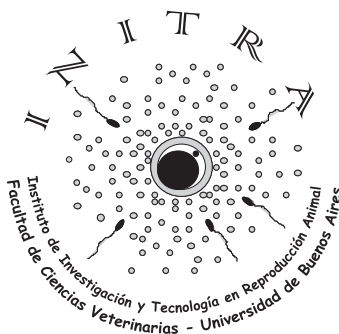


Primeras Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal -INITRA.

Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA

24, 25 y 26 de septiembre, 2008. Buenos Aires, Argentina



Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal INITRA.

Marco conceptual de su creación y objetivos

En los últimos 50 años, la Investigación en reproducción animal ha tenido un amplio desarrollo dada la incorporación de conocimiento y tecnología provenientes de diferentes disciplinas, ampliando su espectro de posibilidades. La creciente necesidad mundial de alimentos se traduce en una mayor demanda de las especies de interés productivo, determinando que se adopten y prioricen líneas de investigación y tecnologías necesarias para optimizar la producción pecuaria. Asimismo, la preservación de especies en peligro de extinción requiere la creación de conocimientos que permitan incrementar los estándares reproductivos. En nuestro país, el desarrollo de la investigación y de la transferencia tecnológica en reproducción animal precisa decisiones urgentes tanto en materia de promoción y coordinación, como en la formación de recursos humanos. En ambos casos la Universidad tiene un papel indelegable.

La Facultad de Ciencias Veterinarias ha contado durante los últimos 20 años con Proyectos de Investigación y Transferencia de Tecnología en el área de conocimiento de la reproducción animal, logrando un desarrollo considerable. Diversos grupos han llevado a cabo investigación básica y aplicada y una gran parte de la formación doctoral y de postgrado de nuestros docentes se realiza en estos temas, generando una masa crítica importante.

La investigación en el área de reproducción animal ha demostrado ser original, de calidad, con amplia pertinencia y adecuación a las necesidades del sector productivo, generando un volumen importante y continuo de recursos humanos. Muchos de los grupos están trabajando

Recibido: 30/09/08 - Aceptado: 12/11/08

InVet. 2008, 10(2): 111-212
ISSN(papel): 1514-6634
ISSN (on line) 1668-3498

fuertemente en la inserción con el sector productivo, para detectar, identificar e implementar líneas de investigación que tengan amplio impacto en el campo disciplinario respectivo, existiendo convenios con organismos de relevancia a nivel nacional e internacional.

En la actualidad, en nuestra Facultad, se desarrollan varias líneas de investigación orientadas al área de la reproducción que vieron la necesidad de constituirse en un organismo con categoría de «Red» multidisciplinaria, un Instituto de Investigación y Tecnología en el área de prioridad; «la Reproducción Animal». Esto obviamente favorece la continuidad de las investigaciones que se abordan a través de las hipótesis experimentales que dichas líneas plantean, así como la proyección hacia nuevas hipótesis.

Las líneas de investigación en reproducción que se desarrollan en nuestra unidad académica, y que se agrupan inicialmente para constituirse como Instituto son las siguientes: Biología celular y molecular de los procesos dinámicos del ovario, Bioquímica de gametas y embriones, Evaluación y criopreservación de gametas, Biotecnología aplicada a la reproducción y Clínica reproductiva. Consideramos que un Instituto contribuirá al avance científico – tecnológico y a la resolución de un sinnúmero de problemas que la temática presenta, como el conocimiento de los mecanismos básicos involucrados en la reproducción, el desarrollo de nueva tecnología apropiada y la transferencia a una industria que ha crecido en forma exponencial. Además, ampliará la capacidad de formar recursos humanos, favorecerá el reconocimiento de las actividades de investigación que se desarrollan en la Facultad de Ciencias Veterinarias, y la participación en los programas de financiamiento externos a la Universidad, optimizando la utilización de equipos e infraestructura física. Resulta evidente que, si bien existe en la Facultad de Ciencias Veterinarias y en la Universidad de Buenos Aires una considerable actividad tanto en lo referente a la formación de recursos humanos como a la investigación básica y aplicada en el área de la Re-

producción Animal, es imprescindible lograr una mayor organicidad en la formación científica en ciencias de la reproducción y una integración entre los grupos de investigación ya existentes y de aquellos que comiencen a incurrir en estas áreas temáticas de la ciencia.

Sobre la base de los antecedentes mencionados, y de acuerdo con el cuadro de situación que se planteó, el Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Veterinarias con fecha 24 de abril de 2007 y por Resolución (CD) N° 808/07 y a posteriori de la evaluación por investigadores externos, el Consejo Superior de la Universidad de Buenos Aires por Resolución (CS) 3411/07, aprobó la creación del «Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal» (INITRA). La creación del INITRA llevó implícito la necesidad de apoyarse en ciertos pilares que se constituyeron en los objetivos del mismo:

- Promover la investigación científica y tecnológica relacionada con la reproducción animal, optimizar recursos y lograr una integración efectiva de las diferentes líneas de trabajo, en pos de un objetivo común: el mejoramiento de los estándares reproductivos a través de la generación de conocimiento de impacto nacional e internacional.
- Formar recursos humanos de excelencia académica, científica y tecnológica. Esta formación no sólo atañe a la investigación sino también a la docencia, promoviendo la capacitación en el marco de cursos y carreras de postgrado que el Instituto produzca.
- Generar conocimientos transferibles a través del asesoramiento técnico a la sociedad mediante la conformación de servicios y la producción de tecnologías de avanzada que impliquen mejoras de interés zootécnico.

Conferencias Plenarias

- Betteridge, Keith; *Department of Biomedical Sciences. Ontario Veterinary College. University of Guelph. Canada*, especialista en el área de Reproducción Aplicada. 115
- Sirard, Marc-André; *Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction. Université Laval* Tema: “*Embryo quality begins in the follicle*”, especialista en el área de Biotecnología de la Reproducción. 117
- Thompson, Jeremy; *Research Center for Reproductive Health. University of Adelaide. Australia*. Tema: “*Determinations of oocyte developmental competence*”, especialista en el área de Biología Reproductiva. 118

The establishment, maintenance, and loss of early pregnancy: Lessons from the mare

BETTERIDGE, KEITH, J.¹

The reasons for regarding the first month of pregnancy as being of especial importance in domestic animal reproduction all hinge on the concept that the embryo, from the beginning, participates in a dialogue with its mother and in the establishment of an environment in which its gestation can continue. This concept underlies our understanding of how pregnancies are maintained or fail, and rationalizes the idea that the uterine environment influences development with effects that extend into fetal, postnatal and adult life and even into subsequent generations. The horse has played a major role in the development of the concept over the past 50 years and so this lecture will begin with a summary of how equine reproduction has contributed to today's acceptance of the fact that embryos 'talk' and 'listen'.

Understanding the dialogue between mother and embryo requires knowledge of the roles of both partners in the exchange. The balance of the lecture will therefore summarize what we know – and, at least as important, what we do not know – about the partnership during the first month of pregnancy, focusing on the mare and her conceptus but drawing comparisons with other domestic species as appropriate. The choice of this relatively short period has been influenced by the author's own research interests and, more objectively, by the fact that it covers: (1) the interval when embryo transfer is possible; (2) the time of most embryonic

loss; (3) a period of interesting contrasts between reproduction in horses and other domestic species; (4) the days at the heart of the "developmental origins of health and disease" concept that is so important to human and veterinary medicine. With these reasons in mind, interactions between the equine embryo and its environment over the first month of pregnancy will be discussed chronologically, starting from the time of ovulation and progressing through six phases.

Phase 1 will extend from Day 0 (the time of ovulation) to Day 6 to include the oocyte and early cleavage-stage embryos, still in the oviduct. Discussion will include: rates of fertilization and of cleavage; the polarity of the equine oocyte and early embryo; the coats that are deposited on the outside of the zona pellucida; the way in which the inner cell mass begins to become segregated; and the remarkable phenomenon of transit of equine embryos through the oviduct while unfertilized oocytes are retained there.

Phase 2, Days 6 to 8, is from the time the blastocyst or morula enters the uterus up until completion of the yolk sac. The formation of the equine embryonic capsule and loss of the zona pellucida will be described, and the importance of energy metabolism in the embryo will be introduced.

Major features of Phase 3 (Days 8 to 17) are completion of the yolk sac, and the pronounced mobility and rapid expansion of

¹Department of Biomedical Sciences, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario, N1G 2W1, Canada

the conceptus. The spherical equine conceptus contrasts markedly with its filamentous counterparts in pigs and ruminants at this stage and considerable attention will be paid to experimental studies of how the equine conceptus expands, and how these may relate to the difficulty of cryopreserving embryos once they start to expand. The proteins and steroid hormones inside and outside the conceptus will be considered in relation to their possible signaling function in the mare-conceptus dialogue.

Immobilization ('fixation') and orientation of the conceptus at the site of future placentation at about Day 16 or 17 will be considered Phase 4. The relatively acute changes that are associated with fixation include: modifications of the chemical structure of the capsule; changes in protein profiles in its environment; and local effects on the vascularity of the endometrium. Each will be discussed.

Phase 5, loss of the capsule at about Day 21, will be discussed briefly (because we know little about the factors involved) in relation to current experimental studies.

Phase 6, the time of establishment of cell-to-cell contact with the endometrium (Days 21 to 28) following loss of the capsule is when

the embryo proper comes into its own, with a completed amnion, emerging allantois, rapidly developing circulatory system and recognizable body form. It will be argued that the horse offers several advantages over the other domestic species as a model in which to study this early organogenesis and its possible disruption by environmental factors.

The lecture will conclude with an acknowledgement of how the potential for advancing our knowledge of reproduction in horses has increased immeasurably with the sequencing of the equine genome, and how molecular biology, genomics and proteomics have revolutionized the ways in which age-old questions can now be answered. Fortunately though, there is still room for good observational studies upon which to base modern experimental approaches to answering the myriad questions raised by observations in horses.

Reference:

Betteridge KJ. 2007. Equine embryology: an inventory of unanswered questions. *Theriogenology* 68 Suppl 1:S9-S21.

Embryo quality begins in the follicle

SIRARD, MARC-ANDRE¹

The potential of the embryo to become a viable blastocyst depends on the quality of the oocyte. The oocyte and the follicle are, in the female mammal, intimately linked from the early phases of gametogenesis. They form a duo in which the death of one component normally induces the death of the other. Until the oocyte reaches its full size, it is quite clear that the follicular cells provide substrate, as well as complementary proteins necessary for oocyte function. The competence of the fully-grown oocyte varies according to species. In the mouse, the ability to resume meiosis is reached around a diameter of 70 μm while the ability to be fertilized and normal development is only achieved when the oocyte reaches maximum size. In domestic animals, the acquisition of developmental competence is not necessarily achieved in full size oocytes. It seems that other differentiation events relating to the follicular development are required for the full developmental competence to be achieved. Recently, it was shown in ruminant that the oocyte's capacity to become an embryo could be pre-

programmed in the ovary. Indeed, when FSH treatment followed by a coasting period is applied to a cow before follicular aspiration, it is possible to harvest immature oocytes that will almost all become embryos. This hormonal treatment simply mimics the natural ovulatory process where FSH rises and then falls a few days before ovulation. Therefore to understand oocyte quality, the follicular physiology must be explored. The arrival of new tools like genomics and proteomics are believed to bring a clearer picture of the complexity and the dynamics of follicular differentiation. Using well defined animal models as the cow where oocyte competence can be manipulated, we can begin the complete dissection of the different phases of follicular differentiation involved in the production of a good egg. Data obtained so far indicate the importance of the final LH influence and the delicate regulation of its receptor in granulosa cells. We are confident that these new genomic tools will bring light into the embryo-oocyte-follicle functional relation.

¹Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction, Département de Sciences Animales, Université Laval, Ste-Foy Québec, Canada.

Determinations of oocyte developmental competence

THOMPSON, JEREMY¹

An understanding of factors that regulate oocyte developmental competence is critical for improving the safety and efficiency of in vitro maturation of immature oocytes, which is required for clinical application as well as improving domestic animal reproductive technologies. Our laboratory has a strong focus in determining such factors, and has recently described two models in which competence is significantly affected by treatment. The first treatment is the application of oocyte secreted factors (OSFs) during cumulus-oocyte complex (COC) maturation. OSFs are known to play important roles in establishing and maintaining the cumulus cell phenotype and viability. We believe that cumulus cell health and function is critical for successful maturation and found that exogenous treatment of maturing COCs with OSFs improves embryo production and quality, and even post-transfer viability. Our second

model involves a metabolic-mediated inhibition of oocyte developmental competence. This involves up-regulation of the Hexosamine Biosynthesis Pathway, the pathway required for hyaluronic acid synthesis, needed for cumulus matrix expansion. Overstimulation of this normally minor glucose metabolic pathway causes a reduction in developmental competence of oocytes to reach the blastocyst stage of development, but does not affect fertilization or early cleavage rates. Further analysis has revealed that the cumulus cells mediate this reduction in oocyte competence. These two different models reveal that conditions for in vitro maturation of oocytes remain poorly understood as to their influence on oocyte developmental competence. Improvement in oocyte viability and quality following in vitro maturation will only be achieved by further basic understanding of interactions between cumulus cells and the oocyte.

¹Research Center for Reproductive Health. University of Adelaide. Australia.

Simposios

- Aba, Marcelo, A.; *Área de Endocrinología, Dpto. Fisiopatología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNPCBa. Tema: "Endocrinología reproductiva en los camélidos sudamericanos domésticos"*. 121
- Bartolomé, Julián, A.; *Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, Argentina. Tema: "Estrategias para mejorar la fertilidad de la vaca lechera"*. 122
- Cetica, Pablo, D.; *Área Química Biológica, INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Tema: "El ácido hialurónico en la maduración, fertilización y desarrollo embrionario bovino"*. 123
- Menchaca, Alejo¹; Vilariño, María¹; Rubianes, Edgardo^{2,1}; *Instituto de Reproducción Animal Uruguay; ²Facultad de Agronomía, UdelaR, Montevideo, Uruguay. Tema: "Tecnologías reproductivas aplicadas en programas comerciales en ovejas y cabras"*..... 124
- Miceli, Dora, C.; *INSIBIO, CONICET, Universidad Nacional de Tucumán. Tema: "Proteasas Involucradas en la Función Oviductal"*. 125
- Miragaya, Marcelo, H.; *Área de Teriogenología, INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Tema: "Clonación Equina"*. 126
- Miranda, Leandro, A.; *Laboratorio de Ictiofisiología y Acuicultura. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas/Instituto Tecnológico de Chascomús (CONICET- UNSAM). Tema: "Desarrollo y evaluación de técnicas de criopreservación de espermatozoides en el pejerrey *Odontesthes Bonariensis*"*. 128
- Sestelo, Adrián, J.; *Fundación Bioandina Argentina. Tema: "Biotecnología reproductiva y bancos de recursos genéticos aplicados a la conservación de fauna silvestre"*. 129
- Vazquez-Levin Mónica, H.; *Instituto de Biología y Medicina Experimental IBYME, CONICET-UBA. Tema: "Estudios sobre la participación de Cadherina Epiteal en la formación del reservorio espermático oviductal y en la fecundación en bovinos"*. 130
- Wanke, Magdalena; *Área de Teriogenología, INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Tema: "Brucelosis canina, un dilema"*. 132

Endocrinología reproductiva en camélidos sudamericanos domésticos

ABA, MARCELO, ALFREDO

Por siglos los camélidos sudamericanos (llama, alpaca, guanaco y vicuña) han representado un importante recurso para el ser humano en la puna y otras regiones del país. El conocimiento actual sobre su biología, y su reproducción en particular, resulta escaso y fraccionado. Al mismo tiempo, la extrapolación directa de conocimientos originados en otras especies ha contribuido a innumerables fracasos a nivel productivo.

En los últimos años se han producido importantes aportes a la comprensión de la fisiología reproductiva de la especie. Su ovulación inducida por la cópula marca una importante diferencia con respecto al manejo de otras especies de interés productivo. Las hembras de camélidos no siguen ciclos estrales en el sentido usualmente aceptado en otras especies. En ausencia de macho, la actividad ovárica ocurre en ondas de crecimiento y regresión folicular. Si no son servidas, pueden permanecer en celo por periodos de hasta 35 - 40 días. También resulta peculiar la corta sobrevivencia del cuerpo luteo en animales vacíos y el transitorio descenso y posterior restablecimiento de

las concentraciones plasmáticas de progesterona a partir de los días 8 - 10 post-servicio en llamas y alpacas preñadas, en asociación con intensa liberación de PGF₂_. La señal responsable del RMP (cualquiera sea su naturaleza) debe aparecer extremadamente temprano a fin de evitar la luteolisis.

Sorprendentemente, casi el 100% de las preñeces ocurren en el cuerno uterino izquierdo. Desde el punto de vista productivo, Las elevadas tasas de mortalidad embrionaria y la baja eficiencia reproductiva condicionan la eficiencia y rentabilidad de los sistemas, es particular en su hábitat natural. Estas y muchas otras particularidades determinan la necesidad de profundizar en el conocimiento de la fisiología reproductiva de la especie. Así, al avanzar en su comprensión se podrá mejorar el manejo reproductivo y consecuentemente su eficiencia. Al mismo tiempo se irán sentando las bases para la implementación a campo de tecnologías que hoy se practican principalmente en forma experimental, como la Inseminación Artificial, la Transferencia de Embriones y otras.

Estrategias para mejorar la fertilidad de la vaca lechera

BARTOLOME, JULIAN, A.

La fertilidad de la vaca lechera ha disminuido debido al aumento de la producción individual y a los sistemas de manejo intensivo. La fertilidad esta determinada por los siguientes aspectos: 1) salud del tracto genital al primer servicio, 2) detección de celo, 3) concepción, 4) mortalidad embrionaria/aborto y 5) rechazos reproductivos. Sería conveniente que vacas primíparas recibieran el primer servicio 15 a 20 días más tarde que vacas múltiparas para aumentar la fertilidad. Algunos factores que dificultan la expresión y detección de celo son los bajos niveles de esteroides, el manejo intensivo, el anestro nutricional y los quistes ováricos. El uso de sistemas de ordeño rotativos, la IATF, y los tratamientos con progesterona y GnRH son soluciones a estos problemas. El protocolo Ovsynch generó los mismos porcentajes de preñez en vacas quísticas que en vacas normales (23.6 vs. 31.5%; n=209). La resincronización de los retornos iniciando el protocolo

Ovsynch 7 días previo al diagnóstico por ecografía generó tasas aceptables de concepción (35%; n=958). Un factor que afecta la tasa de concepción es la ovulación de folículos persistentes. Vacas inseminadas 3 y 4 días luego de la aplicación de PGF2 α tuvieron mayor concepción (49.2 y 43%) que vacas inseminadas antes (38.7%) o después (28.9%; n=443). Para esto, la aplicación de GnRH 7 días previos a la dosis de PGF2 α sincroniza la onda folicular y aumenta la concepción. Las pérdidas de gestación entre los días 29 y 45 fueron del 14% (n=171) y fueron más bajas en vacas tratadas con eCG y hCG durante el período embrionario. En conclusión, y sobre la base de un programa de salud de rodeo que asegure vacas sanas al final del período de espera voluntario y minimize los rechazos reproductivos, el control farmacológico del ciclo estral y del período embrionario permitiría aumentar la fertilidad de las vacas lecheras.

El ácido hialurónico en la maduración, fertilización y desarrollo embrionario bovino

CETICA, PABLO, D.

Durante la maduración del complejo ovocito-cumulus (COC) se produce la expansión del cumulus debido a la deposición de compuestos mucoelásticos, especialmente ácido hialurónico. Las células del cumulus sintetizan este glicosaminoglicano a partir de la glucosa del medio a través de la vía de las hexosaminas. Hay datos controvertidos en cuanto al papel que desempeña el ácido hialurónico en las etapas del proceso de fecundación en las diferentes especies. Se analizó el efecto de la inhibición de la síntesis de ácido hialurónico en eventos relacionados con la maduración, fertilización y subsiguiente desarrollo embrionario en el bovino. Se probaron dos inhibidores del sistema enzimático involucrado en la síntesis de ácido hialurónico, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON) y uridina monofosfato (UMP), durante la maduración de los COCs in vitro. Se determinó que la inhibición de la síntesis de este glicosamino-

glicano no tiene efecto observable sobre la maduración meiótica del ovocito y la capacidad de replicación de las células del cumulus, sin embargo se afectó la tasa de fertilización y por consiguiente la de desarrollo embrionario. La reversión de estos efectos observada por la suplementación del medio de fertilización con ácido hialurónico exógeno o con heparina, demostró su implicancia en el encuentro de los gametos. Posteriormente se comprobó que el ácido hialurónico fue capaz de inducir la capacitación y la reacción acrosomal. La síntesis de ácido hialurónico no estaría involucrada en la maduración del ovocito ni en su competencia de desarrollo embrionario, sino en eventos relacionados con la fertilización. En bovinos, el ácido hialurónico exógeno puede reemplazar a la heparina en las técnicas de fertilización in vitro y también ser utilizado como inductor fisiológico de la capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide.

Tecnologías reproductivas aplicadas en programas comerciales en ovejas y cabras

MENCHACA, A.¹; VILARIÑO, M.¹; RUBIANES, E.²

Las tecnologías de reproducción asistida permiten acelerar el progreso genético incrementando el diferencial de selección, reduciendo el intervalo generacional o incluso modificando directamente el genoma animal. Las técnicas desarrolladas en ovinos y caprinos son la sincronización del estro e inseminación artificial, la superovulación y transferencia de embriones, el ovum pick-up y la producción de embriones in vitro, el sexado de semen, la clonación y la transgénesis. Estas tecnologías han sido aplicadas con una tasa de adopción muy variable. La sincronización del estro y la inseminación artificial representan las dos tecnologías más utilizadas a nivel mundial. Los últimos avances en esta área han permitido el control de la dinámica folicular y la ovulación mediante los Tratamientos Cortos con progesterona (5-6 días) resultando en altas tasas de preñez sin necesidad de detectar el estro (inseminación artificial a tiempo fijo: IATF). La tasa de preñez con IATF por vía cervical supera el 60-70% en caprinos siendo algo menor en ovinos, no obstante la inseminación intrauterina por laparoscopia permite incrementar aun más estos resultados superando el

70% con semen fresco y el 50-60% con semen congelado. La superovulación y transferencia de embriones permite multiplicar la producción de individuos superiores a partir de un núcleo reducido de reproductores en un periodo corto de tiempo. Sin embargo esta tecnología presenta como principal limitante la gran variabilidad en la respuesta superovulatoria. Recientemente se ha desarrollado un nuevo tratamiento para iniciar la superovulación en ausencia de un folículo dominante durante la primera onda folicular (Protocolo Día 0) lo que ha resultado en una mejor respuesta ovulatoria y embrionaria. Por su parte, la ovum pick-up por laparoscopia (LOPU) asociada a la producción de embriones in vitro resulta en una alternativa menos traumática e invasiva que la TE tradicional y a la vez permite obtener una mayor descendencia por hembra. Al mismo tiempo, estas tecnologías favorecen el desarrollo y aplicación de técnicas más recientes como el sexado de semen, la transgénesis y clonación. Estas últimas si bien no son aplicadas en sistemas de producción de lana, carne o leche, las mismas resultan de gran interés para la industria farmacéutica y las ciencias biomédicas.

¹Instituto de Reproducción Animal Uruguay; ²Facultad de Agronomía, UdelaR, Montevideo, URUGUAY.

Proteasas involucradas en la función oviducal

MICELI, DORA, C.

Aunque se reconoce que el oviducto provee de un medio único que nutre al embrión temprano e influencia su desarrollo futuro, la formulación de un microambiente similar in vitro no permitió aún conseguir alta eficiencia de desarrollo embrionario normal. El desarrollo preimplantacional que ocurre mientras el embrión atraviesa el oviducto, es una etapa crítica en la que ocurre la reprogramación de la expresión génica que prepara al embrión para los períodos posteriores en que alcanza su completo desarrollo. No se conoce exactamente cómo se regula el desarrollo embrionario temprano pero se ha postulado un tipo de regulación paracrina por acción de moléculas oviducal (influencia materna) y una autócrina por moléculas generadas por el propio embrión. En esta conferencia se analizarán las funciones de moléculas sintetizadas por el oviducto de anfibios y de mamíferos elegidos como modelos biológicos. Se discutirá la función de moléculas que presentan o que regulan actividades proteolíticas que nos permiten postular nuevos mecanismos de acción en el oviducto. En los anfibios las secreciones oviducal contienen una proteasa, la oviductina, que presenta una es-

tructura molecular con dominios de función desconocida y que a pesar de actuar sobre la matriz extracelular (MEC) de los ovocitos, es diferente a las metaloproteasas. En los mamíferos se analizará el posible mecanismo de acción del sistema Plasminógeno /plasmina y de Factores de Crecimiento Transformante (TGF), particularmente del gen *lefty2/ebaf*, que se expresa diferencialmente en el oviducto de ratas preñadas, los que a través de la regulación de la actividad de las metaloproteasas estarían participando en la remodelación de la MEC del oviducto y de los embriones preimplantacionales. Ya que actualmente se considera que los factores de crecimiento expresados en el tracto reproductor femenino son los candidatos más idóneos para incluir en los medios de cultivo a fin de mejorar el desarrollo embrionario in vitro, se discutirá un concepto emergente que sugieren que algunos componentes del medio oviducal tienen funciones solapadas, las que colectivamente proveen un sistema de autoprotección a fin de asegurar que acontecimientos esenciales para la perpetuación de las especies no dependan de una molécula en particular.

Clonación equina

MIRAGAYA, MARCELO, H.

El equino es una especie con determinadas particularidades a nivel reproductivo que lo hacen muy diferente a las otras especies estudiadas. Por este motivo no se han logrado resultados exitosos al utilizar ciertas técnicas de reproducción asistida como por ejemplo la fertilización in vitro. Estas dificultades se manifiestan al utilizar las técnicas de transferencia nuclear con células provenientes de animales adultos. Son pocos los casos de equinos nacidos por clonación y fueron reportados por primera vez, tres mulas nacidas en la Universidad de Idaho, EEUU en 2003, y en 2005 en Italia nace la primera yegua la que luego produjo en 2008 una cría viva normal. El objetivo de utilizar estas técnicas complejas y de baja eficiencia se fundamenta en la necesidad de reproducir ejemplares con características fenotípicas, de desempeño deportivo o de progenie especiales de interés para sus propietarios. Nuestro país es mundialmente reconocido por la cría caballar y en particular por la producción de los mejores caballos jugadores de polo. La entidad que agrupa la crianza posee un registro abierto donde se aceptan todo tipo de técnicas reproductivas. La transferencia embrionaria es la técnica más utilizada y produjo esta última temporada alrededor de 4.500 preñeces. Muchos de estos animales de elite son de edad avanzada, yeguas que ya no producen embriones transferibles o incluso machos castrados que perdie-

ron la capacidad de reproducirse. Es aquí donde la técnica de transferencia nuclear puede dar lugar al nacimiento de un animal que pueda transmitir el potencial genético a una futura descendencia.

El objetivo fue producir crías vivas por esta técnica con un grupo de trabajo interdisciplinario compuesto por el Laboratorio de Reproducción Equina de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto, el Área de Teriogenología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires y Halitus Biotecnología SA.

Los ovocitos (n=2237) fueron recuperados de ovarios provenientes de matadero dentro de las dos horas pos faena. Fueron incubados en medio TCM 199 suplementado y enviados en estufa de cultivo transportable a 38°C desde Río Cuarto, 1190 ovocitos viables fueron cultivados durante 16 a 18 hs para su maduración. Los complejos fueron denuclados y los que presentaban cuerpo polar (n=712), fueron enucleados por micromanipulación. Un fibroblasto de cultivo proveniente de la yegua donante fue colocado en cada uno de los ovocitos enucleados. La fusión se realizó con dos pulsos DC de 2,2 Kv/cm 30 μ seg. Luego fueron activados con Ionomicina (5 μ M) por 4 minutos seguidos de 4 horas en cultivo con 6-DMAP (2nM) y cicloheximida (5mg/ml) en medio SOFaas. Los

embriones reconstruidos fueron cultivados durante 7-8 días en SOFa a 38,5°C con 5% de CO₂ y 5% de O₂. Se produjeron 23 blastocistos y se realizaron 8 transferencias a yeguas receptoras las cuales fueron previamente tratadas con estrógenos y progesterona de larga acción (P4 LA Biorelease, BET Pharm, Lexington, KY,USA) dado que las transferencias se hicieron durante la temporada no reproductiva (yeguas anovulatorias). Se pro-

dujeron 4 preñeces, 3 resultaron en pérdidas embrionarias y una gestación en curso de diez meses, esperando el parto en julio de 2008. Esta es la primera gestación equina avanzada reportada en America latina.

Si bien la eficiencia general de la técnica es muy baja es factible obtener preñeces y potencialmente volver a reproducir animales de gran valor que por su edad avanzada no se los puede utilizar en la reproducción.

Desarrollo y evaluación de técnicas de criopreservación de esperma en el pejerrey *Odontesthes Bonariensis*

MIRANDA, LEANDRO, A.

El pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*) se ha convertido en un pez emblemático y muy apreciado en la mayoría de las pesquerías de aguas continentales de nuestro país. En los últimos años se han incrementado tanto los estudios básicos como los aplicados debido el interés que ha generado su cultivo. Con el fin de hacer más eficiente la reproducción artificial del pejerrey, se han desarrollado e implementado técnicas de criopreservación de esperma para esta especie. En ese sentido, se desarrollaron diluyentes para semen de pejerrey, determinándose que debían contener Na⁺, azúcares (sacarosa o trehalosa), poseer una osmolaridad entre 400-450 mOsm/Kg y un pH de 8. Se congelaron muestras de esperma (obtenidas por masaje abdominal) diluidas y combinadas con distintos crioprotectores (DMSO, metanol y etilenglicol) utilizando diversos métodos de

congelamiento que incluían al hielo seco (-79 °C), freezer (-80 °C) o N₂ líquido (-196,8 °C). Se determinó también el tiempo óptimo de descongelamiento y la temperatura adecuada para muestras conservadas en crioviales de 1ml (35 °C x 50 segundos) o en pajuelas de 0,250 ml (35 °C x 10 segundos). Los resultados han demostrado que es factible criopreservar esperma de pejerrey con los métodos utilizados, siendo el más eficaz (mayor motilidad espermática postcongelamiento y mayor porcentaje de fecundidad) el congelamiento lento en vapores de N₂ líquido (12 minutos a 6 cm de la superficie del N₂ líquido). Por otra parte el DMSO al 10 % resultó ser el mejor crioprotector para congelar semen de pejerrey. Cabe destacar que los métodos de congelamiento en hielo seco y en freezer a -80°C si bien son menos eficaces resultaron ser los más económicos y sencillos.

Biotecnología reproductiva y bancos de recursos Genéticos aplicados a la conservación de fauna silvestre

SESTELO, ADRIAN, J.

En la actualidad vivimos un proceso de extinción sin precedentes. Esta es una evidencia del deterioro ambiental que sufre el planeta, causado principalmente por el mal aprovechamiento de los recursos naturales. La fragmentación de los ambientes lleva al aislamiento de las poblaciones naturales, las que se ven reducidas en pequeñas unidades, proceso que lleva a la consanguinidad y con ello a la pérdida de variabilidad genética. Este proceso se puede ver revertido fácilmente con la incorporación de nueva genética, es por ello que las biotecnologías reproductivas se convierten en una herramienta novedosa e importante para el manejo futuro de poblaciones silvestres, tanto cautivas como de vida libre.

De todas formas, para que su aplicación sea efectiva es necesario tener un adecuado conocimiento de la fisiología reproductiva de la especie. Además de ello, es necesario maximizar los esfuerzos insumidos en la mantención de biodiversidad, es así que la generación de Bancos de Recursos Genéticos (BRG) criopreservados se convierte en una alternativa viable en la que se optimiza la disponibilidad de espacio y se man-

tiene una alta representación de la diversidad genética de cada especie.

Si bien, dentro de las estrategias de conservación, la protección del hábitat es sin duda prioritaria, hay ocasiones en las que se recomienda el empleo de estrategias complementarias ya que resulta imposible detener las causas que están provocando el declive de las poblaciones en su hábitat, y las mismas se han reducido por debajo de lo que se considera una población viable.

Las ventajas de asistir a la reproducción de las especies silvestres resultan evidentes cuando pensamos que así es posible superar barreras físicas, de comportamiento, de aislamiento geográfico, etc. que imposibilitan la reproducción entre organismos de una misma especie. Sin embargo es importante reconocer que más allá de cualquier esfuerzo que realicemos en materia de conservación, el uso desmedido de los recursos naturales ha llegado a límites insospechados, es por ello que, en definitiva, necesitamos un cambio cultural, modificar nuestra relación con la naturaleza y así brindar una oportunidad para la continuidad de la vida en la tierra. De nosotros depende.

Estudios sobre la participación de cadherina epitelial en la formación del reservorio espermático oviductal y en la fecundación en bovinos

VAZQUEZ-LEVIN MONICA, H.

Los estudios presentados fueron realizados en colaboración con los Dres Pablo Cética y Gabriel Dalvit (Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA) y la Dra Silvina Pérez Martínez (Facultad de Medicina, UBA), y forman parte de la tesis doctoral de la Med. Vet. Julieta Caballero desarrollada bajo mi dirección y la co-dirección del Dr. Cética.

La Cadherina epitelial (cadE) es una glicoproteína de transmembrana que interviene en la adhesión celular de manera dependiente del ión calcio, uniéndose por sus dominios extracelulares preferentemente a otras moléculas de cadE en células adyacentes. En mamíferos, el transporte espermático en el tracto de la hembra y la interacción de las gametas involucra eventos de adhesión no dilucidados a nivel molecular. Nos propusimos caracterizar la expresión de cadE en tejidos del tracto reproductor y en las gametas, y evaluar su participación en la interacción del espermatozoide con las células epiteliales oviductales (CEO) y con estructuras del complejo ovocito cumulus oophorus (COC). Utilizamos el modelo bovino para llevar a cabo un conjunto de estudios, cuyos resultados se resumen a continuación: CadE fue inmunolocalizada 1) en células epiteliales de secciones de tejido oviductal y en las CEO en cultivo, 2) en las células del cumulus y en sus proyecciones en la zona

pellucida (ZP), y en el oolema ovocitario, 3) en el capuchón acrosomal y reborde apical de espermatozoides (del eyaculado o previamente congelados) no capacitados con acrosomas intactos, 4) en el reborde apical de espermatozoides con acrosomas intactos y capacitados in vitro en un medio definido, y 5) en estructuras que corresponderían a la membrana acrosomal interna y al segmento ecuatorial de espermatozoides reaccionados con lisofosfatidilcolina. En los estudios de interacción con las CEO se determinó que los espermatozoides unidos a las células y los liberados del co-cultivo por agregado de heparina presentaban la misma localización de cadE que la encontrada en espermatozoides no capacitados y capacitados in vitro en medio definido. La preincubación de los espermatozoides con anticuerpos anti cadE condujo a una disminución significativa ($p < 0,001$) del número de espermatozoides unidos a las CEO in vitro. En los ensayos de interacción de gametas se determinó que la preincubación de espermatozoides con anticuerpos anti cadE inhibió significativamente ($p < 0,05$) su capacidad de fecundar los ovocitos in vitro, utilizando tanto ovocitos desnudos como COCs; asimismo, el anticuerpo anti cadE produjo una inhibición significativa ($p < 0,05$) de la interacción espermática con la ZP y con el oolema, en ensayos específicos. Los estudios presentados des-

criben, por primera vez en el modelo bovino, la presencia de cadE en espermatozoides, estructuras del COC y en células oviductales, y

sugieren la participación de esta proteína en la adhesión celular durante la formación/disociación del reservorio oviductal y la fecundación.

Brucelosis canina, un dilema

WANKE, MAGDALENA

Son pocas las enfermedades en medicina veterinaria capaces de producir tanto desconcierto entre los propietarios de los perros y entre los mismos veterinarios como la brucelosis canina. Varios son los factores que conllevan a esta situación:

1. Muchos animales afectados no tienen síntomas de infección.
2. No hay un método diagnóstico que otorgue una seguridad total de que un perro no está infectado.
3. Hay tratamientos que son efectivos en algunos casos pero no hay ninguno que lo sea en un 100% de ellos.
4. Las implicancias que tiene la aparición de la enfermedad en un criadero son tan severas que constituyen en la mayor parte de los casos una real tragedia para el criador involucrado.

Si combinamos estos cuatro factores, nos damos cuenta de que la mayoría de las veces la aparición de esta enfermedad en perros de importancia reproductiva nos lleva a laberintos intrincados de los cuales es imposible salir. La infección se puede adquirir a través de las mucosas (conjuntival, digestiva, oral o genital) o por vía transplacentaria y afecta a cánidos y

ocasionalmente a humanos. Los principales síntomas son el aborto, mortalidad perinatal e infertilidad en las hembras, epididimitis, orquitis, prostatitis e infertilidad en los machos, y discospondilitis, y uveítis en ambos sexos, además de linfadenopatías y ocasionalmente fiebre y síntomas generales. El diagnóstico puede hacerse por técnicas de aglutinación, ELISA e inmunodifusión, y cada uno de ellos puede utilizar diferentes tipos de antígenos (de membrana, citoplasmáticos, proteínas específicas). A medida que la sensibilidad de las pruebas aumenta, disminuye su especificidad y los ejemplares con una respuesta inmune leve, suelen quedar con un diagnóstico incierto, salvo que la enfermedad se confirme por bacteriología. Se han analizado las incidencias por edad, sexo y raza de los 1155 sueros analizados, provenientes de 731 perros diferentes de los cuales se sospechó brucelosis, sea por síntomas o por ser contacto de animales enfermos. También se han realizado varios relevamientos poblacionales, resultando una tasa de infección baja 0, 0,34 y 0,79 % en las tres encuestas realizadas que comprendieron 219, 316 y 884 muestras respectivamente.

Resúmenes de pósters

- Alonso, A.; Herrera, C.; Révora, M.; Baca Castex, C.; Lossino, L.; Miragaya, M.:
Inyección intracitoplasmática de ovocitos equinos con semen desecado en presencia o ausencia de extracto espermático. Resultados preliminares. 139
- Alvarez, G.M.; Tellado, M.N.; Dalvit, G.C.; Miguez, M.S.; Cetica, P.D.:
Especies reactivas del oxígeno en la maduración de ovocitos porcinos in vitro. 140
- Amaral, J.I.; Scheid Filho, V.B.; Schiavon, R.S.; Gastal, G.D.A.; Lucía Jr. T.:
Lambing rates after estrus synchronization with previously used intravaginal devices. 141
- Andere, C.; Capel, A.M.; Palacio, M.A.; Catena, M.; Martinez, A.;
Rodriguez, E.M.; Collins, A.: *Evaluación de calidad seminal de zánganos de Apis mellifera para su uso en inseminación instrumental.* 142
- Andere, C.; Capel, A.M.; Palacio, M.A.; Catena, M.; Martínez, A.; Rodríguez, E.M.;
Collins, A.: *Avances en criopreservación de semen de zánganos de Apis mellifera.* 143
- Apichela, S.A.; Jiménez-Díaz, M.A.; Valz-Gianinet, J.; Roldán-Olarte, E.M.;
Miceli, D.C.: *Residuos de N acetil galactosamina y galactosa participan en la formación de reservorios espermáticos en el oviducto de llama.* 144
- Bevacqua, R.; Pereyra-Bonnet, F.; Salamone, D.: *Efecto de distintos protocolos de activación sobre la transgénesis mediada por icsi en bovinos.* 145
- Borelli, V.; González, M.A.; Acosta Sosa, M.A.: *Efecto de la edad y raza sobre las características reproductivas en verracos.* 146
- Breininger, E.; Beorlegui, N.B.; Beconi, M.T.: *Participación de especies reactivas del oxígeno en la reacción acrosomal de espermatozoides porcinos criopreservados.* 147
- Caballero, J.N.; Cetica, P.D.; Dalvit, G.C.; Vázquez-Levin; M.H.: *Participación de cadherina epitelial en la interacción de gametas en el modelo bovino.* 148
- Carballo, E.; Mareco, G.; Ornstein, A.M.; Paramidani, E.: *Dos tratamientos para sincronizar celo en ovinos: progestágenos versus progesterona natural.* 149

Carretero, M.I.; Giuliano, S.; Casaretto, C.; Gambarotta, M.; Neild, D.: <i>Influencia de la estación del año sobre el ADN de espermatozoides de llama.</i>	150
Casaretto, C.; Giuliano, S.; Carretero I.; Lombardo, D.; Miragaya, M.H.: <i>Evaluación del eyaculado de Lama glama: morfometría de cabeza del espermatozoide. Resultados preliminares.</i>	151
Casaretto, C.; Martínez Sarrasague, M.; Giuliano, S.; Rubin De Celis, E.; Carretero, I.; Miragaya, M.H.: <i>Pruebas de correlación entre la viscosidad del eyaculado y variables espermáticas en la especie Lama glama.</i>	152
Castañeira, C.; Alonso, C.; Vollenweider, A.; Losinno, L.: <i>Pérdida embrionaria y categoría endometrial en yeguas receptoras de embriones.</i>	153
Castañeira, C.; Aguilar, J.; Vollenweider, A.; Losinno, L.: <i>Utilización de gonadotrofina menopáusica humana (hMG) para la estimulación ovárica en yeguas donantes de embriones.</i>	154
Cavilla, V.; Bianchi C.; Aba, M.A.: <i>Concentraciones de estrógenos en plasma post inyección de dos ésteres de estradiol en llamas.</i>	155
Colombo, M.; De Villafañe, P.; Cledou, G.; Bartolome, J.A.: <i>Administración de progesterona y estradiol previo al servicio natural en vaquillonas prepúberes.</i>	156
Corcini, C.D.; Pigozzo, R.; Rambo, G.; Varela Junior, A.S.; Rempel, F.J.K.; Leon, P.M.M.; Calderam, K.; Deschamps, J.C.; Lucia, T. Jr.: <i>Association between the presence of seminal plasma proteins and acrosome integrity of frozen swine spermatozoa.</i>	157
Corcini, C.D.; Pigozzo, R.; Rambo, G.; Varela Junior, A.S.; Santos, E.C.S.; Goularte, K.L.; Calderam, K.; Deschamps, J.C.; Lucia, T. Jr.: <i>Association between the presence of a 100 kda protein factor in the seminal plasma and membrane integrity of frozen swine spermatozoa.</i>	158
Córdoba, M.; Pintos, L.N.; Beconi, M.T.: <i>Creatina quinasa y aminotransferasas están involucradas en la reacción acrosomal inducida por la progesterona en el espermatozoide bovino criopreservado.</i>	159
Córdoba, M.; Cetica, P.D.; Gachen, G.; Quse, V.; Merani, M.S.: <i>Análisis morfofuncional de los espermatozoides de Zaedyus pichiy (Dasypodidae, Xenarthra, Mammalia).</i>	160
Cruzans, P.R.; Carou, M.C.; Revilla, M.; Lombardo, D.M.: <i>Regulación de la apoptosis sobre una línea establecida de células de granulosa bovina (BGC-1) con un análogo de GnRH (acetato de leuprolide) y un antagonista (antide).</i>	161
Cuatrin, J.; Pando, V.; Lueso, N.; Catanzariti, M.J.: <i>Inducción de celo en cabras lecheras.</i>	162

Cueto, M.; Gibbons, A.: <i>Fertilidad en ovinos mediante sincronización de estros con cloprostenol e inseminación artificial.</i>	163
De Martino, E.; Polleri, P.; Astore, V.; Jacome, N.L.: <i>Asistencia a la reproducción del cóndor andino (Vultur gryphus): incubación artificial.</i>	164
Egey, J.; Carretero, M.I.; Trasorras, V.,L.; Chaves, M.,G.; Capdevielle, E.F.; Agüero, A.: <i>Recuperación embrionaria continua sin tratamiento superestimulador en llamas (Lama glama)</i>	165
Felipe, A.E.; Aba, M.; Lombardo, D.M.: <i>Desarrollo folicular prenatal en Myocastor coypus bonariensis (coipo).</i>	166
Ferrero, M.; Jiménez-Díaz, M.; Roldán-Olarte, M.; Palma, G.; Miceli, D.: <i>Efecto del sistema de activación del plasminógeno durante la MIV de ovocitos bovinos.</i>	167
Finger, P.F.; Siedler, B.S.; Munhoz, L.S.; Caetano, C.F.; Vilela, C.O.; Ferreira, L.N.; Fischer, G.; Vargas, G.; Vidor, T.; Hübner, S.O.: <i>La prevalencia de anticuerpos para el virus de la diarrea viral bovina (VBVD) en rebaños bovinos de la provincia de Río Grande do Sul (Brasil) en el período de 2003 a 2008.</i>	168
García Guerra, A.; Etcheverry, M.P.; Larraburu, G.; Brogliatti, G.M.: <i>Efecto de la exposición de semen congelado al ambiente por distintos tiempos evaluado mediante el sistema casa.</i>	169
Gastal, G.D.A.; Tonieto, R.A.; Goularte, K.L.; Schiavon, R.S.; Lucía, T. Jr.: <i>Use of low-density lipoprotein as non-penetrating cryoprotectant in extenders for ovine frozen semen.</i>	170
Gervasi, M.G.; Pérez Martínez, S.: <i>La anandamida capacita a los espermatozoides bovinos posiblemente a través de la vía de acción de la heparina.</i>	171
Gibbons, A.; Pereyra Bonnet, F.; Silvestre, P.; Cueto, M.: <i>Vitrificación de embriones ovinos en tips.</i>	172
González, L.; Campi, S.; Blasi, C. García, C.; Cisale, H.: <i>Análisis comparativo entre tres técnicas de evaluación de integridad y funcionalidad de membrana en espermatozoides de cerdo.</i>	173
González, L.; Campi, S.; Cisale, H.; Torres, P.; García, C.; Ferrari, M.: <i>Decondensación in vitro de núcleos espermáticos porcinos.</i>	174
Goularte, K.L.; Schiavon, R.S.; Corcini, C.D.; Schuch, R.; Zanella, E.L.; Lucía, T. Jr.: <i>Pregnancy in ewes after transcervical artificial insemination with semen frozen in extender including trehalose as cryoprotectant.</i>	175
Gutnisky, C.; Pintos, L.N.; Dalvit, G.C.; Beconi, M.T.; Cetica, P.D.: <i>Control de la vía glucolítica durante la maduración de COCs bovinos in vitro.</i>	176

Hozbor, F.; Campisano, S.; Bled, L.; Cano, A.; Sánchez, E.; Alberio, R.: <i>Variabilidad estacional de la calidad seminal en dos razas de conejos.</i>	177
Iorio, G.; Bidone, M.; Ghirardi, P.; Veksler J.: <i>Recuperación de un pool de germoplasma para la formación de un núcleo genético de ovejas frisonas.</i>	178
Jarazo, J.; Gambini, A.; Olivera, R.; Bertola, M.E.; Salamone, D.: <i>Efecto del tiempo de maduración en el desarrollo de embriones equinos.</i>	179
León, P. M.M.; Corcini, C.D.; Santos, E.C.S.; Rambo, G.; Lucia, Jr.T.; Deschamps, J.C.: <i>Vitrification of immature equine oocytes in solid surface.</i>	180
Manes, J.; Fernandez, E.; Hozbor, F.; Aller, J.; Alberio, R.: <i>Concentración residual de acetato de medroxiprogesterona en dispositivos intravaginales utilizados para sincronizar el estro en bovinos.</i>	181
Marini, P.R.; Krupick, M.; Haumuller, J.P.; Charmandarian, A.R.: <i>Producción láctea, variables reproductivas y altura en vacas lecheras en su tercera lactancia.</i>	182
Milicich, H.; Moscuza, H.; Naum, M.: <i>Ocurrencia de patologías umbilicales de resolución quirúrgica en terneros en relación al tipo de parto.</i>	183
Miotti, M.D.; Mollerach, M.I.; Mangione, S.: <i>Ciclo reproductivo anual en machos de Artibeus planirostris (Chiroptera: Phyllostomidae) en el noroeste argentino.</i>	184
Olivera, R.; Pereyra-Bonnet, F.; Salamone, D.: <i>Producción in vitro de embriones porcinos transgénicos a partir de espermatozoides eyaculados y epididimarios.</i>	185
Pereyra-Bonnet, F.; Gibbons, A.; Cueto, M.; Moreno, D.; Comas, D.; Fernández-Martín, F.; Salamone, D.: <i>Transgenesis en ovinos usando espermatozoides como vectores.</i>	186
Perez Wallace, S.; De La Sota, R. L.; Vistarop, A.; Thatcher, W.W.; Bartolome, J.A.: <i>Efecto de un tratamiento combinado con eCG y hCG post IA sobre la tasa de concepción en vacas lecheras.</i>	187
Revilla, M.; Carou, M.C.; Lombardo, D.M.: <i>Rol de las caderinas calcio dependientes en la regulación de la apoptosis en una línea establecida de células de granulosa de ovario bovino (BGC-1).</i>	188
Ricart, M.C.; Breininger, E.; Rodríguez, P.C.; Beconi, M.T.: <i>Participación de adenilato ciclasa de membrana en la capacitación de espermatozoides bovinos criopreservados.</i>	189
Ríos, G.L.; Alvarez, A.; Mucci, N.M.; Kaiser, G.G.; Alberio, R.H.: <i>Efecto del ácido linoleico unido a albumina en el medio de maduración ovocitaria sobre la producción in vitro de embriones bovinos.</i>	190

Ritta, M.; Tartaglione, M.: <i>Respuesta del espermatozoide bovino al regulador de capacitación y reacción acrosomal: ácido g-aminobutírico (GABA)</i>	191
Sánchez, E.; Hozbor, F.; Faverin, C.: <i>Aplicación de progestágenos por seis días combinados con prostaglandina para la sincronización de celo en ovejas en estación reproductiva</i>	192
Santos, E.C.S.; Leon, P.M.M.; Rambo, G.; Corcini, C.D.; Lucía, Jr. T.; Deschamps, J.C.: <i>Effect of the vitrification methods ops and SSV, with inclusion of a synthetic ice blocker, on the viability of mice and bovine oocytes</i>	193
Santos, R.S.; Marchiori, M.O.; Brum, C.; Amaral, L.A.; Torres, A.; Boff, A.; Nogueira, C.W.: <i>Efficiency of fertirelin acetate as inductor of ovulation in mares</i>	194
Satorre, M.M.; Breininger, E.; Beconi, M.T.; Beorlegui, N.B.: <i>Fosforilación de proteínas en tirosina, bajo condiciones de capacitación, en semen porcino fresco y congelado con o sin á-tocoferol</i>	195
Scheid Filho, V. B.; Schiavon, R. S.; Gastal, G.D.A.; Amaral, J.I.; Lucía, T. Jr.: <i>Estrus expression in ewes after synchronization with previously used intravaginal devices</i>	196
Scheid Filho, V.B.; Schiavon, R.S.; Gastal, G.D.A.; Amaral, J.I.; Timm, C.D.; Lucía Jr. T.: <i>Descriptive analysis of reproductive performance in four holsten dairy herds</i>	197
Siedler, B.S.; Finger, P.F.; Munhoz, L.S.; Caetano, C.F.; Vilela, C.O.; Ferreira, L.N.; Fischer, G.; Vidor, T.; Hübner, S.O.; Vargas, G.: <i>La prevalencia de bovinos seropositivos para el herpes virus bovino (BoHV) en propiedades de la provincia de Río Grande do Sul (Brasil) en el período de enero de 2003 a junio de 2008</i>	198
Suhevic, J.; Blasi, C.; Re, A.; García, C.; Cisale, H.: <i>Análisis preliminar de la optimización de curvas de enfriamiento para mejorar la preservación del semen porcino</i>	199
Tartaglione, M.; Ritta, M.: <i>Efecto del ácido g-aminobutírico (GABA) y de la concentración espermática sobre la fertilización in vitro de espermatozoides de bovino criollo criopreservado</i>	200
Tonieto, R. A.; Goularte, K. L.; Schiavon, R. S.; Gastal, G.D.A.; Lucía, T. Jr.: <i>In vitro evaluation of quality of ovine semen frozen with cryoprotectant including trehalose</i>	201
Torres, A.J.; Haetinger, C.; Brum, C.; Nogueira, C.E.W.: <i>Comparative use of synthetic progesterone - P₄ and PGF₂ - á in the oestrus synchronization in the crioulo mares</i>	202
Torres, P.; García, C.; Cisale, H.: <i>Comparación de la eficiencia de diluyentes comerciales en la conservación de semen porcino</i>	203

Trasorras, V.L.; Chaves, M.G.; Agüero, A.: <i>La transferencia embrionaria en relación al sitio de ovulación en la llama.</i>	204
Valdecantos, P.A.; López, M.C.; Argañaraz, M.E.; Miceli, D.C.: <i>Expression profile of transforming growth factor beta (TGF-β) members in the rat oviduct.</i>	205
Van Leeuwen, J.J.J.; Williams, S.; Kemp, B.; Soede, N.M.: <i>Post-weaning altrenogest treatment in primiparous sows; the effect of duration and dosage on follicular dynamics and ovulation rate.</i>	206
Vera, T.A.; Leguiza, H.D.; Chagra Dib E.P.: <i>Circunferencia escrotal de caprinos criollos en los llanos de La Rioja: efecto de la estación.</i>	207
Vichera, G.; Pereyra Bonnet, F.; Salamone, D.: <i>Desarrollo comparativo de embriones androgenéticos y partenogénéticos haploides en bovinos.</i>	208
Vistarop, A.; De La Sota, R.L.; Pérez Wallace, S.; Thatcher, W.W.; Bartolome, J.A.: <i>Efectos de un tratamiento combinado con eCG y hCG pre y post IATF sobre la tasa de concepción en vacas lecheras.</i>	209
Williams, S.; Fernández, V.; Gabilondo, D.; Valette, E.; Iglesias, L.; De La Sota, R.L.: <i>Estudio de diferentes métodos para evaluar la calidad de semen porcino diluido.</i>	210
Williams, S.; Fernández, V.; Gabilondo, D.; Valette, E.; Iglesias, L.; De La Sota, R.L.: <i>Uso de la ultrasonografía para la determinación del desarrollo folicular en cerdas nulíparas.</i>	211
Willis, M.A.; Leopardo, N.P.; Jensen, C.F.; Espinosa, M.B.; Vitullo, A.D.: <i>Lagostomus maximus (vizcacha) como modelo animal para estudios en reproducción.</i>	212

Inyección intracitoplasmática de ovocitos equinos con semen desecado en presencia o ausencia de extracto espermático. Resultados preliminares

ALONSO A¹, HERRERA C², RÉVORA M², BACA CASTEX C¹, LOSSINO L³, MIRAGAYA M¹

Muchos autores postulan la existencia de un factor de activación de origen espermático en el proceso de fertilización en mamíferos. Nuestros estudios tratan de mejorar los resultados en la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), en donde una de las probables dificultades sea la falta de una adecuada activación ovocitaria. Los ovocitos fueron obtenidos de ovarios de faena y madurados en medio de transporte TCM 199 suplementado con Hepes, FSH, LH, IGF-1 y EGF a 38° C en una incubadora portátil. El semen se obtuvo de dos padrillos de fertilidad probada. Fue diluido en medio Kenney, centrifugado y resuspendido en Hepes-TALP. Realizando el extendido en portaobjetos estériles, que fueron secados en el flujo laminar durante 15 a 20 minutos y conservados a 5° C hasta la ICSI. Después de 4 a 6 semanas fueron resuspendidos en Hepes-TALP para la ICSI. Se inyectaron 96 ovocitos aleatoriamente divididos en 3 grupos y se observó clivaje a las 48hs: en el grupo 1 se inyectaron 35 ovocitos con espermatozoides provenientes del semen desecado, de los cuales clivaron 9 (25,7%). En el grupo 2, 36 ovocitos usando un espermatozoi-

de desecado en coinyección con extracto espermático, clivaron 16 (44,4%). En el grupo 3 se inyectó sólo extracto espermático en 25 ovocitos, de los cuales clivaron 6 (24%). Los ovocitos fueron activados en ionomicina durante 10 minutos y en 6-DMAP durante 3 horas. Luego fueron cultivados a 38° C en medio SOF en incubadora gaseada. Se vio una marcada tendencia a un mayor porcentaje de clivaje en el grupo 2. La proporción de clivados en este grupo fue aproximadamente el doble vs. los otros dos grupos. La presencia de clivaje en un valor del 24% en el grupo que fue inyectado sólo con extracto, sugiere que una parte de los ovocitos del grupo 2, pudo haber clivado por activación partenogenética. El uso de extracto espermático en coinyección con espermatozoides probablemente compense parte de las falencias de la técnica y ayude a mejorar los resultados en activación ovocitaria y desarrollo embrionario. El extracto ha sido necesario para lograr preñeces de embriones producidos por ICSI con semen liofilizado. En este estudio mejoró los porcentajes de clivaje y sería importante ver qué efecto tiene en la obtención de embriones de estadios más avanzados.

¹ Área de Teriogenología, INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA ²Halitus Instituto Médico; ³Cátedra de Producción Equina, Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC.

Especies reactivas del oxígeno en la maduración de ovocitos porcinos *in vitro*.

ALVAREZ, G.M.^{1,2}; TELLADO, M.N.¹; DALVIT, G.C.^{1,2}; MIGUEZ, M.S.³; CETICA, P.D.^{1,2}

En estudios previos hemos demostrado que en la maduración *in vitro* el metabolismo del complejo ovocito-cumulus (COC) porcino depende de las características del cumulus que rodea al ovocito y del estímulo gonadotrófico. Los ambientes *in vitro* presentan mayor concentración de oxígeno que los *in vivo*, produciendo un aumento en los niveles de las especies reactivas del oxígeno (ERO). Las ERO pueden producir modificaciones oxidativas que alteran el normal funcionamiento celular. Altos niveles de glutatión inducidos por cisteína serían necesarios para mejorar la maduración del ovocito porcino *in vitro* y la subsecuente competencia de desarrollo embrionario. El objetivo del trabajo fue evaluar la producción de ERO en los ovocitos de las diferentes clases de COCs inmaduros, su posible variación por la maduración *in vitro* en presencia o ausencia de gonadotrofinas y el efecto de la adición de cisteína. Los COCs fueron obtenidos por aspiración de folículos antrales (3-8mm) de ovarios provenientes de cerdas de faena y clasificados bajo lupa estereoscópica en A1: cumulus íntegro, denso y oscuro; A2: cumulus íntegro, denso y claro; B1: ovocitos rodeados sólo por la

corona radiata; B2: ovocitos parcialmente desnudos. La maduración se realizó durante 48 hs. en medio 199. El nivel de ERO se determinó en ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* utilizando el cociente entre las tinciones 2',7' diclorodihidrofluoresceína y diacetato de fluoresceína. La maduración meiótica se determinó por la presencia de la placa cromosómica en metafase II. No se observó diferencia significativa en el nivel de ERO entre los ovocitos provenientes de las diferentes clases de COCs. La producción de ERO de los ovocitos disminuyó debido a la maduración *in vitro* en todas las clases de COCs ($p < 0,05$), no observándose efecto por la presencia de gonadotrofinas. La presencia de cisteína en el medio de cultivo produjo una disminución en el nivel de ERO de los ovocitos madurados *in vitro* ($p < 0,05$). La producción de ERO en el ovocito sería controlada durante el proceso de maduración *in vitro* independientemente de las características del cumulus que rodea al ovocito y la influencia gonadotrófica. La adición de cisteína al medio de cultivo sería un factor importante para el control de la producción de ERO en el ovocito durante la maduración *in vitro*.

¹Área Química Biológica, ²INITRA ³Área de Producción de Porcinos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

Lambing rates after estrus synchronization with previously used intravaginal devices

AMARAL, J.I.; SCHEID FILHO, V.B.; SCHIAVON, R.S.; GASTAL, G.D.A.; LUCIA, JR.T.

The use of artificial insemination (AI) after estrus synchronization is a valuable tool to spread genetic improvement to commercial sheep flocks, but the cost of the estrus synchronization protocols may limit their routine use. The objective of this study was to evaluate the efficiency of a previously used intravaginal device on the lambing rates after a second use of the same device. The experiment was conducted in the Rio Grande do Sul State, south of Brazil, in January, 2007, including 168 Texel ewes, raised under extensive conditions. The ewes have been previously exposed to males treated with 250 mg of Testosterone IM, at a proportion of 1:15, during 21 days. After removal of the males, the ewes were allocated to three groups: T1, that received a previously intravaginal device (CIDR-G®, Pfizer®) containing 0.33 g of natural progesterone, plus 0.133 g of a synthetic Prostaglandin F₂á (PGF₂á) analogue and 250 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG),

both IM, at the removal of the device, six days later; T2, similar to T1, with administration of 0.133 mg of the synthetic PGF₂á analogue at the device's removal; and T3 (control), in which no device was used, but 0.133 mg of the synthetic PGF₂á analogue was administered at the same day of device's removal in the other groups. The devices have been previously used in other synchronization program, one year earlier, and were cleaned and stored. The AI was conducted with fresh semen, 12 hours after the estrus detection. Pregnancies were determined by transcutaneous ultrasonography (Anser Vet 485, Pie Medical®), with a 5.0 MHz convex probe, 35 days after the last AI. The lambing rate of T1 (68.0%) was higher ($P < 0.05$) than T3 (38.9%), but the rate for T2 (56.0%) did not differ from the other two groups ($P > 0.05$). The association of progesterone, PGF₂á analogue and eCG was beneficial for the lambing rates. Previously used intravaginal devices can be used successfully in estrus synchronization programs.

Evaluación de calidad seminal de zánganos de *Apis Mellifera* para su uso en inseminación instrumental

ANDERE, C.¹; CAPEL, A.M.¹; PALACIO, M.A.²; CATENA, M.¹;
MARTINEZ, A.²; RODRIGUEZ, E.M.¹; COLLINS, A.³

En Argentina la diversidad genética que presenta *Apis mellifera* es utilizada para el trabajo de selección que realiza el Programa de Mejoramiento Genético (MeGA) del proyecto Integrado de Desarrollo Apícola (PROAPI). La inseminación de reinas con semen de calidad es clave para el trabajo de preservación de la variabilidad y el mejoramiento de los genotipos en poblaciones cerradas. Los escasos antecedentes en la materia motivaron la realización de este trabajo cuyo objetivo fue evaluar la calidad seminal de zánganos de *Apis mellifera* previo a la inseminación. Para el ensayo se utilizaron 14 colonias del MeGA. La recolección de semen fue realizada con la jeringa Harbo. Para todas las determinaciones se utilizó el diluyente Kiev (pH 8.8 y osmolalidad de 388 mOsm/l). Fueron evaluadas: a) la motilidad según el movimiento detectado utilizando una escala entre 0 y 4; b) la concentración espermática (millones/ μ l), mediante el conteo de espermatozoides en cámara de Neubauer; c) la viabilidad, con tinción de fluorescencia; d) la morfología, por observación microscópica con tinción de rosa de bengala; e) la calidad bacteriológica, por medio del conteo de unidades formadoras de

colonias (UFC) en microaerofilia y aerobiosis e identificación bacteriana a través de pruebas bioquímicas y normas internacionales. Se determinó además, la sensibilidad y/o resistencia a diferentes antibióticos, la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la bactericida mínima (CBM). Por último, fue evaluada la capacidad fecundante a través de la observación del tipo de postura de reinas inseminadas. La motilidad observada resultó entre 2 y 4 para todas las colmenas. La concentración espermática fue de 1.11×10^6 a 9.27×10^6 . La viabilidad espermática por colonia osciló entre 72 y 98%. No fueron detectadas diferencias significativas entre colmenas para concentración ni viabilidad ($P > 0.05$). No se detectaron alteraciones en la morfología espermática. Las bacterias más frecuentes identificadas fueron: *Staphylococcus epidemidis*, *S. hominis*, *S. cohnii subsp. II*, *S. spp.*, *Bacillus cereus*, y *B. coagulans*. Todas las muestras resultaron sensibles a gentamicina con una CBM de 400 μ g/ml. Las reinas fecundadas presentaron buena postura. El semen evaluado a través de estos parámetros resultó apto para inseminar las reinas del Programa de Mejoramiento Genético (MeGA).

¹ FCV-UNCPBA. ² INTA -FCA. UNMdP. ³ Bee Research Laboratory, USDA

Avances en criopreservación de semen de zánganos de *Apis Mellifera*

ANDERE, C.¹; CAPEL, A.M.¹; PALACIO, M.A.²; CATENA, M.¹; MARTINEZ, A.²; RODRIGUEZ, E.M.¹; COLLINS, A.³

En Argentina existe un Programa de Mejoramiento Genético (MeGA) del proyecto Integrado de Desarrollo Apícola (PROAPI). La preservación de los materiales logrados y de la variabilidad genética presente en el país es uno de los desafíos del Programa. El objetivo de este trabajo fue ajustar la metodología para la criopreservación de espermatozoides de zánganos de *Apis mellifera*. Para ello, se recolectaron muestras de semen de un pool de zánganos con la jeringa Harbo en tubos capilares de 100 µl, colocados a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su procesamiento. El semen fue diluido con Kiev modificado (pH 8.8 y osmolalidad de 388 mOsm/l). Se evaluaron dos crioprotectores al 10%: dimetil-sulfóxido (DMSO) y etilenglicol y en diferentes concentraciones: 3:1; 3:2; 1:1 (semen/crioprotector). El semen con diluyente fue mezclado con cada crioprotector en las diferentes proporciones y mantenido en reposo durante unos segundos. Las muestras luego, fueron colocadas en tubos de 0.2 ml, cerrados herméticamente e introducidas en criotubos. Se evaluaron tres tratamientos de enfriamiento: 1). heladera (4°C), freezer (-80°C) e inmersión en nitrógeno líquido (-196

°C); 2). freezer (-80°C) e inmersión en nitrógeno líquido (-196°C); 3). inmersión directa en nitrógeno líquido (-196°C). Para el descongelado, fueron sumergidas en baño de incubación a 37°C durante 5 minutos. Las muestras descongeladas fueron evaluadas por motilidad, viabilidad y capacidad fecundante. Se inseminaron reinas y fue registrado el inicio y tipo de postura. Las muestras de semen tratadas con DMSO en una proporción 3:2 (semen/DMSO) sometidas al tratamiento 2 de enfriamiento y con baño de incubación durante 5 minutos, presentaron la mejor viabilidad con un promedio de 56%. Los espermatozoides presentaron movimientos circulares después del descongelado semejantes a los observados en semen fresco. Reinas inseminadas con semen criopreservado fueron fecundadas y presentaron una escasa postura comparada con reinas inseminadas con semen fresco. Sin embargo estos resultados muestran que es factible obtener cría de obreras a partir de semen criopreservado. Estos resultados contribuyen a estudios básicos y al desarrollo de procedimientos para la preservación de recursos genéticos mediante el uso de espermatozoides criopreservados de *Apis mellifera*.

¹ FCV-UNCPBA. ² INTA -FCA. UNMdP. ³ Bee Research Laboratory, USDA.

Residuos de N acetil galactosamina y galactosa participan en la formación de reservorios espermáticos en el oviducto de llama

APICHELA, S.A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, M.A.; VALZ-GIANINET, J.; ROLDÁN-OLARTE, E.M.; MICELI, D.C.

En el proceso de adhesión de espermatozoides a células epiteliales del oviducto, moléculas tipo lectina de la membrana espermática, reconocen carbohidratos específicos de la superficie oviductal. El carbohidrato involucrado es diferente según la especie. Nuestro objetivo fue caracterizar los residuos glicosilados del oviducto de llama y determinar cuál/es de estos carbohidratos participan en la adhesión oviducto-espermatozoide, detectados mediante lectinohistoquímica. Unión útero-tubal (UUT), istmo y ampulla, fueron fijados e incluidos en parafina. Secciones de 7µm se incubaron con diferentes lectinas (WGA, WGAs, UEA 1, DBA, RCA 120, Con A, PSA, LCA, GSL y SJA) conjugadas con FITC o Rodamina y se observaron por Microscopía Confocal Láser. Se realizaron ensayos de inhibición competitiva *in vitro*: espermatozoides obtenidos por vagina artificial fueron incubados 20 minutos con 10 µg/ml de glucosa, manosa, galactosa o N-acetil galactosamina en medio TL- sp. Luego se cocubaron con explantos de células epiteliales de la UUT durante una hora y fueron fijados, coloreados y fotografiados. Se determinó el área de cada explanto (ImagePro software) y el Índice

de Unión (IU) (espermatozoides adheridos/ 0.1 mm² de explanto). Los carbohidratos presentes son similares en ampulla, istmo y UUT. Se observaron abundantes residuos terminales de α-manosa, α-glucosa, N-acetil glucosamina y ácido siálico en la superficie de la mucosa y en el citoplasma de las células epiteliales. Galactosa y N-acetil galactosamina se distribuyeron en algunos sectores de la superficie de la mucosa en forma aleatoria. No se detectó α-fucosa. Los IU para los tratamientos con galactosa y N-acetil galactosamina resultaron significativamente menores al control. Al incubar espermatozoides eyaculados con N-acetil galactosamina o con galactosa FITC-conjugadas se observó que éstos unen ambos azúcares, no así los espermatozoides epididimales. Concluimos que el sistema de reconocimiento de carbohidratos de la superficie oviductal participa en el proceso de adhesión al epitelio de la UUT, siendo galactosa y N-acetil galactosamina los principales azúcares involucrados en esta interacción. La molécula tipo lectina que reconoce estos azúcares sería aportada al espermatozoide por el plasma seminal durante la eyaculación.

Efecto de distintos protocolos de activación sobre la transgénesis mediada por ICSI en bovinos

BEVACQUA, R.; PEREYRA-BONNET, F.; SALAMONE, D.

La transgénesis mediada por inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) constituye un eficiente método para introducir modificaciones genéticas en ratones y cerdos. Sin embargo, en ausencia de activación química, la ICSI en bovinos presenta tasas de desarrollo embrionario bajas. El objetivo de este trabajo fue comparar 3 protocolos de activación química para asistir a la transgénesis mediada por ICSI. En el primero de ellos se activó con Ionomicina (Io) seguida a las 3hs, por 6-Dimetilaminopurina (DMAP). Para el segundo y tercer tratamiento se empleó una segunda dosis de Io previa al DMAP o a la Dehidroleucodina (DhL). Ovocitos provenientes de ovarios de matadero fueron madurados en TCM-199 suplementado con 10% de SFB, 2 µg/ml de FSH, 10UI/ml penicilina, 0.3 mM de piruvato de sodio y 100 mM de cisteamina, por 24 hs a 39°C en atmósfera con 5% de CO₂ en aire. Espermatozoides descongelados fueron co-incubados con plásmido pCX-EGFP, que codifica para la proteína verde fluorescente, (0.5µg de plásmido/millón de espermatozoides en 2.8% NaCl por 5 min a 0°C) y empleados para la inyección. La activación se inició en todos los grupos con 5 µM Io por 4 min y luego de 3 h, se prosiguió con

uno de los siguientes tratamientos: 2 mM DMAP por 3 hs (1Io-DMAP); o 5 µM Io por 4 min seguido por 2 mM DMAP por 3 hs (2Io-DMAP) o por 5 mM DhL (2Io-DhL). El control fue activado con 5 µM Io por 4 min y luego con 2 mM DMAP por 3 hs. Los embriones se cultivaron en TCM-199 con cocultivo de células del cúmulus, evaluándose desarrollo embrionario y expresión del transgén diariamente hasta el noveno día post-activación.

El control, la activación partenogénica diploide, presentó tasas de desarrollo embrionario significativamente superiores (85% clivaje; 33,3% mórulas y 33,3% blastocistos) a las observadas para los grupos ICSI asistidos por activación (Test de Fisher, $p < 0.05$); constituyendo la excepción el grupo 2Io-DMAP en estadio de mórulas (13,3%). A pesar de no haber diferencias estadísticas significativas entre los distintos grupos de ICSI asistidos por activación, el tratamiento 2Io-DMAP presentó una tendencia a inducir mayor desarrollo embrionario, siendo el único en producir blastocistos (6.7% blastocistos con un 50% de blastocistos GFP). La activación con doble Io se presenta como una nueva alternativa para asistir a la ICSI en bovinos.

Efecto de la edad y raza sobre las características reproductivas en verracos

BORELLI, V.; GONZALEZ, M.A.; ACOSTA SOSA, M.A.

A fin de estudiar las características reproductivas de los verracos desde los 8 hasta los 32 meses de edad, se tomaron 2 padrillos: 1 Landrace puro (L) y 1 híbrido Landrace-Large White (L-Lw). Semanalmente se muestrearon mediante la técnica de mano desnuda y el semen fue evaluado macro y microscópicamente; los caracteres estudiados fueron Volumen (Vo), Motilidad (Mo), Vigor (Vi), Concentración (Co) y porcentaje de anomalías T (aT), realizando análisis de varianza e inferencias de medias. Se observaron diferencias significativas entre razas para aT ($p < 0.05$), sin embargo las aT son más altas a los 8 meses para ambas razas; disminuyendo hacia la madurez sexual, con una tendencia posterior al aumento. Los mayores valores en Vo, Mo, Vi, Co y la menor proporción de aT se observaron en la raza L; los cuales a partir de los 20 meses se mantienen con-

siderablemente constantes indicando su superioridad reproductiva. En cambio el híbrido L-Lw manifestó la mayor eficacia reproductiva (mayor Vo, Mo, Vi, Co y bajas At) recién a los 28 meses; bajando considerablemente tal eficacia a partir de ésta edad. De acuerdo con los resultados preliminares reportados en este trabajo, se puede indicar que los individuos se comportan diferentemente a una misma edad. En la fase prepuberal y puberal el padrillo L presenta una mayor producción seminal y un menor porcentaje de anomalías. A diferencia del híbrido L-Lw cuya mayor eficacia reproductiva la alcanzó en la fase postpuberal. Se concluye que el verraco L tiene un mejor comportamiento que el híbrido L-Lw en todos los indicadores estudiados. A pesar de esto la calidad espermática en estos verracos es aceptable para ser incluidos en cualquier sistema de cubrición.

Participación de especies reactivas del oxígeno en la reacción acrosomal de espermatozoides porcinos criopreservados

BREININGER, E.; BEORLEGUI, N.B.; BECONI, M.T.

Los procesos de capacitación y reacción acrosomal son eventos necesarios para que el espermatozoide pueda fertilizar al ovocito. El fluido folicular se considera un inductor fisiológico de la reacción acrosomal para el espermatozoide porcino criopreservado. A concentraciones fisiológicas, las especies reactivas del oxígeno son mensajeros que modifican la función espermática, activando enzimas u otros mecanismos involucrados en los procesos de capacitación y reacción acrosomal. El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar, en espermatozoides porcinos criopreservados, la participación de las especies reactivas del oxígeno en la reacción acrosomal inducida por fluido folicular. Espermatozoides capacitados con bicarbonato fueron incubados con fluido folicular en presencia de diferentes concentraciones de superóxido dismutasa (250 – 1500 U/ml), catalasa (25 – 300 U/ml) y hemoglobina (5 – 40 mg/ml), para evaluar la participación en la reacción acrosomal de anión

superóxido, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico, respectivamente. La motilidad espermática fue determinada por microscopía óptica, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado por el ensayo de clorotetraciclina y la reacción acrosomal verdadera por microscopía óptica de contraste diferencial-interferencial, en espermatozoides teñidos con azul tripán. El nivel de inducción de la reacción acrosomal verdadera disminuyó en forma concentración-dependiente ($p < 0,05$) con catalasa, superóxido dismutasa y hemoglobina, a partir de las concentraciones 25 U/ml, 750 U/ml y 20 mg/ml, respectivamente. Ninguno de los compuestos utilizados presentó efectos deletéreos en la motilidad espermática. De acuerdo a los resultados obtenidos, el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico podrían estar involucrados en la reacción acrosomal inducida por fluido folicular en espermatozoides porcinos criopreservados.

Participación de cadherina epitelial en la interacción de gametas en el modelo bovino

CABALLERO, J.N.¹; CETICA, P.D.²; DALVIT, G.C.²; VAZQUEZ-LEVIN, M.H.¹

Las interacciones moleculares asociadas al proceso de fecundación en mamíferos involucran eventos de adhesión célula-célula. Cadherina epitelial (CadE) es una molécula de adhesión celular dependiente de iones calcio, de unión homotípica y cuya función está regulada por el anclaje al citoesqueleto de actina a través de β -catenina. Se propone que CadE está presente en ambas gametas participando en fenómenos de adhesión celular durante la fecundación. Se estudió la presencia y localización de CadE en espermatozoides no capacitados (seleccionados por columnas de lana de vidrio), incubados en condiciones capacitantes (60 μ g/ml de heparina durante 45 min.) y reaccionados (100 μ g/ml de lisofosfatidilcolina durante 15 min.) a partir de muestras de semen descongelado y en complejos ovocito-cumulus (COCs) madurados *in vitro* (medio TCM199 + 5 % de suero fetal bovino durante 22 hs.) utilizando ensayos de inmunocitoquímica y Western Immunoblotting (WI). Además se evaluó la participación de CadE en los eventos de interacción de gametas preincubando los espermatozoides con anticuerpos anti CadE *vs.* IgG control: fecundación *in vitro* (espermatozoides capacitados y ovocitos madurados *in vitro*) con o sin

células del cumulus, unión a *zona pellucida* (ZP) (espermatozoides capacitados y ovocitos madurados *in vitro* desnudos) y unión a oolema (espermatozoides reaccionados y ovocitos madurados *in vitro* y sin ZP). CadE fue localizada en el reborde apical del acrosoma de espermatozoides intactos y capacitados, así como en la membrana acrosomal interna y el segmento ecuatorial de espermatozoides reaccionados. En COCs fue inmunodetectada en las células del cumulus y sus proyecciones hacia el ovocito y en el oolema. Estos resultados fueron acompañados por la presencia de una señal específica para una proteína del peso molecular esperado en ensayos de WI. La preincubación de espermatozoides con anticuerpos anti CadE condujo a una disminución del porcentaje de ovocitos fecundados en presencia (90 \pm 1%, n=119 *vs.* 69 \pm 5% n= 151; p<0,05) o ausencia de células del cumulus (89 \pm 4%, n= 98 *vs.* 57 \pm 7%, n= 122; p<0,05) y el número de espermatozoides unidos tanto a ZP (49% de inhibición, n=35; p<0,05) como a oolema (79% de inhibición, n=50; p<0,05). En conclusión CadE está presente en ambas gametas bovinas y participaría en distintos eventos de interacción del proceso de fecundación.

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental (CONICET-UBA), ²Área de Química Biológica, INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA

Dos tratamientos para sincronizar celo en ovinos: Progestágenos versus Progesterona natural

CARBALLO, E.¹; MARECO, G.¹; ORNSTEIN, A.M.²; PARAMIDANI, E.¹

Con la finalidad de comparar la eficiencia de sincronización de celo y el porcentaje de preñez entre dos tratamientos para ovinos con un protocolo de Inseminación a Tiempo Fijo, se dispuso de 160 ovejas de raza Corriedale y cruza en Chascomús, Provincia de Buenos Aires, a 140 km de Capital Federal, a las cuales se les colocaron esponjas vaginales impregnadas de 60 mg de acetato de medroxiprogesterona, un progestágeno, (Syntex, Argentina) Grupo A, o un nuevo dispositivo que contiene 500 mg de progesterona natural (Croniprés CO®, Biogénesis-Bagó, Argentina), Grupo B, durante 7 días. La mitad de la majada (80 animales) fue inseminada fuera de temporada reproductiva, en el mes de diciembre, y la otra mitad (80 animales) dentro de la estación reproductiva, en el mes de abril. En cada ocasión, los 80 animales fueron subdivididos en dos subgrupos de 40 animales

cada uno para evaluar los dispositivos de sincronización. Se inseminaron con un pool de semen fresco de 3 carneros Frisones de fertilidad conocida, diluido en leche descremada UAT. La inseminación fue cervical y la dosis de inseminación fue de 200 x 10⁶ espermatozoides, en 0,15 ml. La inseminación fue realizada 48 a 50 horas después de retirados los pesarios vaginales. El número de ovejas que presentó celo fue superior en el grupo B, tanto dentro como fuera de la estación reproductiva, pero la diferencia fue solamente significativa fuera de temporada (P<0,05). El porcentaje de preñez diagnosticado por ecografía 40 días post-inseminación en el Grupo A fue de 40 % fuera de temporada reproductiva y de 42 % dentro de la temporada reproductiva, y en el Grupo B fue 52,5 % y de 58,5 % , respectivamente. Estas diferencias no fueron significativas.

¹Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH-CONICET) Universidad Nacional de General San Martín (UNSAM)

²Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

Influencia de la estación del año sobre el ADN de espermatozoides de llama

CARRETERO, M.I.¹; GIULIANO, S.^{1,2}; CASARETTO, C.¹; GAMBAROTTA, M.³; NEILD, D.¹

La cromatina espermática puede sufrir diferentes daños como consecuencia de una gran variedad de injurias. Love y Kenny (1999) en equinos y Banks y col., (2005) en ratones observaron alteración de la cromatina espermática en individuos sometidos a estrés calórico. Giuliano y col., (datos no publicados) en llamas con hidrocele y edema escrotal, observaron un aumento en el porcentaje de núcleos con morfología anormal y presencia de vacuolas en la cromatina. El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de la estación del año sobre la condensación del ADN espermático de llamas. Se analizaron 31 eyaculados obtenidos mediante electroeyacuación de 6 animales ubicados en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA (35° latitud sur). Teniendo en cuenta que la espermatogénesis en los mamíferos dura aproximadamente 60 días se consideró como período estival a los meses de febrero, marzo y abril y como período invernal a los meses de julio, agosto y septiembre. Se evaluaron las siguientes características: volumen, concentración, movilidad, funcionalidad de membrana (HOS

test), integridad de membrana (tinción con fluorocromos CFDA/PI), y morfología espermática. Para evaluar el daño del ADN se realizaron frotis fijados con etanol 96°, que luego fueron teñidos con Azul de Toluidina (AT) y se observaron con microscopio óptico. Se contaron 200 células/muestra que fueron clasificadas según la intensidad de la coloración de AT en: positivas, intermedias y negativas. En el análisis estadístico se utilizó un Diseño Factorial tomando al macho como bloque. Se observó un aumento significativo ($p=0,03$) en el porcentaje de espermatozoides con membranas funcionales durante el verano. Aunque no se encontraron diferencias significativas en el resto de los parámetros de rutina ($p > 0,05$) se observó una tendencia a un mayor porcentaje de vivos durante el invierno ($p=0,08$). Se observó un aumento significativo ($p=0,03$) de células con daño en su ADN (positivas + intermedias) durante el período estival. Los resultados indicarían que las condiciones ambientales durante el período estival podrían inducir un aumento de la de condensación de la cromatina de espermatozoides de llama.

¹ Área de Teriogenología, INITRA, ² Área de Física Biológica, ³ Elementos de Estadística. Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

Pruebas de correlación entre la viscosidad del eyaculado y variables espermáticas en la especie *Lama glama*

CASARETTO, C.¹; MARTÍNEZ SARRASAGUE, M.²; GIULIANO, S.^{1,3};
RUBIN DE CELIS, E.²; CARRETERO, I.¹; MIRAGAYA, M.¹

El eyaculado de llama presenta alta viscosidad. En nuestro laboratorio, utilizando un viscosímetro rotacional, se establecieron por primera vez los valores referenciales de la viscosidad absoluta y otros parámetros reológicos (K, n) para la especie comprobando además que el semen de llama se comporta como un fluido no newtoniano pseudoplástico que se adecua al modelo $\tau = K \dot{\gamma}^n$ (τ = fuerza de corte; K= viscosidad estructural; $\dot{\gamma}$ = velocidad de corte; n= coeficiente de consistencia). Debido a que la función fisiológica de la viscosidad y los factores que la determinan no se conocen, el objetivo de este trabajo fue establecer si existe correlación entre la viscosidad del eyaculado y las variables utilizadas en la evaluación seminal de rutina. Se obtuvieron 36 eyaculados mediante electroeyaculación de 10 machos, evaluando: volumen, movilidad, concentración y morfología espermáticas, funcionalidad de membrana mediante HOS test (hypoosmotic swelling test) y porcentaje de vivos mediante tinción con CFDA-Pi (diacetato de 6-carboxifluoresceína – yoduro de propidio). La viscosidad se midió a 37° C

con un viscosímetro rotacional de cono plato (Brookfield modelo DV-I) a un gradiente de velocidad de 0 s⁻¹ a 230 s⁻¹, trazando posteriormente los reogramas correspondientes. A partir de los datos de viscosidad se calcularon los valores de K y n para cada eyaculado. Se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman para evaluar asociación entre las variables. Los resultados obtenidos fueron los siguientes (media \pm DS): viscosidad: 40,3 \pm 28 cpoise (a 11,5 s⁻¹) y 11,7 \pm 4 cpoise (a 115 s⁻¹); K 2,33 \pm 1,5 dinas.s/cm² y n: 0,44 \pm 0,1. No se observó asociación (p>0,05) entre las características reológicas del eyaculado: K, n, viscosidad versus las variables seminales: concentración espermática, volumen de eyaculado y movilidad espermática. Concluyendo, la viscosidad del eyaculado de llama no estaría influida por la concentración espermática ni por el volumen del eyaculado, por otro lado, el porcentaje de movilidad espermática no estaría influido por la viscosidad del eyaculado. Estos resultados contribuirán al conocimiento más completo de la viscosidad del semen de *Lama glama* y a la comprensión de su función fisiológica.

¹Área de Teriogenología, ²Área de Física Biológica, INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA ³Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Evaluación del eyaculado de *Lama glama*: Morfometría de cabeza del espermatozoide. Resultados preliminares

CASARETTO, C.¹; GIULIANO, S.^{1,2}; CARRETERO, I.¹; LOMBARDO, D.³; MIRAGAYA, M.H.¹

La morfología espermática de la especie *Lama glama* se caracteriza por presentar gran variabilidad. Debido a esta característica y a su evaluación exclusivamente por medios subjetivos, no ha sido posible el establecimiento de un único patrón normal de la cabeza del espermatozoide. El objetivo de este trabajo fue evaluar de manera objetiva la morfología de los espermatozoides de la especie *Lama glama*, mediante el análisis morfométrico y digital. Se realizaron frotis teñidos con Tinción 15® de 7 eyaculados obtenidos por electroeyacuación a partir de 7 machos. Los preparados fueron observados por microscopía óptica de campo claro con objetivo 100 X (inmersión). La captura digital de las imágenes se realizó con una cámara Leica DC180 con sensibilidad expresada en "profundidad de color" correspondiente a 16 bits por canal; totalizando 200 – 229 espermatozoides por eyaculado. Se generaron las imágenes binarias de cada captura y, mediante el software QWin Plus (Leica Microsystem Co.), se evaluaron los parámetros longitud, ancho, área, perímetro, redondez, diámetro equivalente, longitud de curva, ancho de curva y fullness ratio; realizando la es-

tadística descriptiva para la población espermática de cada eyaculado. Las medias para los distintos parámetros oscilaron entre los siguientes valores: (1) área: 17,46-19,90 mm²; (2) longitud 6,11-6,52 mm; (3) ancho 3,66-4,04 mm; (4) perímetro 17,44-18,55 mm; (5) redondez 1,25-1,35; (6) diámetro equivalente 4,7-5,03 mm; (7) longitud de curva 5,41-6,13 mm; (8) ancho de curva 3,14-3,73 mm; (9) fullness ratio 0,93-0,95. Se realizó un test no paramétrico de Kruskal-Wallis, observándose diferencias significativas para todos los parámetros entre los eyaculados (p=0,05). A partir de estos resultados podríamos concluir que la morfometría de la cabeza de los espermatozoides difiere significativamente entre los distintos machos. Estos resultados, demuestran que hasta el momento no se podría establecer, mediante morfometría, un único patrón morfológico y sistemático de la cabeza espermática en la especie *Lama glama*. Sería necesaria la evaluación de una mayor cantidad de eyaculados para establecer si los patrones morfométricos son constantes para cada macho y si las diferencias observadas se encuentran entre todos los eyaculados.

¹Área de Teriogenología. ²Área de Física Biológica, INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. ³Área de Histología, INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA

Pérdida embrionaria y categoría endometrial en yeguas receptoras de embriones

CASTAÑEIRA, C.; ALONSO, C.; VOLLENWEIDER, A.; LOSINNO, L.

En programas comerciales de transferencia de embriones (TE) las yeguas receptoras representan uno de los puntos críticos en los índices de eficiencia global. Aproximadamente 15.000 receptoras son utilizadas actualmente en Argentina, seleccionadas por edad, tipo, mansedumbre y evaluación reproductiva. Los objetivos fueron determinar a) la tasa de rechazo en yeguas receptoras por categoría IIB o III de biopsia endometrial b) las pérdidas gestacionales tempranas entre receptoras seleccionadas clínicamente con o sin biopsia endometrial. Se analizaron retrospectivamente 5 temporadas reproductivas de un centro comercial. Las receptoras fueron mestizas entre 4 y 12 años y 400-500 kg, alimentadas con pastura sin suplementación. Las biopsias endometriales fueron colectadas de receptoras ovulatorias, sin cría al pie, seleccionadas por edad, tipo, condición corporal y evaluación reproductiva mediante palpación y ultrasonografía. Las yeguas con categorización alta (IIB o III) fueron eliminadas correspondiendo a la tasa de rechazo. Las muestras fueron divididas en 2 grupos de receptoras: G1) con biopsias clasificadas como I o IIA y G2) no seleccionadas por biopsia. En ambos se analizó el porcentaje de preñez al día

7 post transferencia y las pérdidas de preñez al día 30 y 60. Las donantes fueron inseminadas con semen fresco y el lavaje uterino fue realizado a los 7-8 días post ovulación. La transferencia fue no quirúrgica y ninguna recibió tratamiento hormonal post transferencia. Las preñeces fueron detectadas al día 14, 30 y 60 post ovulación de la donante mediante ultrasonografía. Se utilizó el test de chi-cuadrado. Se tomaron 1399 biopsias, de las cuales 91 (6,5%) fueron descartadas por su categorización de biopsia (IIB o III). La tasa de preñez en yeguas receptoras con o sin categorización endometrial no fue significativamente diferente (72,5 y 71,8% respectivamente). Las tasas de pérdidas gestacionales al día 30 (5,6 y 8,2%; $p < 0,01$), 60 (1,6 y 5,4%; $p < 0,001$) y total (7,2 y 13,2%; $p < 0,001$) para las mismas categorías fueron diferentes. El porcentaje de pérdidas embrionarias acumuladas al día 60 fue casi el doble en receptoras seleccionadas clínicamente sin biopsia endometrial. Estas diferencias en las pérdidas generan un impacto económico negativo que podría compensarse en parte por la utilización de la biopsia endometrial como herramienta de selección en el examen ginecológico de rutina.

Laboratorio de Reproducción Equina, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.

Utilización de Gonadotropina Menopáusica Humana (hMG) para la estimulación ovárica en yeguas donantes de embriones

CASTAÑEIRA, C.; AGUILAR, J.; VOLLENWEIDER, A.; LOSINNO, L.

La obtención de resultados repetibles y consistentes en superestimulación ovarica en la yegua es una limitante de la eficiencia en programas de transferencias embrionarias. Numerosos estudios de superovulación en la yegua consiguen aumentar el número de ovulaciones, pero la tasa de recuperación de embriones por ciclo no aumenta significativamente. Se han utilizado gonadotropinas equina y porcina, extracto de pituitaria, antagonistas de inhibina, sin resultados consistentes y económicamente aceptables. La Gonadotropina Menopáusica Humana (hMG) se usó con éxito en humanos y bovinos pero en la yegua los reportes son muy limitados. El objetivo fue determinar si la estimulación ovárica con hMG induce ovulaciones múltiples (más de 2/ciclo) que se traducen en la recolección de múltiples embriones por ciclo. Se utilizaron 7 yeguas mestizas, entre 7-15 años, ovulatorias, seleccionadas para la característica de ovuladoras simples (no más de un folículo/ciclo). Las yeguas fueron sus propios controles en distintos ciclos. En una primera fase (las yeguas no fueron inseminadas y se determinó la tasa de ovulación), se les asignó uno de los dos tratamientos propuestos (T1₁₅₀ = 75mg hMG, am/pm y T2₃₀₀ = 150 mg hMG, am/pm). Cada ciclo de tratamiento fue seguido, de un ciclo control

sin tratamiento (período *wash out*). Se realizó seguimiento ecográfico diario. Al día 4-5 post-ovulación, se aplicó PgF₂α (día 0) y las yeguas se asignaron a los grupos de tratamientos con hMG. Cuando presentaron 1 o más folículos > 35 mm, se suspendió el tratamiento y se aplicaron 1500 UI hCG IM. Se determinó la ovulación ecográficamente cada 12 h. En la segunda fase, cuyo objetivo particular fue la tasa de ovulación y de recuperación embrionaria, se utilizaron 6 yeguas. Se repitió el ensayo utilizando el protocolo T1₁₅ y un ciclo control por yegua inseminando y recuperando embriones al día 7-8 post ov. En la primera fase, la tasa de ovulaciones dobles fue de 57,1%, 14,3% y 0% para los tratamientos T1₁₅₀ y T2₃₀₀ y control respectivamente. La diferencia fue significativa ($p < 0,025$) para T1₁₅₀ vs. control. En la segunda fase, T1₁₅₀ indujo una tasa de ovulaciones dobles de 50% (3/6), sin diferencia significativa con el 16.7% (1/6) del control. El índice de recuperación de embriones por ciclo fue de 1,3 (8/6) para T1₁₅₀ y 0,83 (5/6) para el control y por ovulación del 0,89 (8/9) y 0,71 (5/7) respectivamente. Los tratamientos ensayados con hMG no aumentaron significativamente la tasa de ovulación ni la tasa de recuperación de embriones, los resultados son alentadores y justifican más estudios.

Concentraciones de estrógenos en plasma post inyección de dos ésteres de estradiol en llamas

CAVILLA, V.^{1,2}; BIANCHI, C.^{1,2}; ABA, M.¹

Las hembras de la especie *Llama glama* presentan ovulación inducida por la cópula, respuesta ovulatoria dependiente del diámetro folicular (> 7 mm) y falta de asociación estro-ovulación. Estas características generan la necesidad de diseñar alternativas de control de la actividad folicular que permitan predecir la presencia de un folículo con capacidad ovulatoria. El estradiol y sus ésteres son utilizados en bovinos para sincronizar la actividad folicular. En camélidos sudamericanos (CS) existen controversias en relación a sus efectos sobre el desarrollo folicular y la información sobre su metabolismo es escasa. Dado que estudios farmacológicos sugieren que el metabolismo de ciertas drogas en CS difiere del observado en otros rumiantes, la extrapolación de datos de bovinos u ovinos a estas especies no resulta adecuada. El objetivo del presente estudio fue caracterizar las concentraciones plasmáticas de estrógenos (E_2) post-inyección intramuscular (i.m.) de dos ésteres de estradiol: benzoato y cipionato, en llamas. Para ello, doce llamas hembras (± 100 Kg) divididas aleatoriamente en dos grupos: BE (n=6) y CPE (n=6) recibieron una inyección i.m. (0 h) de 2,5 mg de benzoato de estradiol (BE) y cipionato de estradiol (CPE), respectivamente. Se extrajeron muestras de sangre a todas las hembras,

10 minutos pre-inyección; 1, 6, 12, 24 horas post-inyección (PI) y diariamente hasta el día 14 PI. La media de las concentraciones plasmáticas de E_2 de todas las hembras a la 0 h fue $33,1 \pm 3,4$ pmol l⁻¹ (media \pm EE). Se estableció una concentración fisiológica máxima de 56,5 pmol l⁻¹ al adicionar 2 DE a la media. En el grupo BE se registró una concentración máxima (C_{max}) de $336,9 \pm 41,7$ pmol l⁻¹, alcanzada en un tiempo (T_{max}) de $8 \pm 1,3$ h PI. En el grupo CPE el C_{max} fue de $152 \pm 8,4$ pmol l⁻¹ y el T_{max} de $20 \pm 2,5$ h. Las concentraciones retornaron a valores fisiológicos el día 5 ($71,5 \pm 14$ pmol l⁻¹) y 9 ($68,1 \pm 8,6$ pmol l⁻¹) para BE y CPE, respectivamente ($P > 0,05$). El área bajo la curva para el BE fue: $1234,8 \pm 157,8$ y para CPE: $1195 \pm 87,8$ pmol x h/L. La inyección i.m. de 2,5 mg tanto de BE como de CPE indujo concentraciones de E_2 superiores a las fisiológicas. Sin embargo, se observó que la inyección de CPE produjo concentraciones máximas menores y registradas más tardíamente e indujo concentraciones suprafsiológicas por un periodo mayor que el BE. Estos resultados demuestran que el CPE presenta un periodo de acción más prolongado que el BE, característica que debería ser considerada al momento de su incorporación en esquemas de manejo reproductivo en la especie.

¹Área de Endocrinología, FCV, UNCPBA, Tandil, Argentina; ²CONICET.

Administración de progesterona y estradiol previo al servicio natural en vaquillonas prepuberres

COLOMBO, M.¹; DE VILLAFÁÑE, P.¹; CLEDOU, G.²; BARTOLOME, J.A.³

La hipótesis de este trabajo fue que la aplicación de estradiol durante un tratamiento con un dispositivo de progesterona aplicado ocho días previos al servicio natural tendría un efecto positivo sobre el porcentaje de preñez de vaquillonas prepuberres en servicio natural. Vaquillonas Aberdeen Angus de aproximadamente 250 Kg. de peso (n=260) fueron evaluadas por palpación rectal ocho días (Día -8) previos al inicio del servicio natural (Día 0), clasificadas según el score del tracto reproductivo (1 a 5; Andersen et al., 1991) y tratadas desde el Día -8 al Día 0 con un dispositivo de progesterona intravaginal (Cronipres, monouso M15, Biogénesis-Bagó). En el Día -8 las vaquillonas fueron asignadas al azar a recibir 2 mg de benzoato de estradiol (n=133) o permanecer no tratadas como control (n=127). En el Día 0 las vaquillonas fueron asignadas al azar a recibir 1 mg de cipionato de estradiol (n=130) o permanecer no tratadas como control (n=130). Se realizó ecografía de los ovarios en un subgrupo (n=20) de vaquillonas en los Días -8, -4 y 0 para evaluar el diámetro (mm) del folículo dominante. En el Día 0 las vaquillonas fueron expuestas a servicio natural utilizando 4% de toros por 45

días. Se realizó palpación rectal el Día 41 para detectar gestaciones de 41 a 34 días correspondientes a la primera semana de servicio y el Día 85 para evaluar el porcentaje de preñez final. El porcentaje de preñez fue comparado utilizando regresión logística y el tamaño del folículo por análisis de varianza. El 89,3% (232/260) de las vaquillonas resultaron con score reproductivo 1, 2 y 3 (prepuberres). El tratamiento con benzoato de estradiol el Día -8 redujo ($P<0,01$) el tamaño del folículo dominante al Día 0 (11,3 vs. $13,1 \pm 0,78$ mm) pero no afectó el porcentaje de preñez. El tratamiento con cipionato de estradiol el Día 0 incrementó ($P<0,01$) el porcentaje de preñez en vaquillonas prepuberres en comparación al grupo control (score 1=17,5% vs. 7,8%, score 2=34,0% vs. 7,8%, score 3= 31,2% vs. 20,0%). El cipionato de estradiol el Día 0 incrementó ($P<0,01$) el porcentaje de preñez final en vaquillonas con score reproductivo 3 y ambos tratamientos con estradiol disminuyeron ($P<0,05$) el intervalo a la concepción (-6 días). En conclusión, la administración de estradiol durante un tratamiento con progesterona puede mejorar la eficiencia reproductiva de vaquillonas prepuberres.

¹Actividad Privada, Buenos Aires. ²Biogénesis-Bago, Buenos Aires. ³Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam, La Pampa.

Association between the presence of seminal plasma proteins and acrosome integrity of frozen swine spermatozoa

CORCINI, C.D.¹; PIGOZZO, R.¹; RAMBO, G.¹; VARELA JUNIOR, A.S.²; REMPEL, F.J.K.¹; LEON, P.M.M.¹; CALDERAM, K.¹; DESCHAMPS, J.C.¹; LUCIA, T.JR.¹

The low fertility observed with frozen swine semen may be attributed to structural and functional damages in the sperm cells, especially in the acrosome due to cold shock. This study evaluated the association between the presence of some seminal plasma proteins (SPP) in samples of swine semen, prior to freezing, and the acrosome integrity (AI) of sperm cells post-thawing. Four boars were used as semen donors, supplying a total of 24 ejaculates within a 15-day period. The sperm-rich fraction of the ejaculates was frozen using an extender including 5% dimetilacetamide as the penetrating cryoprotectant. After semen collection, the seminal plasma was centrifuged at 10000 x g for 10 minutes. The SPP were identified on fresh semen through one-dimensional electrophoresis. The *Lectin from Arachis hypogaea FITC conjugate* stain was used to evaluate AI, in an epifluorescence microscope (WU of 450-490 nm). Comparisons of acrosome integrity

as a function of the presence of the identified SPP were conducted through analysis of variance with repeated measures, with individual boar effects nested within the main effect. Post-thawing AI was associated with the presence of five SPP, having molecular weights of 19, 21, 44, 65 and 80 kDa ($P < 0.05$). Among those SPP, those having 21 and 80 kDa, when present in semen samples, were associated with $99.2 \pm 8.4\%$ and $87.5 \pm 5.2\%$ of sperm cells having AI, respectively. However, when absent, the percent of AI was equal to $52.4 \pm 3.7\%$ and 64.1 ± 6.1 , respectively. AI was higher ($P < 0.05$) when the SSP having 19, 44 and 65 kDa were present ($81.7 \pm 5.0\%$, $81.4 \pm 4.5\%$ and $79.7 \pm 3.9\%$, respectively), than when they were absent ($69.9 \pm 4.3\%$, $70.2 \pm 4.7\%$ and 71.8 ± 5.4 , respectively). Thus, considering the critical role of acrosome integrity, the SPP identified in this study may be potentially relevant markers for fertility with frozen swine semen.

¹PIGPEL - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Brasil ²Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Rio Grande, Brasil.

Association between the presence of a 100 KDa protein factor in the seminal plasma and membrane integrity of frozen swine spermatozoa

CORCINI, C.D.¹; PIGOZZO, R.¹; RAMBO, G.¹; VARELA JUNIOR, A.S.²; SANTOS, E.C.S.¹; GOULARTE, K.L.¹; CALDERAM, K.¹; DESCHAMPS, J.C.¹; LUCIA, T.JR.¹

In swine, artificial insemination (AI) with frozen semen presents unsatisfactory reproductive performance in comparison with the use of cooled semen, being commonly influenced by the variation among individual boars used as semen donors, which may reflect distinct protein content in their seminal plasma. This study had the objective of evaluating the association among proteins identified in the seminal plasma of swine and the integrity of the sperm membrane, both pre-freezing and post-thawing. Four boars were used as semen donors for a total of 24 ejaculates. The sperm-rich fraction of the ejaculates was frozen in an extender including 5% dimetilacetamide as the penetrating cryoprotectant. The protein content of the seminal plasma was evaluated

by unidimensional electrophoresis. Sperm membrane integrity (MI) was evaluated through the fluorescent stains Carboxyfluoresceine diacetate and Propidium iodide. The MI was compared as a function of the presence of the proteins found in the seminal plasma by analysis of variance with repeated measures, with individual boar effects nested within the model's main effect. Increased MI was associated with the absence of a protein having molecular weight of 100 kDa ($P < 0.05$) that was identified in 20 of the samples. In the presence of that protein, pre-freezing and post-thawing MI was $81.1 \pm 4.6\%$ and $43.6 \pm 3.8\%$, respectively, but was 36.3 ± 3.8 , in its presence. Thus, the 100 kDa protein may be a relevant marker for swine sperm membrane integrity.

¹ PIGPEL - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Brasil ² Instituto de Biociências, Universidade Federal de Rio Grande, Brasil.

Creatina quinasa y aminotransferasas están involucradas en la reacción acrosomal inducida por la progesterona en el espermatozoide bovino criopreservado

CÓRDOBA, M.; PINTOS, L.N.; BECONI, M.T.

El objetivo del trabajo fue determinar la actividad de enzimas que participan en el metabolismo espermático y el consumo de oxígeno, vinculados con la obtención de energía para la reacción acrosomal en espermatozoides no capacitados. El piruvato y el lactato fueron utilizados como sustratos oxidativos que usualmente están presentes en los medios de fertilización in vitro. Las actividades enzimáticas correspondientes a creatina quinasa (CK-B), alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) fueron registradas espectrofotométricamente a 340 nm. El consumo de oxígeno fue medido polarográficamente. La capacitación y la reacción acrosomal fueron evaluadas por la técnica de epifluorescencia de clorotetraciclina y la viabilidad espermática por la coloración de Azul Tripán. Los datos fueron analizados por ANOVA y las medias fueron comparadas a través del Test de Tukey como post ANOVA ($p < 0.05$). El porcentaje de espermatozoides reaccionados difirió significativamente respecto del control, no observándose diferencias significativas en la viabilidad espermática. Las actividades enzi-

máticas de la AST son significativamente superiores en todas las muestras y controles respecto a las actividades de ALT. En espermatozoides reaccionados las actividades de AST, ALT, y CK-B no se modificaron respecto a sus controles ($p < 0.05$). El consumo de oxígeno de las muestras de espermatozoides reaccionados con progesterona (8.85 ± 2.77) $\mu\text{L O}_2/\text{h}/10^8\text{esp}$ se incrementó significativamente respecto de sus controles de 10 minutos (5.87 ± 1.80) $\mu\text{L O}_2/\text{h}/10^8\text{esp}$ siendo inferior al valor del consumo de oxígeno de espermatozoides capacitados ($p < 0.05$). En espermatozoides no capacitados la reacción acrosomal en presencia de progesterona produce un cambio significativo en el consumo de oxígeno, no modificándose las actividades de AST, ALT y CK-B; actividades enzimáticas orientadas a la disponibilidad de sustratos y relacionadas con la producción de energía. En presencia de progesterona se demostró la existencia de un perfil metabólico diferencial respecto a la capacitación que permite cubrir los requerimientos energéticos del proceso de reacción acrosomal.

Análisis morfofuncional de los espermatozoides de *Zaedyus Pichiy* (Dasypodidae, Xenarthra, Mammalia)

CÓRDOBA, M.¹; CETICA, P.D.^{1,2}; GACHEN, G.³; QUSE, V.³; MERANI, M.S.²

La forma y dimensiones espermáticas del pichi de la Patagonia, *Zaedyus pichiy*, son muy particulares respecto a la mayoría de los mamíferos euterios. La cabeza es muy grande y extremadamente delgada, presentando una característica forma de cuchara. El flagelo es relativamente largo, principalmente a expensas de la pieza principal. Este tipo particular de espermatozoides está presente en varios géneros de armadillos, no habiendo aún estudios morfofuncionales. Se evaluó la motilidad, viabilidad, morfología normal, integridad acrosómica, capacitación y reacción acrosomal (RA) en *Z. pichiy* a partir de espermatozoides provenientes de conductos deferentes de un macho adulto sometido a una vasectomía con fines de control reproductivo en el Bioparque Temaikén. Los conductos deferentes fueron trasladados a 25°C en 1 h hasta el laboratorio y exprimidos para obtener el semen en medio TALP a 34°C. Se analizó el movimiento espermático en cámara atemperada, observando y filmando en microscopio invertido. Se evaluó el cambio de patrones tintoriales del fluorocromo clortetraciclina (CTC) y de

Giensa (G) luego de 2,5 horas de incubación. La viabilidad espermática y el porcentaje de espermatozoides con RA verdadera se determinaron por la coloración vital de Azul Tripán y microscopía interferencial diferencial. Prácticamente la totalidad de los espermatozoides estaban vivos y mótils luego de su obtención, observándose un alto grado de aglutinación entre ellos. Los que estaban libres se desplazaban en forma progresiva con movimiento de rotación sobre su eje longitudinal, observándose particulares formas apiladas que describían el mismo patrón. Se observó un alto porcentaje de espermatozoides normales (78,5%) y de acrosomas intactos (84%) según G. El porcentaje de capacitación (3% vs 20%) y RA (8% vs 39%) aumentaron con la incubación ($p < 0,05$) según CTC, sin embargo la viabilidad no disminuyó significativamente. La peculiar morfología espermática de *Z. pichiy* responde a un patrón de movimiento rotacional. El medio TALP fue capaz de inducir la capacitación y RA en espermatozoides provenientes de los conductos deferentes en esta especie.

¹Área Química Biológica, INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, ²Instituto de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina UBA y ³Fundación Temaikén

Regulación de la apoptosis sobre una línea establecida de células de granulosa bovina (BGC-1) con un análogo de GnRh (Acetato de Leuprolide) y un antagonista (Antide)

CRUZANS, P.R.; CAROU, M.C.; REVILLA, M.; LOMBARDO, D.M.

Se han identificado receptores de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRHr) en células de granulosa ovárica (CG) y luteales. La activación de GnRHr en CG conduce a la estimulación o inhibición de la función gonadal. Experiencias *in vivo* e *in vitro* de la regulación hormonal con agonistas de GnRH, demostraron en ovarios de ratas un incremento en la atresia folicular. Se determinó que la administración *in vivo* de un análogo de GnRH (GnRH-a) incrementa la muerte celular por apoptosis en tejido ovárico y en CG. Estudios previos de nuestro laboratorio, identificaron un aumento significativo en la proporción de células BGC-1 apoptóticas inducidas durante 24 y 48 Hs con 100 nM de Acetato de Leuprolide (LA) mediante técnicas de DAPI, TUNEL y Anexina V. A los efectos de corroborar y analizar de manera más específica y desde otro punto de vista estos resultados, el propósito del presente trabajo fue comprobar la especificidad del proceso de regulación de la apoptosis con LA mediante el análisis del proceso en presencia de un antagonista de GnRH (ANTIDE). Se realizaron

tres ensayos por triplicado para la determinación de apoptosis por tinción con hematoxilina (análisis morfológico), y dos experimentos por triplicado para la determinación de apoptosis por citometría de flujo (FACS) mediante la marcación de las BGC-1 con Anexina V-FITC y IP, analizando los resultados por ANOVA de dos vías y análisis de comparación de medias de Bonferroni. El análisis morfológico confirmó los resultados obtenidos previamente para la incubación por 24 Hs con 100 nM de LA. El tratamiento con LA arrojó un índice de activación de 2,16 $p= 0.035$. Se observó además, que este efecto fue parcialmente inhibido por la preincubación del cultivo celular con 100 nM de ANTIDE (IA= 1,48 $p= 0.035$), indicando una protección del 68%. De los resultados obtenidos, postulamos que el antagonista "*per se*" no modifica significativamente el comportamiento del control. Los datos obtenidos por citometría de flujo confirman lo observado con hematoxilina. Por lo tanto el efecto inductor de apoptosis en BGC-1 por parte del LA es específico y se da a través del GnRHr.

Inducción de celo en cabras lecheras

CUATRIN, J.¹; PANDO, V.²; LUESO, N.; CATANZARITI, M.J.³

La inducción de celo con inseminación artificial (IA) es una herramienta básica para los programas de mejoramiento productivo en cabras lecheras, aumentando los días de lactancia y el número de crías por animal. Se procedió a inducir celo en 28 cabras lecheras AngloNubian en el periodo de anestro estacional mediante la aplicación de esponjas con 60 mg de Medroxiprogesterona durante 14 días. Al momento de retirar el implante se aplicó 400 UI de gonadotrofina corionica equina (eCG) intramuscular. Se procedió a la IA con semen fresco procedente de dos machos de fertilidad probada del establecimiento. Previamente fueron adiestrados para

la extracción, estas muestras fueron evaluadas para determinar la calidad seminal por técnicas de rutina. Los machos no presentaron disminución de la calidad seminal durante el período no reproductivo. Se inseminó con semen fresco (dosis de 250-300 millones de espermatozoides). Los animales se inseminaron a las 36 y 60 horas de retiradas las esponjas. Se determinó la preñez por ecografía a los 60 días, con un resultado de 23 animales preñados. Concluimos que la inducción de celo en anestro estacional en cabras lecheras es un método efectivo para aumentar la eficiencia productiva (número de cabritos y días de lactancia).

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA y Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Morón, ²Veterinaria, ³Estudiantes de veterinaria.

Fertilidad en ovinos mediante sincronización de estros con Cloprostenol e inseminación artificial

CUETO, M.; GIBBONS, A.

En la actualidad en la especie ovina se utiliza la inseminación artificial con sincronización de estros como herramienta de los programas de conservación, difusión y/o mejoramiento genético. En el presente trabajo se evaluó la fertilidad de distintos tratamientos de sincronización de estros con prostaglandina sintética análoga (Cloprostenol) en ovinos. La experiencia se llevó a cabo en el Campo Experimental del INTA Bariloche (prov. Río Negro), durante la estación reproductiva, con 170 ovejas Merino adultas en estado corporal medio. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente a cada uno de los siguientes tratamientos: a) 2 aplicaciones de 125 microgramos de Cloprostenol, con intervalo de 14 días ($C_{125 \times 2}$) (n= 58), b) 2 aplicaciones de 63 microgramos de Cloprostenol, con intervalo de 14 días ($C_{63 \times 2}$) (n= 60) y c) una aplicación única de 125 microgramos (C_{125}) (n= 52) (Estrumate, Schering-Plough, Argentina). En todos los tratamientos, la detección de estros se llevó a cabo entre las 24 y 96 h post aplicación de la última dosis de prostaglandina. La detección de estros se realizó con machos retajos marcadores de líbido comprobada en una proporción del 8%, efectuándose dos apartes diarios de las ovejas detectadas en estro. La inseminación cervical se llevó a cabo al momento de la detección del

celo. Se colectó semen de 6 carneros adultos Merino mediante vagina artificial. El eyaculado de cada carnero fue mantenido en un baño termostático a 30 °C durante el tiempo de la inseminación (30 minutos). La deposición del semen se realizó con una pistola de inseminación multidosis (SJ Walmur, Uruguay), dosificando un volumen de 0.04 cc y una concentración entre 120-140 millones de espermatozoides totales por oveja. A los 30 días de la inseminación, se evaluó la preñez por medio de ecografías transrectales (Aloka 500, Japón). El análisis de los datos se realizó mediante el procedimiento CATMOD del programa estadístico SAS. Los estros se presentaron entre las 24 y 84 h post última aplicación de prostaglandinas, observándose el menor porcentaje de estros en el tratamiento C_{125} (C_{125} , 75%; $C_{125 \times 2}$, 91%; $C_{63 \times 2}$, 88%) ($P < 0.05$). Asimismo para este tratamiento se evidenció el menor porcentaje de preñez (C_{125} , 48%; $C_{125 \times 2}$, 63%; $C_{63 \times 2}$, 71%) ($P < 0.05$). Se concluye que dos aplicaciones de cloprostenol, distanciadas 14 días, permitieron alcanzar una alta eficiencia reproductiva en la inseminación cervical sobre el primer celo post prostaglandina, recomendándose el tratamiento $C_{63 \times 2}$, debido a su menor costo de aplicación.

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Bariloche, Argentina

InVet. 2008, 10(2): 111-212
ISSN(papel): 1514-6634
ISSN (on line) 1668-3498

Asistencia a la reproducción del cóndor andino (*Vultur gryphus*): Incubación artificial

DE MARTINO, E.; POLLERI, P.; ASTORE, V.; JACOME, N.L.

Desde el año 1991 el Proyecto de Conservación Cóndor Andino (*Vultur gryphus*) de Argentina (PCCA) contribuye al esfuerzo Sudamericano de conservación de esta especie, catalogada en el apéndice I de CITES. Dentro de las acciones ex situ del PCCA se encuentra la incubación artificial de huevos provenientes de parejas en cautiverio, con la finalidad de criar pichones en aislamiento humano para ser devueltos a su ambiente natural. Cada pareja pone un único huevo que será incubado durante 60 días. La cría del pichón requiere de un largo cuidado parental, criando un único pichón cada 3 años. Sin embargo, en cautiverio, es posible obtener una postura múltiple, retirando el primer huevo, la pareja pondrá un segundo huevo, que será dejado a su cuidado. Los huevos retirados de Zoológicos son derivados al Centro de Incubación Artificial del Proyecto. Como objetivo central se plantea utilizar la técnica de puesta múltiple e incubación artificial para aumentar la capacidad reproductiva de la especie. Así mismo se pretende determinar los patrones de tamaño y peso de los huevos. La red de transporte de huevos se basa en dos técnicas. Si los hue-

vos fueron retirados con más de 12 horas de incubación, para cuidar su desarrollo, deben ser transportados en incubadoras portátiles. Pero si fueron retirados con menos de 12 horas de incubación, pueden ser transportados a temperatura ambiente, facilitando su traslado. Una vez llegados al Centro de Incubación son dispuestos en incubadoras Humidaire, modelo 21. Durante este proceso se realizan controles de temperatura, peso y ovoscopias para asegurar el desarrollo del embrión. La red de transporte del PCCA permitió derivar huevos desde zoológicos ubicados en diferentes puntos del país. Incluso fue transportado e incubado con total éxito un huevo proveniente del ZOO de la Habana, en Cuba. De un total de 51 posturas resultó fértil el 53 %. De los 27 huevos fértiles obtenidos por incubación artificial, fue posible lograr el nacimiento del 100 % de los pichones. Y gracias a las técnicas de cría artificial en aislamiento humano, el 100% fueron liberados en ambientes naturales. La incubación artificial demostró ser una exitosa herramienta que brinda un decidido aporte a los esfuerzos de conservación ex situ e in situ que se desarrollan a favor de esta especie.

Recuperación embrionaria continua sin tratamiento superestimuladorio en llamas (*Lama glama*)

EGEY, J.; CARRETERO, M.I.; TRASORRAS, V.L.; CHAVES, M.G.;
CAPDEVIELLE, E.F.; AGÜERO, A.

La superestimulación ovárica es una buena herramienta para lograr el aumento de la eficiencia reproductiva, sin embargo en la llama existe una gran variabilidad en la respuesta ovárica a los tratamientos hormonales. El objetivo del presente trabajo fue obtener embriones a partir de ondas foliculares sucesivas sin tratamiento superestimuladorio. Se utilizaron 9 hembras adultas no gestantes y no en lactancia. Se realizó el monitoreo de la dinámica ovárica por palpación y ultrasonografía transrectal por un período de 60 días. En el momento de presentar un folículo dominante, las hembras recibieron servicio natural junto a una única dosis de 8 µg de buserelina (Receptal®, Intervet, Argentina) vía endovenosa. A las 24 hs recibieron un segundo servicio. La recuperación embrionaria se realizó

mediante un lavaje uterino transcervical el día 8 posterior al primer servicio. Luego del lavaje se aplicó una única dosis de 250 µg de cloprostenol (Estrumate®, Schering-Plough, Argentina) por vía intramuscular para inducir la luteólisis. Se realizaron 5 lavajes uterinos por hembra (total: 45), se recuperaron 24 embriones con una tasa de recuperación de 53,33 % (24/45), 85 % de los cuales se obtuvieron en ondas foliculares sucesivas (17/24). El número de embriones recuperados por hembra fue $2,66 \pm 1,6$ (promedio \pm DE) y el intervalo entre lavajes fue de $13,16 \pm 3,12$ días (promedio \pm DE). En conclusión, es posible obtener en la llama embriones en ondas sucesivas sin tratamientos de superestimulación ovárica, evitando la posible formación de anticuerpos producida por los tratamientos hormonales repetidos.

Desarrollo folicular prenatal en *Myocastor coypus bonariensis* (COIPO)

FELIPE, A.E.¹; ABA, M.²; LOMBARDO, D.M.³

La foliculogénesis en roedores de laboratorio es un proceso posnatal. El fenómeno de ensamblado folicular, con la conformación de folículos primordiales, se inicia al nacimiento. En los rumiantes domésticos y primates, en cambio, tal fenómeno comienza al promediar la gestación. Observaciones previas indicarían que en el coipo (*Myocastor coypus*) el desarrollo folicular es prenatal. El objetivo de este trabajo fue caracterizar cuali y cuantitativamente el desarrollo de los precursores o componentes foliculares en el coipo. Se trabajó con ovarios de fetos de 60, 75, 90, 105, 120 y 135 días poscoito (dpc) de *M. c. bonariensis*. Los órganos se fijaron en formol bufferado y se procesaron hasta su inclusión en parafina. Se realizaron cortes seriados de 5 μm , los cuales se colorearon con hematoxilina y eosina y PAS-hematoxilina. Para la clasificación folicular se aplicó un análisis tipológico sobre la base de los siguientes criterios: diámetro folicular medio (DFM), diámetro medio del gonocito (DG) o del ovocito (DO) y su núcleo, forma, altura y número de capas de las células foliculares, presencia de vacuolas y de tecas. No se consideraron folículos asumidos como en proceso de atresia. En los fetos

de 60 dpc se identificaron gonocitos dispersos (DG $12,6 \pm 3,9 \mu\text{m}$, D nuclear $6,9 \pm 2,8 \mu\text{m}$). En los fetos de 75 dpc se observaron gonocitos dispersos o en acúmulos. A los 90 dpc se encontraron nidos de gonocitos, folículos primordiales (DFM $30,9 \pm 3,4 \mu\text{m}$, DO $25,7 \pm 2,1 \mu\text{m}$), folículos transicionales (DFM $38,1 \pm 1,1 \mu\text{m}$, DO $28,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$) y folículos primarios (DFM $41,6 \pm 14,5 \mu\text{m}$, DO $29 \pm 8,3 \mu\text{m}$) con células foliculares cúbicas. A los 105 dpc se observaron folículos primarios rodeados por una monocapa de células foliculares cúbicas o columnares (DFM $74,3 \pm 9,5 \mu\text{m}$, DO $36,9 \pm 7,7 \mu\text{m}$) o por dos capas de células foliculares ovoidales (DFM $112,6 \pm 1,1 \mu\text{m}$, DO $49,7 \pm 1,2 \mu\text{m}$). En los ovarios de 120 y 135 dpc se determinó la existencia de folículos secundarios, con 3 a 4 capas de células granulosas (DFM $128,1 \pm 5,5 \mu\text{m}$, DO $52,1 \pm 3,1 \mu\text{m}$) y con vacuolas (DFM $138 \pm 16,6 \mu\text{m}$, DO $53,1 \pm 4,3 \mu\text{m}$). A partir de los 120 dpc en torno a los folículos se distinguió una zona de estroma conectivo en disposición anular y límites difusos. Los resultados obtenidos indican que tanto el ensamblado como el desarrollo folicular son procesos prenatales en el coipo.

¹Grupo de Investigaciones Biológicas; ²Laboratorio de Endocrinología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, ³Área de Histología y Embriología, INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

Efecto del sistema de activación del plasminógeno durante la MIV de ovocitos bovinos

FERRERO, M.; JIMÉNEZ-DÍAZ, M.; ROLDÁN-OLARTE, M.; PALMA, G.; MICELI, D.

La investigación sobre el efecto *in vitro* de algunas cascadas proteolíticas en condiciones fisiológicas durante el período preovulatorio en bovinos, como puede ser el sistema de activación del plasminógeno, mejoraría la maduración *in vitro* (MIV), además permitiría conocer algunas de las causas que provocan la baja eficiencia del cultivo de embriones, a fin de incrementar el rendimiento de los sistemas actuales de producción *in vitro* de embriones bovinos. El objetivo consistió en estudiar la participación del sistema de activación del plasminógeno (Plg) en la MIV de ovocitos bovinos. Se localizó al Plg en el gameto femenino, se valoró el efecto de un inhibidor de la actividad de plasmina (ácido ϵ -amino caproico, EACA) y de un activador exógeno del Plg (estreptoquinasa, SK), sobre diferentes parámetros relacionados con la MIV. Las variables estudiadas en los distintos grupos experimentales fueron la expansión del cúmulo, la disgregación de las células del cúmulo (CCs), el porcentaje de ovocitos con primer cuerpo polar y la resistencia de la zona pelúcida (ZP) a la digestión con pronasa al 0,4%. Se utilizaron ovocitos bovinos inmaduros y se maduraron *in vitro* en un medio libre de suero en presencia de EACA o SK. En todas las experiencias las drogas se adicionaron al inicio o al inicio y mitad del pro-

ceso y los resultados se evaluaron finalizada la MIV. Mediante inmunofluorescencia indirecta localizamos al Plg en la ZP, espacio perivitelino y CCs de ovocitos inmaduros y en la membrana plasmática en los madurados *in vitro*. La presencia de EACA (100 mM) en el medio de maduración inhibió la expansión del cúmulo y disminuyó la disgregación de las CCs. Se observó un porcentaje inferior al control, de ovocitos con primer cuerpo polar, posiblemente debido a un retardo en la expulsión del mismo. Se comprobó que el EACA no afectó la viabilidad de los ovocitos madurados *in vitro* ya que los mismos continuaron su desarrollo embrionario luego de ser fecundados. La MIV en presencia de SK (35×10^{-3} UI/L) aumentó el porcentaje de ovocitos maduros con expansión y/o disgregación de las CCs e incrementó significativamente el porcentaje de ovocitos con primer cuerpo polar. Al parecer la formación de plasmina, por la activación del Plg con SK, actuaría degradando la matriz extracelular de las CCs incrementando la disgregación de las mismas, lo que a su vez favorecería la expulsión del primer polocito observándose un mayor porcentaje de ovocitos maduros. En las condiciones de nuestros ensayos la SK no afectó el tiempo de disolución de la ZP, mientras que el inhibidor de plasmina produjo un endurecimiento.

La prevalencia de anticuerpos para el virus de la diarrea viral bovina (VBVD) en rebaños bovinos de la provincia de Rio Grande Do Sul (Brasil) en el período de 2003 a 2008

FINGER, P.F.; SIEDLER, B.S.; MUNHOZ, L.S.; CAETANO, C.F.; VILELA, C.O.; FERREIRA, L.N.; FISCHER, G.; VARGAS, G.; VIDOR, T.; HÜBNER, S.O.

La diarrea viral bovina (BVD) es considerada una de las más importantes enfermedades virales que afectan mundialmente a los bovinos, causando pérdidas económicas significativas para la actividad pecuaria. La mayor parte de las infecciones causadas por el virus de la BVD son subclínicas, pero el virus puede causar problemas digestivos, respiratorios y principalmente reproductivos. Este estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia de los animales seropositivos para el virus de la VBVD en 25 municipios de la provincia de Rio Grande do Sul, además de presentar resultados obtenidos de una investigación hecha en 85 propiedades de Chuy y Santa Vitória do Palmar. En el laboratorio de Virología e Inmunología de la UFPel, durante el período de enero de 2003 a junio de 2008, fueron analizadas 1.776 muestras de suero de bovinos no vacunados, con o sin los signos clínicos de la infección. La determinación de anticuerpos fue realizada a través de la prueba de seroneutralización, que

es la prueba de laboratorio oficial para BVD. Durante el año de 2003 fueron analizados sueros de 313 bovinos detectándose el 47,5% (150/313) de los animales seropositivos para el virus de la BVD, en 2004 de 272 muestras fueron positivos el 64% (174/272), 74,7% (343/459) en 2005, 83% (348/419) en 2006, 71% (120/169) en 2007 y 59% (85/144) en 2008. Todas las ciudades analizadas presentaron por lo menos un bovino seropositivo. De los 1.776 animales evaluados en este período 1.220 de fueron seropositivos. En la investigación hecha en los municipios de Santa Vitória do Palmar y Chuy, de 1.734 muestras analizadas, 1.150 (66,32%) fueron positivas, detectándose bovinos serológicamente positivos en 70 (82,35%) de las propiedades. De los datos obtenidos en este estudio se puede afirmar que hay una alta prevalencia de animales con anticuerpos para BVD en los municipios evaluados, la cual se mantuvo elevada durante los últimos cinco años.

¹Laboratorio de Virología e Inmunología, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas

Efecto de la exposición de semen congelado al ambiente por distintos tiempos evaluado mediante el sistema casa

GARCIA GUERRA, A.; ETCHEVERRY, M.P.; LARRABURU, G.; BROGLIATTI, G.M.

Uno de los factores claves para una criopreservación exitosa es mantener las pajuelas por debajo de -130°C para evitar el daño celular. Fue reportado que la exposición de pajuelas de semen a temperatura ($T^{\circ}\text{C}$) ambiente durante más de 15 segundos elevaba la $T^{\circ}\text{C}$ por encima de los -130°C y reducía la motilidad espermática evaluada por métodos subjetivos. El sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer) permite evaluar parámetros de motilidad en forma objetiva y con alta repetibilidad. Se evaluó el efecto de la exposición de semen congelado en pajuelas de 0.5 ml por 15; 30; 60 o 120 segundos a $T^{\circ}\text{C}$ ambiente evaluado por sistema CASA. Se diluyeron 33 eyaculados de diferentes toros (88% británicos) utilizando un medio químicamente semi-definido (Andromed, Minitub) y posteriormente congelados en un freezer automático (Digicool, IMV). Cinco pajuelas por toro fue-

ron utilizadas una para cada tiempo de exposición. Las muestras fueron expuestas a temperatura ambiente ($15^{\circ}\text{C} \pm 0.78$) según los distintos tiempos y luego introducidas nuevamente en nitrógeno líquido. El descongelado de las pajuelas fue realizado a $37^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Los parámetros de motilidad se evaluaron por IVOS Sperm Analyzer (Hamilton Thorne Research). Dos cámaras de 20 μm de profundidad y 5 campos por cámara fueron evaluadas (30 cuadros/0.5 seg. por campo). Se registraron 7 parámetros: % de Espermatozoides Motiles; % de Espermatozoides Progresivos; VAP (Velocidad promedio de paso, $\mu\text{m}/\text{s}$); VCL (Velocidad de paso, $\mu\text{m}/\text{s}$); ALH (Amplitud lateral, μm); BCF (Frecuencia por golpe, Hz) y LIN (Linealidad, %). La prueba de Kruskal-Wallis se usó para comparar las variables entre los grupos. La tabla indica Parámetros de motilidad:

Seg.	% Mot.	% Prog.	VAP	VCL	ALH	BCF	LIN
0''	61 \pm 13 ^a	35,6 \pm 8 ^a	108,3 \pm 13	189,4 \pm 27	8 \pm 1	27 \pm 3	44,8 \pm 3
15''	59 \pm 16 ^a	35,6 \pm 10 ^a	106,7 \pm 16	189,9 \pm 25	7,8 \pm 1	28,2 \pm 3	45,3 \pm 3
30''	57,2 \pm 13 ^a	34,30 \pm 8 ^a	107,6 \pm 14	192,7 \pm 25	7,9 \pm 1	27,3 \pm 3	45 \pm 3
60''	32,6 \pm 16 ^b	19,6 \pm 9 ^b	102,6 \pm 11	181,3 \pm 23	7,9 \pm 1	27,2 \pm 3	45,5 \pm 3
120''	1 \pm 2 ^c	0,7 \pm 1 ^c	-	-	-	-	-

Se encontraron diferencias significativas en el % de espermatozoides motiles y progresivos a exposición mayor de 30 seg. Las células vivas mostraron similares características de motilidad

(VAP, VCL, ALH, BCF y LIN). Estos resultados sugieren que la motilidad espermática se vería seriamente afectada por una exposición mayor a 30 segundos.

Centro Genético Bovino Eolia S.A., Marcos Paz, Argentina.

Use of low-density lipoprotein as non-penetrating cryoprotectant in extenders for ovine frozen semen

GASTAL, G.D.A.; TONIETO, R.A.; GOULARTE, K.L.;
SCHIAVON, R.S.; LUCIA, T.JR.

Artificial insemination with frozen semen is a valuable tool for spreading genetic improvement to commercial herds, but its use in ovine has been limited. A factor that limits the expansion of this technique is the composition of the available semen extenders. The aim of this study was to evaluate the efficiency of the inclusion of low-density lipoprotein (LDL) as a non-penetrating cryoprotectant in comparison with the conventional use of egg yolk in extenders for freezing ram semen. The semen donors were five rams with age ranging from 23 to 36 months. Eight semen collections were conducted, using an artificial vagina, corresponding to 40 ejaculates. Only samples having sperm motility equal or higher than 80% and vigor of at least 4, at the time of semen collection, were evaluated. Four freezing treatments were compared: control (T1), consisting of TRIS, 20% egg yolk and 110mM trehalose; and three treatments consisting of TRIS with replacement of egg yolk by LDL and including 5% glycerol (T2); 110mM trehalose (T3); and both 5% glycerol and 110mM trehalose (T4). Sperm motility after thawing was evaluated in an optical microscope. Sperm membrane integrity was

evaluated through the fluorescent stains *carboxifluoresceine diacetate and propidium iodide* whereas acrosome integrity was evaluated through the *Lectin from Arachis hypogaea FITC conjugate* stain, in an epifluorescence microscope (WU of 450-490 nm). All evaluations were conducted by the same trained technician. Analysis of variance with repeated measures was used for comparisons of parameters of semen quality among treatments, with the effect of individual rams nested within treatments. Post-thawing motility did not differ ($P > 0.05$) for T1 (31.2%) and T4 (32.5%). However, both these treatments presented motility inferior ($P < 0.05$) to T2 and T3 (43.5% and 41.7%, respectively). Sperm membrane integrity was similar ($P > 0.05$) for T2, T3 and T4 (22.9%, 24.9% and 19.3%, respectively), but only T2 and T3 differed ($P < 0.05$) from T1 (14.9%). Acrosome integrity did not differ ($P > 0.05$) for T1, T2, T3 and T4 (36.0%, 38.5%, 36.7% and 38.3%, respectively). These results indicate that LDL can replace egg yolk as a non-penetrating cryoprotectant in the composition of extenders for freezing ram semen, including either glycerol or trehalose as penetrating cryoprotectants.

La anandamida capacita a los espermatozoides bovinos posiblemente a través de la vía de acción de la heparina

GERVASI, M.G.; PEREZ MARTINEZ, S.

La anandamida (AEA) es un mediador lipídico que participa en diferentes procesos reproductivos. Los niveles de AEA endógenos están regulados principalmente por la acción de la hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH), enzima que degrada AEA. Previamente demostramos mediante un modelo *in vitro* de interacción espermatozoide-oviducto (ESP-CEO) en bovinos que concentraciones nanomolares [nM] de AEA o Met-AEA (análogo estable de AEA) inhiben la unión y promueven la liberación de los ESP unidos a las CEO a través de la activación de los receptores de cannabinoides CB1 y TRPV1. Considerando que la capacitación espermática es una de las posibles causas de la liberación de los ESP del epitelio oviductal, en el presente trabajo nos propusimos estudiar si la AEA actúa como un agente capacitante en bovinos y evaluar una posible relación con la vía que involucra a la heparina (conocido agente capacitante en bovinos). Para ello, se realizaron estudios de capacitación *in vitro* de ESP con concentraciones crecientes de Met-AEA. Luego de 45 min de incubación se observó, mediante la técnica de clortetraciclina, que la Met-AEA, solamente a [nM], produjo un aumento del n° de ESP con patrón B (capacitados) (t 0: 9,3±1,2%; t 45 Met-AEA [nM]: 23,9±3,2%; p<0,001). También se evaluó la

inducción de la reacción acrosomal por lisofosfatidilcolina de los ESP capacitados con Met-AEA [nM] mediante la técnica de aglutinina *Pisum sativum* conjugada con isotiocianato de fluoresceína. Los ESP capacitados con Met-AEA [nM] presentaron un 15% de patrón R (reaccionado) similar a los capacitados con heparina. Mediante la técnica de Western blot se encontró que tanto las CEO como los ESP bovinos expresan a la enzima FAAH. Para estudiar la posible relación entre las vías de heparina y AEA se midió la actividad de la FAAH en ESP capacitados con heparina (60µg/ml). Luego de la capacitación se produjo una disminución significativa de la actividad de FAAH respecto a los ESP no capacitados: (ESP no cap= 104,6±5,4; ESP cap= 74,7±6,7 nmolAA/mgprot*h; p<0,004) sugiriendo indirectamente un aumento endógeno de AEA. Luego se capacitaron ESP con heparina en presencia de antagonistas de los receptores CB1 y TRPV1. La presencia de los antagonistas en el medio inhibió la capacitación de los ESP por heparina (Hep: 18,1±3,9%; Hep+Ant-CB1: 9,9±3,1%; Hep+Ant-TRPV1: 7,5±1,9%; p<0,02). En conjunto, estos resultados sugieren que la AEA [nM] actúa como un agente capacitante en bovinos y que la vía de acción de la misma podría estar involucrada con la de la heparina.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, Facultad de Medicina, UBA-CONICET

InVet. 2008, 10(2): 111-212
ISSN(papel): 1514-6634
ISSN (on line) 1668-3498

Vitrificación de embriones ovinos en tips

GIBBONS, A.¹; PEREYRA BONNET, F.²; SILVESTRE, P.¹; CUETO, M.¹

La vitrificación de embriones ovinos en pajuelas cerradas o abiertas (OPS; Open Pulled Straws) ha sido informada como una técnica que permite una eficiencia reproductiva similar a la técnica de congelamiento lento. Sin embargo, el procesamiento en pajuelas requiere elevada pericia. Nuestro objetivo fue evaluar la viabilidad de embriones vitrificados en tips de micropipetas. Un total de 25 ovejas Merino recibieron un tratamiento hormonal para la ovulación múltiple mediante esponjas intravaginales (60 mg de MAP, Syntex, Argentina), 200UI eCG (Novormon, Syntex, Argentina) y (80 mg/ovejas de pFSH, Folltropin V, Bioniche, Canadá). Se realizó una inseminación artificial laparoscópica con semen congelado, a las 12 h post celo, utilizando 100×10^6 espermatozoides totales. A los 8 días post retiro de esponjas, se realizó la recuperación quirúrgica de embriones con solución buffer fosfato (PBS) suplementado con 10% de suero bovino adulto y 1% de antibiótico. Se procedió a la vitrificación inmediata de los embriones recuperados (Mórulas compactas n= 66, Blastocistos n= 38) según el procedimiento descrito por Martínez y col. (2006) en base a Glicerol (G) y Etilenglicol (E). Los medios de vitrificación y descongelamiento se prepararon en base de PBS con

20% de suero fetal bovino y se utilizaron a temperatura ambiente (25 °C). Brevemente, el procedimiento para la vitrificación se realizó en tres pasos sucesivos de inmersión de los embriones: 1) G 10% (5'), 2) G 10% + E 20% (5') y 3) G 25% + E 25% (30"). A continuación fueron aspirados en tips con 1.5 uL de medio (2 embriones/tip) y sumergidos en criotubos con N₂. El descongelamiento se realizó «al aire» a 37 °C durante 6". Inmediatamente los embriones fueron colocados en una solución de G 12.5% + E 12.5% + Sucrosa (S) 0.5M (5'). Posteriormente se pasaron por dos soluciones de 0.25 M y 0.125 M de S (5'). Finalmente los embriones fueron lavados 2 veces en PBS (2.5' por solución). Los embriones fueron cultivados en estufa en medio TCM 199 a 39°C con 6.5% CO₂, 100% humedad durante 72 h. La tasa de eclosión embrionaria fue del 50% (33/66) para las mórulas y 81.6% (31/38) para los blastocistos (P<0.05). Estos resultados sugieren que en ovinos es conveniente vitrificar los embriones cuando conforman su blastocelo. Esta técnica es sencilla de realizar y de bajo costo, por lo que se facilita su aplicación. La posterior viabilidad de los embriones vitrificados deberá ser validada mediante transferencias embrionarias.

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Bariloche, CC 277 (8400) Bariloche, Argentina. ²Lab. Biotecnología de la Reproducción, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Análisis comparativo entre tres técnicas de evaluación de integridad y funcionalidad de membrana en espermatozoides de cerdo

GONZÁLEZ, L.; CAMPI, S.; BLASI, C.; GARCÍA, C.; CISALE, H.

Los diferentes procesos a los que es sometido el eyaculado en el laboratorio afectan a las membranas espermáticas. La ruptura de las mismas se produce por modificaciones en su organización, permeabilidad y composición lipídica, que llevan a la pérdida de la viabilidad celular y a alteraciones en la funcionalidad de la membrana. De esto surge la necesidad de implementar pruebas de laboratorio que evalúen estos aspectos. El objetivo del presente trabajo fue analizar estadísticamente la homogeneidad de resultados existente entre las pruebas que evalúan la integridad funcional y estructural de la membrana espermática del cerdo doméstico, con el fin de determinar si puede prescindirse del empleo de alguna de ellas en la rutina de evaluación seminal. Se obtuvieron 14 eyaculados de 3 padrillos adultos fértiles por la técnica de la mano enguantada. Las muestras fueron sometidas al protocolo habitual de evaluación en nuestro laboratorio que incluye, entre otras, las pruebas de viabilidad y funcionalidad. Entre las primeras tenemos la técnica de CFDA/PI (carboximetilfluoresceína

diacetato/ yoduro de propidio) y la de eosina-nigrosina, que evalúan la integridad estructural de la membrana. Entre las segundas, el HOS test (Hypoosmotic Swelling test), que evalúa también la funcionalidad de membrana. Los resultados obtenidos fueron procesados estadísticamente utilizando el Test de Kruskal-Wallis. La distribución de los resultados obtenidos de las pruebas de CFDA/PI y eosina-nigrosina fue homogénea ($p < 0,05$), mientras que los de la prueba de HOS fueron estadísticamente diferentes respecto de los anteriores. La homogeneidad encontrada entre las pruebas que evalúan la integridad estructural de las membranas permite considerar que sería indistinto el uso de cualquiera de ellas para evaluar dicha propiedad pudiendo optar por la que mejor se adapte a las características del laboratorio. Si bien el empleo de CFDA es considerado por algunos autores como una prueba que evalúa la integridad funcional de las membranas espermáticas, no guardaría relación con el HOS test que evalúa el mismo parámetro.

Decondensación *in vitro* de núcleos espermáticos porcinos

GONZÁLEZ, L.; CAMPI, S.; CISALE, H.; TORRES, P.; GARCÍA, C.; FERRARI, M.

La reducción de los puentes de sulfuro de la cromatina espermática constituye una etapa clave en el proceso de fertilización. El objetivo del presente trabajo fue implementar una técnica de decondensación *in vitro* de núcleos espermáticos porcinos a fin de analizar el proceso de decondensación y establecer patrones morfológicos de los núcleos de condensados. La decondensación se indujo con ditionitrotol (DTT 0,5%), y el grado de la misma se observó con azul de toluidina (TB). Los núcleos muy compactados son incoloros, y de acuerdo al grado de decondensación azul claro o violeta. El porcentaje de núcleos incoloros en los controles (sin tratamiento con DTT) fue > 99%. Después de 2 minutos de tratamiento con DTT el porcentaje de núcleos coloreados fue > 98%. Al aumentar el tiempo de tratamiento con DTT hasta 30 minutos los núcleos espermáticos modificaron levemente su morfología. La evaluación de estos cambios por el observador era incierta debido a lo sutil de las modificaciones. Sin embargo, si el tratamiento con DTT se complementaba con una incubación de 2 minutos en dodecilsulfato (SDS 0,5 %) se discriminaban núcleos con diferente morfología. El

SDS es un detergente que destruye las membranas, lo que permite observar la distribución de la cromatina según su grado de decondensación. Para establecer el tiempo óptimo de tratamiento con DTT las muestras se incubaron durante 2, 6, 10, 14, 18, 24 y 30 minutos, y luego cada una se trató 2 minutos con SDS. En una muestra, sometida a estrés térmico, con presuntos daños en la cromatina espermática, 30 minutos de exposición a DTT resultaron excesivos, ya que se observaron núcleos muy difusos. A los 6 minutos de tratamiento con DTT algunos eyaculados tenían núcleos con modificaciones en la forma, y luego de 14 minutos en todas las muestras había núcleos espermáticos de condensados con notorias modificaciones en la morfología. Ambas dimensiones (largo y ancho) de los núcleos espermáticos llegaron a presentar un incremento del 60 %. La forma cóncava normal del cuello se hizo recta y la base del núcleo se ensanchó, presentando un tamaño similar al eje transversal. El estudio de la decondensación de la cromatina espermática permitirá evaluar muestras de semen porcino provenientes de individuos con diferente fertilidad y/o sometidas a distintas formas de conservación.

Pregnancy in ewes after transcervical artificial insemination with semen frozen in extender including trehalose as cryoprotectant

GOULARTE, K.L.¹; SCHIAVON, R.S.¹; CORCINI, C.D.¹; SCHUCH, R.²; ZANELLA, E.L.²; LUCIA, T.JR.¹

Artificial insemination (AI) with frozen semen is important for genetic improvement, but the use of such technique is still limited in Brazil. That fact is commonly attributed to the inefficiency of the available semen extenders and to the anatomical structure of the ewe's cervix, which prevents the penetration of conventional catheters, thus limiting the survival of frozen sperm cells. The objective of this study was to evaluate the efficiency of an extender including trehalose as cryoprotectant on the pregnancy rate of ewes, following transcervical AI with frozen semen. Four semen collections, using artificial vagina, were conducted on a sexually mature Suffolk ram. Mean sperm motility evaluated by optical microscopy was equal to 87.5%. The ejaculates were divided in two treatments: Control (T1), consisting of TRIS-glucose including 5% glycerol (n = 15 ewes); and T2, consisting TRIS-glucose including 100 mM trehalose (n = 16 ewes), which was efficient in previous *in vitro* trials, conducted by our research group. Semen samples were

packaged in 0.25 mL straws, with a concentration of 100×10^6 spermatozoa. Straws were thawed at 37° C during 30 s. The ewes, all from the Suffolk breed, had their estrus synchronized, with the use of an intravaginal device impregnated with 60 mg Medroxi-progesterone acetate, which was kept for 12 days. At the time of the device's removal, 400 UI of eCG were administered IM to each ewe. Transcervical AI was conducted by the same technician, 48 h after the device's removal. Pregnancy diagnosis was conducted 35 days after AI, through ultrasound. Pregnancy was generally low: 3 pregnant ewes in T1 (20.0%); and 2 in T2 (12.5%). Considering the low pregnancy rates observed in both treatments, these results are inconclusive concerning the role of trehalose as a cryoprotectant in extenders for frozen ram semen. The unsatisfactory pregnancy rates observed in this study may be due to factors related to the transcervical AI itself, such as traumas inflicted during the procedure or the incapacity of depositing semen in the cervix.

¹Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil. ²Faculdade de Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo-RS, Brasil

Control de la vía glucolítica durante la maduración de COCs bovinos *in vitro*

GUTNISKY, C.; PINTOS, L.N.; DALVIT, G.C.; BECONI, M.T.; CETICA, P.D.

La presencia de glucosa en el medio de cultivo es necesaria para el progreso de maduración del ovocito bovino *in vitro*. Parte de la glucosa consumida por los complejos ovocito-cumulus (COCs) tiene como destino la vía glucolítica. Las células del cumulus son las encargadas de catabolizar glucosa para obtener energía y además proveer piruvato y/o lactato como sustratos oxidativos al ovocito. El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de depresores (NaF y ATP) y estimuladores (AMP) de la vía glucolítica sobre el consumo de glucosa (CG) y la producción de lactato (PL) de los COCs y la maduración nuclear del ovocito. Los COCs inmaduros se obtuvieron por aspiración de folículos ováricos antrales provenientes de ovarios de vacas de faena. Se seleccionaron para las experiencias solamente ovocitos rodeados por un cumulus denso y compacto. La maduración se realizó en medio 199 suplementado con 5% de FBS, FSH + LH (Control), NaF (2, 3, 4 y 5 mM) o ATP (1, 10, 20 y 40 mM) o AMP (1, 10, 20 y 40 mM). Además se estudió el efecto del AMP sin el suplemento de FSH + LH. Para el cálculo del CG y la PL se

determinó la concentración de estos compuestos en el medio de cultivo por espectrofotometría. La maduración nuclear del ovocito se evaluó por la presencia de la placa cromosómica en metafase II. Los COCs madurados en presencia de NaF y ATP mostraron una inhibición dosis dependiente en el CG y la PL y el porcentaje de maduración nuclear de los ovocitos ($p < 0,05$). En presencia de FSH + LH, la suplementación con AMP no produjo cambios significativos en el CG y la PL respecto del control, sin embargo en ausencia de gonadotrofinas se obtuvo un efecto estimulador dosis dependiente sobre el CG y la PL ($p < 0,05$). La suplementación del medio con AMP en presencia o ausencia de gonadotrofinas no modificó el porcentaje de maduración nuclear. Los resultados muestran que la actividad de la vía glucolítica del COC es fundamental para la maduración nuclear del ovocito bovino. El AMP produciría un aumento en el consumo de glucosa durante la maduración *in vitro* por estimulación de la vía glucolítica en el COC bovino pero éste efecto no sería sinérgico al de las gonadotrofinas.

Variabilidad estacional de la calidad seminal en dos razas de conejos

HOZBOR, F.¹; CAMPISANO, S.²; BLED, L.; CANO, A.¹; SANCHEZ, E.¹; ALBERIO, R.¹

El objetivo fue describir la variabilidad de la calidad seminal de dos razas de conejo a lo largo del año en la EEA INTA Balcarce (37° 45' LS y 58° 18' LO). Se usó 20 conejos machos adultos de las razas Californiana (C) (n=9) y Blanco de Nueva Zelanda (B) (n=10). El semen fue obtenido mediante vagina artificial (43° C), semanalmente durante 12 meses consecutivos. Se retiró el tapón mucoso antes de evaluar. Se evaluó volumen (VL), movilidad masal microscópica (MM), motilidad espermática total (MET), concentración (Cc) (10⁶ ml⁻¹), número total de espermatozoides (NTE) (V x Cc; 10⁶) y morfología (PN). Para su análisis las muestras fueron agrupadas por estación del año. Los datos se analizaron con el PROC GLIMMIX (SAS) con distribución gamma y función de enlace canónica. La interacción raza*estación resultó significativa para la variable VL, correspondiendo los valores más bajos a la raza C en el otoño (O) (439,2±27,4µl), y los más elevados a B en las estaciones invierno (I) y primavera (P) (764,1±38,1 y 686,7±36,0µl respectivamente). MM presentó gran variabilidad, observándose en primavera (P) la frecuencia más alta de eyaculados con MM buena ($p<0,05$); la más baja correspondió a O. No se observaron

diferencias entre estaciones en las frecuencias de MM media y mala. En la raza B se hallaron frecuencias más elevadas de MM buenas y medias. La Cc fue similar en ambas razas (558,7±57,1 y 494,2±19,5, para C y B respectivamente), con valores significativamente más altos en O (718,7±57,8) y los más bajos en I y P (439,2±26,6 y 460,2±27,1, respectivamente); en verano (V) se determinaron valores intermedios (560,2±38,9). El NTE fue más elevado en la raza B que en la C (431,4±16,8 y 300,7±15,1 respectivamente) ($p<0,05$), observándose en O los valores más altos (424,3±25,2). En la MET, no se hallaron diferencias entre razas o estaciones. La interacción entre estos efectos tendió a ser significativa ($p=0,077$), observándose la diferencia más marcada entre razas en V (84,97±4,0 y 73,1±2,8% para C y B). La interacción estación*raza resultó significativa para la variable PN, observándose en O y V valores significativamente más elevados en la raza C vs. B. En la raza C, en O se hallaron los valores más altos de PN; los más bajos correspondieron a V (79,9±0,02 y 70,5±0,02%, respectivamente). En B los valores más altos de PN corresponden a P, y los más bajos a V (75,3±0,02 y 48,1±0,02%, respectivamente).

¹EEA INTA Balcarce; ²Fac. de Cs. Exactas y Naturales, UNMdP.

Recuperación de un pool de germoplasma para la formación de un núcleo genético de ovejas frisonas

IORIO, G.¹; BIDONE, M.²; GHIRARDI, P.³; VEKSLER, J.³

El pool genético de ovinos Frisones es escaso en nuestro país. A partir de una partida de semen congelado que se había descartado por falta de resultados en un ensayo de inseminación artificial (IA), se procedió a la reevaluación del mismo y su posterior utilización en un nuevo programa de IA por vía laparoscopia intrauterina (VLIU). El pool de semen congelado en pastillas (9 y 15 años de antigüedad) fue evaluado en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA considerándose apto para el programa. Fueron inducidas 21 ovejas mediante sincronización con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona con esponjas comerciales, las mismas fueron retiradas 14 días después, aplicando el día de retiro 250 UI de gonadotropina corionica equina intramuscular. Se sacó celo mediante retajo por 48 horas y se procedió a la IA VLIU a las

60 horas de retiro de la esponja. Las ovejas se inseminaron con una dosis por cuerno salvo 1 animal que se inseminó con media dosis. Los ovarios fueron observados por vía laparoscopia para corroborar ovulación. El diagnóstico de gestación se realizó 36 y 70 días posteriores a la IA por ultrasonografía obteniendo al día 36: 5 preñeces simples, 1 doble y 3 dobles dudosas y al día 70: 5 preñeces simples, 4 dobles y una muerte fetal. El % de preñez a 40-60 días fue de 61,9%. Concluimos que la IA por VLIU es un método útil para recuperar genética Frisona en nuestro país. La utilización de la VLIU permite ajustar las dosis inseminantes con semen conservado durante mucho tiempo (9-15 años), con algunos índices de evaluación *in vitro* posdescongelación regulares o pobres, permitiendo el aprovechamiento de esta genética.

¹Area de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA y Tecnogen, ²Area de Medicina I, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA y Tecnogen, ³Area de Producción de Ovinos, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA

Efecto del tiempo de maduración en el desarrollo de embriones equinos

JARAZO, J.; GAMBINI, A.; OLIVERA, R.; BERTOLA, M.E.; SALAMONE, D.

La activación química es fundamental para asistir técnicas de producción de embriones in vitro como la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) o la clonación. Los ovocitos equinos al ser activados solamente con ionomicina y 6-dimetilamino purina (DMAP), presentan baja tasa de desarrollo. Con el objetivo de mejorar estos resultados se evaluó la influencia del tiempo de maduración en la producción de embriones equinos por activación partenogénica. A partir de ovarios provenientes de matadero, los ovocitos fueron recolectados mediante aspiración de folículos entre 5 y 30 mm, usando PBS- adicionado con 45 UI/ml de heparina, 0.1mM de piruvato de sodio y 0,3% BSA. Fueron puestos a madurar en microgotas de 100µl del medio de cultivo TCM 199 suplementado con 5% SFB, 200 ng/ml de FSH y antibiótico-antimicótico cubiertas por aceite mineral a 39°C en una atmosfera de 5% CO₂, asignando a los ovocitos a uno de los siguientes grupos: I) 26 horas (n=54) y II) 44 horas

(n=90). Cumplido dichos tiempos fueron desnudados por vortexeo en 1mg/ml de hialuronidasa en PBS- durante 3 minutos. La activación fue realizada en el medio TALP-Hepes con 5µM de ionomicina por 4 minutos y 2 mM de 6-dimetilamino purina (6-DMAP) por 3 hs, enjuagando luego los ovocitos en TALP- Hepes y co-cultivándolos con células del cumulus por 7-9 días en las mismas microgotas utilizadas para la maduración. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con test de Fisher. Nuestros resultados sugieren, que al aumentar el tiempo de maduración se obtienen mejores tasas de clivaje (grupo I n=9, 16,7%; grupo II n=31, 34,4%; $p < 0,05$), y si bien no hubo diferencia estadística, solo se alcanzó el estadio de blastocisto en los madurados durante 44 horas (n=4 blastocistos; 4,4%). En conclusión, el desarrollo in vitro de los embriones equinos luego de la activación partenogénica, podría ser incrementado prolongando el tiempo de maduración.

Vitrification of immature equine oocytes in solid surface

LEON, P.M.M.¹; CORCINI, C.D.¹; SANTOS, E.C.S.²; RAMBO, G.¹; LUCIA, JR.T.¹; DESCHAMPS, J.C.¹

Vitrification is a promising, simple, cheap and less time consuming cryopreservation technique for use in assisted reproduction. The aim of this study was to evaluate the cryopreservation of immature equine oocytes by solid surface vitrification (SSV) through analysis of their membrane integrity and *in vitro* maturation rate. From 418 ovaries collected in a slaughterhouse, 1001 cumulus-oocyte complexes (COC) were collected and divided in 3 treatments: control without vitrification; vitrification in open pulled straws (OPS); and SSV. For the SSV, it was developed an aluminum plate which was kept at -176°C, until it was immersed in liquid nitrogen. The COC were directly placed in that plate's surface. The thawed COC were matured *in vitro* and evaluated by staining with Hoechst 33342, fluoresceine diacetate and propidium iodide. Maturation rate for SSV (11.7%, 49/

420) was lower ($P = 0.03$) than for the OPS (17.3%, 54/312). Rates for both vitrification methods were inferior ($P < 0.0001$) than that observed for the control group (50.9%, 137/269). Vitrification was also associated ($P < 0.0001$) with reduction in the membrane integrity of COC, in comparison between control group (76.6%) and treatments (25.5% for SSV and 30.8% for OPS). The new vitrification methods tested are based on the use of reduced volume of vitrification solutions and on short exposure of oocytes to cryoprotectants, so cryoinjuries would be prevented as a function on the increase on both cooling and warming rates. In this study, the SSV was less efficient than the OPS, regarding *in vitro* oocyte maturation, nevertheless the SSV allowed immature equine oocytes to restart meiosis while keeping membrane integrity.

¹Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Veterinária, ²Centro de Biotecnologia - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS. Brasil. CEP-96010-900.

Concentración residual de acetato de medroxiprogesterona en dispositivos intravaginales utilizados para sincronizar el estro en bovinos

MANES, J.; FERNANDEZ, E.; HOZBOR, F.; ALLER, J.; ALBERIO, R.

El uso de progestágenos y otros esteroides como herramientas para inducir y sincronizar el celo en animales es conocido desde hace más de tres décadas. Uno de estos tratamientos consiste en administrar el progestágeno en un dispositivo de poliuretano colocado dentro de la vagina de la hembra bovina durante 8 días aproximadamente. Actualmente el progestágeno más utilizado es el acetato de medroxiprogesterona (MAP). El objetivo de este trabajo fue determinar la concentración residual de MAP y su variación a lo largo de un tratamiento de 8 días en los dispositivos intravaginales. Se utilizaron 48 vacas Angus multíparas sin cría al pie, 32 de ellas recibieron esponjas impregnadas con 200 mg de MAP (GrupoMAP), el resto de los animales (16) recibieron las esponjas sin impregnar (grupo control). Diariamente, desde el inicio (día cero=colocación de la esponja) se extrajeron 4 dispositivos de las vacas GrupoMAP y 2 del grupo control. El contenido inicial de MAP (dosis real) se determinó previamente, sobre un total de 12 dispositivos. El nivel de MAP residual y real se midió mediante espectro-fotometría. La curva patrón se construyó con valores de absorbancia obtenidos de concentraciones conocidas (0 a 0,020

ng/ 100 ml) y que fueron determinados a una longitud de onda de 241 nm. La recuperación del MAP se realizó mediante el lavado de los dispositivos con 200 ml de cloroformo. Cada solución fue filtrada utilizando un filtro SS banda azul, n° 42. Para el cálculo de la concentración residual y real del progestágeno se utilizó la siguiente fórmula: $a = b \times c$ (donde: a = mg de MAP inicial, b = mg de MAP en la muestra, c = 1:20000 factor de dilución). Las diferencias estadísticas para el nivel residual de MAP entre días se determinaron por análisis de varianza. La dosis real de MAP fue de $193 \pm 53,9$ mg (media \pm D.E.). La concentración residual de MAP no mostró variaciones significativas ($p > 0,05$) entre los sucesivos días en que fueron siendo retiradas las esponjas (Día 0: $140,6 \pm 22,9$ mg; Día 1: $119,8 \pm 11,5$ mg; Día 2: $107,5 \pm 9,7$ mg; Día 3: $104,8 \pm 34,4$ mg; Día 5: $78,8 \pm 16,3$ mg; Día 6: $109,8 \pm 25,3$ mg; Día 7: $85,4 \pm 21,0$ mg y Día 8: $106,1 \pm 40,9$ mg). El 55% de MAP permaneció en las esponjas después de 8 días de tratamiento. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la dosis de progestágeno usada en las esponjas para sincronizar estro en las vacas durante 8 días, no fue completamente liberada de las mismas.

Producción láctea, variables reproductivas y altura en vacas lecheras en su tercera lactancia

MARINI, P.R.; KRUPICK, M.; HAUMULLER, J.P.; CHARMANDARIAN, A.R.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la relación entre producción de leche, reproducción y altura en vacas lecheras de tercera lactancia. Se utilizaron 401 vacas lecheras Holando provenientes de cinco establecimientos comerciales ubicados en la Cuenca del Abasto de Rosario. Los datos utilizados pertenecen a vacas de tercera lactancia, y corresponden al período 2000-2006. Se estudiaron las siguientes variables: producción de leche de la tercera lactancia en días (pl), intervalo parto-concepción en días (ipc), número de servicio (ns) y altura a la cadera en cm (alt). Dentro de cada tambo (t), las vacas se ordenaron de menor a mayor producción a la tercera lactancia, y se las dividió en tres grupos de igual número (n), conformando tres categorías (c): baja (b), media (m) y alta (a) producción. Se estimaron los promedios y sus desvíos estándar y se probó si existían diferencias significativas entre categorías mediante las pruebas de Análisis de la Variancia y comparación de medias (test de Tukey-Kramer, $p < 0,05$).

Tambo 1: pl(b,m,a) 5443,3±665,5c, 6805,6±337,5b, 8758,8±1129,6a; ns(b,m,a) 1,7 ± 1,1b, 2,5 ± 1,6ab, 3,4 ± 1,8a; alt(b,m,a) 137,4 ± 1,1b, 142,9 ± 1,0a, 142,3±1,1a, ipc(b,m,a) 87,2±33,2b, 104,0±46,0ab, 149,8±62,8a;

Tambo 2: pl(b,m,a) 5150,1±753,1a, 6790,5±512,1b, 9495,1±1883,4a; ns(b,m,a) 1,8

± 1,0b, 2,4±1,5b, 4,2±2,7a; alt(b,m,a) 141,4±4,4a, 141,8±2,9a, 141,6±3,1a, ipc(b,m,a) 104,2±61,1b, 125,5±63,2b, 200,7±123,4a;

Tambo 3: pl(b,m,a) 6064,1 ±889,6c, 8093,9± 466,8b, 11482,8± 2424,3a, ns(b,m,a) 2,1±2,0 b, 2,2±1,7b, 4,4 ± 2,9a, alt(b,m,a) 142,8±4,1a, 140,6±3,5b, 143,4±3,6a, ipc(b,m,a) 99,9±67,4b, 119,1 ± 67,2b, 221,0 ± 105,6a;

Tambo 4: pl(b,m,a) 5708,8±657,0c, 7218,4±353,4 b, 9702,7±1598,7a, ns(b,m,a) 1,5±0,8b, 2,0±0,9b, 3,9 ± 2,6a, alt(b,m,a) 143,5 ± 4,5a, 144,1±4,1 a, 144,2±3,9a, ipc(b,m,a) 93,5±52,2b, 115,3±52,3b, 201,5±97,9a;

Tambo 5: pl(b,m,a) 5870,3±586,4c, 7200,6±418,7b, 9376,5±1309,0a, ns(b,m,a) 1,6±0,9b, 1,6±0,8b, 3,2±2,1a, alt(b,m,a) 142,2±4,7ab, 140,5±5,4b, 144,0±4,0a, ipc(b,m,a) 88,0±55,0b, 81,3±42,6b, 158,4±121,0a. Se obtuvieron tres grupos productivos diferentes. Las vacas de baja y media producción no mostraron diferencias para los indicadores reproductivos, mientras que las vacas de mayor producción poseen los mayores ipc y s demostrando un deterioro de su eficiencia reproductiva. Tres tambos mostraron diferencias entre las categorías para altura de las vacas, esto podría estar indicando que para estos establecimientos existiría la posibilidad de una relación entre el tamaño de las vacas y su producción.

Ocurrencia de patologías umbilicales de resolución quirúrgica en terneros en relación al tipo de parto

MILICICH, H.; MOSCUZZA, H.; NAUM, M.

La pérdida de terneros tiene importancia crítica en la eficiencia reproductiva, y el manejo de esta categoría de animales es fundamental para disminuir las pérdidas económicas en rodeos de cría y rodeos lecheros. Las patologías del ombligo del ternero están vinculadas a las condiciones de higiene bajo las cuales se desarrolla el parto. El objetivo del presente trabajo fue determinar la incidencia de las distintas patologías umbilicales de resolución quirúrgica en relación al tipo de parto. Los 92 terneros en estudio corresponden a establecimientos de la Región Pampeana atendidos por los autores durante un período de 7 años (1998-2005). Para la clasificación de las enfermedades del ombligo de resolución quirúrgica, se tuvieron en cuenta las estructuras anatómicas comprendidas en el proceso infeccioso, el nivel de progresión de dicho proceso infeccioso sobre las estructuras comprometidas, y las características macroscópicas de las lesiones halladas durante el acto quirúrgico, de modo que en general los diagnósticos fueron intraoperatorios. La proporción de terneros operados derivados de partos asistidos (77 %) fue significativamente mayor a la de nacidos por partos normales (Test del signo, $p <$

0.05). Realizadas las cirugías respectivas, la ocurrencia de las patologías umbilicales de resolución quirúrgica fue: onfaloflebitis de primer grado 30,4 %, onfaloflebitis de segundo grado 17,4 %, onfaloflebitis de tercer grado 5,4 %, onfaloarteritis 17,4 %, onfalouraquitis de primer grado 14,1 %, onfalouraquitis de segundo grado 9,8 % y onfalouraquitis de tercer grado 5,4 %. Las proporciones de aparición de las distintas patologías no fueron todas iguales. Un análisis de variancia efectuado sobre dichas proporciones permitió rechazar la hipótesis de proporciones iguales. ($F=6,6$; $p < 0,01$). Una posterior prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni (con un nivel de significación del 1 %) detectó que la proporción de casos con onfaloflebitis de primer grado superó significativamente a la proporción de onfaloflebitis de tercer grado y onfalouraquitis de tercer grado. Los defectos de la atención del recién nacido al momento del parto provocan patologías de distinta dimensión e importancia en la zona del ombligo. Por lo tanto, se debe realizar en todos los partos, eutócicos o no, la correcta higiene del ombligo y el control de su cicatrización.

Ciclo reproductivo anual en machos de *Artibeus planirostris* (Chiroptera:Phyllostomidae) en el noroeste argentino

MIOTTI, M.D.^{1,2}; MOLLERACH, M.I.^{1,3}; MANGIONE, S.¹

Artibeus planirostris (Chiroptera:Phyllostomidae) es un murciélago frugívoro que habita en Sudamérica desde Colombia hasta Argentina. Se conoce muy poco de su biología reproductiva. Los ciclos reproductivos en especies de amplia distribución están regulados principalmente por la disponibilidad de alimentos, y ésta por las precipitaciones y la temperatura. La mayoría de los trabajos sobre reproducción en machos de murciélagos se limitan a observaciones macroscópicas acerca de la ubicación testicular, ya sean abdominales o escrotales, como indicio único de la actividad reproductiva. En el siguiente trabajo se estudiaron las gónadas de 16 ejemplares machos entre los cuales había jóvenes y adultos. Los mismos fueron capturados en las provincias de Salta y Jujuy durante los meses de Febrero, Mayo, Julio, Agosto, Octubre y Noviembre, abarcando las estaciones seca-fría y húmeda-calida. Para el estudio de los testículos y

epidídimo se utilizaron técnicas histológicas de rutina de microscopía óptica con coloración Hematoxilina Eosina para denotar sus estructuras. Tanto en la estación seca como en la calida los testículos permanecen activos, observándose en estos la serie espermatogénica completa y el lumen de los túbulos del epidídimo repletos de espermatozoides, todo esto en adultos. En los jóvenes los túbulos seminales solo presentan espermatogonias, pero el lumen de los túbulos del epidídimo se observan vacíos. Tanto en jóvenes como en adultos la posición relativa de los testículos no denotó modificaciones en la producción de espermatozoides. Se concluye en este trabajo que los machos adultos de esta especie no presentan una ciclicidad anual en cuanto a la actividad espermatogénica. Las diferencias encontradas se relacionan con la diferencia de edad y no con la posición testicular o la estación del año.

¹Instituto de Morfología Animal, Fundación Miguel Lillo. ²CONICET, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. ³PIDBA, Programa de Investigaciones de Biodiversidad Argentina, Facultad de Ciencias Naturales e IML, UNT.

Producción in vitro de embriones porcinos transgénicos a partir de espermatozoides eyaculados y epididimarios.

OLIVERA, R.; PEREYRA-BONNET, F.; SALAMONE, D.

La utilización de espermatozoides epididimarios o eyaculados podría resultar en diferencias en la producción *in vitro* de embriones porcinos transgénicos generados por ICSI, dada la presencia o ausencia de secreciones de las glándulas anexas del sistema reproductor masculino. El objetivo fue evaluar la eficiencia de la transgénesis mediada por ICSI, utilizando espermatozoides eyaculados y epididimarios. Se aspiraron complejos cúmulos ovocitos de ovarios procedentes de cerdas de faena y se maduraron en un medio de maduración estándar. Los ovocitos fueron desnudados, y aquellos con primer corpúsculo polar visible, fueron inyectados con espermatozoides congelados/descongelados, eyaculados o recuperados de epidídimo, coincubados o no con el plásmido pCX-EGFP. Los grupos ICSI y controles (inyección con medio sin espermatozoides, con y sin plásmido) fueron activados eléctricamente en una solución de activación, seguido de 3h en TCM 199 permitiendo la extrusión del segundo corpúsculo polar y, posteriormente, en 1.9 mM de 6-DMAP por 3h. Los presuntos cigotos se cultivaron en NCSU-23aa suplementado al día 5 con 10% de SFB. La maduración y el cultivo se realizaron en estufa a 39°C, 5% CO₂ y 100% de

humedad. Se evaluó el porcentaje de clivaje (d2), mórulas (d5), blastocistos (d6) y expresión de GFP (d6) comparándolos por el test de Fisher ($P < 0,05$). Se observó mayor clivaje (31/31, 100% vs 18/23, 78.3%) así como una mayor proporción de embriones expresando el transgén (26/31, 83.8% vs 12/23, 52.1%) cuando la técnica se realizó con espermatozoides eyaculados. El desarrollo de los embriones GFP, así como la homogeneidad de expresión no mostraron diferencias significativas para ambos tipos de espermatozoides. No se observó expresión del transgén en el control sin espermatozoide con plásmido, lo cual indica que es necesario el espermatozoide como vector del gen exógeno para su expresión. No hubo producción de blastocistos en los grupos transfectados, siendo el porcentaje significativamente superior cuando los espermatozoides inyectados no fueron coincubados con el transgén (2/16, 12.5% y 1/13, 7.7%) para eyaculados y epidídimo respectivamente, lo cual revela un posible efecto nocivo del gen exógeno en las concentraciones utilizadas. En conclusión es posible producir embriones porcinos transgénicos a partir de espermatozoides epididimarios pero los resultados son superiores al utilizar espermatozoides eyaculados.

Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, UBA.

InVet. 2008, 10(2): 111-212
ISSN(papel): 1514-6634
ISSN (on line) 1668-3498

Transgénesis en ovinos usando espermatozoides como vectores

PEREYRA-BONNET, F.¹.; GIBBONS, A.².; CUETO, M.².; MORENO, D.¹;
COMAS, D.¹.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.¹.; SALAMONE, D.¹

La transgénesis, se ha convertido en una herramienta importante en la producción animal, la obtención de biofármacos y la biomedicina. Reportes recientes en ratones y cerdos, demuestran la capacidad del espermatozoide para actuar como vector de ADN exógeno durante la fertilización. El objetivo fue comparar la transgénesis mediada por espermatozoides en ovinos mediante Inseminación Artificial Laparoscópica (IAL), Fertilización *in vitro* (FIV) e Inyección Intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) utilizando en todos los casos espermatozoides incubados en forma «corta» o «larga» con el plásmido pCX-EGFP que codifica para una proteína verde fluorescente. La incubación «corta» consistió en exponer los espermatozoides al plásmido (0.5ug/millón espermas) durante 5 min en Citrato de Na 2.8% a 0-5°C; y la incubación «larga» durante 2h en diluyente a base de Tris a 17°C. Para la IAL, un total de 17 ovejas superovuladas con 200UI eCG Novormon y 80 mg/ovejas de pFSH, fueron inseminadas 12 hs post celo utilizando 200x10⁶ espermatozoides/oveja con un pool de semen fresco proveniente de 8 carneros. En la

FIV y la ICSI se utilizaron espermatozoides congelados/descongelados y ovocitos provenientes de matadero madurados (24h) y cultivados (8d) *in vitro*. En la FIV, 162 ovocitos fueron fertilizados con 20x10⁶ espermatozoides/ml en medio Brackett-Olliphant por 5h. Para ICSI, 62 ovocitos fueron inyectados e inmediatamente activados químicamente con 5 uM de ionomocina por 4 min y luego de 3 h colocados en 6-DMAP 1.9 mM por 2.5 h. En todos los tratamientos los embriones producidos fueron observados bajo luz azul (488nm) para detectar fluorescencia. En IAL, ninguno de los 39 y 45 mórulas/blastocistos recuperados provenientes de incubación «corta» y «larga» respectivamente, mostraron fluorescencia. Ninguno de los 35 y 27 mórulas/blastocistos producidos mediante FIV tras incubación «corta» y «larga» respectivamente, expresaron fluorescencia. Sin embargo, las morulas/blastocistos producidos por ICSI mostraron un alto porcentaje de expresión de la proteína verde fluorescente (90.9 y 50.0% para incubación «corta» y «larga», respectivamente). Se concluye que de los métodos ensayados, ICSI fue la única capaz de generar embriones transgénicos en ovinos.

¹Lab. de Biotecnología Animal. Facultad de Agronomía, UBA; ²Lab. Reproducción Rumiantes Menores, INTA, EEA Bariloche, Río Negro, Argentina

Efecto de un tratamiento combinado con eCG y hCG post IA sobre la tasa de concepción en vacas lecheras

PEREZ WALLACE, S.¹; DE LA SOTA, R.L.²; VISTAROP, A.¹;
THATCHER, W.W.³; BARTOLOME, J.A.¹

El objetivo de este estudio fue comparar las tasas de concepción y pérdidas de preñez en vacas que recibieron eCG el Día 22 post inseminación y hCG el Día 29 de gestación. Vacas lecheras en lactación (n=163) fueron incluidas en un protocolo de sincronización e inseminadas a celo detectado o a tiempo fijo. Posteriormente, fueron asignadas al azar para recibir eCG el Día 22 después de la inseminación (n=79) o permanecer como controles no tratados (n=84). En el Día 29, vacas preñadas fueron asignadas al azar para recibir hCG (n=32) o permanecer como controles no tratados (n=36). Se diagnosticó la concepción los Días 29 y 45 post inseminación. El efecto del tratamiento sobre las tasas de concepción y las pérdidas de preñez entre los Días 29 y 45 se analizó utilizando regresión logística. El tratamiento con eCG en el Día 22 incrementó ($P<0.02$) la tasa de con-

cepción en el Día 29 en comparación al grupo control no tratado (50% vs. 33.3%). El incremento en la tasa de concepción en el Día 45 para vacas que recibieron eCG el Día 22 fue mayor ($P<0.01$) en aquellas inseminadas a tiempo fijo (41.2% vs. 6.5%) que en las inseminadas a celo detectado (50.0% vs. 37.8%). El tratamiento con eCG redujo ($P<0.01$) las pérdidas de preñez entre los Días 29 y 45 (7.5% vs. 21.4%). El tratamiento con hCG redujo ($P<0.01$) las pérdidas de preñez en vacas tratadas con eCG el Día 22 (0.0% vs. 15.0%), pero incrementó las pérdidas de preñez en vacas no tratadas con eCG el día 22 (33.3% vs. 12.5%). En conclusión, el uso de eCG en el Día 22 incrementó la tasa de concepción, y la hCG el Día 29 de gestación la redujo las pérdidas de preñez solo en vacas tratadas previamente el Día 22 con eCG.

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa. ²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. ³Department of Animal Sciences, University of Florida, Gainesville, FL; USA.

Rol de las caderinas calcio dependientes en la regulación de la apoptosis en una línea establecida de células de granulosa de ovario bovino (BGC-1)

REVILLA, M.; CAROU, M.C.; LOMBARDO, D.M.

Las Caderinas (CAMs) son glicoproteínas de superficie que están involucradas en una amplia variedad de procesos tales como la adhesión celular, distribución, supervivencia, morfogénesis, formación de uniones intercelulares, mantenimiento de la integridad y tumorigénesis. Estudios en porcinos para determinar los niveles de RNAm y la expresión de CAMs (L-CAM y N-CAM) durante la ontogenia ovárica, mostraron una marcada disminución de los mismos con la madurez y durante los procesos de atresia folicular. Esto le ha conferido a las CAMs un posible rol en el mantenimiento de la integridad estructural de los folículos ováricos. El calcio cumple un importante rol como cofactor, estabilizando las uniones homofílicas entre moléculas de Caderina. Alteraciones a éste nivel generan cambios que posiblemente conduzcan a la apoptosis. El objetivo fue determinar si la pérdida de uniones dependientes de calcio altera el comportamiento de las BGC-1 en función de la activación de la apoptosis y de cambios en la dinámica del ciclo celular. Para ello, se utilizó EGTA 100 nM como quelante exclusivo del calcio y en presencia de SFB 5%, a fin de inducir la pérdida

del contacto entre las moléculas de Caderina. Se utilizó como técnica de valoración morfológica del comportamiento celular, la tinción con Hematoxilina (dos experimentos por triplicado) para 6, 12, y 24 hs de incubación. Para la determinación de apoptosis para 24 y 48 hs de incubación se aplicó la técnica de tinción con Anexina V-FITC e Ioduro de Propidio, analizada por citometría de flujo. Los datos fueron analizados estadísticamente con un ANOVA de dos vías y comparación de medias de Bonferroni. El análisis morfológico mostró un aumento significativo ($\alpha = 5\%$) de la apoptosis a las 24 hs de incubación (IA= 6,3) y un aumento de la fagocitosis a partir de las 6 hs del estímulo respecto del control. La citometría de flujo no mostró diferencias significativas en el tratamiento, hecho que se explica por la alta proporción de células apoptóticas fagocitadas por células vecinas (observación morfológica), impidiendo así que las mismas sean detectadas por esta técnica. Concluimos que, la supresión de las uniones calcio dependientes promueven la desorganización de las células granulosas según dos mecanismos coexistentes; la apoptosis y la autofagocitosis.

Participación de adenilato ciclasa de membrana en la capacitación de espermatozoides bovinos criopreservados

RICART, M.C.; BREININGER, E.; RODRIGUEZ, P.C.; BECONI, M.T.

La participación de adenilato ciclasas en la capacitación de espermatozoides de mamíferos ha sido estudiada en distintas especies. Existe una adenilato ciclasa de membrana (mAC) y una isoforma específica de espermatozoides, la adenilato ciclasa soluble (sAC). Ambas enzimas han sido estudiadas en diferentes células, queda aún por dilucidar su participación en espermatozoides bovinos. Los mecanismos involucrados en la capacitación no son totalmente conocidos, pero ha sido demostrada la generación de AMPc y la activación de proteínas quinasas. La forskolina es una sustancia activadora de mAC que actúa aumentando la concentración intracelular de AMPc. El objetivo del trabajo fue evaluar la participación de la mAC en el proceso de capacitación en espermatozoides bovinos criopreservados. Los espermatozoides se incubaron a 38° C en medio TALP con Ca²⁺ y BSA durante 45 minutos con heparina (10 UI/ml) o en presencia de forskolina, a concentraciones entre 1 y 75 mM. Los porcentajes de capacitación se determinaron por la técnica fluorescente de clorotetraciclina (CTC).

La motilidad progresiva y la viabilidad espermática se evaluaron por microscopía óptica y por la técnica vital de eosina-nigrosina, respectivamente. Espermatozoides previamente capacitados con heparina (10 UI/ml) o forskolina (25 mM) se incubaron a 38° C durante 15 minutos en presencia de fluido folicular (30%), inductor fisiológico de la reacción acrosomal (RA). Los porcentajes de RA y RA verdadera se determinaron por CTC y por microscopía de contraste interferencial-diferencial (DIC), respectivamente. La concentración óptima fue de 25 mM de forskolina, obteniendo un porcentaje de capacitación de 27,80 ± 2,59%, resultado que no difiere significativamente del inducido con heparina (33 ± 4,47%), reconocido inductor de la capacitación en espermatozoides bovinos. La RA inducida con fluido folicular en espermatozoides capacitados con forskolina no fue significativamente diferente de los capacitados con heparina. La forskolina (25 mM) induce capacitación a través de la mAC y conduce a la reacción acrosomal fisiológica, en espermatozoides bovinos criopreservados.

Efecto del ácido linoleico unido a albumina en el medio de maduración ovocitaria sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos

RIOS, G.L.; ALVAREZ, A.; MUCCI, N.M.; KAISER, G.G.; ALBERIO, R.H.

La modificación de la composición química de los medios de cultivo de embriones producidos *in vitro* mediante la incorporación de ácido linoleico unido a albúmina (LAA) permite aumentar su sobrevivencia poscriopreservación sin modificar la tasa de producción de embriones. Sin embargo existe escasa información sobre el efecto del agregado de LAA al medio de maduración ovocitaria, sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el efecto de la incorporación de distintas concentraciones de LAA al medio de maduración de ovocitos sobre la producción *in vitro* de embriones. Ovocitos obtenidos a partir de ovarios de matadero fueron separados en 6 grupos (G) de maduración: **G1**, ovocitos madurados en medio TCM-199 suplementado con r-hFSH y 10% de suero fetal bovino (SFB) (Control 10%); **G2**, similar a G1 pero 2% SFB (Control 2%); **G3**, 2% SFB y 0,01% LAA; **G4**, 2% SFB y 0,03% LAA, **G5**, 2% SFB y 0,1% LAA y **G6**, 2% SFB y 0,3% LAA. Luego de 22-24

horas de incubación a 38,5° C, con 5% de CO₂ y humedad a saturación, los ovocitos fueron fecundados utilizando semen congelado-descongelado. Veinticuatro horas más tarde, los presuntos cigotos fueron denudados y cultivados por 6 días en medio CR1aa a 38,5° C y 5% de O₂, 5% de CO₂, 90% de N₂ y humedad a saturación. Las variables analizadas (CATMOD (SAS)) fueron el porcentaje de embriones de día 7 y protruidos en día 13 respecto al total de ovocitos fecundados. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y los grupos con presencia de LAA en las variables analizadas ($p < 0,05$). El rango de porcentaje de producción de embriones de día 7 y de protrusión en día 13 fueron 21,9-25,7 y 10,3-15,2, respectivamente. Teniendo en cuenta estos resultados y los informados en embriones, la utilización de LAA podría mejorar la calidad de los ovocitos madurados *in vitro* en términos de sobrevivencia poscriopreservación, sin afectar su capacidad para producir embriones.

Respuesta del espermatozoide bovino al regulador de capacitación y reacción acrosomal: Ácido γ -aminobutírico (GABA)

RITTA, M.; TARTAGLIONE, M.

Entre los numerosos factores capacitantes y/o inductores de reacción acrosomal (RA) propuestos en los últimos años, el neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) ha surgido como un posible regulador fisiológico de la funcionalidad espermática. En nuestro laboratorio, demostramos la presencia de GABA y receptores específicos para este neurotransmisor en gametas bovinas frescas y su participación en la inducción de capacitación, mediada por el influjo de calcio y activación de la adenilciclase. Sobre la base de estas consideraciones, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la inducción de RA por GABA en espermatozoides y el efecto de los clásicos moduladores alostéricos del receptor GABAérgico (progesterona y su metabolito neuroactivo alopregnenolona). Cuando la RA se evaluó mediante la técnica de clorotetraciclina, se observó un incremento dependiente de la dosis de GABA del porcentaje de gametas que presentaban el patrón correspondiente a espermatozoides reaccionados (0, 3.4 ± 0.3 ; $1 \mu\text{M}$, 3.9 ± 0.2 ; $10 \mu\text{M}$, 8.0 ± 0.9 ; $50 \mu\text{M}$, 9.3 ± 0.6 ; $p < 0.05$, $10 \mu\text{M}$ vs. 0, $p < 0.05$, $50 \mu\text{M}$ vs. GABA $1 \mu\text{M}$; $p < 0.05$, $50 \mu\text{M}$ vs. GABA $10 \mu\text{M}$; Anova, seguido por test de Duncan). El efecto estimulador de GABA fue revertido por el antagonista del receptor GABAérgico tipo A bicuculina ($p < 0.05$ vs. GABA) y potenciado por la coincubación con

alopregnanolona, aunque este último *per se* no indujo RA.

De acuerdo con los resultados obtenidos, GABA en concentraciones compatibles con la constante de disociación del receptor que describiéramos en el espermatozoide bovino, es capaz de inducir la reacción acrosomal y la capacitación. Los resultados obtenidos aportan evidencias adicionales que apoyan la participación de un receptor GABAérgico tipo A en los fenómenos de capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide bovino, ya que el efecto de GABA resulta potenciado por el metabolito de progesterona alopregnenolona, modulador positivo de este sitio receptor. Sin embargo, en contraste con lo descrito para el receptor de espermatozoide humano, la progesterona no actúa sobre el receptor GABAérgico, sino aparentemente, sobre el sitio específico de reconocimiento de esteroide localizado en la membrana del espermatozoide bovino generando una secuencia de mecanismos intracelulares independientes de los desencadenados por el GABA al unirse a su sitio receptor específico. De esta manera, independientemente de la regulación fisiológica del espermatozoide, el GABA puede ser considerado una buena alternativa como inductor de capacitación y RA para ser utilizados en técnicas de fecundación «in vitro» y técnicas relacionadas.

Aplicación de progestágenos por seis días combinados con prostaglandina para la sincronización de celo en ovejas en estación reproductiva

SÁNCHEZ, E.; HOZBOR, F.; FAVERIN, C.

Los tratamientos clásicos utilizados en ovinos para la sincronización e inducción del celo, emplean progestágenos por 14 días. En esta especie, la emergencia de las ondas foliculares ocurre cada seis días, por ello los tratamientos se han reducido a seis o siete días, obteniéndose buenos porcentajes de preñez. El objetivo fue evaluar la eficiencia de tratamientos cortos (7 días) de sincronización combinados con un luteolítico en estación reproductiva, en abril de 2008. Se utilizó una majada de 207 Texel adultas con buena condición corporal (3-3,5). Fueron divididas aleatoriamente en 4 grupos y recibieron uno de los siguientes tratamientos: esponja intravaginal impregnada con 60mg de acetato de medroxiprogesterona; durante 7 días (EC) y 14 días (EL) y perchas plásticas inertes con 160 mg. de progesterona vegetal (Cronipres CO. Biogénesis Bagó S.A. Argentina), durante 7 días (CC) y por 14 días (CL). Cuarenta y ocho h antes de finalizar el tratamiento de 7 días, se inyectó 75 µg de D- cloprostenol. Se aplicó en todos los grupos 300 U.I de eCG (Novormon, de Syntex SA. Argentina) al momento del retiro de los dispositivos y al mismo tiempo se inició la detección de celo 2

veces por día (mañana y tarde) con 5% de carneros vasectomizados provistos de arnés marcador, hasta las 72 hs. La IATF se realizó entre las 48 y 52 horas posteriores a los tratamientos, utilizándose semen fresco diluido (Tris-Leche descremada, 200×10^6 espz/dosis). La eficiencia de los tratamientos se evaluó por presentación y concentración de celos y tasa de no retorno. Los datos fueron analizados mediante un modelo lineal generalizado, por medio del procedimiento GENMOD del SAS utilizando una distribución binomial y la función de enlace logit. El tratamiento CC (84,44%) tuvo el mayor % de ovejas en celo ($p < 0,05$), no encontrándose diferencias entre los demás tratamientos (EC: 66,67%; EL: 56,25%; CL: 48,94%). Con respecto al momento de la presentación de celo, no se observan diferencias significativas entre tratamientos, concentrándose entre 24 y 48 hs. Al analizar la tasa de no retorno, no se encontró diferencias estadísticas entre tratamientos, aunque si hubo una tendencia favorable a los tratamientos largos. Se concluye que son aplicables tratamientos cortos durante la estación reproductiva, con buenos resultados en manifestación y concentración de celos y aceptable fertilidad.

Effect of the vitrification methods ops and SSV, with inclusion of a synthetic ice blocker, on the viability of mice and bovine oocytes

SANTOS, E.C.S.^{1,2}; LEON, P.M.M.¹; RAMBO, G.¹; CORCINI, C.D.¹;
LUCIA, JR. T.¹; DESCHAMPS, J.C.¹

Oocyte vitrification is a valuable tool for preservation of genetic material, but such method is still inefficient for oocytes in several species. The objective of this study is to compare the effect of the technique of vitrification in open pulled straws (OPS) and solid surface (SSV) using different concentrations of the synthetic ice blocker Supercool™ X-1000 (copolymer) on the viability of mice and bovine oocytes. On the first experiment, mature mice oocytes were collected and vitrified in OPS and SSV, with addition of 0.1 and 1.0% of copolymer to the vitrification medium, besides a group with no ice blocker. A group of oocytes was not vitrified, and used as control for both methods. Membrane viability for the group having 0.1% copolymer was higher ($P < 0.05$) for both vitrification methods, but no differences were observed between methods ($P > 0.05$). In the second experiment, mice oocytes were

vitrified and fertilized *in vitro* and cleavage rates were evaluated post-thawing. In this experiment, the SSV method without copolymer presented lower cleavage rate (9.2%) than the control group (26.6%). On the third experiment, immature bovine oocytes were vitrified according to the same treatments mentioned above for mice oocytes, with subsequent evaluation of maturation rate and membrane viability post-thawing. Maturation rate was lower ($P < 0.05$) for the control group for all treatments, in both methods. Those results indicate that both vitrification methods can be used with inclusion of 0.1% of copolymer, for mature murine oocytes, considering membrane viability, but the SSV method without copolymer should not be used due to its low cleavage rate. However, the procedures tested in this study are not recommended for cryopreservation of bovine oocytes.

¹Laboratory of Animal Reproduction/ Center of Biotechnology University Campus s/n – Mailbox 354 – CEP 96010-9000 Federal University of Pelotas, Pelotas/RS/ Brazil

Efficiency of fertirelin acetate as inductor of ovulation in mares

SANTOS, R.S.¹; MARCHIORI, M.O.²; BRUM, C.¹; AMARAL, L.A.²;
TORRES, A.³; BOFF, A.³; NOGUEIRA, C.W.⁴

The efficiency of Fertirelin Acetate in the induction of ovulation in Brazilian breeds (Crioulo and Mangalarga) was evaluated. Clinical and gynecological examinations were carried in 30 healthy mares, 10 Crioulo and 20 Mangalarga mares. The Fertirelin Acetate was administrated to mares presenting follicles bigger than 35 mm, which were detected by gynecological examination, rectal palpation and ultrasound scanning each 12 hours. The Crioulo mares ovulated earlier than Mangalarga. Sixty percent of the Crioulo mares ovulated after 12 to 24 hours of the

Fertirelin Acetate application, twenty percent ovulated after 24 to 36 hours, ten percent ovulated after 48 hours and one mare did not ovulated. While fifty percent of Mangalarga ovulated 36 to 48 hours, twenty percent after 12 to 24 hours, twenty five percent between 24 to 36 hours and five percent after 48 hours. The conclusion was that the Fertirelin Acetate induced the ovulation in an interval ranging between 12 and 48 hours in mares of the breeds Crioulo and Mangalarga with follicles bigger than 35 mm and it did not demonstrate side effect.

¹Acadêmico do curso de Medicina Veterinária UFPel, Brasil; ²Medico Veterinário Residente UFPel, Brasil; ³Médico Veterinario Autônomo; ⁴Med. Vet. Prof. Dr. Depto. de Clínicas Veterinárias UFPel, Brasil

Fosforilación de proteínas en tirosina, bajo condiciones de capacitación, en semen porcino fresco y congelado con o sin α -tocoferol

SATORRE, M.M.; BREININGER, E.; BECONI, M.T.; BEORLEGUI, N.B.

La criopreservación altera la funcionalidad de las membranas espermáticas, promoviendo un estado semejante a la capacitación, con disminución de la capacidad fertilizante. El α -tocoferol, agregado al diluyente de congelamiento, preserva a las membranas de la lipoperoxidación, mejorando la funcionalidad espermática. En el porcino, la capacitación espermática está asociada a la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina correspondientes a un peso molecular de 32kDa. El objetivo del trabajo fue evaluar el comportamiento de espermatozoides provenientes de semen porcino fresco y criopreservado, en condiciones de capacitación. Muestras de semen fresco y criopreservado con o sin el agregado de α -tocoferol, fueron incubadas con bicarbonato como inductor de capacitación y se tomaron alícuotas a los 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 minutos, para evaluar la motilidad, por microscopía óptica; la viabilidad, por la técnica de eosina-nigrosina y los patrones de coloración de clorotetraciclina (CTC). Los cambios en la fosforilación de proteínas en tirosina fueron determinados por Western immunoblotting.

Los porcentajes de motilidad, viabilidad y espermatozoides intactos (Patrón F-CTC) fueron mayores ($P < 0,05$) en semen fresco comparado con las muestras congeladas, durante toda la incubación. El semen fresco mostró un incremento progresivo en el porcentaje de espermatozoides capacitados (Patrón B-CTC), mientras que las muestras de semen criopreservado alcanzaron un máximo a los 30 minutos en espermatozoides congelados sin α -tocoferol y a los 45 en los congelados con α -tocoferol, disminuyendo hasta valores cercanos a cero al final de la incubación. La cantidad de proteína fosforilada en tirosina, se incrementó durante la incubación en todos los tratamientos. Los mayores valores fueron obtenidos a los 30 y 45 minutos para espermatozoides congelados sin o con α -tocoferol, respectivamente, y a los 180 minutos para semen fresco. El aumento de la motilidad y la intensidad de proteínas fosforiladas en tirosina indicarían un mayor rendimiento energético, sugiriendo que el agregado de α -tocoferol en el diluyente de congelamiento podría mejorar los resultados de fertilización de semen porcino criopreservado.

Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Área de Química Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

InVet. 2008, 10(2): 111-212
ISSN(papel): 1514-6634
ISSN (on line) 1668-3498

Estrus expression in ewes after synchronization with previously used intravaginal devices

SCHEID FILHO, V.B.; SCHIAVON, R.S.; GASTAL, G.D.A.;
AMARAL, J.I.; LUCIA, T.JR.

Improvement of reproductive efficiency in sheep can be achieved by combining oestrus synchronization with artificial insemination (AI), to minimize the impact of the reproductive seasonality of that specie. The objective of this study was to evaluate the efficiency of previously used intravaginal devices on the oestrus expression of ewes. The study was conducted in the Rio Grande do Sul State, South of Brazil, in January, 2007, using 168 Texel ewes, raised under extensive conditions. The ewes have been previously exposed to testosterone treated males (250 mg IM), during 21 days, at a 1:15 proportion. After the males' removal, the ewes were randomly divided in three groups: T1, which received intravaginal devices (CIDR-G[®], Pfizer[®]), containing 0.33 g of natural progesterone, kept for six days, plus 0.133 mg of a Prostaglandin F₂á (PGF₂á) analogue and 250 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG), both IM, at the

device's removal; T2 was similar to T1, but without using the eCG; T3 (control), in which only 0.133 mg of the PGF₂á analogue was administered, at the same day of device removal in the other groups. The devices used on T1 and T2 have been used one year earlier, on other synchronization program, and subsequently stored and cleaned. Oestrus detection was conducted during five days, starting right after the devices' removal, by gelded rams, twice a day (in the morning and at night). The oestrus expression rate did not differ ($P > 0.05$) between T1 (89.3%) and T2 (89.3%), but it was lower for T3 (64.3%). The association between progesterone and PGF₂á analogue, with or without eCG allowed better oestrus expression than the use of only a luteolytic substance. Previously used intravaginal devices can be used in oestrus synchronization protocols without negative consequences for oestrus expression.

Descriptive analysis of reproductive performance in four holsten dairy herds

SCHEID FILHO, V.B.; SCHIAVON, R.S.; GASTAL, G.D.A.;
AMARAL, J.I.; TIMM, C.D.²; LUCIA, JR.T.

Reproductive performance is critical for dairy herds that aim to achieve profitability. The objective of this study was to describe reproductive parameters in four Holsten dairy herds located in the Paraná State, Brazil, latitude 24°47'24.40"S and longitude 50° 0'15.01"W. All four herds were monitored by the same bureau, with production records managed by a software system. The period of data collection was from March to September of 2006. The data corresponded to calvings occurred from March 2004 to September 2006. The study evaluated from 813 cows: 175 (21,5%) from Herd 1; 218 (26,8%) from Herd 2; 256 (31,5%) from Herd 3 and 164 (20,2%) from Herd 4. The evaluated variables included: calving interval; calving-conception interval (CCI); number of calvings (NP) and number of artificial inseminations (AI). The calving interval was calculated by the difference between the last recorded calving and the previous calving. The CCI was

calculated between the date of the last AI and the date of the previous calving. The distribution of cows according to the NP was: 33.1% with 1; 25.0% with 2; 14.1% with 3; 15.7% with 4; and 12.1% with 5 or more. Two hundred and fourteen cows received no AI (26,3%), 224 received one AI (27,6%); 114 received 2 AI (17,7%); 89 received 3 AI (10,9%); and 142 received 4 or more AI (17,5%). The mean calving interval was 476.1 ± 112.7 days for Herd 1, 419.6 ± 80.8 days for Herd 2, 412.3 ± 61.6 days for Herd 3 and 459.5 ± 112.9 days for Herd 4. The mean CCI was equal to 157.4 days. The mean CCI as a function of the NP: 155.2 days for parity-1 cows, 161,8 days for parity-2 births, 160.4 days for 3 parity-3 cows, 155,2 days for parity-4 cows and 153,5 days for cows having 5 or more parities. Thus, cows having one parity presented larger CCI than those having two or more parities, but CCI were very large for cows having 1 and 2 parities.

La prevalencia de bovinos seropositivos para el herpes virus bovino (BoHV) en propiedades de la provincia de Rio Grande do Sul (Brasil) en el período de enero de 2003 a junio de 2008

SIEDLER, B.S.; FINGER, P.F.; MUNHOZ, L.S.; CAETANO, C.F.; VILELA, C.O.; FERREIRA, L.N.; FISCHER, G.; VIDOR, T.; HÜBNER, S.O.; VARGAS, G.

El tipo 1 o el tipo 5 del herpes virus bovino (BoHV-1 o 5) se caracteriza por provocar diversas enfermedades que afectan al aparato respiratorio, reproductivo y sistema nervioso, más allá de las infecciones generalizadas en los recién nacidos, dando por resultado pérdidas significativas en la productividad pecuaria. Una característica importante de estos virus es la capacidad de establecer estado latente cuando están instalados en ganglios nerviosos y no son detectados por los exámenes tradicionales. Una vez establecido el estado latente, el animal puede volver a excretar periódicamente el virus a través de las secreciones, diseminándolo a los bovinos susceptibles. Este estudio tuvo el objetivo de determinar la prevalencia de anticuerpos contra BoHV en bovinos provenientes de 100 propiedades de diversos municipios de la provincia de Rio Grande do Sul, de muestras enviadas al laboratorio de Virología e Inmunología de la UFPel en el período de enero de 2003 a junio de 2008. Para el presente estudio fueron

analizadas 1.904 muestras de suero de bovinos que presentaron o no sintomatología clínica, por medio de la realización de la técnica de seroneutralización. De los animales analizados durante el año de 2003, 17% (61/352) presentaron anticuerpos para BoHV, mientras que este índice aumentó al 36% (136/378) en el año 2004, fue de 11,7% (56/477) en 2005, 34% (131/384) en 2006, 10% en 2007 (17/169) y 8,3% (12/144) en el año 2008. Del total de animales analizados en el período, 413 de 1904 presentaron seropositividad, lo que correspondió a 64 propiedades (64%) con animales seropositivos. En base a estos resultados se puede concluir que la mayoría de las propiedades analizadas presentaron animales infectados por el BoHV, lo que indica la gran necesidad de la adopción de acciones de prevención, tales como la vacunación, teniendo como objetivo reducir el porcentaje de los animales infectados y los perjuicios económicos causados por el virus.

¹Laboratorio de Virología e Inmunología, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas

Análisis preliminar de la optimización de curvas de enfriamiento para mejorar la preservación del semen porcino

SUHEVIC, J.; BLASI, C.; RE, A.; GARCÍA, C.; CISALE, H.

El objetivo fue evaluar posibles modificaciones en la calidad del semen pre y poscongelado durante la curva de enfriamiento del semen porcino entre 17° y 5° C, temperaturas entre las que se registran los mayores daños en los espermatozoides cuando se congela semen de esta especie. Se utilizaron 4 machos híbridos, de los que se obtuvieron 5 muestras de semen en total, mediante la técnica de «mano enguantada». Dos alícuotas (á y â) fueron diluidas 1:2 con Androstar® y estabilizadas 2h a 17° C (etapa 1). Luego ambas muestras fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 15 min y resuspendidas en el diluyente de congelamiento. Se efectuó una 2° estabilización a 17°

C durante 2h (etapa 2). Posteriormente, la alícuota á fue enfriada hasta 5° C siguiendo una curva de enfriamiento rápida, mientras que la alícuota â se llevó a una heladera de 2 celdas Peltier programando multipuntos escalonados, de 0,1° C/min entre 17° y 5° C en 2 h (curva lenta). Las dos muestras, al alcanzar los 5° C, se estabilizaron durante 2 h y se glicerolaron al 3%. Fueron envasadas en pajuelas de 0,5 ml rotuladas (etapa 3), y congeladas con curva rápida. El descongelado se realizó a los 30 días (etapa 4). Luego de cada estabilización y al descongelar, se realizaron evaluaciones de: movilidad, vitalidad, integridad acrosómica y test de endósmosis (HOS test).

	Acrosomas		Vitalidad		HOST test		Movilidad	
	Mediana	Máx/mín	Mediana	Máx/mín	Mediana	Máx/mín	Mediana	Máx/mín
Etapa 3 α	65,5 %	69 / 39	40 %	43 / 33	40 %	42 / 29	29 %	38 / 23
Etapa 3 β	56,5 %	74 / 29	39 %	47 / 33	35,5 %	42 / 28	29 %	33 / 20
Etapa 4 α	92,5 %	94 / 91	25 %	29 / 18	17,5 %	28 / 12	8,5 %	20 / 05
Etapa 4 β	91 %	92 / 85	24 %	28 / 21	18,5 %	34 / 16	11 %	22 / 06

Los resultados se analizaron con el test de Kruskal-Wallis. Entre los tratamientos (á y â) para la misma etapa se obtuvieron $p > 0,6$ en todos los casos, esto indicaría homogeneidad entre tratamientos; excepto en la integridad acrosómica de la etapa 4 ($p = 0,1$). El test de Tukey ($p < 0,05$) colocó a ambos tratamien-

tos (acrosomas, etapa 4 á vs. â) en el mismo grupo. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos á y â, lo que sugiere que los cambios efectuados en esta investigación en la curva de enfriamiento entre 17° y 5° C no influirían en la calidad seminal pre y poscongelado.

Laboratorio de Calidad Seminal y Conservación de Gametas. Física Biológica, INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

Efecto del ácido γ -aminobutírico (GABA) y de la concentración espermática sobre la fertilización *in vitro* de espermatozoides de bovino criollo criopreservado

TARTAGLIONE, M.; RITTA, M.

A partir de la revalorización de rusticidad y fertilidad como indicadores de aptitud productiva del bovino criollo introducido en la Patagonia a fines del siglo XVIII, se ha propuesto su conservación. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar la técnica de fertilización *in vitro* utilizando semen congelado de 4 toros adultos, evaluando el efecto de diferentes concentraciones de espermatozoides sobre el porcentaje de ovocitos fertilizados *in vitro* y establecer las condiciones óptimas de capacitación utilizando como inductor ácido gama-aminobutírico (GABA). Los ovocitos fueron madurados en TCM199 suplementado con suero fetal bovino, hormonas y antibióticos. Los espermatozoides congelados/descongelados fueron seleccionados por «swim

up». Los ovocitos fueron inseminados con diferentes concentraciones de espermatozoides (0.5×10^6 , 1×10^6 , 2×10^6 y 3×10^6 espermatozoides/ml) en presencia de distintas concentraciones de GABA (0.1, 1, 5 μ M). La mayor proporción de ovocitos penetrados correspondieron a los inseminados con 2×10^6 espermatozoides/ml, que no presentaron diferencias significativas con los porcentajes obtenidos en el caso de utilizar 1×10^6 (73.7 ± 1.1 vs 71.5 ± 1.7). Sin embargo, se optó por la concentración de 1×10^6 dado que la mayor concentración de gametas determinó un mayor porcentaje de polispermia con el consecuente aumento del porcentaje de ovocitos que presentaban más de dos pronúcleos (1×10^6 espermatozoides/ml, 8.7 ± 0.8 %; 2×10^6 espermatozoides/ml, 15.2 ± 1.1 % , $p < 0.001$).

	Nº de ovocitos	Ovocitos fertilizados (%)
GABA(μ M)0	181	71.2 ± 1.1^a
0.1	146	73.4 ± 1.5^a
1.0	189	80.2 ± 0.9^c
5.0	195	82.7 ± 1.7^c
Heparina 10μ g/ml	192	81.2 ± 1.4^c

Se fertilizaron los ovocitos en las condiciones indicadas con 2×10^6 espermatozoides/ml. Diferentes letras implican diferencias significativas ($p < 0.01$). De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio podemos

concluir que la combinación de GABA 5 μ M y 1×10^6 espermatozoides/ml resultan en las más altas tasas de fertilización con bajos porcentajes de polispermia.

In vitro evaluation of quality of ovine semen frozen with cryoprotectant including trehalose

TONIETO, R.A.; GOULARTE, K.L.; SCHIAVON, R.S.;
GASTAL, G.D.A.; LUCIA, T.JR.

Artificial insemination with frozen semen is not efficiently used in ovine, which may be attributed to the cryoprotectant solutions present in the extenders commonly used. The objective of this study was to evaluate the effect of inclusion of trehalose as a cryoprotectant in an extender for frozen ovine semen on post-thawing parameters of semen quality. The semen donors were four 24-36 month-old rams, which provided 6 semen samples each (total of 24 samples). Semen collections were conducted with artificial vagina. After evaluation in optical microscope, at the time of collection, only ejaculates presenting sperm motility (MOT) equal or higher than 80% were further processed. Semen samples were frozen according to four treatments: a control treatment consisting of TRIS + 20% egg yolk (T1); T1 + 5% glycerol (T2); T1 + 100 mM trehalose (T3); and T1 + 100 mM trehalose + 5% glycerol (T4). In all treatments, semen samples were diluted at 20/1 (v/v) at 37°C. Subsequently, cooling was conducted by immersing semen samples in isothermal water during nearly 2 h, until reaching 5°C. After that, glycerol was added to the samples in T2 and T4, which were kept stable during 20 min. The samples were packed in 0.25 mL straws with a concentration of 200×10^6 spermatozoa, which were exposed to vapor of liquid nitrogen for 15 minutes prior to freezing. Thawing was

done at 37°C during 20 s. The parameters of semen quality evaluated post-thawing included: MOT (as mentioned above); sperm membrane integrity, through the fluorescent stains *carboxifluoresceine diacetate and propidium iodide*; and acrosome integrity, by the *Lectin from Arachis hypogaea FITC conjugate* stain, in an epifluorescence microscope (WU of 450-490 nm). Comparisons across treatments were conducted by analysis of variance with repeated measures, including the effect of individual rams nested within the treatments. The post-thawing MOT for T1 (23.7%) was lower ($P < 0.05$) than for T2, T3 and T4 (54.2%; 49.2% and 43.7, respectively), but there were no differences among T2, T3 and T4 ($P > 0.05$). Likewise, although T2, T3 and T4 presented similar ($P > 0.05$) post-thawing sperm membrane integrity (37.2%, 36.5% and 35.1%, respectively), all those 3 treatments were superior ($P < 0.05$) to T1 (16.4%). The acrosome integrity did not differ ($P > 0.05$) for T1, T2, T3 and T4 (49.2%, 55.4%, 65.3% and 56.2%, respectively). In conclusion, the extenders including trehalose were as efficient in keeping post-thawing semen quality, as that including glycerol as penetrating cryoprotectant. Thus, considering the benefits regarding the execution of the cooling protocol, trehalose can efficiently replace glycerol in extenders for frozen ram semen.

Comparative use of synthetic progesterone - P_4 and $PGF_{2\alpha}$ in the oestrus synchronization in the crioulo mares

TORRES, A.J.¹; HAETINGER, C.¹; BRUM, C.¹; NOGUEIRA, C.E.W.¹

The aim was to demonstrate of the efficiency of the synchronization use in the reproductive handling of equine females during reproduction season, comparing the use of the of Progesterone (P_4 oily intravenous - PowerVet™) and Prostaglandin (Clopros-tenol Sodic-Ciosin™) protocols in the induction of oestrus and pregnancy rate in a reproductive period. For this study 27 mares were used, ages ranging from age 5 to 23, all gynecologically healthy and suitable to reproduction. For the reproductive handling the oestrus synchronization technique was used following two protocols. Group I (13 mares), received 2 doses of 150mg/ml (1500 mg/per animal) each, using P_4 intramuscular via, having an interval of 7 days between each application. From the 5th day after the unblocking these females were examined every 48 hours, and, at the presence of a dominant follicle with pre-ovulate characteristics the animals were inseminated. Group II (14 mares) received 0,265mg/ per animal intramuscular via of $PGF_{2\alpha}$ following the

same procedure of the first group from the 5th day following the application. In both treatments, after 21 days following ovulation, gynecological examination was carried out with the help of the ultrasound exam for pregnancy diagnosis. Out of fourteen animals of the $PGF_{2\alpha}$ protocol, nine responded, giving rise to a new cycle and, after diagnosis, were actually pregnant. Four animals did not respond to the protocol remaining not pregnant to the end of the season. Thirteen mares received treatment with progesterone, in this group eight responded to the treatment, following the cycle and presenting a positive diagnosis of pregnancy. Five mares did not respond to the treatment remaining not pregnant at the end of the reproductive season. It was concluded that the Injective Synthetic Progesterone - P_4 (PowerVet™) and the Synthetic Prostaglandin - $PGF_{2\alpha}$ (Ciosin™) showed efficiency in the synchronization process of equine females without significant differences in the results obtained between a system and other.

¹Área de Ciências Agrárias, Faculdade de Veterinária, Univ. Federal de Pelotas

Comparación de la eficiencia de diluyentes comerciales en la conservación de semen porcino

TORRES, P.; GARCÍA, C.; CISALE, H.

La utilización de semen diluido refrigerado en la inseminación artificial porcina, con por lo menos dos servicios por celo en cada hembra, hace indispensable determinar el real valor protector de los diluyentes disponibles en el mercado, accesibles y utilizables por granjas comerciales, a fin de asegurarles un óptimo resultado en la protección seminal. El objetivo del presente trabajo fue analizar y jerarquizar diferentes diluyentes de semen porcino en base a la preservación espermática en el tiempo. Se utilizaron pruebas de laboratorio que determinan la morfo-funcionalidad de los espermatozoides. La población de estudio incluyó 3 verracos en edad reproductiva. Se utilizaron 2 eyaculados de cada animal en esta primera etapa. Los diluyentes comerciales seleccionados fueron ANDROSTAR[®], MR-A[®] y M-III[®]. La extracción del semen se efectúo

mediante la técnica de la mano enguantada y recolección en termo atemperado a 37° C. Se prepararon dosis inseminantes estandarizadas (100 ml y 3000 millones de espermatozoides normales con movilidad progresiva) y se conservaron a 17° C por 5 días. Se valoró la movilidad progresiva, la integridad morfológica de la membrana (Eosina-Nigrosina), la integridad acrosomal (contraste de fases) y la funcionalidad de membrana (Test de Endósmosis). Se contaron 100 espermatozoides en cada prueba. La evaluación se realizó diariamente durante cinco días consecutivos. Sobre los eyaculados evaluados se aplicó estadística de varianza no paramétrica, alternativa al método ANOVA, con $p < 0,05$, donde la H_0 fue la inexistencia de diferencias en la capacidad de conservación de los diluyentes.

Prueba	Eosina Nigrosina		Hos		Acrosomas		Movilidad	
	Día 1	Día 4	Día 1	Día 4	Día 1	Día 4	Día 1	Día 4
ANDROSTAR	65,00%	51,00%	27,00%	20,00%	75,00%	65,00%	55,00%	22,50%
MR-A	71,00%	50,50%	35,60%	27,00%	71,60%	65,00%	50,00%	25,00%
M-III	70,00%	55,50%	29,00%	22,00%	75,00%	61,00%	52,50%	22,50%

Valor de medianas al inicio y fin de la prueba para cada diluyente

Del análisis de las medianas realizado sobre los datos obtenidos al momento de esta presentación, se concluye que se cumple la hipótesis nula, no encontrándose diferencias

significativas en la capacidad de conservación de los diluyentes estudiados para ninguno de los parámetros de calidad seminal analizados.

Laboratorio de Calidad Seminal y Criopreservación de Gametas, Área de Física Biológica, INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

La transferencia embrionaria en relación al sitio de ovulación en la llama

TRASORRAS, V.L.; CHAVES, M.G.; AGÜERO, A.

Hasta el momento no se ha desarrollado en la llama un protocolo de transferencia embrionaria (TE) con resultados comparables a los obtenidos en otras especies. El cuerpo lúteo (CL) presenta una vida media de 8-9 días limitando la ventana de tiempo necesaria para transferir los embriones al útero y que se lleve a cabo el proceso de Reconocimiento Materno de la Preñez (RMP) para mantener el CL viable. Se demostró que la acción luteolítica del cuerno uterino derecho (c.u.d.) se produce sobre el CL ipsilateral mientras que el cuerno uterino izquierdo (c.u.i.) produce el efecto luteolítico sobre el CL derecho e izquierdo. El objetivo fue evaluar si influye sobre el RMP el lugar uterino donde se realiza la inovulación (depósito del embrión) con respecto al ovario donde se encuentra el CL. Se utilizaron 31 hembras donantes y 50 hembras receptoras. El día 8 posterior al primer servicio de la hembra donante, se realizó la recuperación embrionaria por lavaje uterino transcervical. Las hembras receptoras se separaron en cinco grupos al azar (n=10 por grupo): grupo A: inovulación c.u.i.-CL izquier-

do; B: inovulación c.u.d.-CL derecho; C: inovulación c.u.i.-CL derecho; D: inovulación cuerpo uterino-CL derecho y E: inovulación cuerpo uterino-CL izquierdo. Se monitoreó la dinámica ovárica por palpación y ultrasonografía transrectal. Las hembras receptoras recibieron una dosis de buserelina (día 0) dos días después del primer servicio de la hembra donante y ante la presencia de un folículo dominante. El día 6 se realizó la TE correspondiente a cada grupo y a los trece días el diagnóstico de preñez. Se evaluó la actividad del CL en las receptoras a través de la medición de progesterona plasmática mediante radioinmunoensayo (RIA) en muestras obtenidas desde el día 5 hasta el día 12. Los porcentajes de preñez obtenidos fueron los siguientes: grupo A: 50 %; grupo B: 30 %; grupo C: 20 %; grupo D y E: el 10 % en cada grupo. En las hembras vacías, se produjo la disminución de los niveles de progesterona durante el período de RMP (entre los días 8 a 10). En conclusión, se observó un menor porcentaje de preñez en todos los casos en que el embrión debió migrar para mantener la viabilidad del CL.

Expression profile of transforming growth factor beta (TGF- β) members in the rat oviduct

VALDECANTOS, P.A.; LOPEZ, M.C.; ARGANÁRAZ, M.E.; MICELI, D.C.; INSIBIO

The mammalian oviduct provides an appropriate environment for fertilization and early embryonic development synthesizing and releasing molecules into the lumen. Active cell divisions, the embryonic genome activation and the reprogramming of the embryo gene expression take place after a few cleavage divisions in the oviduct. During this pre-implantation period, the oviduct creates a microenvironment that serves to facilitate the optimal early embryo development, in part by the secretion of cytokines and growth factors. Members of the TGF- β superfamily and their receptors have been detected in the mammalian oviduct. In this work, we have used the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to study the expression pattern of the TGF- β /activin subfamily (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, Inhibin a, Inhibin ba, Inhibin bb, Inhibin bc, Lefty1, Lefty2 and Nodal) and some members of the BMP/GDF subfamily (Bmp2, Bmp7, Bmp10, Bmp15, Gdf9 and Gdf10) in the rat oviduct during normal sexual cycle and early pregnancy. Oviducts from normal sexual cycling (proestrus, diestrus and estrus) and early pregnant rats (day 1 to 6 after mating) were used (3 animals for each sample). Rats showing at least two consecutive 4-day estrous cycles were included.

Total RNA samples were isolated with TriReagent (MRC) and reverse transcribed using oligo dT and M-MLV reverse transcriptase. Primers sequences for each mRNA were designed according to the nucleotide sequences from the rat genome database. Transcripts for all of the members studied, except Inhibin bc, were detected in all of the estrous cycle and early pregnancy stages. As compared to the β -actin mRNA, Bmp7 mRNA was the more abundant; lowest mRNA levels were found for Nodal, Bmp10, Lefty1 and Inhibin a. Increasing levels from proestrus to diestrus were observed for Inhibin ba and lefty2; mRNAs of Lefty2 and Gdf9 showed a decrease during estrus. From day 1 to 6 of early pregnancy, increasing levels for Inhibin ba and Bmp10 mRNAs were also observed. To the best of our knowledge, this is the first time Lefty1, Nodal, Bmp1, Bmp7, Bmp10 and Gdf10 genes are reported as being expressed in the mammalian oviduct. Our results indicate that the rat oviduct express a complex combination of TGF- β s may influence fertilization, early embryonic development or oviduct remodeling.

(CONICET-UNT). Instituto de Biología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT. Chacabuco 461. San Miguel de Tucumán.

Post-weaning Altrenogest treatment in primiparous sows; the effect of duration and dosage on follicular dynamics and ovulation rate

VAN LEEUWEN, J.J.J.^{1,2,3}; WILLIAMS, S.²; KEMP, B.¹; SOEDE, N.M.¹

Post-weaning treatment of primiparous sows with Altrenogest to delay estrus increases ovulation rate, pregnancy rate and subsequent litter size. Success of Altrenogest treatment is probably highly dependent on improving follicle development during treatment. Our aim was to study follicle development at weaning, during and after different Altrenogest treatments, and relate this to ovulation rate. Primiparous sows (n=48) were weaned from their (9.4±1.1) piglets at Day 21±3 of lactation (=Day 0) and were randomly assigned to the following treatments: control (no Altrenogest, n=11), RU7-15 (15 mgs of Altrenogest, n=11, Day -1 till Day 7), RU7-20 (20 mgs of Altrenogest, n=12, Day -1 till Day 7) or RU14-15 (15 mgs of Altrenogest, n=12, Day -1 till Day 14). From weaning onwards, trans-abdominal ultrasound was performed daily and the five largest follicles on one ovary were measured until ovulation occurred. Sows were slaughtered 5 days after ovulation. Response variables were: follicle size and follicle growth (mm), level of P₄, ovulation rate and number of cell cycles (log of n°of cells/embryo). Follicle size at weaning was 2.6±1.1mm. Follicle size increased to reach a plateau of 4.6±1.6mm in

Day 6, irrespective of treatment. This increase resulted in (4.8±1.8, 4.98±1.3 and 4.81±1.1 mm for RU7-15, RU7-20 and RU14-15, vs controls 3.02±0.8; *P*<0.001). Follicles of treated animals remained significantly larger until the fourth day after treatment. Pre-ovulatory follicle size also tended (*P*=0.07) to be larger vs controls (7.78±0.3 vs. 6.79±0.5 mm). Interval to onset of estrus (from weaning for controls and treatment) was 6.5±1.4 days for controls and 4.6±1.35, 4.7±0.89 and 5.2±1.6 days for RU7-15, RU7-20 and RU14-15, respectively (*P*=0.001). Treatment did not affect ovulation rate, embryonic development or progesterone levels at slaughter. For treated animals, follicle growth during treatment was positively related to ovulation rate (*r*=0.3, *P*=0.07). The fact that treatments did not affect ovulation rate and embryonic development may be related with the low number of piglets weaned; sows are not expected to have a reduced reproductive performance after weaning. However, follicle growth occurred during altrenogest treatments, with larger follicles and the level of follicle growth during treatment was related with subsequent ovulation rate.

¹Wageningen University and Research Centre, Wageningen, the Netherlands. ²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. ³Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, Argentina

Circunferencia escrotal de caprinos criollos en los llanos de La Rioja: Efecto de la estación

VERA, T.A.¹; LEGUIZA, H.D.²; CHAGRA, D.I.B.E.P²

La circunferencia escrotal (CE) es un indicador de la capacidad espermatogénica y reproductiva. El ganado caprino criollo argentino carece de información sobre valores de CE. El objetivo fue determinar la influencia de la época del año sobre los valores de CE en distintas categorías. La experiencia se realizó en el campo experimental «Las Vizcacheras» (30° 22' S; 66° 17' W), del INTA EEA La Rioja. Se utilizaron 91 machos caprinos criollos de diferentes edades, definiendo 4 categorías (Edad en meses – G): G 1: de 2 a 13 (n= 18); G 2: de 14 a 25 (n= 26); G 3: de 26

a 37 (n= 26) y G 4: más de 38 meses de edad (n= 21). Los animales permanecieron en potreros de vegetación natural, con una carga animal de 1 UG/11 ha. Las lecturas se realizaron mensualmente (durante 12 meses) con el animal de pie, mediante cinta métrica en la región de mayor diámetro. Los resultados fueron analizados a través de ANOVA para un diseño factorial (categoría, época e interacción categoría*época), detectándose efecto de la interacción ($p<0.01$). El cuadro 1 presenta los resultados agrupando las medias mensuales según estaciones del año.

Cuadro 1. Promedios de CE (cm \pm D.E.) por época del año, en distintas categorías de caprinos criollos				
Categoría	Verano (V)	Otoño (O)	Invierno (I)	Primavera (P)
G 1	19,6 \pm 1A,b	19,1 \pm 3A,b	17,6 \pm 2A,a	20,9 \pm 3A,b
G 2	24,2 \pm 2B,c	22,8 \pm 3B,b	20,6 \pm 2B,a	23,0 \pm 3B,b
G 3	26,3 \pm 2C,c	23,9 \pm 2C,b	21,5 \pm 2C,a	24,1 \pm 3C,b
G 4	26,9 \pm 2C,c	25,3 \pm 2D,b	22,9 \pm 2D,a	25,2 \pm 2D,b

Letras minúsculas distintas en una misma fila y mayúsculas distintas en una misma columna difieren significativamente ($p<0.01$).

La época del año influye sobre los valores de CE en todas las categorías, b) Si bien los valores de V de G3 y G4 inducirían a pensar que en G3 se habría alcanzado el tamaño adulto de CE, los valores de O, I y P indicarían lo contrario; y c) Los valores de CE en G2, 3 y 4, mostraron una tendencia decreciente en O e I (menor valor de

CE), para incrementarse en P, pero sin alcanzar los valores de V (mayor valor de CE). Los valores de O y P fueron similares entre si. Posiblemente este comportamiento refleje la influencia del fotoperíodo. En G1, la tasa de crecimiento parecería enmascarar este comportamiento, ya que los valores de V, O y P son similares.

¹INTA EEA La Rioja; ²INTA EEA Junín.

Desarrollo comparativo de embriones androgenéticos y partenogenéticos haploides en bovinos

VICHERA, G.; PEREYRA BONNET, F.; SALAMONE, D.

La producción de embriones androgenéticos y partenogenéticos es una herramienta muy útil en la investigación del imprinting genómico, debido a que estos embriones poseen exclusivamente cromosomas de origen uniparental. El objetivo de este trabajo fue comparar la capacidad de desarrollo de embriones bovinos androgenéticos y partenogenéticos haploides versus embriones biparentales obtenidos por fertilización in-vitro (FIV). Para ello, ovocitos bovinos fueron colectados de ovarios de matadero y madurados (24 h) en TCM-199 bajo condiciones estándares. La FIV se realizó con una concentración final de espermatozoides

de 15 millones/ml y el tiempo de coincubación fue de 3 h. Los embriones androgenéticos fueron producidos por FIV de ovocitos previamente enucleados. La enucleación se realizó mediante tinción con Hoechst 33342 y microcirugía. Los embriones partenogenéticos haploides fueron producidos utilizando Ionomicina 5 mM por 4 min, luego TCM-199 por 3 h para permitir la extrusión del 2° corpúsculo polar y posteriormente con 1,9 mM 6-dimetilamino purina por 3 h. Se evaluó el N° de embriones clivados a las 48 h, y el N° de mórulas y blastocistos a los 5 y 7 días respectivamente. Los resultados se presentan en la Tabla 1.

	n	Clivados (%)	Mórulas (%)	Blastocistos (%)
Androgenotes haploides	106	59 (56)a	19 (18)a	8 (8)a
Partenotes haploides	62	37 (60)a	11 (18)a	3 (5)a
Control biparental FIV	190	154 (81)b	63 (33)b	31 (16)b

a,b porcentajes con diferencias significativas (Fisher's Test; p<0,05).

En nuestro estudio, tanto los embriones uniparentales androgenéticos como partenogenéticos haploides, desarrollaron en forma significativamente inferior al control biparental realizado por FIV. Sin embargo, sin evidenciar diferencias significativas entre ellos, ambos gru-

pos lograron desarrollar hasta estadios de compactación y formación de blastocistos. En conclusión, demostramos que es posible la producción de embriones uniparentales haploides bovinos hasta estadios avanzados del desarrollo in-vitro.

Efectos de un tratamiento combinado con eCG y hCG pre y post IATF sobre la tasa de concepción en vacas lecheras

VISTAROP, A.¹; DE LA SOTA, R.L.²; PEREZ WALLACE, S.¹;
THATCHER, W.W.³; BARTOLOME, J.A.¹

El objetivo de este estudio fue comparar tasas de concepción y pérdidas de preñez en vacas que recibieron eCG 60 horas antes y 22 días después de la inseminación a tiempo fijo (IATF) y hCG en el Día 29 de gestación. Vacas lecheras en producción (n= 215) fueron sometidas a un protocolo de sincronización de la ovulación e IATF y distribuidas al azar para recibir eCG 60 horas antes de la IATF (n= 104) o permanecer como controles no tratadas (n= 111). En el Día 22 posterior a la IATF las vacas fueron distribuidas al azar para recibir eCG (n= 100) o permanecer como controles no tratadas (n= 115). En el Día 29, las vacas preñadas fueron distribuidas al azar para recibir hCG (n= 47) o permanecer como controles no tratadas (n= 56). Se determinó la tasa de concepción al Día 29 y 45. El efecto de los tratamientos sobre la tasa de concepción en los Días 29 y 45 y las pérdidas de preñez entre los Días 29 y 45 fueron analizados por regresión logística. El tratamiento con eCG 60 horas previas a la IATF incrementó ($P<0,01$) la tasa de concepción al

Día 45 en comparación al grupo control (48,1% vs. 34,2%) y redujo ($P<0,01$) las pérdidas de preñez entre los Días 29 y 45 (5,7% vs. 24,0%). Así mismo, el porcentaje de vacas con 1, 2 y 3 cuerpos luteos fue 53,6%, 39,3%, 7,1% para el grupo eCG y 83,3%, 14,3%, y 2,4% para el grupo control ($P<0,05$). El tratamiento con eCG el Día 22 post IATF incrementó ($P<0,04$) la tasa de concepción al Día 45 en comparación al grupo control (47,0% vs. 35,6%) y redujo ($P<0,05$) las pérdidas de preñez entre los Días 29 y 45 (7,8% vs. 21,2%). La aplicación de hCG el Día 29 de gestación redujo las pérdidas de preñez en vacas tratadas con eCG al Día 22 (0% vs. 13,3%) pero incrementó las pérdidas de preñez en vacas no tratadas con eCG al Día 22 (34,6% vs. 7,8%; $P<0,05$). En conclusión, el tratamiento con eCG 60 horas antes y 22 días después de la IATF incrementó la tasa de concepción y la hCG al Día 29 de gestación redujo las pérdidas de preñez solo en las vacas tratadas con eCG al Día 22 post IATF.

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, ²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, ³Department of Animal Sciences, University of Florida, Gainesville, FL.

Estudio de diferentes métodos para evaluar la calidad de semen porcino diluido

WILLIAMS, S.; FERNÁNDEZ, V.; GABILONDO, D.; VALETTE, E.;
IGLESIAS, L.; DE LA SOTA, R.L.

El objetivo del presente trabajo es determinar la calidad del semen porcino diluido y la capacidad de dos diferentes métodos para valorar integridad acrosomal. Para el presente estudio se utilizaron eyaculados provenientes de padrillos, de +2 años, de línea terminal comercial. Los animales estaban alojados en corrales individuales de 6 m², piso de cemento y alimentados con balanceado comercial. El semen se obtuvo por el método de presión manual, recogiendo la fracción espermática sobre un recipiente de boca ancha provisto de una doble tela de gasa. Una vez en el laboratorio, se procedió al análisis rutinario del eyaculado: determinación de la motilidad, y recuento de espermatozoides y cálculo de anormalidades con el uso de la cámara cuentaglobulos de Bürker. Luego, se procedió a evaluar integridad del acrosoma por microscopía de contraste de fases y por fluorescencia, utilizando *pisum sativum agglutinin* (PSA) (Sigma L 0770) Con el propósito de poder determinar la sensibilidad de los métodos, el número de células no viables y con daño celular fue deliberadamente

incrementado, para lo cual una alícuota del eyaculado fue sometida a tres ciclos consecutivos de congelación (-20° C durante 30 minutos) y descongelación. Se determinó la sensibilidad y el valor predictivo positivo (VPP) de la acrosomía por contraste de fases y por tinción con PSA. Asimismo, ambos métodos fueron comparados por χ^2 . La integridad acrosomal por contraste de fases mostró una sensibilidad de 97% y de 89% utilizando la tinción fluorescente de PSA. Sin embargo, el VPP fue del 50% y del 53% con contraste de fases y PSA, respectivamente. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos técnicas ($P < 0,16$). Se puede concluir, que si bien no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los métodos de valoración del acrosoma, la mayor sensibilidad de la tinción fluorescente, puede deberse a la afinidad del fluorocromo PSA por los residuos alfa-metilmanosa y que al unirse a la membrana acrosomal, permite distinguir grados de daño del acrosoma, no observables con microscopía de contraste de fases.

Uso de la ultrasonografía para la determinación del desarrollo folicular en cerdas nulíparas

WILLIAMS, S.; FERNÁNDEZ, V.; GABILONDO, D.; VALETTE, E.;
IGLESIAS, L.; DE LA SOTA, R.L.

El objetivo del presente trabajo es la determinación del desarrollo folicular y el momento de la ovulación en cerdas nulíparas, mediante el uso de la ultrasonografía. Se utilizaron hembras púberes, de genética definida. Las cerdas (n=7) estaban alojadas en corrales individuales (instalaciones ad-hoc, de la FCV, UNLP) y alimentadas con una fórmula comercial de gestación. Al momento del arribo, fueron tratadas con gonadotrofinas (400 UI de eCG-200 UI de hCG, Duogestál®, Syntex, SA), presentando celo en promedio a los 4 días del tratamiento. Los escaneos se iniciaron en el día 15 del ciclo estral (fase folicular). Los animales fueron monitoreados una vez al día, para confeccionar mapas ováricos y registrar el número, la localización y el tamaño de los folículos > a 3 mm. Se controló la salida en celo dos veces por día, y en el momento que mostraban síntomas de estro, los escaneos fueron realizados cada 8 horas. El momento de ovulación se definió como la hora del primer escaneo sin visualizar imágenes de folículos presuntamente ovulados, menos 4 h. La ovulación se confirmó con una ecografía

posterior. Para el control del desarrollo folicular, se utilizó un ecógrafo de pantalla, modelo Tringa S50 (Pie Medical, Holanda) de sonda sectorial con una frecuencia de 5-7.5 Mhz. Todos los diagnósticos fueron realizados por la vía transabdominal. Se calculó el número de folículos según clase (3, 4, 5; 6; 7; 8 y 9 mm), desde el primer escaneo hasta la confirmación de la ovulación. En promedio, la ovulación ocurrió a las 36,57±15,50 (promedio ± DE) horas del inicio del estro y el tamaño promedio de los folículos preovulatorios fue de 5,65±0,52 (promedio±DE) mm. Los folículos de 3 mm fueron los más numerosos; los de 4 mm comenzaron a visualizarse a las 48 h de iniciados los escaneos mientras que los de 5 mm 48 h posteriores. Con respecto a la dinámica de los folículos mayores, los más numerosos fueron los de 6 mm, visualizados a las 120 h de iniciados los escaneos. Los de 7 y 8 mm se visualizaron aproximadamente el día 20 del ciclo, mientras que los de 9 mm sólo fueron vistos en algunas de las hembras y hacia el final del ciclo (día 21).

Lagostomus maximus (vizcacha) como modelo animal para estudios en reproducción

WILLIS, M.A.; LEOPARDO, N.P.; JENSEN, C.F.; ESPINOSA, M.B.; VITULLO, A.D.

L. maximus es el mamífero con mayor tasa de ovulación (400-800 oocitos por ciclo), aunque sólo 8 a 12 oocitos son fertilizados e implantados. Sólo 2 embriones llegan a término, mientras que el resto se reabsorbe. La gestación dura alrededor de 154 días, periodo inusualmente largo para roedores, y uno de los más largos conocidos en Histricomorfos. Se analizó la dinámica morfogénica del ovario de *L. maximus* con especial énfasis en la foliculogénesis, formación de cuerpos lúteos (CL) y calidad oocitaria al momento de la ovulación. El análisis se realizó por histología clásica, inmunohistoquímica (IHQ), western blot (WB) y RT-PCR para genes relacionados a la apoptosis ovárica (*BCL2* y *BAX*), y recolección de oocitos por lavado de oviducto en hembras adultas preñadas y no preñadas, provenientes de la colonia natural del ECAS (Estación de Cría de Animales Salvajes, Prov. Buenos Aires). El ovario mostró una continua modificación morfológica debido a una activa foliculogénesis en ausencia de atresia folicular que puede adscribirse a la alta expresión del gen antiapoptótico *BCL2* encontrada en todo momento por IHQ, WB y RT-PCR. Se halló

también una extensa formación de CLs que sólo regresan en el momento de la lactancia sin seguir una luteólisis estructural clásica sino por transformación morfológica que promueve la recuperación de masa germinal. Se halló ovulación en la mitad de la gestación con formación de CL a partir de folículos ovulados y CL secundarios por luteinización sin ovulación. El análisis de calidad oocitaria post-ovulación mostró una amplia variabilidad morfológica en los oocitos recuperados. Estos resultados muestran la presencia de foliculogénesis continua incluyendo fase ovulatoria aún durante la gestación, con poliovulación masiva atribuible a la ausencia de atresia mediada por apoptosis. La baja calidad morfológica de los oocitos ovulados puede adscribirse a la ausencia de atresia y podría explicar las bajas tasas de fertilización reportadas para la especie. Las características generales descritas muestran que *L. maximus* presenta una dinámica ovárica totalmente diferente a la conocida para mamíferos que hacen de esta especie un modelo excepcional para abordar hipótesis no contrastables en modelos convencionales.