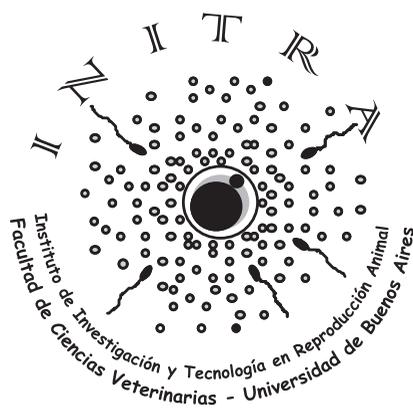


**Cuartas Jornadas Internacionales  
del Instituto de Investigación y  
Tecnología en Reproducción Animal**



**INITRA**

**Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA**

**16 y 17 de octubre de 2014**

**Buenos Aires, Argentina**



## Conferencias Plenarias

Señalización del calcio en el proceso de fertilización <i>Dr. Rafael Fissore</i> .....	91
Rol del cobre como suplemento mineral para el desarrollo de embriones bovinos: análisis de los factores metabólicos involucrados <i>Dra. Cecilia Furnus</i> .....	93
Clonación y transgénesis animal <i>Germán Kaiser, Vet, MSci</i> .....	95
Utilización de células madre para el tratamiento de endometriosis en yeguas <i>Fumuso, E.; Carmo, M.T.; Herrera, M.F.; Cantatore, S.E.; Landim, F.C.; Lombardo, D.; Felipe, A.E.; Rosatti, J.J.; Redolatti, C.; Alvarenga, M.A.</i> .....	97
A análise computadorizada do semen (casa) e a integridade da membrana espermática na avaliação da qualidade do sêmen criopreservado de carneiro <i>Sony Dimas Bicudo, Leandro Rodello, Tácia Gomes Bergstein, Luana de Cássia Bicudo</i> .....	99
Nuevas tendencias en la valoración de la calidad seminal <i>Cisale, H.O.</i> .....	101
Experiencias en investigación y perspectivas futuras de las biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos <i>Dra. Susana María Giuliano</i> .....	104
Influencia del estrés en la fisiopatología ovárica bovina <i>Dr. Hugo H. Ortega</i> .....	106
El fotoperíodo y su aplicación al control de la reproducción en ovinos y caprinos <i>Chemineau, P.</i> .....	109



# Señalización del calcio en el proceso de fertilización

Dr. Rafael Fissore<sup>1</sup>

En la mayoría de las especies estudiadas hasta el momento, incluyendo a los mamíferos, el ingreso del espermatozoide al ovocito causa la activación del mismo y la consecuente iniciación del desarrollo embrionario. Es sabido que el mecanismo mediante el cual el espermatozoide induce esta activación depende de las concentraciones intracelulares de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) libre del ovocito. El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  es observado al momento de la fecundación, sin embargo la forma y el patrón de los picos varía entre diversas especies.

La primer parte de esta presentación se centrará en el mecanismo mediante el cual los espermatozoides inducen la activación del ovocito mediante  $\text{Ca}^{2+}$  y en cómo este incremento adopta un patrón oscilatorio de incremento repetitivo que ocurre cada 10 a 30 minutos y puede durar hasta 10 horas. Si bien aún no ha sido confirmado mediante modelos genéticos, vastas son las evidencias que demuestran que el espermatozoide de mamíferos transporta una fosfolipasa C (PLC, por su denominación en inglés) específica denominada zeta 1. Al momento de la fecundación, PLCzeta1 es liberada en el ooplasma y desencadena el patrón de oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  que es característico en los mamíferos. Las propiedades tanto de estructura como de función de PLCzeta1 que permiten a esta enzima mantener las oscilaciones persistentemente serán discutidas. Así como

también serán discutidas las variaciones especie-específicas en la potencia de esta enzima y el impacto que generan sobre la fertilidad defectos de expresión de la misma. Por último, investigaciones recientes sugieren un mecanismo adicional que involucra a una proteína *novel* PAWP que contribuye a la activación del ovocito en mamíferos. Estos hechos serán presentados en el contexto de PLCzeta1 y la generación de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En la segunda parte de la presentación, se expondrán algunos de los mecanismos necesarios para mantener las oscilaciones de manera persistente en el tiempo. Específicamente, se presentarán evidencias que muestran que el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular es requerido para la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo endoplasmático (ER, por su denominación en inglés) que actúa como depósito intracelular de este ion en el ovocito. Mediante la utilización de un constructo de FRET, se midieron el  $\text{Ca}^{2+}$  intra-ER simultáneamente con las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático inducidas por la fecundación. Nuestros resultados indicaron que las 2 primeras oscilaciones inducidas por el espermatozoide promueven una entrada marginal de  $\text{Ca}^{2+}$  a los depósitos, mientras que subsecuentes oscilaciones promueven un entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  importante que contribuye a recargar el ER a tal punto que la tasa de recarga de los depósitos controla la frecuencia de las oscilaciones.

<sup>1</sup>Dept. of Vet. & Animal Sciences, University of Massachusetts, Amherst, MA. USA.

Tanto durante el estado de vesícula germinal como las oscilaciones posteriores a la fecundación, los bajos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ER podrían ser el estímulo que promueve la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en estas condiciones. Por ello, examinamos la posibilidad de que esta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , a fin de llenar los depósitos, se encuentre asociada con la activación de los mecanismos de *Store Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry* (SOCE). En primer lugar, encontramos que los efectores moleculares de SOCE, Stim1 y Orai1, se expresan en el ovocito de ratón. Luego determinamos que la expresión heteróloga de Stim1 y Orai1 potenció el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en ovocitos y recapituló la inactivación progresiva de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en general, y SOCE en particular, que se desarrolla durante la

maduración. Por otro lado, los intentos de inactivar SOCE con formas mutantes dominantes negativas de Stim1 y Orai1 fallaron en afectar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ER durante la maduración o luego de las oscilaciones seguidas de la inyección de ARNm de PLCzeta. Estos resultados sugieren que un mecanismo alternativo a SOCE tal vez sea importante para el llenado de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la maduración y la mantención de las oscilaciones luego de la fecundación. Finalmente, hemos encontrado que los ovocitos de ratón expresan varios miembros de la familia de canales *transient receptor potential* (TRP). Como parte de esta presentación, presentaremos además estrategias para probar la función y posible rol de estos canales durante los procesos de maduración y fecundación en ovocitos de mamíferos.

# **Rol del cobre como suplemento mineral para el desarrollo de embriones bovinos: análisis de los factores metabólicos involucrados**

Dra. Cecilia Furnus<sup>1</sup>

El cobre (Cu) es un micronutriente esencial que se halla presente en casi todos los tejidos animales, siendo especialmente importante su concentración en hígado, cerebro, riñón, corazón, pelo, lana y plasma sanguíneo. Es un mineral eminentemente catalítico, que desempeña sus funciones como agente catalizador en enzimas actuando como componente estructural. En estas enzimas conocidas como metaloenzimas, el metal se halla firmemente asociado a la porción proteica no pudiendo ser removido de la enzima sin que se produzca la pérdida de actividad de la misma.

A nivel mundial, la hipocuprosis bovina es la segunda deficiencia mineral en importancia en bovinos de cría. En nuestro país, se halla ampliamente difundida pero adquiere especial relevancia en la región deprimida del Río Salado (Provincia de Buenos Aires) en la cual anualmente afecta al 50% de las existencias de ganado. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son características que incluyen entre otras: despigmentación, alteraciones osteoarticulares, diarrea y muerte súbita. Sin embargo, estas manifestaciones representan la fase final de la enfermedad que es precedida por un extenso período subclínico, en el que se producen las principales pérdidas con impacto económico-productivo las que incluyen, menores ganancias diarias de peso, alteraciones inmunológicas y alteraciones reproductivas.

La deficiencia de Cu en bovinos puede ser causada por un aporte inadecuado de este elemento en la dieta (deficiencia simple) o por una baja disponibilidad del Cu ingerido (deficiencia condicionada). La hipocuprosis se desarrolla en tres etapas: depleción, deficiencia y disfunción. La depleción ocurre cuando el requerimiento neto de Cu no es cubierto por la dieta. Este término expresa la falla de la dieta para mantener el nivel de Cu en el organismo y puede continuar durante un largo lapso sin consecuencia para la producción, mientras existan reservas hepáticas de cobre. Cuando la reserva hepática comienza a agotarse y no puede mantener un aporte adecuado de Cu a los tejidos, comienza la etapa de deficiencia, caracterizada por una disminución de la concentración plasmática de Cu por debajo de 60 µg/dl. Finalmente, durante la etapa de disfunción, las enzimas tisulares dependientes de Cu se ven afectadas en su funcionamiento, causando los daños bioquímicos que determinarán la aparición de los signos clínicos de la hipocuprosis y las alteraciones productivas y reproductivas.

Los primeros estudios que relacionaron las alteraciones reproductivas con la deficiencia de Cu se basaron en ensayos de tipo dosis-respuesta. Estos estudios demostraron que la suplementación con Cu mejora los parámetros reproductivos evaluados, pero no fue posible establecer el origen de dichas alteraciones.

<sup>1</sup>Facultad de Cs. Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Otros estudios realizados en ratas y ratones demostraron que el déficit de Cu ocasiona muerte embrionaria temprana y un aumento de anomalías embrionarias estructurales. Además, la deficiencia de Cu disminuye las tasas de fertilización, recuperación de ovocitos, formación de blastocistos y la tasa de eclosión de los blastocistos. También se han informado alteraciones cardíacas y cerebrales post-implantación y un incremento de la concentración del anión superóxido junto con una disminución de la actividad Cu/Zn-superoxido dismutasa (CuZnSOD), daño oxidativo del ADN, lípidos y proteínas.

En rumiantes existen pocos estudios dedicados a investigar las consecuencias de la deficiencia de Cu sobre la fisiología reproductiva, quedando pendiente la necesidad de conocer

cuándo, porqué y en qué grado se afecta la productividad. El ambiente al que está expuesto el complejo ovocito-cúmulus (COC) durante la maduración *in vivo* e *in vitro* condiciona la fertilización y el desarrollo embrionario posterior. Los efectos sobre el ovocito en sí mismo y en su posterior desarrollo son prácticamente desconocidos. Por lo tanto, partiendo de la hipótesis de que la deficiencia de Cu provoca alteraciones en el desarrollo de embriones preimplantacionales de bovino como consecuencia de un incremento en el nivel de daño oxidativo se realizaron en nuestro laboratorio, estudios tendientes a investigar la influencia de distintas concentraciones de Cu durante el período de maduración (maduración meiótica + citoplasmática) y su impacto en el desarrollo embrionario posterior.

# Clonación y transgénesis animal

Germán Kaiser<sup>1</sup>, Vet, MSci.

Habiendo cumplido la técnica de clonación por transferencia nuclear ya casi 20 años, tomando como hito inicial la publicación en el año 1996 del nacimiento de la oveja Dolly, podemos decir que el INTA ha sido parte del desarrollo y utilización de esta biotécnica reproductiva desde casi sus inicios, ya que los primeros trabajos fueron realizados en el año 2000 con investigadores de la Universidad de Munich. El INTA, a través de su cartera de proyectos, ha apoyado el desarrollo de investigaciones en el área de la transgénesis desde el año 2006, siendo la clonación la metodología elegida para la obtención de organismos genéticamente modificados. Sin embargo, esta técnica fue en un principio utilizada con fines de recuperar y/o reproducir individuos (clonación reproductiva), habiéndose obtenido en distintos países del mundo crías clonadas de animales de interés productivo (bovinos, ovinos, caprinos, equinos), de compañía (perros, gatos), e incluso de razas en extinción (gaur).

Vale aclarar que los clones son “copias” genéticas del animal fundador, pero al estar la información genética altamente influenciada por el ambiente, los caracteres productivos, *performance*, e incluso en algunos casos la apariencia de los clones puede variar con respecto al individuo fundador. Este hecho, junto con la baja eficiencia de preñez de embriones

clonados (que influye directamente en el costo de obtención del individuo) pueden ser las razones por las cuales esta técnica no haya alcanzado gran difusión mundial, al menos con fines reproductivos. Sin embargo, en nuestro país numerosas cabañas han clonado a sus animales de “elite” con el fin de obtener un mayor impacto de esa genética a partir de la obtención de un mayor número embriones y dosis de semen, que al provenir de animales clonados, poseen el mérito genético de los individuos de los cuales se los obtuvo, manteniendo los efectos de dominancia y epistasia. A esto se suma la posibilidad de recuperación de la genética de animales muertos, con enfermedades adquiridas, y en particular en el caso de los equinos de padrillos castrados.

Aun siendo una biotecnología considerada como “nueva”, se ha avanzado a paso firme en el mejoramiento de las eficiencias, tanto en el laboratorio como en el logro de nacimiento de clones con fines reproductivos y modificados genéticamente, siendo esto último un área de gran proyección. En este sentido, nuestros primeros trabajos para la obtención de organismos genéticamente modificados (OGMs) fue la producción de cabras transgénicas con capacidad para producir leche con proteínas humanas, de la mano de un convenio con la Universidad de San Martín. Luego de varios años de trabajo, y pese a haber logrado varias gestaciones de

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción del INTA Balcarce.

animales transgénicos, debimos abandonar este proyecto por cuestiones logísticas que hacían muy dificultoso su progreso. Fue entonces cuando decidimos retomar estos trabajos en bovinos, planteándonos además el desafío de lograr un animal bitransgénico (portador de dos genes humanos), algo nunca antes logrado en el mundo. Dos años más tarde logramos obtener a ROSITA ISA, portadora de dos genes humanos (lisozima y lactoferrina) de importancia fundamental en la lactancia de los bebés, y un año más tarde comprobamos que a su vez, era capaz de producir estas proteínas en su leche.

Como proyectos a futuro, se plantea seguir utilizando la técnica de clonación como

herramienta clave en los procesos de mejora genética de animales de interés zootécnico. Específicamente, su empleo permitirá lograr cabras productoras de leche con anticuerpos específicos contra agentes responsables de diarreas infantiles, utilizando vectores que permitan la expresión de múltiples transgenes. Al mismo tiempo se desarrollará una plataforma de edición génica para la eliminación de genes responsables de la producción de proteínas que generan afecciones luego de su consumo (producción de leche hipoalérgica) mediante técnicas de edición génica de última generación, las cuales permiten reconocer y cortar secuencias específicas de ADN sin dejar “huellas” en el genoma.

# Utilización de células madre para el tratamiento de endometriosis en yeguas

Fumuso, E.<sup>1</sup>; Carmo, M.T.<sup>2</sup>; Herrera, M.F.<sup>1</sup>; Cantatore, S.E.<sup>1, 3</sup>; Landim, F.C.<sup>2</sup>; Lombardo, D.<sup>4</sup>; Felipe, A.E.<sup>1</sup>; Rosatti, J.J.<sup>1</sup>; Redolatti, C.<sup>1,3</sup>; Alvarenga, M.A.<sup>2</sup>

Existen dos características que conducen a que las yeguas permanezcan en los sistemas productivos a edades avanzadas. Por un lado, pertenecen a una especie longeva. Por otro su valor como madre aumenta en la medida que sus crías son probadas. Uno de los problemas más frecuentes en estas yeguas “viejas”, es el desarrollo de cambios endometriales degenerativos, o endometriosis, caracterizados por diferentes grados de fibrosis subepitelial y glandular, lagunas linfáticas y angiomas.

Estos procesos hacen que el útero pierda en forma paulatina las posibilidades de contraerse adecuadamente, de desarrollar una correcta respuesta de fase aguda frente a cualquier elemento extraño que ingrese al útero, disminuye la expresión de receptores de hormonas esteroides y produce menor cantidad de leche uterina o histotrofo que constituye la fuente de alimentación del embrión hasta el día 35-40 de gestación. Como consecuencia la fertilidad de la yegua se puede reducir a porcentajes inferiores al 10%.

Para tales alteraciones se utilizan tratamientos paliativos basados en drogas ecbólicas que favorecen las contracciones y el drenaje linfático, antimicrobianos, antiinflamatorios esteroides y no esteroides e inmunomoduladores. Para mantener la preñez se suplementa con progesterona.

La medicina regenerativa se basa en la capacidad que tienen las células madre para autorrenovarse y diferenciarse en distintos linajes celulares. Para ello utilizan los mismos procesos intra e intercelulares que emplea el organismo para su autorreparación. De hecho en hígado, corazón, cerebro, médula ósea, sangre de cordón umbilical y de placenta y útero se encuentran células madre adultas o somáticas encargadas de la reparación. Resulta conocido que algunas terapias con células pluripotenciales son utilizadas para mejorar inflamaciones agudas y crónicas en articulaciones, tendones, huesos y heridas con resultados satisfactorios. Recientemente el tratamiento con células madre (CM) de médula ósea autóloga en yeguas con endometriosis mejoró la distribución y la densidad glandular.

El objetivo de este trabajo fue evaluar en yeguas con endometriosis, la acción de la terapia con CM sobre el colágeno y la actividad de los fibroblastos mediante alfa-actina de músculo liso (SMA).

Se trabajó con 9 yeguas de entre 14 y 23 años de edad que padecían endometriosis de acuerdo a la escala de Kenney & Doig 1996.

Las CM se obtuvieron mediante aspiración de médula ósea autóloga según el siguiente protocolo: las yeguas fueron sedadas con Detomidina, tricotomizadas en un área de 5 x 20

<sup>1</sup> CIVETAN Tandil, Fac. Cs Veterinarias, UNCP BA, Argentina. <sup>2</sup> Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNESP, Botucatu, Brasil. <sup>3</sup>CIC- PBA. <sup>4</sup>Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal - INITRA, FCV, UBA, Argentina.

cm para permitir la evaluación ultrasonográfica. Una vez localizada la 5ta esternebra, se realizó un bloqueo local con 10 ml de clorhidrato de lidocaína, seguido de anti-sepsia local. Para la aspiración se usó una aguja de punción de médula ósea para equinos, modelo Jamshidi calibre 8 y de 12 cm de longitud. Una vez fijada la aguja dentro del esternón, se removió el mandril y se realizó la aspiración de las células de médula ósea con el auxilio de una jeringa de 20 ml conteniendo 5 ml de Dulbecco's PBS (DPBS) y 1 ml de heparina

(1000 UI/ml). Se tomaron 3 jeringas de 20 ml de muestra, de los cuales 6 ml eran de Heparina y DPS y el resto medula ósea. En alícuotas de 4 ml se transfirieron a un tubo de 15 ml con 4 ml de Ficoll Pack para centrifugación a 1500 RPM a temperatura ambiente durante 40 minutos. Se separaron las células de la interfase de Ficoll, se resuspendió en DMEM sin suero y centrifugó a 1500 RPM durante 10 minutos en 2 oportunidades. Finalmente el *Pellet* fue resuspendido en DMEM con 20% de Suero Fetal Bovino. Se realizó el recuento de células x  $\mu$ l y se plaquearon en frascos de 25 cm<sup>3</sup> con 5 ml de DMEM de alta concentración de glucosa con L-glutamina y 10% de Suero Fetal Bovino. El medio se cambió cada 4/5 días. Las células se repicaron una vez lograda la confluencia.

La caracterización celular se hizo por la reacción celular cruzada de anticuerpos caninos con los antígenos de superficie equinos (CD 44, CD 34), por citometría de flujo FACS Calibur BD en el Laboratorio de Citometría de Flujo del Centro de Hemoterapia de la Facultad de Medicina de BOTUCATU (UNESP-Brasil).

El tratamiento consistió en inyectar un total de  $8 \times 10^6$  de CM en un volumen de 0,5 ml siguiendo una línea horizontal desde el extremo de un cuerno uterino al otro en 20 puntos diferentes. Las inyecciones se realizaron por histeroscopia con una aguja

diseñada para procedimientos endoscópicos. Se tomaron 18 biopsias endometriales. Nueve de las cuales fueron obtenidas en el día 0 (D0) pre-administración del tratamiento con CM autólogas. Sesenta días más tarde (D60) se obtuvo una segunda biopsia de cada yegua. Las biopsias se fijaron en solución Bouin y luego en etanol al 70-% hasta la inclusión en parafina. Las secciones seriadas (4  $\mu$ m) fueron montadas en portaobjetos pretratados con solución de silane.

Para la determinación del colágeno total se colorearon los cortes histológicos con rojo de picosirio. Para inmunohistoquímica de SMA las secciones se incubaron con un anticuerpo monoclonal de anti-actina de músculo liso anti-humano (DAKO) diluido 1/100, a 4°C durante 12 h. Se utilizó el sistema Dako LSAB<sup>TM</sup>+ kit/HRP y como coloración de contraste hematoxilina de Mayer.

Las imágenes fueron capturadas con una cámara Leica ICC50HD incorporada a un microscopio Leica DM500 con magnificaciones de x200 y x400, utilizando el programa "Leica Application Suite EZ". Se analizaron ocho imágenes de cada muestra para la detección tanto de colágeno como de SMA, a x400 utilizando el programa Q-Win Plus Leica 2003. Se determinaron las áreas de tinción y de inmunomarcado (% de campo por imagen) que se expresaron en  $\mu$ m<sup>2</sup>. Los datos se analizaron con GraphPad-InStat a través del Test "t" para datos pareados, el nivel de significancia se estableció en  $p < 0,05$ .

Luego del tratamiento, al D60, se infirieron tanto un incremento del colágeno total (D0: 151,09, D60: 179,01;  $p < 0,009$ ), como de la actividad de los fibroblastos, indicada por valores elevados de inmunomarcación de SMA (D0: 12,09; D60: 18,3;  $p < 0,03$ ). Los hallazgos obtenidos indicarían que el tratamiento con CM autólogas modificó y remodeló la matriz extracelular del endometrio de yeguas con endometrosis.

# **A análise computadorizada do semen (casa) e a integridade da membrana espermática na avaliação da qualidade do sêmen criopreservado de carneiro**

## **"The Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) and sperm membrane integrity in assessment of the quality of the cryopreserved ram semen"**

Sony Dimas Bicudo<sup>1</sup>, Leandro Rodello<sup>1</sup>, Tácia Gomes Bergstein<sup>1</sup>, Luana de Cássia Bicudo<sup>1</sup>

O processo de criopreservação do sêmen impõe modificações morfofuncionais à maioria dos espermatozoides. A extensão dessas modificações varia em função do indivíduo, ou mesmo de cada ejaculado, havendo grande variação principalmente entre as espécies animais. A diversidade na composição bioquímica dos constituintes do plasma seminal e principalmente na estrutura bioquímica das membranas espermáticas, determinam diferentes respostas ao processo de criopreservação. Os espermatozoides criopreservados de ovino apresentam dificuldade de colonização e baixa longevidade no genital da fêmea, devido ao elevado percentual de células com modificações semelhantes à capacitação. Após a criopreservação, em todas as espécies, a triagem qualitativa das amostras tem sido feita pela avaliação da motilidade espermática e das alterações morfológicas. Até o momento nenhum método laboratorial é capaz de prever com exatidão o potencial fertilizante de uma amostra espermática. A possibilidade de empregarem-se técnicas de seleção por métodos de filtração/adsorção (Sephadex) espermática, *swim up* e centrifugação em gradientes de diferentes densidades, tem exigido o aprimoramento das avaliações e valorização do conceito de subpopulação espermática. Embora não seja recente a compreensão de

que o ejaculado ou uma amostra de sêmen seja uma mescla de espermatozoides em diferentes estádios fisiológicos, a avaliação dessas características que permitam a identificação de subpopulações surgiu com a sofisticação nos métodos de análise. A incorporação de técnicas como CASA (*Computer-Assisted Semen Analysis*) e o estudo das membranas dos diversos compartimentos realizado com o emprego de sondas fluorescentes, que permitem uma estimativa indireta das funções espermáticas, têm aumentado a acurácia no prognóstico do desempenho das amostras de sêmen no processo de fertilização *in vivo* ou *in vitro*. A avaliação espermática pela citometria de fluxo além de ser objetiva apresenta alto nível de repetibilidade experimental, permite trabalhar com pequenas amostras e realizar avaliação de milhares de células de maneira quase que instantânea. Adaptada inicialmente para a quantificação do conteúdo em DNA da célula espermática sua aplicação estendeu-se à análise de um maior número de parâmetros como contagem e mensuração dos espermatozoides, viabilidade celular, integridade acrossomal, função mitocondrial, capacitação espermática, fluidez de membrana, marcadores de apoptose, marcadores do estresse oxidativo e danos ao DNA. A CASA permite um avanço na maneira

<sup>1</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista – UNESP Botucatu

de compreender a célula espermática, por possibilitar não só o cálculo dos valores médios dos parâmetros de velocidade e dos padrões de movimento do conjunto das células analisadas, mas também a obtenção de valores individuais das células. Com isso, torna-se possível a identificação estatística das subpopulações com distintos padrões de movimento que coexistem na amostra. Essa ferramenta amplia a possibilidade de obterem-se correlações mais

efetivas entre a análise espermática e a capacidade fecundante do sêmen. Os espermatozoides aptos a desempenhar o papel de fertilização devem pertencer simultaneamente à subpopulações com um padrão cinético determinado e também à subpopulação de células com membranas dos seus compartimentos, fisiologicamente adequadas. A presente palestra tem por objetivo discutir a potencialidade dessas ferramentas na avaliação do sêmen ovino criopreservado.

The process of sperm cryopreservation impose morphofunctional modifications to most sperm. The extent of these changes varies with the individual, or even each ejaculate, there is great variation mainly between animal species. The diversity in the biochemical composition of the constituents of seminal plasma and especially in the biochemical structure of the sperm membranes, determine different responses to the cryopreservation process. The cryopreserved ram sperm have difficulty in colonization and reduced longevity in the female genital, due to the high percentage of cells with capacitation-like changes. After cryopreservation, in all species, qualitative screening of samples has been done by the evaluation of sperm motility and morphological changes. To date, no laboratory method is able to accurately predict the fertilizing potential of a semen sample. The possibility of employing techniques of selection methods by filtration/adsorption (Sephadex) sperm, swim up and centrifugation in gradients of different densities, has demanded better assessments and appreciation of the concept of sperm subpopulation. Although not recent understanding that the ejaculate or semen sample are a mixes of spermatozoa at different physiological stages, the evaluation of these features that enable the identification of subpopulations emerged with the sophistication in the methods of analysis. The incorporation of techniques such as CASA (Computer Assisted Semen Analysis) and the study of the membranes of the various compartments performed with the

use of fluorescent probes, which allow an indirect estimate of sperm functions, have increased the accuracy on predicting the performance of semen samples on process of fertilization in vivo or in vitro. Sperm evaluation by flow cytometry in addition to being objective has a high level of experimental repeatability, allows working with small samples and perform evaluation of thousands of cells almost instantaneously. Initially adapted to quantify the DNA content of sperm cells extended their application to analysis of a larger number of parameters such as sperm counting and sperm sizing, cell viability, acrosomal integrity, mitochondrial status, sperm capacitation, membrane fluidity apoptotic markers, oxidative stress markers and DNA damage. The CASA enables an advance in the way of understanding sperm cell, for not only enable the calculation of the average values of the parameters of speed and movement patterns of all analyzed cells, but also to obtain individual cell values. With this, it becomes possible statistical identification of subpopulations with different patterns of movement which coexist in the sample. This tool increases the possibility of obtaining more effective correlations between sperm analysis and the fertilizing capacity of semen. The fit sperm to play the role of fertilization must simultaneously belong to subpopulations with a particular kinetic pattern and also the subpopulation of cells with membranes of its compartments physiologically appropriate. This conference aims to discuss the potential of those tools in assessing the cryopreserved ram semen.

# Nuevas tendencias en la valoración de la calidad seminal

Cisale, H.O.<sup>1</sup>

La inseminación artificial (IA) bovina ha sido la técnica de reproducción asistida más empleada desde mediados del siglo XX debido a las ventajas que presenta en el mejoramiento genético, la prevención y control de enfermedades de transmisión sexual, la posibilidad de emplear toros con facilidad de parto y la optimización del manejo reproductivo del rodeo.

El éxito de la IA depende de múltiples factores, siendo uno de los principales la calidad seminal, utilizada para estimar la capacidad fecundante de las dosis comercializadas. Ningún examen *in vitro* presenta una correlación alta con la fertilidad, por lo cual debe desarrollarse un protocolo de control de calidad que estudie el mayor número posible de características de los espermatozoides, permitiendo revelar defectos compensables y no compensables. Los primeros pueden subsanarse por el aumento de la concentración de espermatozoides en las dosis seminales, mientras que los segundos no, siendo éstos los más graves porque pueden ser causa de subfertilidad en los rodeos.

Las técnicas de rutina empleadas hasta el momento presentan algunas desventajas como la subjetividad en las mediciones, la escasa cantidad de células analizadas en cada muestra y el hecho de no evaluar la presencia de defectos espermáticos no compensables.

Nuevas investigaciones permiten describir mejor este tipo de alteraciones a partir de dos áreas principales: 1) evaluación del ADN espermático y 2) mediciones más precisas de la morfología de la cabeza. En ambos casos, puede mejorarse fuertemente la efectividad de la valoración a través de la incorporación de pruebas que analizan la calidad nuclear y las nuevas tecnologías automatizadas (*Computer Assisted Semen Analysis - CASA*). Éstas proporcionan una metodología fiable, y de elevada repetibilidad, permitiendo estandarizar y objetivar el análisis de las características seminales.

En nuestro país, las dosis comerciales de semen deben cumplir con las condiciones de calidad establecidas en el Decreto Reglamentario N° 4.678/73. Sin embargo, las mismas resultan insuficientes para predecir la calidad seminal o la fertilidad del donante. Este hecho, sumado a los requisitos impuestos por el mercado internacional, pone en evidencia la necesidad de implementar un protocolo que permita la certificación de la calidad seminal con mayores exigencias a las impuestas por la legislación vigente. Para aumentar el valor agregado de sus productos, Argentina debería adaptarse a las demandas del mercado internacional establecidas en países como Alemania, Canadá, Italia o Estados Unidos, países en los cuales se

<sup>1</sup>Cátedra de Física Biológica, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires.

están efectuando Programas de Certificación de Calidad de semen criopreservado para el ganado bovino que incluyen la incorporación de nuevas tecnologías como el análisis computarizado, la citometría de flujo y marcadores moleculares, que aseguran la trazabilidad del material y garantizan la objetividad de los resultados.

El análisis computarizado de la morfología espermática ha tenido, y tiene, una amplia difusión en la caracterización de eyaculados humanos. Una de las preguntas a responder en este sentido es si la misma correlación encontrada en humanos se repite en animales de producción. Se ha intentado establecer valores de referencia para las diferentes variables morfométricas y morfológicas de los espermatozoides de toro empleando diferentes sistemas computarizados. No obstante, aunque en los trabajos publicados a la fecha no han definido valores estándar, queda claro que la incidencia de morfologías anormales más allá de los valores esperables es indicio de problemas reproductivos. Un análisis ajustado de la morfología en nuestro laboratorio ha demostrado que, contra lo descrito en la bibliografía, los problemas de cuello espermático son los más evidentes en dosis seminales aprobadas por los centros productores.

Las pruebas de calidad del ADN espermático, han ganado amplia difusión en los últimos tiempos vista la necesidad de encontrar metodologías que permitan evaluar algunas anomalías no compensables. Estas pruebas permiten detectar problemas de subfertilidad en los rodeos, así como explicar, en algunos casos, las pérdidas embrionarias tempranas. Las coloraciones estequiométricas del ADN permiten el estudio de las anomalías morfológicas, del contenido de ADN y de la distribución de la cromatina. Otras técnicas evalúan la maduración y compactación de la cromatina, la respuesta a la exposición a agentes decondensantes y la integridad del ADN (TUNEL, ISNT, COMETA, DBD-FISH, SCDt y SCSA). Muchas de las técnicas referidas requieren equipos sofisticados y son costosas limitando su aplicación en los laboratorios de control de calidad seminal. Esta situación

ha ameritado desarrollar y poner a punto pruebas nucleares alternativas, que sean rápidas, repetibles y económicas para que se incorporen a la rutina de control de calidad espermática en los centros de IA de nuestro país.

Dentro de las tendencias internacionales, más allá de la diversidad de criterios en la valoración de los resultados de laboratorio, se entiende que debe existir una normativa que lleve a estandarizar el material genético a utilizar en el sistema pecuario, no solo desde el punto de vista sanitario, sino también en cuanto a la calidad propia de las muestras seminales, nacionales o importadas, que permitan una Certificación de la Calidad Seminal. Este hecho permitiría que los laboratorios que cumplan con estas normas tengan un producto con valor agregado, que, a la postre, se traslade a la genética nacional, permitiendo una mejor inserción en los mercados regionales e internacionales.

Basados en esta propuesta, nuestro laboratorio ha establecido un protocolo de valoración de dosis seminales que incorpora el análisis de diversas características del espermatozoide a través de técnicas de la máxima objetividad, fundadas en los modelos internacionales y la bibliografía disponible, al nivel de los centros internacionales de la mayor envergadura. Esto nos permite poner a disposición del productor una serie de estudios no convencionales en el espermograma permitiendo una mayor precisión en la predicción de las características de fecundidad de las dosis analizadas.

Nuestros espermogramas incluyen el uso de sistemas de valoración objetivo de a través de CASA, viabilidad a través de la medición de fluorescencia específica por citometría de flujo, pruebas que incluyen la valoración de la funcionalidad de la membrana, la integridad del acrosoma, y la morfología espermática. Sumado a esto, creemos que el análisis del núcleo espermático tiene una importancia fundamental en la detección de problemas de subfertilidad, por lo que incorporamos diversas pruebas nucleares (morfología nuclear, maduración y decondensación de la cromatina), y estamos desarrollando un nuevo test de fragmentación nuclear.

La eliminación de toros o partidas por la valoración de las dosis preparadas necesita de parámetros claros y estandarizados internacionalmente, los que hoy no existen. Solo algunos países tienen controles centralizados de la calidad seminal, y lo hacen a través de la valoración con Citometría de flujo y CASA. El uso de estos equipos tiene la ventaja de permitir la repetición de estudios sobre las mismas partidas seminales en diversos lugares, la

comparación de datos, y, finalmente, permitirá el acuerdo internacional sobre los parámetros mínimos de calidad que deberán tener las dosis en el mercado internacional. La nueva tendencia incluye el análisis de la calidad de núcleo espermático como medio de predecir posible subfertilidad. La suma de estas pruebas medidas en forma objetiva permitirá en un futuro la certificación de dosis comercializadas, dándole valor agregado a la genética nacional.

# Experiencias en investigación y perspectivas futuras de las biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos

Dra. Susana María Giuliano<sup>1</sup>

La fisiología reproductiva de los camélidos sudamericanos (CSA), tanto del macho como de la hembra, presenta particularidades que ha hecho de estas especies un foco de interés internacional para poder comprenderla. Dichas particularidades, a su vez, han condicionado la implementación de biotecnologías reproductivas en forma masiva en las comunidades campesinas, siendo restringido su uso a centros de investigación o centros comerciales puntuales. A nivel mundial existen varias líneas de investigación básica y aplicada con el objetivo último de poder conocer las particularidades reproductivas y comprender porque las técnicas de reproducción asistida no tienen los resultados satisfactorios o medianamente satisfactorios que hay en otras especies. Con respecto a la hembra, hay que mencionar que son ovuladoras inducidas, consecuentemente hay que inducir la ovulación antes de inseminarlas. Debido a que los perfiles de estrógeno exhiben un patrón en ondas y tienen una estrecha correlación entre la concentración hormonal y el tamaño folicular, presentan un período de receptibilidad sexual prolongado. Por lo tanto para poder establecer el momento óptimo del empadre o de la inseminación artificial (IA) es necesario el uso de la ultrasonografía ya que la hembra, en presencia del macho puede adoptar la postura de aceptación de la cópula sin que eso signifique

que tenga un folículo dominante con el tamaño adecuado.

Con respecto a la extracción de semen, la postura adoptada por CSA durante la cópula (decúbito esternal), la duración de la misma (10 – 50 minutos) y el patrón de eyaculación, han ocasionado muchas dificultades en la recolección de eyaculados de calidad. A estas dificultades se suman las características particulares de los eyaculados de CSA (alta filancia y viscosidad estructural y nula movilidad espermática progresiva). De esto ha derivado que para elegir un método de extracción de semen en estas especies, no solo hay que tener en cuenta el tipo de monta, sino también las características del semen, la especie de CSA (doméstica o silvestre) y el uso de la muestra (evaluación, IA, producción de embriones, investigación, etc.). Otra situación a tener en cuenta, es que la mayoría de la población de CSA se encuentra a más de 3000 msnm, lejos de laboratorios con infraestructura adecuada y cuyos propietarios tienen costumbres ancestrales y tradiciones que no siempre coinciden con un manejo reproductivo adecuado, haciendo muy difícil la introducción de mejoras. En este contexto fisiológico reproductivo de los CSA y contexto ambiental y socio cultural, la implementación de biotecnologías reproductivas ha tenido un progreso lento.

<sup>1</sup>Cátedra de Física Biológica, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires.

*Inseminación artificial (IA):* esta tecnología está limitada al uso de semen fresco con una tasa de preñez máxima de 77% en centros experimentales y de no más de 50% en criaderos particulares. Utilizando semen congelado de llama y alpaca e inseminando a tiempo fijo (24 h pos-inducción de la ovulación) se han obtenido hasta el momento tasas de preñez de solamente 26%. Esta situación ha conducido a que actualmente no se practiquen campañas de IA con semen congelado de CSA en los establecimientos que producen llamas y/o alpacas.

*Producción de embriones in vitro:* Existen pocas publicaciones sobre producción *in vitro* de embriones en camélidos. Sólo hay un reporte de preñez, en la llama, luego de la transferencia intrauterina de embriones producidos *in vitro* a hembras receptoras, obtenidos mediante FIV y utilizando gametas de animales vivos.

*Transferencia embrionaria intra e interespecífica:* en los CSA no solo posibilita la propagación genética de donadoras de alta calidad, sino que también facilita la preservación y repoblación de CSA silvestres en peligro de extinción y de alpacas o llamas con características especiales. En la actualidad esta técnica permite que una donante presente más de 8 o diez crías, en vez de una y además obtener una tasa de preñez del 40%. Consecuente con esta biotecnología es con la que mayor éxito se ha logrado hasta la actualidad.

### **Perspectivas futuras de las Biotecnologías Reproductivas**

En los CSA la presencia del PS no permite un buen manejo del semen dificultando la interacción de los espermatozoides con los crioprotectores y el envasado de las pajuelas, por lo tanto se hace necesario un tratamiento enzimático que posibilite el manejo de las

muestras a criopreservar. Por otra parte la dilución o tratamiento enzimático de los eyaculados podría modificar el patrón de movilidad de los espermatozoides, interferir en la interacción oviducto-espermatozoide y favorecer fenómenos de membrana similares a la capacitación, comprometiendo el encuentro de los gametos en el oviducto. Es necesario investigar estos fenómenos ya que al afectar este encuentro debería modificarse el protocolo de IA con el objetivo de ajustar el intervalo entre la inducción de la ovulación y la inseminación con semen congelado. Con respecto a la producción de embriones *in vitro*, las nuevas investigaciones están dirigidas al estudio del proceso de reconocimiento materno de la preñez en los camélidos, para mejorar los porcentajes de preñez luego de la transferencia embrionaria. También, están dirigidas a la utilización de semen refrigerado y congelado para la realización de la FIV, a la evaluación de diferentes combinaciones de medios de cultivos para el desarrollo embrionario *in vitro*, y a la preservación de los embriones. Acerca de la transferencia embrionaria, esta técnica es la que mayor proyección comercial presenta en la actualidad. Sin embargo, para un mejor aprovechamiento de las mismas, es necesario nuevos estudios sobre el tiempo de llegada del embrión al útero y su migración al cuerno izquierdo y sobre las causas de pérdida embrionaria temprana.

El desarrollo y la aplicación de nuevos protocolos de biotecnología reproductiva aplicados a CSA permitirían disminuir la brecha generacional y mejorar los índices reproductivos de los rodeos. Además esto implicaría mayor cantidad de productos para exportación, los cuales son reconocidos a nivel internacional por su calidad, y mayor rentabilidad para las comunidades de altura.

# Influencia del estrés en la fisiopatología ovárica bovina

Dr. Hugo H. Ortega<sup>1</sup>

La Enfermedad Quística Ovárica (COD) es una importante disfunción ovárica y una de las mayores causas de problemas reproductivos en el ganado lechero. Debido a la complejidad de este desorden y a la heterogeneidad de sus signos clínicos, no existe una definición clara. Los quistes se desarrollan cuando ocurre una falla en la ovulación y los folículos persisten en el ovario. A pesar de la abundante bibliografía relativa a la enfermedad, aún se desconoce su patogenia. Se acepta que una disrupción en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal debida a factores endógenos y/o exógenos, podría ser una de las causas de la formación de quistes. A nivel ovárico, cambios celulares y moleculares en el crecimiento folicular podrían contribuir a la anovulación y formación de los quistes. La asociación entre el genotipo y fenotipo de animales afectados, y con la producción lechera, podría ser atribuida al balance energético negativo y las adaptaciones metabólicas y hormonales asociadas.

Está claro que en esta enfermedad como en otras que afectan al bovino, una de las causas iniciales en la cascada de eventos que contribuyen a su patogenia es una falla en el mecanismo normal de ovulación, que lleva a su ausencia o a una falta de coordinación en los diferentes componentes endocrinos involucrados. En este sentido, es importante

destacar que la ovulación ha sido descrita por diversos autores como un proceso inflamatorio localizado, donde una sucesión de eventos lleva a la degradación proteolítica de un punto específico de la pared folicular para permitir la salida del ovocito. Considerando los múltiples factores que intervienen en este proceso (ovulación/inflamación), la alteración en uno o más componentes, podría contribuir de manera importante en la etiopatogenia de este tipo de enfermedades.

Es evidente que la intensificación cada vez mayor de la producción pecuaria es un camino sin retorno, ya que la demanda mundial de alimentos y biocombustibles deja un margen cada vez menor para la ganadería extensiva tradicional. Continuamente se incorporan nuevas tierras a la actividad agrícola, arrinconando a la ganadería en áreas marginales. En este sentido, comparando los índices reproductivos de rodeos mantenidos en diferentes zonas geográficas, las evidencias de que el estrés afecta la eficiencia reproductiva en el ganado son concluyentes. Hasta la fecha se ha establecido claramente que los estresores reducen la fertilidad por interferir con los mecanismos que regulan el cronograma de eventos dentro de la fase folicular, tanto a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal como así también a través de acciones directas en el ovario.

<sup>1</sup>Universidad Nacional del Litoral – CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias. Profesor Titular Cátedra de Biología Celular. Investigador Independiente - ICiVet-Litoral - CONICET

Además, en publicaciones recientes se ha demostrado que los diferentes estresores afectan los mecanismos sistémicos asociados a la cascada inflamatoria generando, por ejemplo, mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Vlisidou *et al.*, 2004; Aich *et al.*, 2007; Lavon *et al.*, 2011). Sin embargo, a la fecha, no ha sido posible encontrar estudios que analicen los efectos a nivel ovárico de los cambios en la respuesta inmune asociados al estrés.

Dos sistemas neuroendócrinos de protección son los encargados de mediar en forma bidireccional las adaptaciones de los organismos a situaciones potencialmente peligrosas. Uno de ellos, es el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (eje HHA): un conjunto complejo de influencias directas y de interacciones de retroalimentación entre el hipotálamo, la hipófisis y las glándulas adrenales. El núcleo paraventricular del hipotálamo, sintetiza y secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la que actúa sobre la hipófisis estimulando la secreción de ACTH. La ACTH induce la liberación de cortisol en la corteza adrenal, lo cual induce una retroalimentación negativa del sistema e inhibe la secreción de hormonas desde el hipotálamo y la hipófisis. Esto reduce la secreción de CRH y la vasopresina, y también reduce directamente la escisión de proopiomelanocortina (POMC) en ACTH y  $\beta$ -endorfinas.

El segundo sistema es el simpático-adrenérgico. La adrenalina y noradrenalina se producen en la médula adrenal a través de la estimulación simpática y los efectos locales del cortisol. Estas hormonas producen una retroalimentación positiva a nivel de la hipófisis e incrementan de esa manera la transformación de la POMC en ACTH y  $\beta$ -endorfinas.

La ACTH ejerce sus acciones principalmente a través de los receptores de melanocortinas, habiéndose caracterizado 5 receptores (MC1R-MC5R) que son comunes a toda esta familia de péptidos (ACTH y hormona estimulante de melanocitos). Recientemente hemos realizado la primera descripción de estos 5 receptores en el ovario bovino, lo que abre una importante línea de trabajo en relación a las influencias del estrés

directamente en el ovario y a la modulación de las acciones anti y pro-inflamatorias asociadas a la ovulación. Los MCRs están implicados en las respuestas fisiológicas de ACTH y  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ - hormonas estimulantes de melanocitos ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -MSH). Su expresión ha sido previamente analizada en diferentes tejidos bovinos detectándose los 5 tipos existentes; sin embargo no existían estudios sobre su localización en el ovario. Además, en ensayos *in vitro*, hemos comprobado una liberación de cortisol en respuesta a ACTH en folículos medianos así como un incremento de la testosterona y del cortisol en folículos grandes. En relación al sistema simpático-adrenérgico, hemos descrito que los folículos ováricos de bovino presentan terminales nerviosos simpáticos cuya capacidad de respuesta varía inversamente en relación al estado de maduración. Estos resultados demuestran que los estresores también tienen una vía directa de acción sobre los ovarios bovinos, habiendo antecedentes de que tanto la vía de la ACTH-Cortisol, como la vía de la noradrenalina, ejercen importantes efectos sobre la actividad del sistema inmune y los mecanismos inflamatorios asociados a la ovulación.

Se sabe que los estresores también reducen la fertilidad por interferir con los mecanismos que regulan el cronograma de eventos dentro de la fase folicular. De hecho, se ha demostrado que el transporte de los animales (un estresor agudo) durante 4 a 8 h, reduce la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH, en la fase folicular tardía y puede afectar la ovulación.

En algunas situaciones, como durante el estrés crónico debido a laminitis o fiebre, la frecuencia pulsátil de GnRH/LH puede ser más lenta, de modo tal que el desarrollo folicular comienza, pero no puede continuar a estadios avanzados donde se necesita la mayor frecuencia de liberación. De esta manera, el animal no es capaz de desarrollar ciclos estrales normales y se produce anestro. Esta situación ha sido descrita por nuestro grupo de trabajo en bovinos expuestos a luz permanente durante más de 10 semanas. En otros casos, la frecuencia del pulso de GnRH/LH puede ser suficiente para soportar

el desarrollo folicular pero con alteraciones en la liberación de GnRH o la sensibilidad de la hipófisis al estradiol. De esta forma, se genera una liberación inadecuada de LH, incapaz de producir ovulación y luteinización, ocasionando la persistencia folicular y el desarrollo de quistes foliculares.

A esto deben adicionarse acciones locales en la cascada de enzimas relacionadas al metabolismo de los glucocorticoides que también interferirían con el proceso inflamatorio asociado

a la ovulación, y como hemos mencionado previamente, la pared folicular bovina, es capaz de responder frente al estímulo por ACTH con cambios en la secreción de esteroides, incluyendo una mayor liberación de cortisol.

Por último, han sido asociadas diferentes condiciones estresantes a calidad de ovocitos y a altas pérdidas embrionarias tempranas, por lo que comprender estos mecanismos es de suma importancia para lograr la exitosa aplicación de técnicas de biotecnología reproductiva.

# El fotoperíodo y su aplicación al control de la reproducción en ovinos y caprinos

Chemineau, P.<sup>1,2</sup>

Los ovinos y caprinos de razas y países templados y subtropicales paren únicamente durante algunos meses en el año, lo que produce una aparición estacional de carne o leche en el mercado, provocando variaciones de precios y calidad de estos productos. Este fenómeno se origina por el período de anovulación/anestro de las hembras y de reposo sexual en los machos, que ocurre al mismo tiempo en todos los animales, al final del invierno y durante la primavera. De duración variable entre razas, el anestro va de 3 a 7 meses, lo que obliga al productor utilizar técnicas de reproducción a contra-estación durante la mayoría del tiempo.

Las variaciones de duración del día a lo largo del año, el fotoperíodo, y sus efectos en la fisiología reproductiva son responsables de la aparición del anestro en la hembra y de la reducción de la actividad sexual en el macho. El período de reposo sexual se origina por la disminución casi completa de la actividad pulsátil de las neuronas a GnRH provocada por el incremento estacional de la retroacción negativa del estradiol sobre las neuronas a GnRH. Esto provoca una baja secreción de LH de la hipófisis y de las actividades ováricas y testiculares. El fotoperíodo, via la retina de los ojos y la glándula pineal que produce la melatonina durante la noche, sincroniza

un ritmo endógeno circanual y permite la coincidencia de la actividad sexual con el medio exterior. Algunas características singulares del efecto del fotoperíodo sobre la actividad sexual, como los efectos estimulantes e inhibidores de los días cortos y días largos, respectivamente, la presencia de una fase de sensibilidad 16 horas después del alba y la propiedad de los días largos de eliminar la refractariedad a los días cortos, permiten desarrollar tratamientos en hembras y machos para el control de la reproducción a contra-estación.

Cuatro tipos de control pueden ser empleados. (1) El mantenimiento a lo largo del año, de una actividad sexual elevada con una producción seminal de buena calidad, es posible en chivos y corderos sometidos permanentemente a una alternancia de un mes de días cortos (8 h luz) con un mes de días largos (16 h). Este tratamiento en el cual los machos se mantienen en edificios cerrados, se utiliza esencialmente en centros de inseminación artificial (IA) donde los machos son de alto valor genético y se necesita tener semen a lo largo del año. (2) La inducción de una actividad sexual elevada de los chivos y corderos durante dos meses en plena contra-estación en primavera es posible utilizando una secuencia de dos meses de días largos en invierno seguidos o no

<sup>1</sup>INRA, CNRS, Univ Tours, Haras Nationaux, UMR 7247 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France. <sup>2</sup>EAAP - The European Federation for Animal Science Via Tomassetti, 3 - 00161 Roma ITALY

de implantes subcutáneos de melatonina. Este tratamiento es aplicable en edificios abiertos y los animales siguen recibiendo el fotoperíodo natural. Los chivos y corderos pueden ser utilizados para producir dosis de IA o en monta natural, en este último caso tienen una capacidad inductiva (por «efecto macho») y una fertilidad elevadas. (3) El mismo tratamiento de dos meses de extraluz en invierno, seguido o no con un implante de melatonina, puede ser utilizado también en hembras mantenidas en edificios abiertos, en rebaños en producción. En hembras, esta asociación con machos tratados como en (2) y utilizados para un «efecto macho» provoca ovulaciones y estros sincronizados en casi

todas hembras, conduciendo a una fertilidad de alrededor de 75% de partos. (4) El cuarto tipo de tratamiento es el empleo de implantes subcutáneos de melatonina que permiten adelantar el período de cubrición de 1.5 meses y que aumentan la prolificidad.

Aunque ahora estos tratamientos son empleados por los ganaderos y los centros productores de semen de una manera bastante amplia en Francia y Europa, la tendencia es de simplificarlos y de utilizar, especialmente en el subtrópico, machos tratados con hembras no tratadas. Esta última situación, permite desarrollar sistemas simples, de bajo costo, sin emplear hormonas y permitiendo fertilidad elevada a contra-estación.