criopreservación de semen de conejo, los resultados aún son subóptimos, dado que los índices de fertilidad y prolificidad son inferiores a los obtenidos con semen fresco o refrigerado. El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad seminal pos descongelado con dos combinaciones diferentes de agentes crioprotectores: 2% Dimetilsulfóxido (DMSO), 3% Dimetilacetamida (DMA) y 20% yema de huevo (diluyente A) vs. 5% DMSO y 2% Ficoll 70 (diluyente B). Se utilizaron 24 muestras (n=6; r=4) provenientes de conejos neozelandeses pertenecientes a la Escuela Agropecuaria y Agroalimentaria, FCV, UBA (Protocolo CICUAL N°209/32). Los eyaculados fueron obtenidos mediante vagina artificial y transportados a 37°C al laboratorio. Sólo se utilizaron aquellas muestras que en la evaluación inicial presentaron movilidad progresiva (MP; CASA) e integridad de membrana plasmática (IMP; CFDA/PI) \geq 70%, integridad de membrana acrosomal (IMA; Coomassie Blue) \geq 85% y funcionalidad de membrana plasmática (HOS; test de endósmosis) \geq 65%. Las muestras fueron alicuotadas, diluídas (1/2) con los diluyentes A y B y atemperadas a 37°C durante 10 min. Luego, las dosis fueron envasadas en pajuelas de 0,25 mL a 20°C y estabilizadas durante 20 min, antes de ser llevadas a 5°C (1°C/3 min), temperatura a la que se estabilizaron durante 60 min. Se repitieron las evaluaciones de calidad espermática antes mencionadas, para cada tratamiento. A continuación, las pajuelas se llevaron a -70°C durante 20 min y se almacenaron a -196°C. A los 30 días se descongelaron (37°C, 30s) y se realizaron las evaluaciones de calidad seminal. No se observaron diferencias significativas (prueba de t Student para muestras apareadas; $p \leq 0,05$) en %: MP (A: 59,75 \pm 3,05; B: 58,55 \pm 2,35), HOS+ (A: 54,35 \pm 1,99, B: 54,75 \pm 1,82), IMP (A: 75,80 \pm 1,87, B: 73,60 \pm 2,05) e IMA (A: 80,70 \pm 1,49, B: 82,65 \pm 1,73) a los 5°C. Tampoco existieron diferencias al descongelado en %: MP (A: 23,70 \pm 1,80; B: 26,25 \pm 1,92), HOS+ (A: 23,20 \pm 2,97; B: 22,30 \pm 1,90) e IMP (A: 42,45 \pm 3,18, B: 38,35 \pm 2,11). No obstante, al descongelado, el % de Z con membrana acrosomal íntegra del tratamiento A (62,75 \pm 2,73) fue significativamente mayor ($p=0,0264$) que en el tratamiento B (59,30 \pm 2,31). Estos resultados sugieren que el diluyente que contiene en su formulación 2% DMSO, 3% DMA y 20% yema de huevo (tratamiento A) protegería mejor la membrana acrosomal, posiblemente por la presencia de yema de huevo, que estabilizaría las membranas y reduciría el daño durante el proceso de criopreservación espermática.

Efecto de la adición de plasma seminal a espermatozoides equinos epididimarios pos-descongelados

OLIVIERI G.,¹ NEILD D.,² BRUNO S.,¹ PLAZA J.,² MIRAGAYA M.²

¹ Dirección de Remonta y Veterinaria, Ejército Argentino, Haras Militar "General Lavalle"; ² Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Cátedra de Teriogenología.

La obtención y conservación de espermatozoides de epidídimo es de gran importancia para preservar material genético de animales valiosos o en peligro de extinción. La mayoría de los estudios indican un efecto perjudicial del plasma seminal (PS) equino durante la criopreservación de espermatozoides por lo que es removido previo al proceso. Sin embargo, el PS puede aumentar la movilidad de los espermatozoides epididimarios y parece ser importante para la remodelación de la membrana plasmática, la capacitación, la reacción acrosomal y la fecundación. Consecuentemente, la adición de PS pos-preservación podría ser beneficioso para los espermatozoides. Por lo tanto, el objetivo del trabajo fue evaluar si la incubación pos-descongelada de espermatozoides equinos epididimarios con diferentes concentraciones de plasma seminal mejora los parámetros espermáticos. Se preparó un pool de PS obtenido de 3 padrillos Silla Argentino de fertilidad probada, que se almacenó a -18 °C hasta su uso. Se utilizaron muestras de espermatozoides obtenidas de castraciones realizadas a 40 potros Silla Argentino de 24 a 36 meses de edad. Los testículos fueron refrigerados a 4 °C y almacenados 24 hs previo a su disección para recuperar los espermatozoides de la cola del epidídimo y someterlos a una curva rápida de congelamiento profundo. Las muestras fueron descongeladas e incubadas durante 10 min. con las diferentes concentraciones de PS (10%, 50%, 100%) y un control sin PS. La movilidad se evaluó mediante un sistema asistido por computadora (CASA, AndroVision), la integridad funcional de membrana y acrosoma se evaluaron utilizando la técnica combinada de la prueba hipoosmótica (HOS) y la tinción con Azul de Coomassie (AC). La morfología espermática se evaluó con microscopía de contraste de fase. Para comparar los diferentes tratamientos se realizó, según correspondía, la prueba de Kruskal Wallis o un Análisis de Varianza seguido del test de Tukey. Se determinó que la incubación pos-descongelada con PS disminuyó significativamente ($P < 0,05$) los parámetros cinemáticos de movilidad en el CASA con respecto al control, siendo mayor el efecto observado con las concentraciones más altas de PS. Sin embargo, al evaluar la funcionalidad de membrana, el acrosoma y la morfología espermática, no se evidenciaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos ($P > 0,05$). Los resultados indicarían que el agregado pos-descongelado de PS no mejora los parámetros espermáticos *in vitro*. Sin embargo, como el PS ejercería también un efecto modulador en el tracto reproductivo de la hembra, sería de interés realizar la inseminación profunda de estas muestras para ver si el agregado de PS pos-descongelado mejora los resultados de preñez.

Uso de dos protocolos de producción de embriones de llama y su transferencia en dos épocas del año

PACHECO JI¹, VÉLEZ VM¹ Y GARCÍA W¹

¹ Estación IVITA Maranganí – Facultad de Medicina Veterinaria, Grupo de Investigación de Producción y Sanidad en Ganadería Altoandina. UNMSM. Perú.

La producción de camélidos sudamericanos es una actividad económicamente importante para el poblador altoandino, entre las especies domésticas, la crianza de llamas se viene incrementando en los últimos años debido a su gran capacidad de adaptación y rusticidad. La transferencia embrionaria es una biotecnología reproductiva que se viene investigando desde hace varias décadas, esta técnica permite realizar mejoramiento genético de los rebaños de llamas en menor tiempo, sin embargo, los resultados aún son bajos debido a las particularidades de su fisiología reproductiva, puesto que se presentan inconvenientes como el bajo porcentaje de fertilidad, la alta mortalidad embrionaria y estacionalidad reproductiva. El objetivo del presente trabajo fue realizar la evaluación de dos protocolos de producción de embriones: a) la ovulación simple y b) la superovulación. 45 hembras fueron distribuidas en dos grupos: grupo 1: ovulación simple (n=30) y grupo 2: superovulación (n=15); todos los animales fueron mantenidos en pasturas naturales y en condiciones de crianza altoandina a los 4200 msnm. Para el grupo 1, se realizó el empadre el día 0, el lavado y transferencia embrionaria el día 8; para el grupo 2, el protocolo se inició el día 0 con la determinación ecográfica de un folículo preovulatorio, se aplicó análogo de GnRH (8.4 µg), el día 4 se aplicó 500 UI de eCG, el día 7 se aplicó 25 µg de cloprostenol sódico, los días 11 y 12 se realizó monta natural y el día 20 se realizó la colección y transferencia de embriones. La preparación de hembras receptoras para ambos grupos consistió en aplicación de 8.4 µg de acetato de busarelina previa determinación de la presencia de un folículo preovulatorio 8 días antes de la transferencia embrionaria. Se evaluaron la tasa de colección de embriones, la calidad de los embriones según parámetros morfológicos y la fertilidad durante época reproductiva y no reproductiva, determinada mediante ecografía a los 30 días post transferencia. Los resultados fueron: La tasa de recolección de embriones fue diferente entre ambas técnicas: en a) ovulación simple se colectaron 53 % (44/83) embriones sobre el total de hembras, mientras en b) superovulación 242,3 % (63/26). La calidad de los embriones colectados por a) ovulación simple fue: grado I (90,3 y 83,6 %) y grado II (9,4 y 16,7 %), no encontrándose embriones grado III. En b) superovulación se encontraron embriones grado I (76,6 y 87,5 %), grado II (14,9 y 12,5 %) y grado III en 8,5 y 0 % para época reproductiva y no reproductiva respectivamente. La fertilidad encontrada en a) ovulación simple fue de 56,2 %, en b) superovulación fue de 55,7 %, siendo similares. Se concluye que estas técnicas son factibles de utilizar en condiciones de crianza del productor alto andino.

Evaluación bacteriológica de semen de llamas reproductores obtenidos mediante vagina artificial y electroeyaculación

PEZO, D.¹; MEZA, A.²; AMPUERO, E.²; PEZO, S.³; CÁRDENAS, N.²; BECERRA, J.²; TARIFA, N.²; SALAS, F.²; CUCHO, H.²

¹ Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura – Marangani; Facultad de Medicina Veterinaria - Universidad Nacional Mayor de San Marcos. ² Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS) La Raya; Escuela profesional de Zootecnia; Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. ³ Práctica Privada

La reproducción en llamas está afectada por diferentes factores como los nutricionales, inmunológicos, alteraciones patológicas, mortalidad embrionaria y fetal; pero aún no se conocen los agentes infecciosos bacterianos que pueden ser transmitidos a través del semen. Por esta razón se planteó realizar la evaluación bacteriológica del semen de machos llamas utilizados como reproductores en el CICAS La Raya, Perú; además se realizó la comparación bacteriológica entre eyaculados obtenidos por vagina artificial (VA) y por electroeyaculación (EE). Para ello se seleccionaron doce machos llamas a los cuales se les colectó semen durante la época reproductiva (enero – marzo) mediante dos métodos VA y EE. Se realizaron 8 colectas por animal, 4 por cada método, con intervalos de una semana entre ellas. En la evaluación bacteriológica cualitativa de las muestras se realizaron cultivos aerobios en Agar Sangre, Mac Conkey y Tripticasa Soya; observando la presencia o no de bacterias mediante el aislamiento, identificación, reconocimiento morfológico y tipificación del género de las bacterias mediante pruebas bioquímicas. Se empleó la prueba de t para comparar los métodos de colección. En las muestras colectadas por el método de VA se aislaron los géneros de bacterias: *Staphylococcus sp*, *Escherichia coli*, *Proteus sp*, *Streptococcus sp*, *Enterococcus sp*, *Gardnerella sp*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Morganella sp*, *Serratia sp*, y por EE se identificaron además de las bacterias obtenidas por el método de VA, bacterias del género *Bacillus sp*. Se observó una mayor frecuencia de presentación de colonias de bacterias aisladas por el método de VA (167) que por EE (128). *Proteus sp*, fue el género de mayor porcentaje de presentación en ambos métodos (19,53% y 17,96%, para VA y EE, respectivamente). En la primera colecta de ambos métodos la frecuencia de presentación de bacterias fue mayor en el método de EE; mientras que en las otras 3, el método de VA fue superior. Se observó menor ($p < 0,05$) contaminación bacteriana en los eyaculados obtenidos por EE respecto a los obtenidos por VA. Además, en ambos métodos de colecta se observó mayor porcentaje de bacterias Gram negativas que de Gram positivas. Se concluye que ambos métodos de colección evaluados muestran contaminación bacteriana; sin embargo, muestras provenientes de EE tienen menor contaminación que las de VA.

Efecto del agregado de EDTA al diluyente de Kenney para la refrigeración de semen asnal

PLAZA J¹, OLIVIERI G², GALLELLI MF^{1,3}, BRUNO S², MIRAGAYA M¹

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA) Buenos Aires, Argentina. ² Haras Militar General Lavalle, Dirección de Remonta y Veterinaria, Ejército Argentino. ³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

La situación de riesgo en la que se encuentra el asno a nivel mundial precisa la búsqueda de biotecnologías reproductivas que permitan aumentar el número y la variabilidad genética de los individuos de manera rápida; siendo la refrigeración de semen una herramienta que lo permita. Los diluyentes a base de leche descremada son utilizados usualmente para la refrigeración de semen de distintas especies. Sin embargo, la elevada concentración de calcio presente en los mismos afecta la vida media y capacidad fertilizante de los espermatozoides. El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es un quelante de calcio que suele ser parte de diluyentes de congelación de semen. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto del agregado de distintas concentraciones de EDTA al diluyente de Kenney suplementado con 2% de yema de huevo para la refrigeración de semen de asno. Se utilizaron dieciocho eyaculados de seis asnos Remonta Argentino (n=6, r= 3). Los eyaculados fueron diluidos en Kenney suplementado con: 2% yema de huevo (KY-0 EDTA); 2% yema de huevo y 1,5 mM EDTA (KY-1,5); 2% yema de huevo y 2,5 mM EDTA (KY-2,5); 2% yema de huevo y 4,5mM EDTA (KY-4,5). Las muestras se refrigeraron en Equitainer® durante 24 h, luego se trasladaron a una heladera a 5°C por un periodo total de 72 h, y se evaluaron cada 24h. La movilidad progresiva fue evaluada utilizando un Sistema CASA (Androvision™) mientras que la funcionalidad de membrana y presencia de acrosoma mediante la Técnica de HOS-Azul de Coomassie. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Kruskal Wallis. En todos los tratamientos se observó una disminución de la movilidad total y progresiva a lo largo del tiempo, sin embargo, no se observaron diferencias entre los valores de motilidad total y progresiva entre las muestras evaluadas a las 24 y 48 h. Las muestras diluidas en KY-4,5 presentaron menor motilidad total y progresiva a las 48 h respecto a los otros tratamientos (p <.05). Los parámetros cinéticos VSL, VCL, VAP, ALH y BCF presentaron diferencias significativas en relación al tiempo de refrigeración, siendo más bajos a las 72h. Además, luego de 72h de refrigeración, el BCF fue significativamente mayor en las muestras diluidas con KY-0 y KY-2.5 (p<.05). El porcentaje de espermatozoides con membrana funcional y acrosoma intacto no presentó diferencias significativas entre los tratamientos (p >.05). Por lo tanto, el agregado de 1,5 mM y 2,5 mM EDTA al diluyente de Kenney para la refrigeración de semen de asno no afecta los parámetros de movilidad, funcionalidad de la membrana y estado acrosomal. Mientras que el agregado de 4,5 mM del quelante provoca una disminución significativa de los parámetros de movilidad comparado con los demás tratamientos. Como prueba de fertilidad se inseminaron dos grupos de yeguas utilizando semen refrigerado durante 48h. Un grupo de yeguas fue inseminado utilizando semen refrigerado por 48 hs en el diluyente KY-0, (control) y otro grupo se inseminó con semen refrigerado por 48 hs en el diluyente KY-2.5. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de preñez entre tratamientos: KY-0 60% (6/10) y KY-2,5 50% (5/10).

Evaluación y caracterización de salud reproductiva en perros mestizos enteros

SÁNCHEZ, ALFONSO R.; PFEFFER, MARIELA P.

Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de Las Américas, Viña del Mar, Chile

Postulando a la salud reproductiva como un concepto innovador y complementario al bienestar animal en perros, el propósito del presente estudio fue evaluar y caracterizar parámetros de salud reproductiva en perros mestizos enteros, de diferentes pesos vivos y edades, a través de examen físico y ultrasonográfico de testículos y próstata, postulando la hipótesis que la salud reproductiva de perros enteros, independiente de su peso vivo, experimentaría mayor afectación sobre los 5 años de vida. A través de un muestreo por conveniencia y con consentimiento de los propietarios, se examinaron 90 perros mestizos, clínicamente sanos, mayores de 1 año de edad y sin afecciones reproductivas evidentes. Se conformaron 6 grupos (n=15), según edad y peso vivo: P1E1: < 15 kg y > 1 año y ≤ 5 años; P1E2: < 15 kg y > 5 años; P2E1: 15 - 25 kg y > 1 y ≤ 5 años; P2E2: 15 - 25 kg y > 5 años; P3E1: > 25 kg y > 1 y ≤ 5 años; P3E2: > 25 kg y > 5 años. En el examen físico se inspeccionó y midió el perímetro escrotal, se palpó testículos y epidídimos. La evaluación ecográfica testicular consideró: ecogenicidad del parénquima, visualización de mediastino y presencia o ausencia de estructuras anecoicas y/o hiperecoicas. La evaluación ecográfica prostática consideró: tamaño, forma, simetría y ecotextura del parénquima y presencia de focos anecoicos y/o hiperecoicos en el mismo. En el análisis de variables continuas se utilizó el test de Student y para las variables categóricas el test no paramétrico Mann-Whitney. Se ocupó el programa STATA 14, considerando un 95% de confianza ($p < 0,05$). En todos los análisis se observó independencia del peso vivo. En el examen reproductivo se registraron mayores frecuencias de anomalías testiculares, entre estas asimetría y tono disminuido, en perros > 5 años ($p < 0,05$). En la evaluación ultrasonográfica testicular se observó mayor frecuencia de alteraciones del parénquima, especialmente heterogeneidad y presencia de focos anecoicos en perros > 5 años ($p < 0,05$). En la evaluación prostática destacó la mayor proporción de anomalías de ecotextura y presencia de focos anecoicos en perros > 5 años ($p < 0,05$). Cabe destacar que la prostatomegalia se observó en el 85 % de perros > 5 años, ($p < 0,05$). En concordancia con la hipótesis propuesta para el estudio, los perros mestizos enteros > 5 años, presentaron mayores proporciones de alteraciones testiculares y prostáticas respecto de animales más jóvenes, independiente del peso vivo de los animales. Cabe destacar que la evaluación ultrasonográfica permitió develar alteraciones subclínicas, las que potencialmente podrían derivar en un detrimento del bienestar de los animales, postulando con ello la importancia de establecer pautas en salud reproductiva de perros enteros, a fin de mejorar la calidad de vida de los mismos.

Assessment of cryotolerance of ivf bovine blastocysts after vitrification and one step-warming using an economical device

TELLO MF¹, MARURI A¹, LORENZO MS^{1,2}, LOMBARDO DM^{1,2}

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Cátedra de Histología y Embriología, ² CONICET, Buenos Aires, Argentina.

This study aimed to assess the cryotolerance of IVF bovine blastocysts after vitrification and warming in one step using a novel and economical device (eD) and to compare it with the well-known method of Cryotop® and warming in sequential steps. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were obtained by follicular aspiration from slaughterhouse ovaries and washed three times with PBS supplemented with antibiotics. Only grade 1 oocytes were in vitro matured for 22 h (39 °C, 5% CO₂) and incubated for 5 h with 10x10⁶ spermatozoa/mL in 100 µL-drops of modified 199 medium (M199), under mineral oil in the same condition of IVM. Previously, a straw of a bull was warmed (35 °C, 5 s), and sperm washed twice in M199 with caffeine and heparin. After IVF, presumptive embryos were pipetted to eliminate cumulus cells and sperm, and cultured in 50 µL-drops of SOF medium under mineral oil and incubated (39 °C, 5% CO₂ and 5% O₂) from day 2 to day 7-8. Only good-quality expanded blastocysts were selected and placed in a culture dish with PBS plus fetal bovine serum until vitrification. For the vitrification device, a 0.25 mL-straw was cut in half, and then each part again at both ends, creating a slightly concave surface where the embryos were placed. A total of 42 blastocysts was used. For vitrification, each blastocyst was placed in the equilibration solution for 5 min and then in the vitrification solution for 1 min. Afterward, the embryo was placed on the vitrification support (Cryotop® or eD), immersed in liquid nitrogen, and stored for at least one week in a tank. For warming, the eD was placed vertically in a 0.5 mL-straw loaded with 0.25 M sucrose solution at 40 °C. After 3 minutes, the straw was discharged on a culture dish with a washing medium, and the embryos were washed twice in SOF medium before in vitro culture in drops. The Cryotop® was placed directly in one of the wells of a four-well plate containing 0.25 M sucrose solution, followed by gradual dilutions of sucrose (0.125 M and 0.06 M) every 5 min and then proceeded in the same way as before. An additional group was added as control, using non-vitrified blastocysts that returned to the culture drops. Rates of re-expanded, hatching, and hatched blastocyst were determined at 24, 48, and 72 h after warming, respectively. There were no differences in these rates between Cryotop-vitrified and eD-vitrified embryos (94.4-93.3%, 61.1-53.3%, and 61.1-53.3%, respectively). In non-vitrified blastocysts, the rate of expanded embryos was 100%, and the hatching and hatched rates were significantly higher (P < 0.05) than in vitrified blastocysts (88.9 and 100%, respectively). In conclusion, the proposed device allows the vitrification of bovine blastocysts like the Cryotop® method. Besides, one-step warming facilitates ET under field conditions.

Eventos reproductivos en biotipos Brown Swiss y mestizo en condiciones ambientales y de manejo de Trópico Húmedo

TRONCOSO, R.¹; MEDINA, C.^{2,3}; REÁTEGUI, J.^{2,3}

¹ Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios. ² Universidad Católica de Santa María. ³ Centro Latino Americano de Estudios de Problemáticas Lecheras (CLEPL).

Los eventos reproductivos son particularmente sensibles a los efectos del choque térmico. La capacidad de los rumiantes para regular la temperatura corporal depende del biotipo. Las razas lecheras suelen ser más sensibles al estrés por calor al igual que animales de mayor producción ya que generan más calor metabólico. Setenta y ocho animales fueron evaluados según el biotipo: 40 Brown Swiss, procedentes del altiplano peruano y 38 Mestizas de la región amazónica de Madre de Dios. Los animales se mantuvieron en el Centro de Desarrollo Ganadero de Madre de Dios, sector Castañal, Distrito y Provincia de Tambopata, geográficamente ubicado a una altitud de 219 m.s.n.m. a 12° 38' 30,29" de latitud Sur y 69° 17' 03,52" longitud Oeste. El clima es tropical; cálido, húmedo con precipitaciones superiores a 1000 mm anuales y temperatura media anual de 38 °C. Los animales se mantuvieron en un sistema mixto, en pradera compuesta por pasto Marandú (*Brachiaria brizantha cv marandú*), Brizanta (*Brachiaria brizantha*) y pasto Camerún y suplementación con concentrado al 20% de proteína cruda y 70% de nutrientes digeribles totales más sales minerales con un periodo de adaptación de 60 días y 18 meses de ensayo. El objetivo fue evaluar el desempeño reproductivo como respuesta de adaptabilidad a las condiciones de manejo y climáticas de Trópico Húmedo. Las variables paramétricas se analizaron con medidas de tendencia central y dispersión, las no paramétricas mediante un análisis de frecuencias. La prueba chi-cuadrado (χ^2) de independencia se utilizó para detectar diferencias, $\alpha = 0,05$. Las variables dependientes categorizadas y continuas se evaluaron con t de Student utilizando el Software SPSS ver 23, con el evento de IA como unidad experimental y el biotipo como efecto aleatorio. La edad promedio a primer celo en Brown Swiss fue de 12,43±0,84 meses, en el ganado mestizo de 18,68±0,99 meses ($P<0,05$). Edad promedio del primer parto en Brown Swiss 25,25 ± 2,67 meses en ganado mestizo 28,34 ± 1,71 meses ($P<0,05$). Intervalo parto a la primera IA en Brown Swiss fue de 99,29 ± 20,09 días y 152 ± 9,57 días en mestizas ($P<0,05$). Días abiertos observados en Brown Swiss 107,29 ± 14,50 versus 162 ± 12,50 en mestizas ($P<0,05$). Tasa de preñez 70,0% al primer servicio y 30,0% al segundo servicio en Brown Swiss, para el biotipo mestizo 68,4% al primer servicio, 28,9 al segundo y 2,6 al tercer servicio ($P>0,05$). Se observó que el 10,0% de las vacas Brown Swiss tuvieron incidencias de abortos frente a un 5,3% del ganado mestizo ($P>0,05$). El 15,0% de las vacas Brown Swiss tuvieron retención de placenta y 13,2% del ganado mestizo ($P>0,05$). El 17,5% de las vacas Brown Swiss tuvieron infección uterina frente a un 7,9% del ganado mestizo. Se concluye que no hubo diferencias estadísticas en el porcentaje de preñez, tasa de abortos, retención de placenta e infecciones uterinas entre los dos biotipos. El ganado mestizo mostró ser reproductivamente más tardío por los promedios y la diferencia estadística en edad al primer celo y primer parto.

Evaluación de protocolos de IATF sobre la expresión proteica de receptores endometriales en vacas de carne

TRUCCO FT¹, ANGELI E², NOTARO US², BELOTTI EM², AHIBE ME¹, ANDRÉS SOTO T², SALVETTI NR², ORTEGA HH², DÍAZ PU²

¹ Actividad privada, ² Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICi-Vet-Litoral) Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina.

La utilización de protocolos de sincronización hormonal que prolongan el tiempo de proestro han sido relacionados con mayores tasas de preñez en programas reproductivos. Algunos autores sugieren que la exposición del endometrio a concentraciones séricas de estrógenos por un periodo mayor de tiempo da lugar a un ambiente endometrial más apto para la sobrevivencia del conceptus en las etapas embrionarias iniciales. La biopsia endometrial ofrece un gran potencial para lograr una mejor comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que ocurren durante el ciclo estral. El objetivo del presente trabajo fue comparar el efecto de tres protocolos de sincronización de la ovulación, dos con proestro corto y uno con proestro extendido, sobre la expresión proteica de los receptores de estrógenos alfa (RE alfa), receptores de estrógenos beta (RE beta) y receptores de progesterona (RP) a nivel endometrial el día 15 post-ovulación durante las etapas iniciales del reconocimiento materno de la gestación. Se utilizaron 30 vacas Aberdeen Angus sin cría al pie, con un postparto ≥ 90 días y con una condición corporal promedio ≥ 3.5 (escala de 1 a 5). Las vacas fueron asignadas en forma aleatoria a cada uno de los 3 protocolos, seleccionándose sólo aquellas que presentaron un cuerpo lúteo (CL) y/o folículo dominante (FD) ≥ 10 mm al inicio del ensayo. El grupo 1 (*proestro extendido*) recibió el Día 0: un dispositivo de $P_4 + 0,021$ mg de GnRH. Día 5: retiro del dispositivo de $P_4 + 0,150$ mg de PGF2 α . Día 8: 0,021 mg de GnRH. El grupo 2 (*proestro corto con GnRH*) recibió el Día 0: un dispositivo de $P_4 + 0,021$ mg de GnRH. Día 7: retiro del dispositivo + 0,150 mg de PGF2 α . Día 9: 0,021 mg de GnRH. El grupo 3 (*proestro corto convencional*) recibió el Día 0: un dispositivo de P_4 . Día 7: retiro del dispositivo de $P_4 + 0,150$ mg de PGF2 α + cipionato de estradiol. Se obtuvieron muestras de tejido uterino el día 15 post-ovulación, mediante biopsias realizadas con la ayuda de sedación y anestesia epidural baja. Se introdujo la pinza para biopsias a través de la vagina y se la guió por palpación transrectal hasta contactar con el cérvix. Luego, mediante la técnica de enhebrado cérvico-uterino se atravesó el cérvix y se deslizó la pinza hacia uno de los cuernos del útero donde se obtuvo la muestra de tejido endometrial. Una vez obtenidas fueron fijadas a campo e identificadas para su posterior procesamiento. En el laboratorio se incluyeron en parafina y se realizó la técnica de inmunohistoquímica indirecta utilizando anticuerpos específicos. Para cada receptor se estimó el porcentaje del área inmunomarcada tanto en el epitelio como en las células glandulares superficiales y profundas del endometrio. Todos los datos obtenidos fueron analizados mediante ANOVA, seguido de un postest de Duncan. El presente estudio no encontró diferencias significativas en la expresión proteica nuclear de RE alfa y RE-BETA en las células del epitelio, glándulas superficiales y profundas del endometrio entre los distintos tratamientos hormonales evaluados. Además, no se hallaron diferencias al comparar los niveles de expresión de RE alfa y RE-BETA dentro de cada grupo en las diferentes estructuras uterinas analizadas. Por su parte, en concordancia con lo descrito por otros autores, no se observó expresión nuclear de del RP al día 15 postovulación. Nuestra investigación pretende contribuir en el avance del conocimiento de los procesos que acontecen a nivel uterino y que regulan la respuesta fisiológica de las células endometriales a las variaciones en las concentraciones de las hormonas ováricas. Las mayores tasas de preñez observadas en otros estudios podrían estar asociadas a mayores concentraciones de P_4 como una respuesta esteroideogénica diferencial del ovario en vacas con proestros prolongados.

Comparación de tres protocolos de superestimulación ovárica a tiempo fijo en llamas usando GnRH y PGF_{2α}. Resultados preliminares

ZAMPINI, ENZO GERMAN^{1,2}; MIRAGAYA, MARCELO HORACIO¹; TRASORRAS, VIRGINIA LUZ^{1,2}

¹ Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Teriogenología, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Buenos Aires, Argentina. ² CONICET, Buenos Aires, Argentina.

En los camélidos sudamericanos existe una alta variabilidad de respuesta a los protocolos de superestimulación ovárica (SO), lo cual ha dificultado el avance en la aplicación de biotecnologías reproductivas, tales como la criopreservación y la transferencia embrionaria (TE), cuya implementación permitiría mejorar el bajo desempeño reproductivo de estas especies. El inicio de un protocolo de SO requiere aplicar el tratamiento hormonal en ausencia de folículos mayores a 5 mm. El objetivo del presente ensayo fue evaluar tres protocolos de SO a tiempo fijo en llamas, basados en el uso de GnRH, PGF_{2α} y eCG. En primera instancia, se sincronizó la dinámica ovárica (n=17) mediante la administración de una dosis EV de 8 µg de buserelina (análogo sintético de GnRH; aGnRH) el día 0 y el día 8. Luego, las hembras fueron divididas al azar en tres grupos de acuerdo al protocolo de SO utilizado. Previo control ultrasonográfico vía transrectal para corroborar la ausencia de folículos > 5 mm, la gonadotropina coriónica equina (eCG, 1000 UI, IM) y el cloprostenol (prostaglandina sintética, 250 µg, IM) fueron aplicados en los grupos del siguiente modo: A (n=5) el día 12 recibieron eCG y el día 13 se les administró una dosis de cloprostenol para inducir la luteólisis; B (n=4) el día 11 se administró la eCG y el día 14 cloprostenol. Mientras que las hembras del grupo C recibieron eCG el día 10, seguida por una dosis de cloprostenol al día 14. En todos los grupos, cinco días posteriores a la eCG, se controló el número de folículos dominantes desarrollados vía ultrasonografía transrectal. Al tratarse de resultados preliminares, se realizó un análisis descriptivo de la muestra. En cada grupo, el diámetro folicular promedio al momento de aplicar el tratamiento de SO fue: 6 mm en el grupo A (día 12); 4,5 mm en el grupo B (día 11) y 1,7 mm en el grupo C (día 10). El 40% (2/5) de las hembras del grupo A, el 75% (3/4) del grupo B y el 100% (8/8) de las llamas del grupo C presentaron folículos menores a 5 mm, y por ende recibieron eCG. El porcentaje de respuesta positiva a la inducción del desarrollo folicular múltiple (presencia de dos o más folículos dominantes) fue del 100% (2/2) en el grupo A; 67% (2/3) en el grupo B y 100% (8/8) en el grupo C; siendo el promedio de folículos dominantes por hembra de 5,5; 4,3 y 5,1 para los grupos A, B y C, respectivamente. Hasta el momento, el menor diámetro folicular el día de inicio de la SO, se registró en el grupo C, siendo además el grupo con mayor porcentaje de hembras que recibió eCG. Según estos resultados, se obtendría una mejor respuesta a la superestimulación ovárica iniciando el tratamiento tan pronto como dos días luego de la segunda dosis de aGnRH. Si bien sería importante aumentar el número de hembras tratadas, la implementación de este protocolo permitiría facilitar el manejo a campo de llamas donantes de embriones en programas de TE.