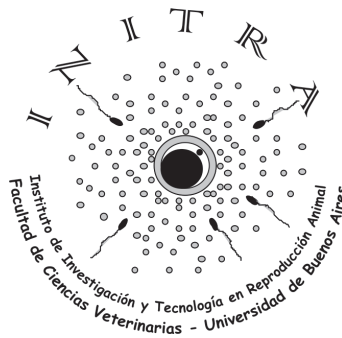


Segundas Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal -INITRA.

Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA

25 y 26 de noviembre, 2010. Buenos Aires, Argentina



Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción
Animal INITRA

Conferencias Plenarias

Aisen, E. <i>Laboratorio de Teriogenología, IDEPA CONICET, Universidad Nacional del Comahue. Tema: “Sincronización de celos en ovinos y caprinos”</i>	217
Dalvit, G. <i>Cátedra de Química Biológica, INITRA, Facultad de Cs. Veterinarias, UBA. Tema: “Vitrificación de oocitos, embriones y tejido ovárico”</i>	218
Gastal, E.L. <i>Department of Animal Science, Food and Nutrition, Southern Illinois University Carbondale, USA. Tema: “B-mode and color-Doppler ultrasonographic morphological changes of the equine preovulatory follicle”</i>	219
Gastal, E.L. <i>Department of Animal Science, Food and Nutrition, Southern Illinois University Carbondale, USA. Tema: “Folliculogenesis and endocrinology of the equine estrous cycle: what we have learned so far”</i>	220
Gigli, I. <i>Facultad de Agronomía- UNLPam, La Pampa, Argentina. Tema: “Activation of preantral follicles”</i>	222
Lombardo, D.M. <i>Cátedra de Histología y Embriología. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Tema: “Rol del proceso apoptótico en la dinámica folicular”</i>	224
Marcantonio, S.A. <i>Cátedra de Teriogenología, Facultad de Cs. Veterinarias, UBA. Tema: “Aplicación del control de la ovulación en rodeos bovinos”</i>	225
Stockert, J.C. <i>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, España. Tema: “Daño nuclear en espermatozoides: técnicas histoquímicas de valoración y diagnóstico”</i>	226
Tesone, M. <i>Laboratorio de Fisiología Ovárica del Instituto de Investigaciones Biológicas y Medicina Experimental (IByME), CONICET. Tema: “Papel de la angiogenesis en la selección del folículo dominante”</i>	227

Sincronización de celos en ovinos y caprinos

AISEN, E.¹

El control del estro y de la ovulación permite inducir y sincronizar el celo en las hembras en anestro y sincronizar el momento de aparición del mismo en las hembras cíclicas. De ese modo es posible controlar y concentrar, entre otras, la época de parición. Resulta un complemento importante en la inseminación artificial, la que puede así ser programada y realizada en un período predeterminado, reduciendo los costos de aplicación de dicha tecnología. La sincronización de estros es útil también en combinación con otras técnicas de reproducción asistida, como la superovulación y la transferencia embrionaria. En esta última, la concordancia del ciclo sexual de la donante y las receptoras resulta fundamental para el éxito de la misma. Los métodos de sincronización de celos clásicos se basan en la aplicación de hormonas, a fin de suprimir la actividad hipofisiaria (progestágenos), o bien provocar la regresión del cuerpo lúteo (prostaglandinas). La inducción de la ovulación va asociada a la sincronización, utilizando para ello una hormona folículoestimulante/luteinizante, que contribuye además al crecimiento folicular, la duración del celo y la tasa ovulatoria. La detección de celos va asociada frecuentemente a la sincronización, y su eficiente aplicación depende de las técnicas empleadas, del personal, de las instalaciones y del número de animales. El efecto macho puede ser una herramienta para agrupar celos o para

combinarse con los tratamientos hormonales. Este fenómeno es multisensorial y la respuesta de las hembras depende de la calidad de las señales emitidas por el macho (comportamiento sexual, olor, vocalizaciones). Utilizando machos sexualmente activos se determinó que el olor y el comportamiento sexual de los mismos estimulan la secreción de LH, y que las vocalizaciones por sí solas, estimulan el estro en las hembras. En la actualidad se trata de modular la actividad sexual mediante el control del fotoperíodo. Se procura con esto: a) inducir y mantener en contra-estación una actividad cíclica en la hembra (los tratamientos hormonales clásicos permiten la inducción de un solo período de ovulación sin regreso al celo); b) abolir totalmente las variaciones estacionales de la actividad sexual; c) avanzar la fecha de la estación sexual en las hembras.

Un avance significativo en el control de la reproducción estacional en pequeños rumiantes ha sido logrado en las últimas décadas por la utilización de tratamientos con melatonina, que mimetizan o simulan los días cortos. Esta hormona puede combinarse con un fotoperíodo artificial. La correcta utilización de los diversos métodos de sincronización de celos dependerá del objetivo reproductivo, del sistema de producción en el cual se apliquen y de la capacitación del personal interviniente.

¹Laboratorio de Teriogenología, IDEPA CONICET, Universidad Nacional del Comahue

Vitrificación de oocitos, embriones y tejido ovárico

DALVIT, G.¹

La vitrificación permite generar un estado vítreo amorfo de la solución sin la producción de cristales de hielo en las células vivas. En los últimos años hemos mejorado en conjunto con científicos del Japón los procedimientos realizados, obteniéndose altas tasas de supervivencia de oocitos y embriones a partir del modelo bovino. Oocitos madurados *in vitro* fueron vitrificados sobre una fina lámina plástica en soluciones conteniendo crioprotectores y agentes osmóticos (sucrosa) en medio TCM199 con Hepes. Fue examinada la supervivencia de los oocitos luego de la vitrificación-descongelamiento, y la capacidad de desarrollo embrionario de los embriones vitrificados-descongelados. El porcentaje de sobrevida fue analizado morfológicamente y por la técnica fluorescente de diacetato de fluoresceína (FDA). Los resultados de viabilidad de oocitos y embriones de todos los estadios, desde pronuclear hasta blastocisto expandido fueron mayores al 99%. El comportamiento posterior de oocitos y embriones vitrificados-descongelados fue similar a las muestras frescas en los parámetros de supervivencia y desarrollo posterior *in vitro* y los porcentajes de preñez en hembras receptoras. A partir de estas experiencias esta tecnología de vitrificación fue aplicada en oocitos y embriones humanos con

la misma eficiencia y resultados, obteniéndose desde el año 2002 bebés nacidos saludables en todo el mundo. Nuestro laboratorio esta capacitando a los grupos de reproducción asistida de Latino América en esta técnica de vitrificación. Utilizando los mismos principios y similar tecnología, fue vitrificado tejido ovárico sobre una lámina especial de cobre y luego descongelado. Se evaluó 1- la presencia de oocitos viables dentro del parche de corteza ovárica, 2- fue colocado bajo la piel del cuello en vacas ovariectomizadas, y 3- reimplantado en el ovario en otras hembras bovinas. Los resultados obtenidos indicaron que la cantidad de oocitos viables es similar a la de la corteza ovárica sin criopreservar, los animales que recibieron el trasplante ovárico bajo la piel del cuello recuperaron sus hormonas ováricas en el torrente sanguíneo en 80-90 días, y el tejido transplantado sobre el ovario bovino se vascularizó correctamente conservando su viabilidad y recuperando el bovino su ciclo estral en 90 días. Estos resultados permitieron que esta tecnología sea utilizada en conjunto con la vitrificación de oocitos para pacientes humanos en edad reproductiva que deben someterse a quimioterapia, logrando preservar su vida reproductiva luego de sobrepasar su problema oncológico.

¹Cátedra de Química Biológica, INITRA, Facultad de Cs. Veterinarias, UBA

B-mode and color-doppler ultrasonographic morphological changes of the equine preovulatory follicle

GASTAL, E.L.¹

High-resolution ultrasonographic machines with B-mode (gray-scale) and color-, power-, and spectral-Doppler modes have brought a powerful dimension to the evaluation of the equine preovulatory follicle during recent years. These technologies have permitted the development of more in depth scientific and clinical studies with regard to the characteristics of the preovulatory follicle and the ovulation process. Results of recent studies have demonstrated the potential for providing clinical information on the status and future success of a follicle to ovulate and its oocyte to become fertilized and to generate an embryo/pregnancy. Ovulation in the mare seems to be a culmination of a complex series of events under elevating LH concentrations that lead to rupture of a preovulatory follicle (e.g., >30 mm) at the ovulation fossa and the extrusion of follicular fluid, granulosa cells, and the *cumulus*-oocyte complex. This process usually occurs 1 or 2 days before the end of estrus. Controlling or predicting the time of ovulation within hours is important, and has practical implications for the equine industry and for research protocols that require a close interval between breeding and ovulation. Insemination close to the time of ovulation (e.g., within 6 to 12 hours) is important to prevent rebreeding mares and to maximize conception rate when using frozen semen or perhaps semen from stallions with limited sperm longevity. In addition, prediction of the time of ovulation is desired for equine oocyte retrieval programs that use assisted reproductive technologies. During recent years, the mare has become an increasingly productive

research model in the area of folliculogenesis. The striking similarities between mares and women in follicle dynamics and hormonal changes during the interovulatory interval and the ovulatory follicular wave, in ultrasonographic changes of the preovulatory follicle before ovulation, and in reproductive aging processes provide rationale for the use of and highlights the importance of the mare as an important experimental model for the study of folliculogenesis in women. The equine model allows hypothesis testing using invasive technologies and may provide additional information that can also be considered useful for other farm animal species and in human clinical medicine. This presentation will focus on the main findings of our experiments that used B-mode and color-Doppler ultrasonography during the preovulatory period to study the morphological and blood flow/perfusion changes of the preovulatory follicle in mares. The topics to be addressed in this presentation will be: ultrasonographic characteristics of the preovulatory follicle; B-mode echotextural changes of the follicle wall; blood flow and perfusion changes of the follicle wall; signs of impending ovulation; prediction of impending ovulation; types of preovulatory follicle outcomes (ovulation, septated evacuation, hemorrhagic anovulatory follicle, atresia); follicle blood flow during evacuation; entry of follicular fluid into the abdomen; infundibular fluid; early corpus luteum blood flow; vascularity of the preovulatory follicle versus fertility; and influence of hCG antibodies on follicle and oocyte.

¹Department of Animal Science, Food and Nutrition, Southern Illinois University Carbondale, USA

Folliculogenesis and endocrinology of the equine estrous cycle: what we have learned so far

GASTAL, E.L.¹

Ovarian follicle development in the mare is characterized by waves of several follicles that emerge and initially grow in synchrony. Various numbers and types of follicular waves develop during an equine interovulatory interval (IOI). In a major wave, the largest follicle attains the diameter of a dominant follicle (≥ 28 -30 mm), whereas in minor waves, the largest follicle does not become dominant. The ovulatory wave emerges midway during an IOI of 21-24 days. After emergence at 6 mm, the follicles of a wave develop in a common-growth phase for several days. At the end of the common-growth phase, a distinctive change in growth rates begins. This process is called deviation and begins in mares when the diameter of the two largest follicles on average are 22.5 mm and 19.0 mm. The deviation in growth rates between the future dominant and subordinate follicles is a key event during the selection of the ovulatory follicle. After deviation, the developing dominant follicle maintains a constant growth rate until one or two days before ovulation and the remaining follicles (subordinate follicles) grow at a reduced rate or establish a plateau phase and regress. The ovulatory waves, as well as major anovulatory waves and minor waves, originate from the stimulation of an FSH surge, which reaches a peak when the largest follicle is about 13 mm. The initial decline in the FSH surge appears to be a function of inhibin. Circulating estradiol

does not begin to increase until about 2 days after the FSH peak or about 1 day before the beginning of deviation. Concentrations of LH of the ovulatory LH surge reach a transient plateau encompassing deviation of the ovulatory wave. The intrafollicular concentrations of estradiol, IGF-1, inhibin-A, and activin-A increase differentially in the future dominant follicle versus the future subordinate follicles about 1 day before the beginning of diameter deviation. These factors may be enablers for differentially enhancing the FSH and LH responsiveness of the future dominant follicle. Experimental results from some of our *in vivo* experiments will be presented to demonstrate the critical role of the IGF-1 system for the initiation of the deviation mechanism in mares. During the recent years (2004 to 2010), our studies have elucidated intriguing temporal and mechanistic relationships among the preovulatory follicle and circulating hormones. Although follicle dynamics and endocrine aspects of all phases (recruitment, selection, dominance, preovulatory) of the follicular waves will be discussed, this talk will emphasize the contribution of our recent findings related to the development of the ovulatory follicle and the associated systemic and intrafollicular hormones. Therefore, the principal topics to be addressed in this presentation will be: development of one versus two dominant follicles with a single ovulation; development of one versus multiple

¹Department of Animal Science, Food and Nutrition, Southern Illinois University Carbondale, USA

ovulatory follicles; conversion of double dominant follicles to double ovulations; role of hormones in development of double ovulations; interrelationships of periovulatory reproductive hormones; repeatability of preovulatory follicle diameter and hormones; and factors that affect preovulatory follicle diameter and

hormones, such as breeds and types, season, body condition, and aging. This presentation is directed to equine theriogenologists and scientists who are involved in monitoring, managing, and manipulating the ovarian function in mares.

Activation of preantral follicles

GIGLI, I¹

The pool of resting primordial follicles serves as the source of developing follicles in females. The primordial follicles, characterized by an oocyte in Prophase I surrounded by a simple layer of granulose cells, could remain quiescent in the ovary for decades. An important step in folliculogenesis is the differentiation from primordial to primary follicle. This initial activation and early growth are gonadotropin-independent. A fundamental question that still has not a definitive answer in biology of reproduction is which mechanism or mechanisms are involved in the activation of preantral follicle. In other words, why do some follicles start growing while others remain dormant? The production of one live mouse from an oocyte grown entirely *in vitro* showed that oocyte development from primordial to the stage of tertiary follicle is possible *in vitro* culture (Eppig and O'Brien, 1996). This result inspired the developing of an optimal culture system for primordial follicles in other species (for an extensive review see Smitz *et al.* 2010). *In vitro* culture methods require not only the correct hormone concentrations and nutritional factors supplementation but also to resolve physical aspects as oxygen tension and optimal culture temperature. Recent studies underline the importance of the follicle architecture and the surrounded somatic cells for the correct growing and development (West-Farrell *et al.* 2009). All of this stresses the importance of tissue culture as an alternative of follicle culture.

Mice ovary culture systems used newborn ovary mice, as primordial follicles are formed during the first few days after birth and the ovary size is small enough to be cultured intact. In contrary, in other species such as bovine, primordial follicles are formed during fetal life and the ovaries are too large to be organ-cultured. To overcome these problems, a technique has been developed to culture small pieces of ovarian cortex obtained from fetal bovine (Wandji *et al.*, 1996). Mice ovary and bovine cortical pieces were cultured in Waymouth's MB 752/1 supplemented with antibiotics, pyruvic acid and ITS+. In this medium, primordial follicles activated spontaneous. To stimulate the passage from the primary to secondary stage, different concentration of FSH and bovine serum fetal (BSF) were added to the medium and different oxygen tensions were tested (Gigli *et al.* 2006). In these conditions, a large amount of primary follicles were obtained but only a few secondary follicles were observed. Another method developed was the "in ovo" culture system where bovine cortical pieces were grafted beneath the chorioalantoic membrane (CAM) of chick embryos to test the hypothesis that they would become vascularized and follicles activated. Although, the grafts were vascularized and remained irrigate and healthy until day 10 when they were removed, follicle activation did not occur (Cushman *et al.* 2002). Chick embryos produced a high level of Anti-mülleriana hormone (AMH) in both sexes. Furthermore,

¹Facultad de Agronomía- UNLPam, La Pampa, Argentina

AMH supplementation *in vitro* inhibits initial activation (Cushman y Fortune, 2002). This result plus the massive primordial follicle depletion observed in AMH gene knockout mice (Durlinger *et al.* 2002), led to the hypothesis that AMH may inhibit follicle activation “in ovo” culture. In fact, when ovaries from AMH receptor knockout mice were grafted in chick embryos, activation to secondary stage were observed (Gigli *et al.* 2005). Taken together, these results indicate that AMH plays a role in primordial follicle activation. Other factors, as

PTEN, p27, Foxo3a y PI3-K dependent (Reddy *et al.* 2008; Rajareddy *et al.* 2007; Castrillon *et al.* 2003 Junger *et al.* 2003; John *et al.* 2008) have been reported to participate in follicle activation. A better understanding of the mechanisms involved in primordial follicles activation would allow designing new biotechnology strategies for domestic animal reproduction and for protected wild animals. Moreover, the developing of a successful ovarian culture is an alternative for preserving fertility in women who receive chemotherapist treatment.

Rol del proceso apoptótico en la dinámica folicular

LOMBARDO, D.M.¹

Es conocido el hecho que las células de la granulosa (CG) contribuyen en la maduración del ovocito y la mayoría de los factores de crecimiento que este necesita, actúan a través de las mismas. Esta simple definición, hace que se considere como factor de suma importancia la viabilidad e integridad de las CG a lo largo del desarrollo folicular. Se ha establecido que la muerte de las CG durante la atresia folicular y la lúteolisis se da por apoptosis, proceso que en el folículo ha sido considerado como un evento fisiológico que elimina selectivamente las células, manteniendo un equilibrio dinámico en la fisiología de la gonada femenina. Sin embargo, las vías mediante las cuales se regula la apoptosis en las CG no se encuentran plenamente estudiadas. Receptores de hormona liberadora de gonadotropina (GnRHR) se han identificado en las células de la granulosa y en las luteales. Análisis *in vitro* en cultivos primarios de CG humana y porcina, demostraron que el acetato de buserelina (agonista de GnRH), indujo el aumento de cuerpos apoptóticos. Nuestro laboratorio encaró como objetivo general estudiar *in vitro* la regulación de la apoptosis en CG de ovario bovino utilizando acetato de Leuprolide (LA) como agonista de GnRH y ANTIDE como antagonista competitivo. Se trabajó tanto en una línea establecida de CG bovina (BGC-1) como en cultivo primario de CG bovina (CPGB). Para evaluar apoptosis a nivel experimental, se utilizaron diferentes técnicas; a nivel morfológico por tinción con DAPI y hematoxilina, a nivel bioquímico por TUNEL, citometría de flujo utilizando anexina V y DAPI y por actividad

de Caspasa 3. A los fines de explorar las vías de regulación de la apoptosis se determinó la expresión de Bax/Bcl-2 por Western Blot y la actividad de PLD (Fosfolipasa D).

Tanto el análisis morfológico como el bioquímico demostró que el LA indujo apoptosis en las BGC-1 cuando fueron cultivadas durante 24 hs en presencia de SFB 5% a una concentración dosis dependiente y directamente proporcional a la misma (1, 10 y 100 nM LA). Asimismo, la preincubación por 3 hs con 100 nM de ANTIDE inhibe parcialmente la inducción de la apoptosis por parte del LA a 100 nM. El hecho que la actividad de PLD sea disminuida tanto por LA como por ANTIDE permite pensar que el ANTIDE per se actúa a este nivel, induciendo activación de la Caspasa 3, y posiblemente a través de la vía extrínseca de regulación de la apoptosis. No ocurriendo a través de la vía mitocondrial ya que los niveles de Bax y Bcl-2 no son modificados por el ANTIDE. En CPGB la inducción es dosis dependiente e inversamente proporcional a la concentración. En presencia de ANTIDE, se observó una gran variabilidad de respuesta, siendo “la densidad de células por campo” el factor que la explica. Por citometría para Anexina V y PI sólo se observó apoptosis temprana, hecho que puede explicarse dada la observación de cuerpos apoptóticos fagocitados por células vecinas (fagocitosis homotípica – cultivos homologos). El soporte de esta hipótesis se basó en la contundencia de las imágenes confirmadas por TUNEL en las que se demuestra la existencia de fagocitosis tanto para BGC-1 como para CPGB.

¹Cátedra de Histología y Embriología. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA

Aplicación del control de la ovulación en rodeos bovinos

MARCANTONIO, S.A.¹

Los avances del conocimiento en fisiología de la reproducción animal de los últimos 30 años han sido vertiginosos. La introducción de la ultrasonografía y el desarrollo de nuevas técnicas endocrinológicas, inmunohistoquímicas y moleculares han brindado luz a muchas zonas oscuras del saber. La posibilidad de estudiar los eventos reproductivos de una manera “tridimensional” resultante del enfoque integrado de estas áreas, ha dado a esta disciplina el relieve necesario para su mejor comprensión. Una de las consecuencias del mayor entendimiento de los fenómenos reproductivos ha sido el desarrollo de programas de control de la ovulación, que ha significado un importante avance en la práctica reproductiva bovina, tanto en rodeos de leche como de carne. El control de la ovulación en los rodeos carniceros se ha transformado en una poderosa herramienta que facilita la adopción de la inseminación artificial (IA), con todas las ventajas resultantes de la introducción de esta biotecnología. La criopreservación de semen y el desarrollo de programas de control de la ovulación probablemente sean los dos hitos cognitivos que más han contribuido a la difusión de la IA en bovinos. Si bien ésta es una biotecnología de utilidad comprobada, su adopción en los rodeos de cría tradicionalmente no ha estado acorde con los beneficios que brinda. A su histórica subutilización se suma el hecho de que aun en aquellos establecimientos que la empleaban, estaba principalmente limitada a la categoría minoritaria de los rodeos: las vaquillonas de reposición. El desarrollo de distintos programas de control de la ovulación ha representado una herramienta clave en la introducción de la IA. Cabe destacar que en los últimos 30 años ha aumentado en aproximadamente

un 70% el número de cabezas inseminadas (800.000 en la década del '80; 1.400.000 actualmente). Estos tratamientos de inseminación a tiempo fijo (IATF), es decir sin detección de celos, posibilitan obtener porcentajes de preñez que rondan el 50%. Otro de los beneficios del uso de programas de control de la ovulación en los rodeos de cría es el acortamiento del anestro post-parto, con la consiguiente mejora en la distribución temporal de las preñeces. El control de la ovulación en los rodeos lecheros contribuye a la solución de uno de los problemas más costosos del tambo: la ineficiencia reproductiva. Esta caída en la eficiencia es causada principalmente por un descenso en la efectividad de la detección de los celos. El desarrollo de distintas estrategias de control de la ovulación también ha permitido implementar programas que posibilitan la IATF. Si bien el empleo de esta herramienta en los rodeos lecheros implica una mayor complejidad, debido a la dinámica reproductiva particular de estas explotaciones, también se ha evidenciado un progresivo aumento en su utilización. Hoy existen establecimientos que la han incorporado en forma rutinaria al manejo reproductivo y otros que la emplean en situaciones particulares. El uso del control de la ovulación ha aumentado significativamente la tasa de preñez, permitiendo una mejora de entre un 50 y un 80%.

El anhelo de lograr ovulaciones sincronizadas en bovinos a través del control del eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero se ha cumplido. El desafío hacia adelante es que esta herramienta siga estando en manos profesionales que garanticen su uso adecuadamente en cada circunstancia.

¹Cátedra de Teriogenología, Facultad de Cs. Veterinarias, UBA

Daño nuclear en espermatozoides: técnicas histoquímicas de valoración y diagnóstico

STOCKERT, J.C.¹

En el núcleo de espermatozoides de mamíferos placentarios el DNA está empaquetado de forma muy compacta debido (1) al reemplazo de las histonas somáticas por protaminas ricas en cisteína durante la espermiogénesis y (2) a la formación de puentes disulfuro intra- e intermoleculares durante la maduración de los espermatozoides en el epidídimo. Esta organización de las protaminas origina una estructura supramolecular fuertemente condensada y estable de la cromatina del espermatozoide, que la protege del daño por proteasas, nucleasas, desnaturalización y rotura del DNA, y exposición a agentes xenobióticos. Una gran variedad de métodos microscópicos morfológicos y citoquímicos han sido aplicados para la evaluación de la viabilidad (exclusión de colorantes) y de la calidad fecundante de los espermatozoides (predicción de fertilidad), en particular con relación a procedimientos de reproducción asistida. Entre ellos caben destacar las tinciones con naranja de acridina (AO) y azul de toluidina (TB), colorantes catiónicos muy apreciados en microscopía por sus notables propiedades orto- y metacromáticas. La persistencia de histonas y/o su reemplazo inadecuado por protaminas, así como la formación deficitaria de puentes disulfuro, están asociados con alteraciones morfológicas e inestabilidad de la cromatina del espermatozoide y con disminución de la fertilidad. Esta correlación hace necesaria la búsqueda y aplicación de métodos sencillos y rápidos para la determinación de la calidad del semen con valor predictivo para estimar el éxito de la reproducción. Sobre la base de la respuesta metacromática del AO en presencia de polinucleótidos de cadena simple, Tejada *et al.* (1984) propusieron un método para la evaluación de la fertilidad masculina en el que la aparición de fluorescencia roja en el núcleo del espermatozoide

era adjudicada a la desnaturalización del DNA. Una técnica de tinción similar empleando azul de toluidina (Barrera *et al.* 1993; Andreetta *et al.* 1995) reveló igualmente una respuesta metacromática (violeta) en la cabeza de espermatozoides de muestras de semen de pacientes con fertilidad disminuída, pero debida no a la desnaturalización del DNA sino a la inadecuada compactación de la cromatina por formación incompleta de puentes disulfuro. Este hecho pudo ser confirmado por el tratamiento de los espermatozoides con agentes reductores como mercaptoetanol y ditiotreitol, que rompen los puentes disulfuro, aumentan notablemente el volumen nuclear e inducen una respuesta metacromática de la cromatina por TB y AO. Además de la aplicación microscópica de estos métodos citoquímicos de valoración de fertilidad basados en respuestas orto- y metacromáticas del núcleo de espermatozoides, una posibilidad de análisis poblacional de gran interés por su rapidez y simplicidad es el estudio macroespectrofotométrico de absorción o emisión de las muestras de semen teñidas con los colorantes correspondientes. A este respecto, el análisis espectral de muestras de semen de pacientes con grados variables de fertilidad, previamente extendidas sobre portaobjetos de forma homogénea y teñidas con TB, revela curvas de absorción distintas y con componentes de orto- y metacromasia variables, cuya relación (índice OM) permite diferenciar claramente entre pacientes fértiles y estériles. En todos los casos, el tratamiento reductor con ditiotreitol incrementa siempre la reacción metacromática, lo que confirma que es el menor grado de compactación nuclear debida a puentes disulfuro insuficientes el factor responsable de las diferencias en las técnicas de coloración por AO y TB usadas con fines diagnósticos.

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, España

Papel de la angiogénesis en la selección del folículo dominante

TESONE, M.¹

En el adulto, la angiogénesis en condiciones fisiológicas es infrecuente a excepción del tracto reproductor femenino. VEGF (Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular) y Angiopoyetina 1 son los principales reguladores involucrados en la angiogénesis ovárica, siendo reguladores de la selección del folículo dominante. En el presente trabajo investigamos si el VEGFA y la Angiopoyetina 1 juegan un rol intraovárico crítico para la supervivencia de las células foliculares en la foliculogénesis dependiente de gonadotrofinas. Examinamos el efecto de la administración intrabursa tanto de un inhibidor de VEGFA como de un inhibidor de Angiopoyetina 1 sobre el desarrollo folicular, la apoptosis y los niveles de proteínas pro y antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 (Bax, Bcl-2, BclX) como también de FAS y FASL. Para inhibir VEGFA se utilizó una proteína quimérica formada por un dominio extracelular del receptor 1 de VEGF y una región Fc de una inmunoglobulina humana (Trap), mientras que para inhibir Angiopoyetina 1 se utilizó un anticuerpo anti Angiopoyetina 1 y 4. La administración intrabursa de 0,5 µg de Trap por ovario no produjo cambios en el número de folículos preantrales (PF) ni antrales tempranos (EAF), mientras que disminuyó significativamente el número de folículos periovulatorios (POF) y aumentó el número de folículos atrésicos (AtF), 48 hs post inyección. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los estadios foliculares en los ovarios extraídos luego de 12 o 24 hs de la cirugía. Se realizó la técnica de TUNEL sobre secciones de ovario para cuantificar el número de células que presentan fragmentación

apoptótica del ADN. El tratamiento con Trap produjo un incremento al doble en el número de células apoptóticas en folículos antrales tempranos. Por otra parte, el ADN aislado de folículos antrales incubados 24 hs en medio libre de suero exhibió el patrón de fragmentación característico de la apoptosis. Los folículos aislados de ovarios tratados con Trap mostraron un aumento significativo en la fragmentación apoptótica espontánea del ADN. La inyección de Trap produjo un aumento significativo de los niveles de Bax y disminuyó los niveles de Bcl-2. La relación Bcl-xL/Bcl-xS disminuyó significativamente en los folículos obtenidos de ovarios tratados con Trap. No se observaron cambios en los niveles de FAS y FASL luego del tratamiento. La administración intrabursa de 10 ng de un anticuerpo anti Angiopoyetina 1 provocó una disminución significativa en el número de EAF y un aumento significativo en el número de AtF 48 hs post inyección. No se observaron cambios en el número de PF ni POF. No se observaron cambios significativos en ninguno de los estadios foliculares a las 12 o 24 hs luego de la inyección. Se realizó la técnica de TUNEL sobre secciones de ovario. El tratamiento con el anticuerpo anti Angiopoyetina 1 produjo un aumento del 200% en el número de células apoptóticas en EAF. Por otra parte, el ADN aislado de folículos antrales incubados 24 hs en medio libre de suero exhibió el patrón de fragmentación característico de la apoptosis. Los folículos aislados de ovarios tratados con el anticuerpo mostraron un aumento significativo en dicha fragmentación. La inyección del anticuerpo anti Angiopoyetina 1 produjo un aumento significativo de los niveles de

¹Laboratorio de Fisiología Ovárica del Instituto de Investigaciones Biológicas y Medicina Experimental (IByME), CONICET

Bax y disminuyó los niveles de Bcl-2. La relación Bcl-xL/Bcl-xS disminuyó significativamente en los folículos obtenidos de ovarios tratados con el anticuerpo. No se observaron cambios en los niveles de FAS y FASL. Esta investigación tiene un alto impacto en el área de salud humana ya que

las anomalías en el desarrollo de vasos sanguíneos durante la foliculogénesis podrían estar involucradas en distintos desórdenes que involucran fallas en el desarrollo folicular como ser, síndrome de ovario poliquístico, síndrome de hiperestimulación ovárica, pubertad o menopausia precoz, etc.

Resúmenes de posters

Acuña, S.; D'Anatro, G.; Barbosa, J.; Fumuso, E.; Tasende, C. <i>Receptores de progesterona en células inmunes de endometrio de yeguas con endometritis durante el ciclo estral: resultados preliminares.</i>	235
Acuña, S.; López, C.; Tasende, C. <i>Receptores de estrógenos y progesterona en células inmunes de la vagina ovina.</i>	236
Alfaro, N.S.; Salvetti, N.R.; Velazquez, M.M.L.; Stangaferro, M.L.; Rey, F.; Ortega, H.H. <i>Expresión de receptores de hormonas esteroides en folículos antrales de bovinos con enfermedad quística ovárica.</i>	237
Alvarez, G.; Ferretti, E.; Vecchi Galenda, B.; Dalvit, G.; Cetica, P. <i>Effect of cumulus type and cysteine in the level of reactive oxygen species produced in the in vitro maturation of porcine oocytes</i>	238
Ajmat, M.T.; Bonilla, F.; Hermosilla, P.C.; Zelarayán, L.; Bühler, M.I. <i>Role of phospholipase A₂ pathway in regulating activation of Bufo arenarum oocytes.</i>	239
Arzondo, M.M.; Caballero, J.N.; Marin-Briggiler, C.I.; Dalvit, G.; Gutnisky, C.; Cetica, P.; Vazquez-Levin, M.H. <i>Inmunodetección de cadherinas epitelial y neural en el complejo ovocito cumulus bovino.</i>	240
Barbosa, J.; Acuña, S.; D'Anatro, G.; Fumuso, E.; Tasende, C. <i>Distribución endometrial de receptores de progesterona en yeguas con endometritis ciclando: resultados preliminares.</i>	241
Bernardi, S.F.; Maglione, D.; Allende, R.; Marini, P.R. <i>Efecto del protocolo de descongelación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal, y la morfología de los espermatozoides bovinos.</i>	242
Bevacqua, R.; Pereyra-Bonnet, F.; Sipowicz, P.; La Rosa, I.; Hiriart, M.I.; Fernandez Martin, R.; Salamone, D. <i>Efecto de diferentes conformaciones del plásmido pCX-EGFP en la transgénesis bovina mediada por fertilización in vitro.</i>	243
Bianchi, C.P.; Meikle, A.; Alvarez, M.; Benavente, M.; Cavilla, V.; Aba, M.A. <i>Población de receptores endometriales a estrógenos y progesterona y expresión de COX2 desde la inducción de la ovulación hasta la luteólisis en llamas.</i>	244
Borelli, V.S.; Gonzalez, M.A. <i>Factores que influyen en la productividad numérica de hembras porcinas.</i>	245
Bulfon, M.E.; Bee De Speroni, N. <i>Ultraestructura e identificación de muerte celular por apoptosis en el ovario de Myiopsitta monachus y Zenaida auriculata (aves: psittacidae y columbidae).</i>	246

Cánepa, M.J.; Mutto, A.A. <i>Evaluación del patrón de expresión de genes marcadores de estrés en ovocitos madurados en medios con distinta composición de hormonas.</i>	247
Carou, M.C.; Cruzans, P.; Fiorito, C.D.; Revilla, M.; Lombardo, D.M. <i>Apoptosis in bovine granulosa primary cell cultures: morphological aspects and cell density dependence.</i>	248
Carretero, M.I.; Arraztoa, C.C.; Caldevilla, M.; Ferrante, A.; Lombardo, D.; Neild, D. <i>Chromatin dispersion test in equine spermatozoa</i>	249
Carretero, M.I.; Giuliano, S.M.; Gambarotta, M.C.; Arraztoa, C.C., Cantanzari, M.J.; Neild, D. <i>Effect of freeze-thawing on llama sperm chromatin. Preliminary results.</i>	250
Catalano, R.; González, C.; Teruel, M.; Williams, S.; Videla Dorna, I.; Callejas, S. <i>Evaluación del efecto de la hCG administrada al inicio del ciclo estral sobre la concentración plasmática de progesterona de borregas en anestro estacional con tratamiento de inducción de celos.</i>	251
Cavilla, V.; Bianchi, C.; Aba, M. <i>Caracterización estructural del fenómeno de superposición de ondas foliculares en llamas.</i>	252
Comercio, E.A.; Monachesi, N.E.; Loza, M.E.; Gambarotta, M.; Wanke, M.M. <i>Hypoosmotic swelling test (HOS) in domestic cat sperm</i>	253
Cueto, M.; Pereyra-Bonnet, F.; Escobar, L.; Gibbons, A. <i>Recuperaciones embrionarias sucesivas en ovinos.</i>	254
D'Anatro, G.; Acuña, S.; López, C.; Garófalo, E.G.; Tasende, C. <i>Distribución epitelial de Ciclooxigenasa 2 en endometrio ovino.</i>	255
Faya, M.; Risso, A.; Carranza, A.; Paganelli, Y.; Ponchón, T.; Calabozo, M.; Barovero, M.; Gobello, C. <i>Effect of long term melatonin administration in pre and postpubertal domestic cats (Felis catus).</i>	256
Fernández, S.; Córdoba, M. <i>Oxidative metabolism changes with different substrates in heparin capacitation of cryopreserved bovine spermatozoa</i>	257
Fernández, S.; Sestelo, A.; Rivolta, M.; Córdoba, M. <i>In vitro capacitation of cryopreserved spermatozoa of dama deer (Dama dama)</i>	258
Fernandez-Martín, R.; Pereyra-Bonnet, F.; Gómez, C.; Pagano, E.; Gibbons, A.; Cueto, M.; Ardila, F.; Salamone, D. <i>Optimización del método de pcr para la detección de posibles transgénicos ovinos</i>	259

Ferretti, E.; Álvarez, G.; Dalvit, G.; Cetica, P. <i>Relationship between pentose phosphate pathway activity and porcine oocyte in vitro maturation</i>	260
Fiorito, C.D.; Claver, J.A.; Boviez, J.D.; Tossenberger, V.P.; Iñiguez, M.A.; Lombardo, D.M. <i>Histological analysis of the testes, epididymis and ductus deferens of male specimens of commerson's dolphin (cephalorhynchus commersonii commersonii) from Patagonian coasts</i>	261
Galassi, I.; Marini, P.R. <i>Relación entre celo-inseminación con semen sexado y el porcentaje de preñez en vaquillonas Holstein.</i>	262
García Romero, G.; Risso, A.; Valiente, C.; Corrada, Y.; Abeya, M.; Rodríguez, R.; Gobello, C. <i>Endocrine response to exogenous GnRH in male dogs treated with a GnRH antagonist.</i>	263
García Valdez, M.V.; Chamut, S.; Valdez Jaen, G.; Arce, O.; Manes, M. <i>La dinámica folicular en lagartos Tupinambis merianae e incidencia de las interacciones sexuales sobre la ovulación.</i>	264
Gavazza, M.; Marmunti, M.; Williams, S.; Gutiérrez, A.M.; Piergiacomì, V.; Palacios, A. <i>Análisis de la peroxidación lipídica y composición de ácidos grasos durante la criopreservación de semen porcino.</i>	265
Germano, P.; Maruri, A.; Soñez, M.C.; Lombardo, D.M. <i>Effects of leuprolide acetate (GnRH analogue) as inductor of apoptosis in primary cultures of bovine luteal cells</i>	266
Ghirardosi, M.S.; Jorge, A.; Malcervelli, D.; Blasi, C.; Fischman, M.L.; Cisale, H. <i>Prevalence rates of morphological abnormalities in commercial bull frozen semen. Preliminary study.</i>	267
Gibbons, A.; Pereyra-Bonnet, F.; Escobar, L.; Cueto, M. <i>Eficiencia de un tratamiento de ovulación múltiple con dosis reducida de FSH-p en ovejas merino.</i>	268
Giuliano, S.; Carretero, M.I.; Caldevilla, M.; Ferrante, A.; Santa Cruz, C.R.; Neild, D. <i>Development of a freeze-thawing protocol for llama semen. Preliminary results.</i>	269
González, N.; Alberio, R.; Rios, G.; Canizo, J.; Manes, J.; Gil, L. <i>Maduración ovocitaria canina: efecto de la suplementación definida y atmósfera gaseosa.</i>	270
González Altamiranda, E.A.; Kaiser, G.G.; Verna, A.E.; Campero, C.M.; Odeón, A.O. <i>Efecto del virus de la diarrea viral bovina sobre la población folicular de vaquillonas persistentemente infectadas.</i>	271

González, M.A.; Williams, S.; Acosta Sosa, M. <i>Diferencias en la eficiencia reproductiva en cerdas ante el uso de la inseminación artificial con dos y tres dosis.</i>	272
Gutnisky, C.; Dalvit, G.C.; Cetica, P.D. <i>Pentose phosphate pathway activity during bovine oocyte in vitro maturation: consequences on developmental competence.</i>	273
Hozbor, F.; Bled, L.; Cano, A.; Manes, J., Alberio, R. <i>Susceptibilidad espermática a la criopreservación en dos razas de conejos.</i>	274
Jorge, A.E.; Malcervelli, D.M.; Ghirardosi, M.S.; Chan, D.; Blasi, C.; Fischman, M.L.; Cisale <i>H. Thermoresistance test in bull frozen semen</i>	275
La Rosa, I.; Fernández-Martín, R.; Salamone, D.F. <i>Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) and its inhibitor, Noggin, on cell cycle kinetics of bovine embryos before maternal to zygotic transition (MZT).</i>	276
Ledesma, A.; Manes, J.; Hozbor, F.; Aller, J.; Ríos, G.; Alberio, R. <i>Efecto del método de colecta de semen y de la adición de plasma seminal sobre la calidad de espermatozoides ovinos.</i>	277
Leon, P.M.M.; Campos, V.F.; Haas, C.S.; Seixas, F.K.; Deschamps, J.C.; Collares, T. <i>Effects of in vitro maturation on the expression of apoptosis-associated genes in equine oocytes.</i>	278
Leon, P.M.M.; Thurow, H.; Campos, V.F.; Haas, C.S.; Hartwig, F.; Seixas, F.K.; Deschamps, J.C.; Collares, T. <i>Association among TP53 SNP and reproductive parameters in mares.</i>	279
Luaces, J.P.; Ciuccio, M.; Rossi, L.F.; Faletti, A.G.; Cetica, P.D.; Casanave, E.B.; Merani, M.S. <i>Actividad estacional de hormonas esteroideas ováricas en el peludo (Chaetophractus villosus) y el piche llorón (Chaetophractus vellerosus), determinación por un método no-invasivo.</i>	280
Luaces, J.P.; Rossi, L.F.; Castillo, L.R., Merani, M.S. <i>Reproducción estacional en armadillos (Mammalia, Xenarthra).</i>	281
Luaces, J.P.; Rossi, L.F.; Aldana Marcos, H.J.; Cetica, P.; Gachen, G.; Ledesma, M.; Merani M.S. <i>Anatomía e histología del tracto reproductivo de hembras del oso melero (Tamandua tetradactyla, Xenarthra).</i>	282
Manes, J.; Hozbor, F.; Maresca, S.; Quiróz, J.; Melani, G. <i>Efecto del nivel nutricional pre y posparto en vacas de cría sobre la actividad ovárica.</i>	283

Mareco, G.; Capdevielle, E.F.; Ornstein, A.M.; Caldevilla, M.; Casaretto, C.; Chan, D.; Flores, M.; Ferrante, A. <i>Criopreservación de semen ovino: comparación in vitro de tres diluyentes seminales.</i>	284
Maruri, A.; Lombardo, D.M.; Miragaya, M.H.; Trasorras, V.L.; Agüero, A. <i>Isolation and primary culture of llama (Lama glama) luteal cells and oviduct epithelium</i>	285
Morado, S.A.; Cetica, P.D.; Beconi, M.T.; Dalvit, G.C. <i>Effect of hydrogen peroxide on bovine oocyte in vitro maturation</i>	286
Pereyra-Bonnet, F.; Bevacqua, R.; Fernandez-Martin, R.; Salamone, D. <i>La concentración de plásmido afecta la expresión y el desarrollo en embriones bovinos transgénicos.</i>	287
Pinto, M.R.; Ferrante, A.; Baca Castex, C.; Miragaya, M.H. <i>Use of flunixin meglumine to increase pregnancy rates after embryo transfer in mares</i>	288
Quiñones Martorello, A.S.; Ríos, G.L.; Cano, A.; Alberio, R.H. <i>Efecto de la concentración del calcio en el medio de vitrificación sobre la activación de ovocitos bovinos.</i>	289
Redolatti, C.; Herrera, M.F.; Marinone, A.I.; Acuña, S.; Tasende, C.; Fumuso, E. <i>Receptores de estrógenos alfa en células inmunitarias del endometrio equino.</i>	290
Ríos, G.; Mucci, N.; Kaiser, G.; Alberio, R. <i>Maduración nuclear y producción embrionaria de ovocitos bovinos madurados in vitro en medio definido suplementado con factor de crecimiento epidermal, hyaluronan y cisteamina.</i>	291
Santa Cruz, C.R.; Carretero, M.I.; Arraztoa, C.; Neild, D.; Trasorras, V.; Miragaya, M.; Giuliano, S. <i>Use of androcoll-E™ for selecting llama sperm. Preliminary results</i>	292
Schuh, A.; Jorge, A.; Miralles, M.; Decaminada, E.; Coppola, M.; Ghirardi, P.M.; Veksler Hess, J. <i>Efecto del estrés digestivo en la producción ovina y su influencia sobre la calidad seminal.</i>	293
Silva, M.A.; Stangaferro, M.L.; Salvetti, N.R.; Alfaro, N.S.; Amweg, A.N.; Ortega, H.H. <i>Expresión de activina in situ en ovarios de vacas con quistes foliculares.</i>	294
Trasorras, V.L.; De Simone, E.; Chaves, M.G.; Álvarez, E.; Miragaya, M.H.; Chiappe Barbará, M.A.; Agüero, A. <i>A preliminary study of the composition of internal oviductal fluid in the llama</i>	295
Trasorras, V.L.; Giuliano, S.; Chaves, M.G.; Baca Castex, C.; Carretero, M.I.; Negro, V.; Rodriguez, D.; Miragaya, M.H. <i>In vitro production of llama embryos</i>	296

Urtiaga, G.; Campos, V.F.; Collares, T.F.; Selau, L.; Seixas, F.K.; Deschamps, J.C.; Collares T. <i>Association between sperm viability and seminal plasma proteins in rabbits submitted to gene doping.</i>	297
Valiente, C.; Diaz, J.D.; Picco, S.; Corrada, Y.; Abeya, M.; Gobello, C. <i>Canine spermatozoa DNA damage in a milk based cooling extender: a preliminary report.</i>	298
Williams, S.; Fernández, V.; Prenna, G.; Barrales, H.; De La Sota R.L. <i>Efecto de la criopreservación sobre la calidad de semen porcino y diferencias según individuos.</i>	299

Receptores de progesterona en células inmunes de endometrio de yeguas con endometritis durante el ciclo estral: resultados preliminares

ACUÑA, S.¹; D'ANATRO, G.¹; BARBOSA, J.¹; FUMUSO, E.²; TASENDE, C.¹

La sensibilidad de los tejidos a los niveles de progesterona (P) circulantes depende de la presencia, distribución y cantidad de su receptor (RP). La progesterona (P) y su receptor (RP) han sido vinculados con la actividad de células del sistema inmune. Se investigó la distribución de RP en células del sistema inmune del endometrio de yeguas durante el ciclo estral con endometritis provocada por infección con *Streptococcus zooepidemicus*. Se tomaron biopsias endometriales en cuatro momentos del ciclo estral: al momento de detectado el estro (edema endometrial y folículo ovárico dominante >30mm, n=24); 24 horas post-infección (n=24), en periovulación (± 12 h, n=6) y al día 7 post-ovulación (n=6). La presencia de RP fue determinada por ensayos de inmunohistoquímica con el sistema avidina-biotina-peroxidasa. Se detectó tinción positiva a RP en polimorfos nucleares (PMN) y linfocitos (L). Ambos tipos celulares inmunomarcados a RP, fueron observados en el epitelio luminal superficial, estrato compacto y esponjoso del endometrio equino en los días del ciclo estral

estudiados. El inmunomarcado a RP en PMN y L fue observado en diferentes grados de intensidad, indicando diferencias en la sensibilidad de éstas células a la P circulante (en términos RP). Éste es el primer trabajo que demuestra la presencia de receptores de progesterona en células del sistema inmune del endometrio de yeguas con endometritis durante el ciclo estral. Aún no hemos analizado si hay variaciones cíclicas en la distribución endometrial de los PMN y L inmunomarcados a RP. La presencia de RP en PMN y L en el endometrio de yeguas con endometritis durante el ciclo estral, indica que la progesterona podría influir sobre actividad de células del sistema inmune. Nuestros hallazgos sugieren que el receptor de progesterona estaría involucrado en la modulación de la respuesta inmune del endometrio en yeguas con endometritis. El análisis de las variaciones cíclicas de la distribución endometrial de RP en células del sistema inmune permitirá establecer las características de ésta modulación.

¹ Área Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Uruguay;

² Laboratorio de Clínica y Reproducción Equina, Facultad de Ciencias Veterinarias Tandil-Argentina.

Receptores de estrógenos y progesterona en células inmunes de la vagina ovina

ACUÑA, S.; LÓPEZ, C.; TASENDE, C.

En ovejas, el sitio de deposición del semen en la monta natural es la vagina. El ambiente inmuno-endócrino vaginal condiciona la llegada de los espermatozoides al oviducto y posterior fecundación. La función vaginal es controlada, en parte por estrógenos (E) y progesterona (P) que ejercen su acción a través de receptores específicos (RE y RP). Estas hormonas y receptores, han sido vinculados con la actividad de células inmunes. No hay estudios que documenten la presencia de estos receptores en células del sistema inmune en vagina ovina. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de RE α y RP en células del sistema inmune en la vagina de ovejas en estación reproductiva. La presencia de RE α y RP se determinó por inmunohistoquímica con el sistema avidina-biotina-peroxidasa y contracolorados con hematoxilina. Para ello se utilizaron muestras de la porción caudal de la vagina de siete ovejas al día 1 de detectado el estro por retajo. El inmunomarcado a RE α y RP fue evaluado por dos observadores independientes utilizando microscopio óptico en lente de inmersión. Se encontró inmunomarcado

a RE α y RP en polimorfos nucleares (PMN) en el epitelio superficial y tejido conjuntivo. El inmunomarcado a RE α y RP fue asignado en forma subjetiva en una escala de 0 a 3, de acuerdo a su tinción específica en: ausente (0), tinción leve (1), tinción moderada (2) y tinción fuerte (3). Las diferencias visualizadas en el inmunomarcado a ambos receptores (escala asignada 0 a 3), indican diferencias en la sensibilidad a E y P en los PMN. Los PMN participan en la respuesta inmune innata de fase aguda a través de la fagocitosis y lisis de microorganismos. Los RE α y RP presentes en PMN en la vagina ovina al estro, indicarían una relación entre los E y la P y la respuesta inmune de fase aguda. Aún no se han analizado estadísticamente las diferencias en la ubicación tisular e intensidad de tinción de los PMN inmunomarcados. Sin embargo, la presencia y diferencias en la intensidad de inmunomarcado a RE α y RP visualizada en polimorfos nucleares de la vagina ovina, sugieren la mediación de ambos receptores en la preparación del ambiente inmuno-endócrino al momento de la monta en ovejas en estación reproductiva.

Expresión de receptores de hormonas esteroideas en folículos antrales de bovinos con enfermedad quística ovárica

ALFARO, N.S.¹; SALVETTI, N.R.¹; VELAZQUEZ, M.M.L.¹;
STANGAFERRO, M.L.¹; REY, F.¹; ORTEGA, H.H.¹

La enfermedad quística ovárica (del inglés: *Cystic Ovarian Disease*: COD) es un desorden reproductivo complejo que implica alteraciones en la foliculogénesis y falla en la ovulación. Las hormonas esteroideas juegan un rol clave en el crecimiento, diferenciación y función del aparato reproductor femenino, incluyendo el desarrollo de los folículos ováricos. En este sentido, los esteroideos producidos localmente están involucrados en la regulación de varias funciones a nivel ovárico. Sus acciones genómicas son mediadas por sus receptores, cuya expresión es regulada de manera autocrina. El objetivo del presente trabajo fue determinar la expresión del ARNm de los receptores de estrógenos α y β (RE α y RE β), andrógenos (RA) y de progesterona (RP $_{total}$, RP $_{ab}$, RP $_{b}$) en estructuras foliculares antrales provenientes de bovinos normales y con COD. Los ovarios fueron recolectados en la playa de faena y se tomaron muestras de folículos que se clasificaron según su diámetro en pequeños (<0,5 cm), medianos (0,5-1 cm), grandes (>1 cm) y quistes (> 2 cm

con ausencia de cuerpo lúteo). La expresión de ARNm se evaluó en las células de la granulosa y de las tecas por separado mediante RT-PCR. El análisis de las bandas obtenidas se llevó a cabo por densitometría óptica en relación a la cuantificación de GAPDH. Los folículos quísticos mostraron una mayor expresión del ARNm de RE α (P <0.05) y una menor expresión de RE β (P <0.05) en las células de la granulosa y de la teca con respecto a folículos controles. Además, los folículos quísticos evidenciaron una fuerte expresión de RA (P <0.05) en las células de la granulosa. No se observaron cambios en las isoformas RP $_{total}$ y RP $_{ab}$, pero hubo una elevada expresión de la isoforma RP $_{b}$ (P <0.05) en las células de la granulosa de folículos quísticos. Los hallazgos encontrados apoyan nuestra hipótesis de trabajo, indicando que alteraciones en el patrón de expresión de los receptores de esteroideos podrían modificar los mecanismos de regulación de la transcripción en las células foliculares y participar en la patogenia de la enfermedad quística ovárica bovina.

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral

Effect of *cumulus* type and cysteine in the level of reactive oxygen species produced in the *in vitro* maturation of porcine oocytes

ALVAREZ, G.; FERRETTI, E.; VECCHI GALENDA, B.; DALVIT, G.; CETICA, P.

The *in vitro* culture systems have a higher concentration of oxygen than *in vivo* environments, resulting in increased levels of reactive oxygen species (ROS). ROS can cause oxidative modifications that alter cell function. The presence of cysteine in culture medium would be needed to improve porcine oocyte *in vitro* maturation. We have previously demonstrated that the metabolism of porcine *cumulus*-oocyte complex (COC) during *in vitro* maturation and oocyte cytoplasmic maturation depend on the characteristics of the *cumulus* surrounding the gamete. The aim was to evaluate the influence of cysteine addition on the oocyte ROS production and oocyte *in vitro* maturation in different COC types. COCs were obtained by aspiration of antral follicles (3-8 mm) from ovaries of slaughtered gilts and classified under a stereomicroscope in A1: complete and dark *cumulus*; A2: complete and translucent *cumulus*; B1: oocytes surrounded only by the corona radiata; B2: partially naked oocytes. Maturation was performed during 48 hours in 199 medium with or without 0.57 mM cysteine and fertilization in TBM with fresh semen. ROS level was determined in

immature and matured oocytes by the ratio of 2',7' dichlorodihydrofluorescein and fluorescein diacetate stains. Meiotic maturation was determined by the presence of chromosomes in metaphase II and cytoplasmic maturation by the presence of decondensed sperm heads and / or pronuclei. Despite *cumulus* features ROS production decreased during *in vitro* maturation ($p < 0.05$) and in the presence of cysteine was observed further decrease in the ROS level in all COC types ($p < 0.05$). The percentages of nuclear maturation were not modified by the presence of cysteine. The cytoplasmic maturation rates were higher in all COC classes in the presence of cysteine ($p < 0.05$), except in B2 class. The highest percentage of cytoplasmic maturation was obtained in A1 class in the presence of cysteine ($p < 0.05$). The addition of cysteine to culture medium would contribute to the control of oocyte ROS production without influence of the features of the surrounding *cumulus*. Although nuclear maturation seems to be independent of oocyte ROS level, control of oocyte ROS production by the presence of cysteine would improve cytoplasmic maturation.

Role of phospholipase A₂ pathway in regulating activation of *Bufo arenarum* oocytes

AJMAT, M.T.; BONILLA, F.; HERMOSILLA, P.C.; ZELARAYÁN, L.; BÜHLER, M.I.

Transient increases in the concentration of cytosolic Ca⁺⁺ are essential for triggering egg activation events. Increased Ca⁺⁺ results from its rapid release from intracellular stores, mainly mediated by one or both intracellular calcium channels: the inositol trisphosphate receptor (IP₃R) and the ryanodine receptor (RyR). Several regulatory pathways that tailor the response of these channels to the specific cell type have been proposed. Among its many modulatory actions calcium can serve as an activator of a cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂), which releases arachidonic acid from phospholipids of the endoplasmic reticulum as well as from the nuclear envelope. Previous studies have suggested that arachidonic acid and/or its metabolites were able to modulate the activity of several ion channels. Based on these findings, we have studied the participation of PLA₂ pathway in the process of *Bufo arenarum* oocyte activation and the interrelation between any of its metabolites and the ion channels involved in the calcium release from the intracellular reservoirs

at fertilization. Denuded fully-grown ovarian oocytes matured *in vitro* with progesterone (2.5 µM) were microinjected with different doses of melittin (2.5 – 40 µg/mL) and arachidonic acid (25 – 200 µM) and, after 20 minutes, parameters of activation were evaluated. Then the study of the effect of arachidonic acid in combination with agonists and antagonists of the IP₃Rs and RyRs was approached in mature oocytes. We found that addition of both melittin, a potent PLA₂ activator, and arachidonic acid, the main PLA₂ reaction metabolite, was able to induce activation events in a bell-shaped manner. Differential regulation of IP₃Rs and RyRs by arachidonic acid and its products could explain melittin and arachidonic acid behaviour in *Bufo arenarum* egg activation. The concerted action of arachidonic acid and/or its metabolites could provide controlled mobilization of calcium from intracellular reservoirs and useful tools for understanding the calcium homeostasis in eggs expressing both types of receptors.

Inmunodetección de cadherinas epitelial y neural en el complejo ovocito *cumulus* bovino

ARZONDO, M.M.^{1*}; CABALLERO, J.N.^{1*}; MARIN-BRIGGILER, C.I.¹; DALVIT, G.²; GUTNISKY, C.²; CETICA, P.²; VAZQUEZ-LEVIN, M.H.¹

La fecundación involucra eventos de adhesión entre las gametas. Cadherina epitelial (cad-E) y cadherina neural (cad-N) son glicoproteínas de membrana que participan en la adhesión celular preferentemente por interacción homofílica (del mismo tipo). Estudios previos de nuestro grupo han descripto la presencia y localización de ambas proteínas en espermatozoides y ovocitos humanos y presentaron evidencias sobre su participación durante la fecundación (Marín-Briggiler/Veiga *et al.*, 2008; Marín-Briggiler *et al.*, 2010). Asimismo, ambas moléculas de adhesión han sido inmunolocalizadas en el espermatozoide bovino, en regiones subcelulares involucradas en la interacción con el ovocito (Caballero *et al.*, J Androl, 2006; Arzondo *et al.*, Biocell, 2010). En base a los antecedentes, se propone como hipótesis que cad-E y cad-N se encuentran en el complejo ovocito *cumulus* (COC), en estructuras involucradas en la interacción con el espermatozoide. El objetivo del estudio fue determinar la presencia, formas proteicas y localización celular de cad-E y cad-N en componentes del COC bovino. Para ello, se analizaron ovocitos y células del *cumulus* provenientes de COCs inmaduros y

madurados *in vitro*. Se realizaron ensayos de “Western immunoblotting” e inmunocitoquímica utilizando anticuerpos específicos de cad-E y cad-N (Santa Cruz Biotech). La forma proteica completa de cad-E (120 kDa) y cad-N (135 kDa) fue identificada en extractos proteicos de células del *cumulus* y de ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* con zona pellucida (ZP). En inmunocitoquímica, la ZP presentó una señal específica para ambas proteínas, principalmente en estructuras que corresponderían a proyecciones de las células del *cumulus*, de mayor intensidad en COCs inmaduros. Ambas proteínas fueron inmunolocalizadas en la membrana plasmática de ovocitos y de células del *cumulus* provenientes de COCs inmaduros y madurados *in vitro*. En conclusión, los hallazgos presentados, en conjunto con resultados previos en los espermatozoides, permiten sugerir la participación de cad-E y cad-N en eventos de adhesión celular durante la interacción de gametas en el modelo bovino.

Marín-Briggiler*, Veiga* *et al.* *Mol Hum Reprod.* (2008)4:561-71. (*) igual contribución. Marín-Briggiler, *et al.* *Int J Androl* (2010)33: e228-39. Caballero *et al.* *J. Androl.* Marzo /Abril 2006. Arzondo *et al.* *Biocell* (2010).

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET-UBA; ²INITRA, Facultad Cs. Veterinarias, UBA. (* igual contribución)

Distribución endometrial de receptores de progesterona en yeguas con endometritis ciclando: resultados preliminares

BARBOSA, J.¹; ACUÑA, S.¹; D'ANATRO, G.¹; FUMUSO, E.²; TASENDE, C.¹

La distribución y contenido de Receptores de Progesterona (RP) en el endometrio son indicativos de la sensibilidad del tejido a la progesterona (P) circulante. Normalmente, durante la fase folicular, cuando predominan los estrógenos (E), el contenido de RP es mayor que en fase luteal (predominio de P), indicando una inhibición de la P sobre su propio receptor. Se estudió la distribución de RP en endometrio de yeguas con endometritis ciclando. La endometritis fue provocada por infección intrauterina con *Streptococcus zooepidemicus*. Se tomaron biopsias endometriales al momento de detectado el estro (edema endometrial y folículo ovárico dominante >30mm, n=24); 24 horas post-infección (n=24), en periovulación ($\pm$ 12 h, n=6) y al día 7 post-ovulación (n=6). El RP se determinó por inmunohistoquímica y fue evaluado en epitelios luminal (EL) y glandular (EG), estratos compacto (EC) y esponjoso (EE). El inmunomarcado a RP en cada tipo tisular fue analizado por ANOVA, se consideró significativo $P < 0.05$. Se encontró efecto día del ciclo, tipo tisular e interacción entre ambos

sobre el inmunomarcado a RP. Éste fue similar en EL y EC en todos los días estudiados. El inmunomarcado a RP aumentó en EG y EE a las 24 h post infección en relación al día de detectado el estro. Por el contrario, en EG en periovulación disminuyó en relación al día de detectado el estro y 24 h postinfección, mientras que en EE fue similar. Al día 7 postovulación, el inmunomarcado a RP fue similar al hallado en periovulación en todos los tipos tisulares estudiados. En fase luteal, al día 7 postovulación (predominio de P), el inmunomarcado a RP en todos los tipos tisulares fue similar a lo hallado en el momento de la detección del estro y en periovulación (fase folicular, predominio de E). Los perfiles de RP endometriales, hallados en yeguas con endometritis ciclando, están en desacuerdo con lo reportado para yeguas sin endometritis durante el ciclo estral. Nuestros resultados sugieren que la disminución en la fertilidad de las yeguas con endometritis, podría deberse en parte, a patrones alterados en la distribución de receptores de progesterona endometriales.

¹Área Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Uruguay;

²Laboratorio de Clínica y Reproducción Equina, Facultad de Ciencias Veterinarias Tandil-Argentina.

Efecto del protocolo de descongelación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal, y la morfología de los espermatozoides bovinos

BERNARDI, S.F.¹; MAGLIONE, D.¹; ALLENDE, R.²; MARINI, P.R.³

El objetivo del presente trabajo fue evaluar como la morfología espermática, la integridad de la membrana plasmática y acrosomal se modifican en función de los cambios ocurridos en el protocolo de descongelación. Se utilizó semen congelado de un toro Holando Argentino de calidad probada. Desde el termo de nitrógeno (N2) hasta depositar la pajuela en el termo caliente se probaron los siguientes tiempos: 4", 30", 1' y 5'; las temperaturas de descongelación fueron 21, 30, 35, 37, 40, 55, 75 y 95° C con distintos tiempos de exposición cada una (4, 15 y 30"; 1 y 5'). También se probó dejar la pajuela por 20', luego de descongeladas, a dos temperaturas ambiente (9° C y 22° C). La morfología fue evaluada utilizando el software *Sperm Vision* (Cabeza piriforme, micro y macroencefálicos, cabeza libre, vacuola nuclear, implantación abaxial, pieza media diastal doblada, gota proximal y distal, cola doblada), la integridad de la membrana plasmática a través del test hipoosmótico y la integridad del acrosoma utilizando un microscopio de contraste de fases. Los resultados mostraron que el número de espermatozoides reaccionados con el test hipoosmótico y el número con acrosoma

intacto no disminuyeron significativamente ($p>0,05$) al extender a 5' el tiempo utilizado para pasar la dosis del termo de N2 al termo de descongelación. También se evidenció una disminución significativa de estas variables cuando la temperatura de descongelado fue menor a 35 ° C o mayor a 37° C y cuando el tiempo de exposición fue inferior a 30"o superior a 1'. Sin embargo, esta disminución fue mayor cuando las pajuelas, ya descongeladas, fueron expuestas a temperaturas ambientes (de 22° C y 9° C) por 20'. No se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$), para ninguna modificación prevista sobre el protocolo, en relación al número total de espermatozoides con morfología anormal y en la proporción en que se presentó cada uno de los tipos de anormalidades evaluadas. En conclusión, a los efectos de conservar una buena calidad seminal al descongelado, se proponen las siguientes recomendaciones: no tardar más de 5' en pasar la pajuela del termo de N2 al termo para descongelar, la temperatura de este último debe mantenerse entre 35 y 37 ° C y finalmente, una vez descongelada la dosis, inseminar sin demoras.

¹Cátedra Histología I y Embriología Básica.

²CIAVT.

³Cátedra de Producción de Bovinos Lecheros. Facultad de Ciencias Veterinarias - UNR.

Efecto de diferentes conformaciones del plásmido pCX-EGFP en la transgénesis bovina mediada por fertilización *in vitro*

BEVACQUA, R.¹; PEREYRA-BONNET, F.¹; SIPOWICZ, P.²; LA ROSA, I.¹;
HIRIART, M.I.¹; FERNANDEZ MARTIN, R.¹; SALAMONE, D.¹

Las técnicas rutinariamente empleadas para producir embriones transgénicos presentan la desventaja de ser costosas y bastante ineficientes. Recientemente hemos introducido un nuevo método para producir embriones modificados genéticamente, consistente en la inyección citoplasmática de vesículas de ooplasma incubadas con transgén (ICV-T), o de transgén solo (ICT), en embriones derivados de fertilización *in vitro* (FIV). El objetivo de este trabajo fue comparar la eficiencia de transgénesis de esta nueva técnica al emplear plásmido en conformación cerrada o linearizada. Mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y cultivo en túneles de agarosa de los blastocistos obtenidos, se evaluó el estado del transgén. Ovocitos de vaca fueron madurados *in vitro* en condiciones estándar, sometidos a FIV (Salamone; *Theriogenology*; 549-61; 1999), y a inyección con el transgén. Para el grupo ICV-T, pequeños fragmentos de ooplasma obtenidos a partir de ovocitos donantes por microcirugía, e incubados en PVP conteniendo 50 ng/ul pCX-EGFP lineal o circular, fueron inyectados en los presuntos cigotos. Para el grupo ICT, un volumen equivalente de PVP

conteniendo igual transgén fue inyectado. La FISH se realizó con una sonda específica para pCX-EGFP marcada con FITC. Para el cultivo en los túneles, los blastocistos fueron suplementados con concentraciones crecientes de SFB, y transferidos a un túnel de agarosa. Se obtuvieron tasas de embriones *egfp* superiores para los grupos ICV-T e ICT inyectados con plásmido lineal respecto al circular (51/84, 60%; 34/63, 53%; 31/93, 33%; 18/73, 24% para ICV-T e ICT lineal, ICV-T e ICT circular respectivamente, $p < 0.05$). El grupo ICV-T lineal presentó una tasa de blastocistos *egfp* (22/26; 84%) superior a los grupos ICT lineal, ICVT e ICT circular (10/19, 52%; 13/28, 46%; 8/18, 44% respectivamente) ($p < 0.05$). Se obtuvieron señales de FISH positivas para pCX-EGFP en una interfase de un embrión ICV-T y de un embrión ICT. Se observó expresión de *egfp* hasta día 11 en un blastocisto ICT lineal cultivado en un túnel de agarosa. La transgénesis mediada por ICV-T e ICT e una alternativa simplificada y de bajo costo, para la producción de animales modificados genéticamente.

¹ Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, UBA; ² Laboratorio de Neuro y Citogenética Molecular, Universidad de San Martín, Buenos Aires, Argentina

Población de receptores endometriales a estrógenos y progesterona y expresión de COX2 desde la inducción de la ovulación hasta la luteólisis en llamas

BIANCHI, C.P.^{1,2}; MEIKLE, A.³; ALVAREZ, M.¹; BENAVENTE, M.¹;
CAVILLA, V.^{1,2}; ABA, M.A.¹

La población endometrial de receptores a hormonas esteroideas y la expresión de COX2 es regulada por efecto de los estrógenos y progesterona (P_4) sobre sus propios receptores (Spencer y Bazer, 1995). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la población endometrial de receptores a estrógenos α (RE α), receptores a progesterona (RP) y expresión de la COX2 desde la inducción de la ovulación hasta la luteólisis en llamas. Cinco animales fueron ecografiados diariamente hasta la detección de un folículo ≥ 8 mm, momento en que se indujo la ovulación con GnRH (8,4 μ g Receptal, Invet[®]). Se obtuvieron biopsias endometriales por vía transcervical al momento de la inducción de la ovulación (Día 0) y los días 4, 8, 10 y 12 post GnRH. Se recolectaron muestras diarias de sangre para determinación de P_4 y 17 β -estradiol (E_2) en plasma a través de kits de RIA. Las biopsias fueron procesadas usando la técnica inmunohistoquímica avidina-biotina-peroxidasa para la determinación de cada uno de los receptores y COX2. La expresión de los mismos fue evaluada en el epitelio luminal (EL) y glandular (EG) y estroma (Str). El porcentaje de área positiva y la intensidad de tinción se analizaron por el procedimiento mixto del

SAS. Los cambios más significativos fueron observados en el EL y Str para los RE α y RP, los cuales alcanzaron su expresión mayor al día 0 ($P \leq 0,05$), momento de máxima liberación de E_2 . Una abrupta disminución del número de RE α y de los niveles de E_2 se observaron al día 4 ($P \leq 0,05$), los cuales comenzaron a recuperarse paulatinamente en los días subsiguientes aunque la expresión de RE α no logró alcanzar los valores preovulatorios. Los RP disminuyeron para el día 8 cuando se observaron las concentraciones plasmáticas de P_4 más elevadas y permanecieron bajos hasta el día 12 post GnRH ($P \leq 0,05$). La expresión de COX2 fue elevada en los días 8, 10 y 12 en el EL y EG. Como en ovinos, la población de RP se encuentra disminuida al inicio del proceso luteolítico probablemente debido al efecto supresor de la P_4 , mientras que los RE α comienzan a incrementarse hacia el final de la fase luteal en relación con un aumento en los niveles circulantes de E_2 (Bazer y Spencer, 1995). La mayor expresión de COX2 ocurre en coincidencia con la liberación endometrial de PGF 2_α responsable de la luteólisis (Aba *et al.*, 2000).

¹Área de Endocrinología, FCV, UNCPBA; ²CONICET; ³Lab. de técnicas nucleares, FV, Universidad de la República, Uruguay

Factores que influyen en la productividad numérica de hembras porcinas

BORELLI, V.S.; GONZALEZ, M.A.

Con el fin de aprovechar al máximo el potencial reproductivo y reducir la subfertilidad en cerdas, es necesario aumentar la eficiencia reproductiva a través del uso de biotecnologías y manejo reproductivo. Es amplia la bibliografía que cita el efecto individual de los factores (tanto climáticos, de manejo y genéticos) que influyen sobre la proporción de lechones destetados, sin embargo es escasa la referida a la interacción de 2 o más de estos factores. El objetivo fue evaluar la influencia de factores climáticos y de manejo reproductivo sobre la productividad numérica de hembras porcinas en el sudoeste chaqueño. Se utilizaron datos de 355 partos de hembras híbridas Landrace x Large White pertenecientes al plantel productivo de INTA EEA Las Breñas en el periodo 2004- 2009. El rasgo evaluado fue proporción lechones destetados (LD $n= 2978$) y como efectos se consideró época de parto (O, I, P, V), número de parto de la hembra (1, 2, 3, 4 y más de 4), Inseminación Artificial (Si o No), raza del macho (Puro o Híbrido). Los datos fueron analizados bajo un modelo lineal general mixto (GLIMMIX, acrónimo en inglés) del SAS (2009), y se estudió la proporción de lechones destetados a través de n° de parto, la época, el tipo de macho, I.A. y las interacciones:

macho*IA, nparto*IA, nparto*macho*IA. De los factores incluidos en el modelo resultaron significativos época de parto (I y V- $p < 0,0025$), el número de parto ($p < 0,0244$), el tipo de servicio y la interacción parto*IA ($p < 0,0092$), no así la raza del macho. La época en la cual la media de LD es mayor es invierno. Cuando se empleó servicio natural la proporción de LD en el primer parto resultó alta (93% LD) y decrece a partir del 2° parto (87% LD), sin importar la raza del macho utilizado en el servicio; cuando se emplea IA si bien la proporción de LD es más baja (83% LD) no muestra variaciones a partir del 2° parto. Los resultados del presente trabajo contribuyen a aportar datos sobre los factores que influyen en la productividad numérica de las cerdas del sudoeste chaqueño. Se evidencia que el utilizar IA como tipo de servicio no tiene un efecto perjudicial en el tamaño de las camadas a partir del 2° de parto; ya que el número ordinal de partos tiene una marcada influencia sobre la tasa de ovulación, que presenta un considerable aumento hasta el 4° parto. La diferencia en la proporción de LD entre invierno y verano corresponde a que en época estival las altas temperaturas ambientales de la zona resultan desfavorables para la reproducción.

Área Mejoramiento Genético- Sector Porcinos, INTA EEA Las Breñas, Chaco, Argentina

Ultraestructura e identificación de muerte celular por apoptosis en el ovario de *Myiopsitta monachus* y *Zenaida auriculata* (aves: *psittacidae* y *columbidae*)

BULFON, M.E.¹; BEE DE SPERONI, N.¹.

Se analizaron las características ultraestructurales y el proceso de muerte celular por apoptosis en el ovario de *Zenaida auriculata* (Paloma torcaza) y *Myiopsitta monachus* (Cotorra) a fin de aportar conocimientos básicos a la biología reproductiva de estas especies. Diez hembras adultas de cada especie se capturaron en Río I (Cba), ciclo 2007 - 2008. Cinco gónadas se postfijaron con tetraóxido de osmio y procesaron de acuerdo a la técnica para microscopía electrónica e igual número se utilizó para la valoración de apoptosis con la técnica de TUNEL. A nivel ultraestructural, el núcleo y las organelas del ovoplasma de los diferentes folículos ováricos exhiben variaciones de acuerdo al estadio de desarrollo, siendo una característica de los ovocitos primordiales y previtelogénicos pequeños (80 a 170 μ m) el notorio cuerpo de Balbiani. En los folículos previtelogénicos y vitelogénicos blancos > de 2 mm, el Aparato de Golgi, numerosas mitocondrias, el retículo endoplásmico rugoso y liso y los transosomas, estos últimos implicados en deposición del vitelo, constituyen las organelas más evidentes. Mientras que, en la zona cortical del ovoplasma

de los folículos vitelogénicos amarillos > de 4 mm, se observan abundantes gotas de vitelo en la proximidad del Aparato de Golgi y una notoria zona radiada. El inicio de la involución folicular se manifiesta por la hiperplasia del epitelio folicular y gran disminución de los transosomas y sus precursores, evidenciándose a posteriori la ruptura de la zona radiada y concomitantemente la desorganización de las organelas. La presencia de los lisosomas, grandes vacuolas, restos celulares y macrófagos caracterizan a la necrosis de los últimos estadios de atresia folicular en ambas aves. Además, mediante la marcación del ADN fragmentado, en la granulosa de los folículos vitelogénicos > de 2mm de *Z.auriculata*, se revelan numerosas células apoptóticas en estadios involutivos tempranos. De estos resultados se infiere que, en el ovario de las dos especies aviarias se desarrolla un mecanismo de crecimiento y diferenciación metabólicamente muy activo y uno de regresión caracterizado por un proceso de muerte celular por apoptosis y necrosis, entre otras.

Subsidiado por SECYT -UNC.

¹Anatomía Comparada. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
UNC. V. Sársfield 299. Córdoba. Argentina

Evaluación del patrón de expresión de genes marcadores de estrés en ovocitos madurados en medios con distinta composición de hormonas

CÁNEPA, M.J.¹; MUTTO, A.A.¹

La evaluación y predicción de la calidad de los ovocitos ha adquirido un rol substancial en las tecnologías de reproducción asistida (ART). La ausencia de técnicas confiables y objetivas como predictoras de la capacidad de maduración *in vitro* y del posterior desarrollo embrionario, dificulta la eficiencia de las ARTs. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de distintos protocolos de maduración de ovocitos sobre la abundancia relativa de 5 marcadores genéticos indicativos de estrés celular, reticular y apoptosis. Se maduraron ovocitos en 5 medios que variaban en la composición de hormonas y cisteamina: 1) Folltropin y cisteamina; 2) EGF; 3) EGF y cisteamina; 4) rhFSH; y 5) rhFSH y cisteamina. Se analizaron por PCR cuantitativa 3 grupos de 10 ovocitos madurados en cada uno de los medios. Los resultados se relativizaron a la expresión del control endógeno (GAPDH). La expresión de la proteasa de la subunidad $\beta 5$ del proteasoma se encontró aumentada significativamente ($P < 0,05$) en un 70% en promedio en ovocitos madurados en medio suplementado con Folltropin y cisteamina, en comparación con los otros medios de maduración; y la expresión de la chaperona del retículo endoplásmico, Bip, estaba aumentada

significativamente ($P < 0,05$) en un 120% en ovocitos madurados en el mismo medio, en comparación a aquellos madurados en medio suplementado con rhFSH- cisteamina. Si bien, la expresión de la chaperona citoplasmática Hsp70 y de los genes pro-apoptóticos Bax y Caspasa3 mostraron tendencia a aumentar en ovocitos madurados en medio suplementado con Folltropin y cisteamina, las diferencias no llega a ser significativas entre los distintos tratamientos. Los resultados sugieren que los ovocitos madurados en medio suplementado con FSH porcina y cisteamina cursan un estrés reticular que se ve reflejado en el aumento de transcritos que codifican para la chaperona Bip y para $\beta 5$ - Proteasa. Dado que la expresión de la chaperona citoplasmática Hsp70 no se ve modificada en ninguno de los tratamientos, se confirma que no hay evidencias de estrés celular generalizado. Sin embargo, el grado de estrés no es crítico como para inducir la apoptosis, debido a que los marcadores Bax y Caspasa 3 no se encuentran modificados. Este estudio podría complementar el análisis morfológico, con el fin de contribuir a desarrollar una técnica efectiva y precisa para el diagnóstico de calidad de ovocitos para ser utilizados en las ARTs.

¹Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Instituto Tecnológico de Chascomús, Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal. IIB-INTECH / UNSAM-CONICET.

Apoptosis in bovine granulosa primary cell cultures: morphological aspects and cell density dependence

CAROU, M.C.^{1,2}; CRUZANS, P.¹; FIORITO, C.D.^{1,2}; REVILLA, M.¹; LOMBARDO, D.M.^{1,2}

Gonadotropin-releasing hormone receptors (GnRHR) have been identified on ovarian granulosa (GC) and luteal cells. Activation CG's GnRHR regulates gonadal function. Experiences *in vivo* and *in vitro* showed that hormonal induction with GnRH agonists generates an increase of follicular atresia in rat ovaries. In order to analyze the apoptotic effect of 1, 10 and 100 nM concentrations of leuprolide acetate (LA) on bovine granulosa primary cell cultures (BGPC), 23 punctures of 3-8 mm follicles were performed and incubated for 24 and 48. They were analyzed morphologically with a hematoxylin stain, and the images were captured using a Leica DC-180 digital camera and the Leica IM50 software at a magnification of 100x. This analysis resulted in erratic results when the cultures had a basal density of cells per field below 9, with stable results when the cultures had density of cells per field superior than 9. Two experiments with a high density of cells were analyzed by a two-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison of means test against a control ($p = 0.0726$, $n = 6$, $\alpha =$

0.1), showing a significant 35% induction of apoptosis with 100 nM LA. This cell density dependant behavior, was also observed on an established bovine granulosa cell line, BGC-1, at a same value of cohort. Tests were performed to asses caspase 3 activity, as well as P-serine demarcation with Annexine V-FITC and PI with flow citometry, but the inconsistency of the results made impossible a statistical analysis. Poprtella *et al.*, 2010, *in vitro* tests have shown that differences in cell density generates modifications in the estrogen: progesterone (E2: P4) ratio of cell cultures. The association between apoptosis and steroidogenesis in GC *in vitro* is known, thus the determination of the E2: P4 ratio in cell cultures might prove helpful to acknowledge why ovarian granulosa cells are only induced into apoptosis at high cellular densities. In conclusion, cell density is a variable that can modulate apoptosis when analyzed *in vitro* on a bovine granulosa primary cell culture population, its expression being dependant on it.

¹Cátedra de Histología y Embriología,

²INITRA, Facultad de Cs. Veterinarias, UBA

Chromatin dispersion test in equine spermatozoa

CARRETERO, M.I.^{1,3}; ARRAZTOA, C.C.^{1,3}; CALDEVILLA, M.¹;
FERRANTE, A.¹; LOMBARDO, D.^{2,3}; NEILD, D.^{1,3}

There are different methods to evaluate sperm DNA. The Sperm Chromatin Dispersion assay (SCD) is based on the loss of proteins from sperm nuclei after exposition to lysing solutions, producing or not a halo depending on DNA fragmentation. The Toluidine Blue (TB) stain evaluates the degree of sperm chromatin decondensation by detecting disulfide bond absence. The objective of the study was to use the SCD test on equine sperm, to determine a positive control for the test, to establish the patterns observed and to correlate them with TB patterns. Semen samples were obtained from 4 stallions (n=4; r=2). Three positive controls for SCD were evaluated: a) semen exposure to 100° C for 30 minutes, b) incubation for 30 minutes in 0.3M NaOH at room temperature and c) 2 hs UV exposure. Three concentrations of 2-mercaptoethanol (ME) (2.5; 5 and 10%) were tested as SCD lysing solutions. An image analyzer was used to capture 600 images/ ejaculate (200/solution) and both the halo and the residual nuclear structure or “core” were

measured. The experimental design considered the treatment as a fixed factor and the ejaculate nested in the male. The SCD and TB patterns were correlated using Spearman's test. Significant differences ($p=0.04$) were observed in halo size between the 2.5% ($60.4 \pm 23.2 \mu\text{m}$) and 10% ($71.9 \pm 26.6 \mu\text{m}$) ME solutions, but not with the 5% ($63.9 \pm 23.1 \mu\text{m}$) solution (mean $\pm$ SD). The patterns observed were the same as those reported for humans: (i) large dispersion halos, (ii) intermediate halos, (iii) small halos and (iv) no halo. All positive controls proved effective. No correlation was observed between SCD and TB patterns. To conclude, the 5% ME solution was selected, because no differences in halo size were observed between this and the 2.5% ME solution. The absence of correlation between SCD and TB could be due to evaluating different DNA alterations. The use of the SCD test to evaluate equine sperm DNA fragmentation was simpler and less expensive than other methods such as TUNEL, SCSA and Comet.

¹. Cátedra de Teriogenología,

². Cátedra de Histología,

³. INITRA; FCV, UBA

Effect of freeze-thawing on llama sperm chromatin. Preliminary results

CARRETERO, M.I.^{1,4}; GIULIANO, S.M.^{1,2}; GAMBAROTTA, M.C.³;
ARRAZTOA, C.C.^{1,4}; CANTANZARI, M.J.¹; NEILD, D.^{1,4}

Sperm chromatin is very important because of its role in the fertilization process. In South American Camelids, low pregnancy rates have been observed using frozen semen and the reason could be due to the damage spermatozoa suffer during the freeze-thawing procedure. The objective was to evaluate the effect of cooling to 5° C and of freeze-thawing on chromatin condensation in llama spermatozoa using the toluidine blue (TB) stain. Semen was collected from 5 llama males (n=5; r=2) using electroejaculation under general anesthesia. Each ejaculate was incubated with a solution of 0.1% collagenase at 37° C for 8 minutes and then was divided into 4 aliquots. A lactose and egg-yolk (LEY) extender with either 7% glycerol (LEY-G) or 7% dimetilformamide (LEY-DMF) was added to 2 of the aliquots, which were then stabilized for 20 minutes at ambient temperature (AT). The other 2 aliquots were extended in LEY, cooled to 5° C, after which, LEY-G or LEY-DMF were added and then they were stabilized for 20 minutes at 5° C. After each stabilization period, the samples were frozen. The following smears were made for TB evaluation: a) fresh

semen, b) semen + LEY-DMF/5° C, c) semen + LEY-G/5° C, d) thawed semen (LY-DMF/AT), e) thawed semen (LY-G/AT), f) thawed semen (LY-DMF/5° C), g) thawed semen (LY-G/5° C). TB stain was carried out according to Carretero *et al.* (2009). For the statistical analysis, 2 factorial designs of 3 and 5 levels each were carried out; the male was taken as a blocking factor. Thus, fresh semen was compared with thawed semen and fresh semen was compared with semen stabilized at 5° C. Semen stabilized at 5° C and all freeze-thawing protocols showed a significant increase in sperm with chromatin condensation alterations ($p < 0.05$), except semen frozen with LEY-G and stabilized at AT, which was not different from fresh semen. To conclude, these preliminary results could be indicating that semen extended with LEY-G and stabilized at ambient temperature would seem to produce less alteration of sperm chromatin condensation as evaluated with toluidine blue.

Carretero MI, Giuliano SM, Casaretto CI, Gambarotta MC, Neild DM (2009). Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. *Invet* 11(1) 55-63.

¹Cátedra de Teriogenología, ²Cátedra de Física Biológica, ³Cátedra de Estadística, ⁴INITRA; FCV, UBA.

Evaluación del efecto de la hCG administrada al inicio del ciclo estral sobre la concentración plasmática de progesterona de borregas en anestro estacional con tratamiento de inducción de celos

CATALANO, R.¹; GONZÁLEZ, C.¹; TERUEL, M.¹; WILLIAMS, S.²; VIDELA DORNA, I.³; CALLEJAS, S.¹

La gonadotropina coriónica humana (hCG) ha sido utilizada con el objetivo de incrementar los niveles de progesterona (P) ovárica que permitan obtener mayor porcentaje de parición y/o mayor crecimiento de los fetos en ovejas y borregas cíclicas. No obstante, en borregas en anestro estacional no se ha evaluado dicho efecto. Por tal motivo, con el objetivo de evaluar el efecto de la hCG sobre los niveles plasmáticos de P, se realizó un estudio en borregas en anestro a las que se aplicó un tratamiento de inducción de celos y posteriormente se les administró hCG al inicio del ciclo estral. Se utilizaron borregas Corriedale (n: 25) de 8 meses de edad, que recibieron un tratamiento de inducción de celos (esponja intravaginal con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona [Syntex S.A.] por 10 días y 300 UI de gonadotropina coriónica equina [eCG. Novormón. Syntex S. A.] administradas al retiro de la esponja. A las 36 horas de retirados los dispositivos (día 0), las borregas se dividieron en tres grupos (grupo control, grupo h150 y grupo h300) que recibieron vía intramuscular, 2 ml de solución fisiológica, 150 UI de hCG y 300 UI de

hCG (Ovusun. Syntex S. A.), respectivamente. La ovulación fue confirmada por desaparición del folículo dominante y posterior aparición de un CL mediante estudios ecográficos cada 24 horas desde el día -1 hasta el día 6 (ecógrafo Sonovet 900; transductor de 7,5MHz). Se realizaron muestreos sanguíneos cada 48 h a partir del día 2 hasta el día 12 y cada 24 h, a partir del día 13 hasta el día 18. Se utilizó un diseño de medidas repetidas donde las parcelas son los distintos tratamientos y las subparcelas, los días de muestreos; los resultados fueron analizados a través del subprograma PROC MIXED (SAS). Se observó que los niveles de P no fueron afectados por la dosis de hCG administrada ($P>0,05$). Las concentraciones de P (promedio $\pm$ DE) durante todo el período de muestreo para los grupos control, h150 y h300 fueron $1,8\pm1,6$ ng/ml; $2,4\pm2,2$ ng/ml y $2,0\pm2,1$ ng/ml, respectivamente. Se concluye que, sobre la base del presente estudio, la hCG administrada al inicio del ciclo estral no afecta la concentración plasmática de P.

¹Fac. Cs. Vet (UNCPBA), ² Fac. Cs. Vet. (UNLP), ³ Lab. Syntex S. A.

Caracterización estructural del fenómeno de superposición de ondas foliculares en llamas

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

La llama, ovuladora inducida, requiere de un estímulo externo (cópula u hormonas) en presencia de un folículo maduro (> 7 mm) para ovular. En ausencia de ovulación, se desarrollan ondas repetitivas de crecimiento folicular y regresión en las que una onda superpone su origen con el final de la anterior. Este fenómeno induciría elevadas concentraciones plasmáticas de estrógenos por periodos prolongados que hacen a las hembras receptivas a los machos incluso en ausencia de un folículo con capacidad de ovular. Los estudios realizados a la fecha han caracterizado el desarrollo de ondas foliculares individuales, pero poco se sabe sobre el fenómeno de superposición de ondas foliculares sucesivas. El objetivo del presente estudio fue caracterizar estructuralmente el fenómeno de superposición de ondas en llamas. Para ello, se realizó ecografía diariamente a 9 llamas hembras adultas, no gestantes ni lactantes y aisladas completamente de los machos, por un período de 45-75 días. El folículo de mayor diámetro creció desde la emergencia a una tasa promedio de $0,7 \pm 0,04$ mm/día durante $10,7 \pm 0,5$ días y, alcanzó la fase de madurez donde sufrió variaciones promedio de $0,1 \pm 0,03$ mm/día durante $5,0 \pm 0,4$ días. En esta fase el folículo dominante alcanzó un diámetro máximo promedio de $10,9 \pm 0,5$ mm. Finalmente, el folículo regresionó ($0,8 \pm 0,05$

mm/día) en $9,5 \pm 0,6$ días. Así, la duración promedio de la onda completa fue de $25,1 \pm 0,8$ días. Los primeros 9 días post-emergencia, la tasa de crecimiento no difirió entre los animales y, el folículo alcanzó el diámetro ovulatorio a los 6 a 8 días de dicha emergencia. La ocurrencia de folículos maduros fue igual en el ovario derecho e izquierdo. En el 57,7% de los casos la emergencia de ondas sucesivas alternó entre los ovarios. La emergencia de ondas ocurrió en promedio cada $15,6 \pm 0,5$ días, y en consecuencia se observó un folículo con tamaño ovulatorio cada $16,2 \pm 0,5$ días. Este intervalo entre ondas sucesivas determinó un grado de superposición promedio del origen de una onda con el final de su predecesora de $31,5 \pm 2,0$ % ($8,0 \pm 0,6$ días). El diámetro máximo alcanzado por el folículo durante la fase de madurez dependió de la tasa de crecimiento y se correlacionó positivamente con el intervalo entre ondas y, en menor grado, con la tasa de regresión. El intervalo entre ondas se correlacionó negativamente con el grado de superposición entre ellas. En suma, esta información básica resulta de utilidad en el diseño de protocolos de control exógeno de la dinámica folicular, la planificación de servicios y la aplicación de tecnologías reproductivas en la especie.

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

Hypoosmotic swelling test (HOS) in domestic cat sperm

COMERCIO, E.A.¹; MONACHESI, N.E.¹; LOZA, M.E.¹⁻²; GAMBAROTTA, M.³; WANKE, M.M.¹⁻²

The routine spermogram in the domestic cat is based on the determination of individual sperm progressive motility, vigor, morphology and concentration using direct microscopic observation of the ejaculate. Nevertheless, these determinations do not offer information about sperm membrane functionality, which is of great importance for fertilization. The hypoosmotic swelling (HOS) test has been used in other species to indicate sperm fertilizing capacity. The aim of this study was to determine the response of domestic cat sperm to the HOS test and the type of solution, concentration and exposure time necessary to obtain the maximum percentage of sperm swelling. Also to correlate the results obtained with individual sperm progressive motility and finally to evaluate if semen dilution affects the results of the test.

Citrate and fructose solutions each of 50 and 100 mosmol/Kg were tried for 30 and 45 minute incubation periods. The highest percentage of swelling was obtained using the 50 mosmol/Kg fructose solution. Positive correlation was evident between the percentages of individual progressive motility and sperm swelling. No significant differences were observed between the different incubation times. When using the 50 mosmol/Kg fructose solution, no significant differences were observed between raw or diluted semen when evaluating sperm swelling percentages. The results obtained in this study suggest that the hypoosmotic swelling test may be useful for evaluating sperm membrane functionality in the domestic cat, both in raw semen and semen diluted with EZ Mixin®.

¹Cátedra de Teriogenología, ²INITRA, ³Cátedra de Bioestadística. Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

Recuperaciones embrionarias sucesivas en ovinos

CUETO, M.; PEREYRA-BONNET, F.; ESCOBAR, L.; GIBBONS, A.

Se evaluó la producción de embriones ovinos, mediante tres recuperaciones embrionarias sucesivas. Diez ovejas Merino fueron tratadas con 60 mg de MAP con esponjas intravaginales (Progespon®, Syntex, Argentina) durante 14 días. Al retiro, se administró 200 UI de eCG im (Novormon®, Syntex, Argentina). A partir del día 12 post colocación de la esponja intravaginal, cada oveja donante recibió un total de 80 mg de FSHp (Folltropin®-V, Bioniche, Canadá), suministrados en 6 aplicaciones cada 12 h (18, 18, 14, 14, 8 y 8 mg). A las 12 h luego de la detección de estros, se procedió a la inseminación laparoscópica con semen congelado (100 x 106 esp). Se realizó la recuperación quirúrgica de los embriones a los 8 días post retiro de las esponjas intravaginales. Al finalizar cada recuperación embrionaria, se administraron 50 µg de prostaglandinas (Estrumate®, Schering-Plough,

Argentina). Al quinto día post aplicación de prostaglandinas, se procedió nuevamente a la colocación de esponjas intravaginales por 14 días, reiniciándose los mismos tratamientos descriptos de ovulación múltiple y recuperación embrionaria, hasta totalizar 3 recuperaciones quirúrgicas sucesivas por oveja donante. La tasa de recuperación embrionaria fue mayor en la primera intervención quirúrgica respecto a la segunda y tercera ($P<0,05$). El número de embriones totales y embriones Grados 1-2 obtenidos se redujo en la tercera recuperación sucesiva ($P<0,05$) (Tabla 1).

La recuperación quirúrgica de embriones mediante tres tratamientos sucesivos de ovulación múltiple permitió obtener un valor medio de 18,5 embriones por oveja donante en un período de 2,5 meses.

Tabla 1. Eficiencia productiva de embriones en ovejas Merino tratadas con 80 mg de pFSH + 200 UI eCG en tres recuperaciones embrionarias sucesivas.

	Recuperaciones embrionarias		
	Primera	Segunda	Tercera
Cuerpos lúteos ($\pm$ SEM)	13,8 $\pm$ 2,2a	12,1 $\pm$ 2,2a	12,0 $\pm$ 2,2a
Embriones totales ($\pm$ SEM)	8,3 $\pm$ 1,4a	6,3 $\pm$ 1,4ab	3,9 $\pm$ 1,4b
Embriones Grados 1-2* ($\pm$ SEM)	7,4 $\pm$ 1,3a	5,7 $\pm$ 1,3ab	3,2 $\pm$ 1,3b
Recuperación de embriones totales (%)	66,1 $\pm$ 7,5a	41,4 $\pm$ 7,5b	34,5 $\pm$ 7,9b
Recuperación de embriones Grados 1-2 (%)	84,8 $\pm$ 8,4a	89,5 $\pm$ 9,4a	67,4 $\pm$ 8,9a
Tasa de fertilización (%)	100 $\pm$ 5,6a	95,8 $\pm$ 6,3a	85,3 $\pm$ 6,0a

Valores con diferente letra presentan diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$)

*Grados de calidad embrionaria 1-4, IETS 1998

Lab. Reproducción Rumiantes Menores, INTA Bariloche, Argentina

Distribución epitelial de ciclooxigenasa 2 en endometrio ovino

D'ANATRO, G.; ACUÑA, S.; LÓPEZ, C.; GARÓFALO, E.G.; TASENDE, C.

En ovinos, ocurren naturalmente fases lúteas subnormales (FLSN), las cuales se caracterizan por presentar una duración mas corta que la normal y/o una concentración de progesterona (P) circulante menor a la normal. Se ha demostrado que es necesaria una exposición previa a la P para desarrollar una función lútea normal (FLN). Una de las causas de la FLSN es la luteólisis prematura provocada por la liberación anticipada de PGF2 α . La PGF2 α se sintetiza a partir del Ácido Araquidónico por acción de la Ciclooxigenasa 2 (COX-2) que cataliza la síntesis de Prostaglandinas. Se estudió la distribución de COX-2 en epitelio luminal caruncular (ELC) e intercaruncular (ELIC) del endometrio de ovejas ciclando y en anestro estacional tratadas con GnRH con o sin P previa. Se tomaron muestras endometriales de 19 ovejas ciclando, los días 1, 6 o 13 de detectado el estro (día 0). Veintidós ovejas en anestro estacional fueron tratadas con 9 micro dosis de GnRH i/v cada 2 h y a las 16 h de la primer dosis se le administro un bolo de GnRH (día 0) para inducir FLSN (Grupo GnRH) o con igual tratamiento de GnRH precedido de P por 10 días (Grupo P+GnRH) para inducir FLN. Las muestras se tomaron al día 1 o 5 del bolo de GnRH. La distribución de

COX-2 se determinó por inmunohistoquímica y la intensidad de inmunomarcado se analizó por ANOVA ($p < 0.05$). En las ovejas ciclando se encontró efecto día sobre el inmunomarcado, siendo en ambos epitelios mayor al día 13 que a los días 1 y 6, entre los que no hubo diferencias. En las ovejas tratadas se encontró efecto de tratamiento, día e interacción entre ellos sobre el inmunomarcado a COX-2. Al día 1, el inmunomarcado en ELC fue menor en el grupo GnRH que en el P+GnRH y en ELIC no se encontró diferencias entre grupos. Al día 5, el inmunomarcado fue mayor en el grupo GnRH que en el P+GnRH en ambos epitelios. El inmunomarcado en el grupo P+GnRH, desde el día 1 al 5 no varió en ELIC y disminuyó en ELC. Contrariamente en el grupo GnRH desde el día 1 al 5 el inmunomarcado aumentó en ELC y ELIC. En las ovejas ciclando, el aumento de la expresión de COX-2 endometrial al día 13 es consistente con su participación en la luteólisis normal. En las ovejas tratadas sólo con GnRH, la mayor expresión de COX-2 al día 5, en relación a las pre-tratadas con P y a las ovejas ciclando (día 6) sugiere que la ciclooxigenasa 2 podría estar involucrada en el desarrollo prematuro de la luteólisis.

Effect of long term melatonin administration in pre and postpubertal domestic cats (*Felis catus*)

FAYA, M.²; RISSO, A.¹; CARRANZA, A.²; PAGANELLI, Y.²; PONCHÓN, T.²; CALABOZO, M.²; BAROVERO, M.²; GOBELLO, C.¹

Despite of the adverse effects on cat species, the pharmacological control of cat population has been conducted through steroid hormone administration. Thus, we have decided to study other different hormones able to interrupt the estral cycle similarly without producing a negative outcome. The aim of this study was to assess the efficacy and safety of melatonin long term administration (either as an implant or an oral presentation) on domestic cat interestrus intervals. Additionally, the effect of melatonin implants on puberty postponement has been studied. Two randomized controlled trials were conducted. In the first one, 68 interestrus intervals of 28 postpubertal queens were studied and in the second 29 prepubertal female cats were used. During non-ovulatory interestrus intervals the postpubertal cats were assigned to: melatonin implant 18 mg/cat sc (n = 17; MEI), melatonin tablets 4 mg/cat q 24 hours po (n=12;

MEO) until estrus onset or control (n = 12; CTL). The prepubertal females were randomly assigned to: melatonin 18 mg/cat sc implants at either 1.9±0.3 (MEI-A; n = 10) or 1.5±0.3 kg (MEI-B n = 10) body weight or control (CTL, n = 9). Interestrus intervals in the postpubertal MEI, MEO and CTL groups were 63.8 ± 5.4, 63.0 ± 5.3 and 19.2± 1.4 days (p<0.05), respectively. Treatment onset – first estrous cycle interval in the same groups were 51.0 ± 4.7, 50.0 ± 6.1 and 12.6 ± 1.1 days (p<0.05). In the second experiment, neither age (MEI-A [232.9±11.5 days] vs. MEI-B [208.6±13.0 days] vs. CTL [190.1±22.4 days]; p > 0.1) nor body weight (p > 0.1) at puberty differed among groups. None of the cats of both studies presented side effects. It was concluded that long term melatonin treatment shortly prolongs interestrus but does not postpone puberty in domestic cats.

¹Laboratorio de Fisiología Reproductiva, Universidad de La Plata - CONICET

²Universidad de Católica de Córdoba

Oxidative metabolism changes with different substrates in heparin capacitation of cryopreserved bovine spermatozoa

FERNÁNDEZ, S.; CÓRDOBA, M.

Heparin is a glycosaminoglycan presents in genital tract of bovine female that induces sperm capacitation *in vitro*. Spermatozoa requires oxidative substrates for capacitation and acrosome reaction. Sperm motility is maintained by the production of ATP obtained in glycolysis and in oxidative phosphorylation. ATP production can be evaluated through the determination of oxygen consumption, an indicator of the mitochondrial function. The aim of this study was to evaluate heparin capacitation through lactate dehydrogenase (LDH) activity, variation of lactate concentration in incubation medium and oxygen consumption in the presence of lactate (L) and pyruvate (P) like oxidative substrates. Activity of LDH was assayed in a spectrophotometer at 340 nm and oxygen consumption was measured polarographically with an oxygen electrode modified Clark type. Capacitation was evaluated by the chlortetracycline epifluorescent technique (CTC) and viability by Trypan blue stain. Data was analyzed by ANOVA and Tukey test ($P < 0.05$). In heparin capacitated sperm was

observed a decrease in the concentration of lactate when it was only combined with pyruvate ($0.36 \pm 0.03 \times 10^6$ spermatozoa) respect to control ($0.49 \pm 0.01 \times 10^6$ spermatozoa). With pyruvate as unique oxidative substrate there was no production of lactate. Oxygen consumption was increased in the presence of P/L ($P < 0.05$). The greater percentage of capacitation was induced in the presence of pyruvate or P/L respect to the obtained with lactate only. The sperm viability was similar in all treatments decreasing in the absence of substrates ($P < 0.05$). LDH activity decreased in the presence of P/L respect to control. Heparin is not able to capacitate bovine spermatozoa without the presence of oxidative substrates. In the presence of pyruvate or P/L the metabolic destiny of the pyruvate would be the entrance into a oxidative pathway as Krebs cycle, as it was demonstrated by the low production of lactate and the increase of oxygen consumption. The mitochondrial function is crucial in order to obtain energy in heparin capacitated spermatozoa

In vitro capacitation of cryopreserved spermatozoa of dama deer (*Dama dama*)

FERNÁNDEZ, S.¹; SESTELO, A.^{2,3}; RIVOLTA, M³; CÓRDOBA, M.¹

The biodiversity is threatened at the moment mainly by the impact of the man on the ecosystems. The reproductive biotechnologies, as cryopreservation and *in vitro* fertilization, constitute a strategy to preserve the genetic biodiversity of species in extinction danger. The aim of this study was to determine sperm response to heparin, lysophosphatidylcholine and progesterone, in frozen-thawed semen of dama deer (*Dama dama*) during reproductive season (brama). In this way dama deer could be used like a biological model of endangered cervids. Deers in captivity were isolated during 4-5 days before the semen collection by electroeyaculation. Heparin and lysophosphatidylcholine/ progesterone were used like capacitation and acrosome reaction inducers, respectively. Capacitation and acrosome reaction were evaluated by chlorotetracycline epifluorescence technique (CTC). Data was analyzed by ANOVA and Tukey Test ($P<0.05$). Semen was

cryopreserved in Fructose-Tris-Glicine extender. The progressive motility percentage of frozen-thawed sperm was $58,89 \pm 4.17\%$ with a vigor of 4. Capacitation with heparin at 45 minutes incubation was $24.0 \pm 3.09\%$, showing CTC bovine sperm patterns. When acrosome reaction was induced with lysophosphatidylcholine (100 $\mu\text{g/ml}$) or progesterone (1 μM) in heparin capacitated sperm, percentage of reacted spermatozoa was $29.5 \pm 3.45\%$ and $26.0 \pm 3.90\%$, respectively ($P<0.05$). Heparin induces capacitation in *Dama dama* deer, confirming this induction by the acrosome reaction obtained by lysophosphatidylcholine or progesterone treatment. This study contributes to understand *in vitro* capacitation and acrosome reaction allowing to advance with the development of reproductive biotechnologies like a conservation strategy of species threatened of the Cervidae family.

¹Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal INITRA - Química Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias UBA.

²Fundación Bioandina Argentina.

³Jardín Zoológico de la Ciudad de Buenos Aires

Optimización del método de PCR para la detección de posibles transgénicos ovinos

FERNANDEZ-MARTIN, R.¹; PEREYRA-BONNET, F.¹; GÓMEZ, C.²; PAGANO, E.²; GIBBONS, A.³; CUETO, M.³; ARDILA, F.²; SALAMONE, D.¹

La PCR es la técnica más usada para la identificación de animales transgénicos debido a su rapidez, simplicidad y bajo costo. En el laboratorio, la amplificación de genes a partir de plásmidos purificados puede hacerse muy eficientemente, inclusive a muy bajas concentraciones. Sin embargo, la detección de transgenes en tejidos puede complicarse si el animal a analizar tiene bajo número de copias por genoma o presenta mosaicismo. En el presente trabajo analizamos 12 fetos ovinos obtenidos a partir de cigotos microinyectados en el citoplasma con el plásmido pCX-NEGFP, que contiene la secuencia codificante del gen GFP. Se realizaron extracciones de ADN de distintos tejidos y se cuantificaron mediante espectrofotometría y gel de agarosa al 1 %. Se utilizó el gen de la β globina como control endógeno. Para detectar el transgén, se diseñaron dos pares de primers internos para GFP (PCR y nested PCR). La optimización de la PCR se realizó con ADN genómico de un ovino no transgénico con el agregado de pCX-NEGFP en una concentración i) equimolar (cEq) imitando un transgénico con una copia por genoma; ii) diez veces menor (cEqx0.1) para imitar un transgénico mosaico; iii) diez veces mayor (cEqx10) considerando posibles integraciones múltiples. Como control positivo se utilizó plásmido solo, y como control negativo ADN

genómico ovino. En el primer grupo de PCRs se compararon 6 temperaturas de anealing (entre 55 y 65° C). En el segundo grupo de PCRs se compararon 5 concentraciones de CIMg (entre 1,5 y 0,5) con la mejor temperatura de anealing. En los grupos cEq y cEqx10 y control positivo, se obtuvieron amplicones en todas las condiciones analizadas. Sorpresivamente, en el grupo cEqx0.1 solo se logró ver amplicón a 63 y 65° C, con una temperatura de annealing 10° C superior a la temperatura “óptima” según el diseño de los primers. Utilizando ADN extraído del pulmón con estas nuevas condiciones de PCR, se obtuvo una tenue amplificación de uno de los fetos, que fue claramente reamplificada con la nested PCR. Este mismo feto había dado negativo usando las condiciones “ideales” donde daba positivo el control con plásmido solo. Se obtuvo el mismo resultado en sucesivas determinaciones realizadas con el mismo ADN. Nuestros resultados, demuestran que el DNA genómico desvía recursos hacia amplicones inespecíficos descartando posibles positivos por no tener optimizadas las condiciones. En conclusión, se destaca la necesidad de efectuar ensayos preliminares incluyendo positivos reconstituidos, para la evaluación de materiales presuntamente transgénicos y no quedarnos con el clásico control positivo de plásmido solo.

¹Laboratorio Biotecnología Animal, FA-UBA.

²Instituto de Genética “Ewald A. Favrer”, CICVyA, INTA Castelar.

³Laboratorio de Reproducción en Rumiantes Menores, INTA Bariloche

Relationship between pentose phosphate pathway activity and porcine oocyte *in vitro* maturation

FERRETTI, E.; ALVAREZ, G.G.; DALVIT; CETICA, P.

Glucose consumed by murine, bovine and porcine *cumulus*-oocyte complexes (COCs) would be aimed primarily to the glycolytic pathway. However, glucose may be alternately oxidized in the pentose phosphate pathway (PPP), which is involved in the regulation of intracellular redox state, pentose 5-phosphate production and generation of NADPH for reductive synthesis. The activity of this pathway may be linked to oocyte maturational ability. The aim of this study was to establish the possible relationship between the PPP activity and the different stages of maturation reached by pig oocytes *in vitro*. COCs were obtained by aspiration of antral follicles (3-8mm) from ovaries of slaughtered gilts. Maturation was performed during 48 hours in 199 medium supplemented with gonadotropins at 39°C, 5% CO₂ in humidified atmosphere. The pathway activity was determined incubating the COCs during the last 3 hours of maturation in culture

medium supplemented with 4.8 mM of Brilliant Cresyl Blue. The oocytes arising from COCs that have low activity of the PPP remain blue, while those with high activity of the pathway may fade. Meiotic progress was determined by evaluating the nuclear stages: germinal vesicle, germinal vesicle breakdown, metaphase I and metaphase II. Statistical association between variables was determined by the independence test of Chi-square. It was observed that oocytes with PPP activity did not remain in germinal vesicle stage and a high proportion of them reached metaphase II, demonstrating the association between the variables ($p = 0.00001$). While no association was found between the metabolic pathway activity and the permanence of the oocyte in intermediate nuclear stages (germinal vesicle breakdown and metaphase I). Therefore, the PPP activity may be related to the ability of oocytes to resume meiosis and complete nuclear maturation.

Histological analysis of the testes, epididymus and ductus deferens of male specimens of commerson's dolphin (*Cephalorhynchus commersonii commersonii*) from patagonian coasts.

FIORITO, C.D.¹; CLAVER, J.A.¹; BOVIEZ, J.D.¹; TOSSENBERGER, V.P.²;

IÑIGUEZ, M.A.²; LOMBARDO D.M.¹

The Commerson's dolphin (*Cephalorhynchus commersonii*) have two well defined populations which are considered two subspecies: *C. c. commersonii* in Patagonian Coasts of Argentina and Malvinas islands, and *C. c. kerguelensis* around Kerguelen islands (Robineau *et al.* 2007). Few is known on reproductive biology of this species, particularly of the subspecies that inhabits Argentina waters. In the present work, we describe for the first time the histological features of the testes and upper reproductive tract of two specimens of Commerson's dolphins found stranded in Bahia San Julian coasts (Santa Cruz, Argentina) with the aim of characterize its reproductive status. The gonads, epididymus and part of the ductus deferens were dissected, weighted and fixed in 10% formalin until remission two our laboratory where anatomical measures were made and representative samples were taken for histological examination. The samples were embedded in paraffin, cuted and stained with H/E, Massons trichrome and PAS stain. Frozen sections were stained with Sudan black. Results: the testes are dorso-ventrally elongated, with a central mediastinum and intratesticular *rete testis*. The epididymus present a well defined *caput*, *corpus* and *cauda*. The cauda

is prominent, greatly overpassing the posterior pole of the testis. The ductus deferens begins into this prominent portion as a convoluted duct. Male A: Total length, 131,5cm. Testes length (TL): W= 5 cm L= 5,2 cm. Seminiferous tubules with closed lumen containing mostly spermatogonia and Sertoli Cells. Diameter of seminiferous tubules (DTS): $45.73 \pm 4.27 \mu\text{m}$. In few cases, primary spermatocytes. Poorly developed interstitium, with few Leydig cells. Epididymus with scant lumen development and without evidence of secretion. Absence of spermatozoa. Classified as immature. Male B: Total length: 145cm, TL: W=11.4, L = 11.5 cm. Developed seminiferous tubules. All stages of spermatogenesis present. Few spermatozoa. DTS= $120.05 \pm 15,91 \mu\text{m}$. Well developed Leydig cells with few vacuoles and yellow refractile crystalloids. Epididymus with plicated lumen and a high epithelium with evidence of secretion. Few spermatozoa in epididymus. Classified as prepuberal or adult at the end of his reproductive period. In view of the anatomo-histological features described in male B we suggest that the subspecies *CC commersonii* may attain sexual maturity at a smaller size that the subspecies *C. C kerguelensis*.

¹ Area Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias, INITRA, Universidad de Buenos Aires.

² Fundación Cethus

Relación entre celo-inseminación con semen sexado y el porcentaje de preñez en vaquillonas Holstein

GALASSI, I.¹; MARINI, P.R.¹

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la relación entre la duración del período transcurrido entre la detección del celo y la inseminación con semen sexado y el porcentaje de preñez en vaquillonas Holstein. En un estudio observacional de carácter retrospectivo se evaluó información recolectada durante el año 2009 entre los meses de Julio a Noviembre, sobre 607 períodos celos-servicios correspondientes a 607 vaquillonas Holstein provenientes de un establecimiento ubicado en la Cuenca Este de la Pcia. de Córdoba, durante el período analizado se utilizó semen sexado de cinco toros. Se registraron observaciones de celos e inseminaciones durante cuatro veces por día. En función de esta información las vaquillonas se categorizaron de acuerdo al lapso en horas transcurrido entre la detección del celo y su inseminación, en cuatro grupos: G1:9:00-10:59 horas, G2:11:00 a 12:59 horas, G3:13:00 a 14:59 horas y G4:15:00 a 17:00 horas. La proporción observada de hembras preñadas en cada período, bajo la hipótesis que la probabilidad de preñez de las vaquillonas es la misma en todos ellos se analizó, con una prueba de bondad de ajuste extrínseca a los datos basada en la estadística Chi-cuadrado, también se evaluó, dentro de los toros, con la misma prueba. Los resultados

por grupo mostraron G1: 126 servicios, 53 vaquillonas preñadas, 42 % de concepción; G2: 115 servicios, 56 vaquillonas preñadas, 49 % de concepción. G3: 275 servicios, 130 vaquillonas preñadas, 47 % de concepción y G4: 91 servicios, 43 vaquillonas preñadas, 47 % de concepción. No hay diferencias significativas entre los distintos grupos $P=0,72$ ($X^2=1,306$) y el porcentaje de preñez, aunque se observa un corte entre el primer grupo y los tres restantes. Los resultados por toro mostraron Toro 1: 149 servicios, 82 vaquillonas preñadas, 55 % de concepción; Toro 2: 67 servicios, 27 vaquillonas preñadas, 40 % de concepción; Toro 3: 224 servicios, 108 vaquillonas preñadas, 48 % de concepción; Toro 4: 34 servicios, 15 vaquillonas preñadas, 44 % de concepción y Toro 5: 133 servicios, 50 vaquillonas preñadas y 38 % de concepción. Las comparaciones fueron estadísticamente significativas $P = 0,0408$ ($X^2 = 9,984$), para el efecto porcentaje de preñez dentro de toro. Se concluye que en las inseminaciones efectuadas entre las 09:00 y 17:00 horas después de la iniciación del celo no se observaron repercusiones negativas sobre el porcentaje de preñez, pero sí con el tipo de toro utilizado.

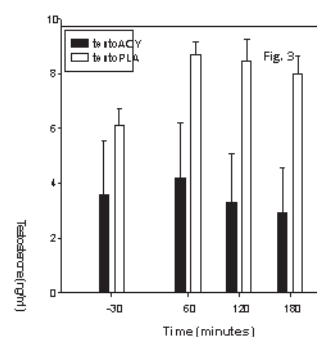
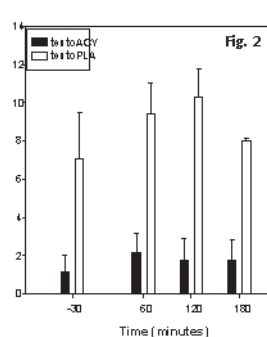
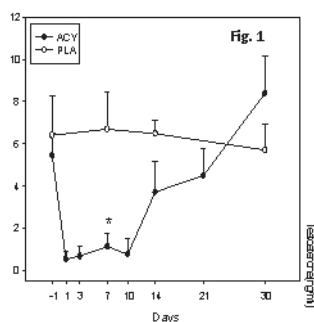
¹Cátedra de Producción de Bovinos Lecheros. Facultad de Cs. Veterinarias, UNR.

Endocrine response to exogenous GnRH in male dogs treated with a GnRH antagonist

GARCÍA ROMERO, G.; RISSO, A.; VALIENTE, C.; CORRADA, Y.; ABEYA, M.;
RODRÍGUEZ, R.; GOBELLO, C.

Acyline is a potent and safe, third generation GnRH antagonist which has a promising place in future canine reproduction control. The objective of this study was to describe testosterone (T) response to GnRH challenge in GnRH antagonist-treated dogs over a 30-day period. Eight reproductively normal mixed-bred dogs were randomly assigned to acyline (NIH, USA) 330 µg/kg sc (ACY; n=4) or a placebo group (PLA; n=4; day 0), and challenged with the agonist buserelone (Receptal®, Intervet) 0.2 µg/kg sc on days -7, 1, 3, 7, 14, 21 y 30. Blood samples were collected before (-30 minutes) and 60, 120 and 180 minutes after the injection for T determinations. Testosterone was measured by electrochemiluminiscense

(Elecsys®, Cobas, England) and data analyzed by ANOVA for repeated measures (SPSS®). Before treatments (day -1) there were no differences in T concentrations between groups ($P > 0,1$). After treatments, there was an interaction between treatment and day ($P = 0,05$). Testosterone varied in the ACY ($P < 0,01$) but not in the PLA group ($P > 0,1$). In the ACY group, day 30 differ from days 1, 3, 7 and 10 ($P < 0,01$; Fig 1). On day -1, the stimulation tests had only a time effect ($P = 0,05$), although on days 7 ($P < 0,01$; Fig 2) and 14 ($P < 0,05$; Fig 3) the response differed between groups. The GnRH antagonist treated canine gonadal axis seemed to be unable to physiologically respond to agonistic challenge during 14 days



Laboratory of Reproductive Physiology. Faculty of Veterinary Medicine,
National University of La Plata – CONICET. Argentina

La dinámica folicular en lagartos *Tupinambis merianae* e incidencia de las interacciones sexuales sobre la ovulación

GARCÍA VALDEZ, M.V.; CHAMUT, S.; VALDEZ JAEN, G.; ARCE, O.; MANES, M.

A lo largo de su historia evolutiva, los reptiles han desarrollado una amplia variedad de estrategias reproductivas, que incluyen desde reproducción sexual y partenogénica, oviparidad y viviparidad con diversos grados de placentación, ciclos reproductores estacionales o continuos, asociados o disociados. Estas se basan no solo en un correcto ajuste entre las condiciones climáticas y las respuestas neuroendocrinas, sino también en finos mecanismos de coordinación entre sexos. Evidencias de sincronización sexual, son los varios ejemplos de recrudescencia gonadal y ovulación inducidas por miembros del sexo opuesto.

En este trabajo, empleando ultrasonografía y la identificación de individuos mediante microtransmisores, se evalúa la dinámica folicular en hembras de *Tupinambis merianae* en condiciones de reproducción y de aislamiento sexual.

En las tres temporadas reproductivas consecutivas, se presentaron series de desarrollos foliculares con ovulación; series de desarrollos foliculares sin ovulación, seguidos por procesos

de involución, y también la alternancia de ambos casos. El 34% de las hembras estudiadas ovipusieron, presentado los folículos, un crecimiento sostenido y uniforme hasta la ovulación. En los ciclos anovulatorios (66%), se distinguieron dos patrones de desarrollo folicular, de curso corto y de curso largo. El crecimiento limitado y el carácter anecogénico de los folículos del primer tipo, sugieren que sólo alcanzaron una fase previtelogénica; mientras que los folículos involucrados en el segundo tipo, se encontrarían en etapa vitelogénica. Los procesos de desarrollo folicular, ovulación y regresión folicular en *T. merianae* constituyeron eventos generalizados, afectando a ambos ovarios y a la totalidad de los folículos reclutados. El desarrollo folicular anovulatorio de hembras en reproducción, reveló un plus de crecimiento respecto a las hembras sexualmente aisladas. Este efecto se encontró asociado a las interacciones sexuales pero no a las cópulas efectivamente registradas en el grupo. Por otra parte, la ovulación en esta especie apareció fuertemente condicionada por la cópula.

Análisis de la peroxidación lipídica y composición de ácidos grasos durante la criopreservación de semen porcino

GAVAZZA, M.¹; MARMUNTI, M.¹; WILLIAMS, S.²; GUTIÉRREZ, A.M.^{1,3};
PIERGIÁCOMI, V.¹, PALACIOS, A.¹

El oxígeno es esencial para la vida, pero puede ser tóxico cuando hay una producción exagerada de sus especies reactivas. Las membranas de los espermatozoides son vulnerables a la peroxidación lipídica (PL). Este proceso es causa potencial de infertilidad en machos de numerosas especies, ya que existiría una relación entre la PL y la motilidad de los espermatozoides. El objetivo del presente trabajo fue analizar en semen porcino la PL (no enzimática) y la composición de ácidos grasos (AG) durante las diferentes etapas del proceso de criopreservación: 1) a 15° C, 2) 15° C + medio Boarciphos A (previo al enfriamiento), 3) a 5° C + medio Boarciphos B (antes de la congelación) y 4) descongelación. Se utilizó semen porcino proveniente del Laboratorio de Reproducción Animal (FCV-UNLP) de padrillos de la facultad y de establecimientos comerciales. Los lípidos se extrajeron por el método de Folch. La composición de AG se realizó mediante cromatografía gaseosa. La PL fue iniciada por el

agregado de ascorbato-Fe⁺⁺ y se determinó por quimioluminiscencia (cpm). Cuando se analizó el proceso de peroxidación lipídica, se observó que las muestras fueron sensibles en todas las etapas de congelación estudiadas, encontrándose una alta variabilidad individual en los valores de quimioluminiscencia. La composición de AG de los espermatozoides en los distintos suinos fue diferente. Cuando analizamos el porcentaje total de AG no saturados luego del proceso de lipoperoxidación, no se encontraron diferencias significativas en las etapas 1 y 2, mientras que sí las hubo luego del enfriamiento, siendo más marcadas durante la descongelación. Puede concluirse entonces que existe variabilidad en: la PL y en la composición de AG entre los diferentes suinos analizados. La PL podría ser uno de los mecanismos bioquímicos responsables de los cambios fisiológicos durante la criopreservación, dado que los espermatozoides presentan un alto porcentaje de AG polinsaturados y éstos son sustrato importante de la PL.

¹Cátedra de Bioquímica, ²Cátedra de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, ³Cátedra de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP 60 y 118 (1900), La Plata, Buenos Aires.

Effects of leuprolide acetate (GnRH analogue) as inductor of apoptosis in primary cultures of bovine luteal cells

GERMANO, P.; MARURI, A.; SOÑEZ, MC.; LOMBARDO, DM

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) has been involved in mechanisms associated with apoptosis in mammalian ovary in relation with the processes of folliculogenesis, follicular atresia and luteolysis.

The effects of GnRH agonists / antagonists on bovine luteal cells have not been explored. This study aims to evaluate the effects of Leuprolide Acetate (LA - GnRH agonist) and Antide (ANT - GnRH antagonist) on apoptosis in primary cultures of bovine luteal cells. Bovine ovaries were collected from slaughter animals and corpora lutea were isolated. Luteal cells were dispersed by mechanical and enzymatic treatment (trypsin 0.25%), 1x 10⁵/well were seeded and cultured for 7 days with DMEM + F12 supplemented and 10% FBS. Oil red stain was applied to detect lipid vacuoles typical of luteal steroidogenic cells. Treatments for 24 and 48 hours with 5% FBS (Control), ANT 100 nM, LA 1,10 and 100 nM and ANT plus LA 1,10 and 100 nM were run by triplicate. Apoptotic bodies were assessed following

morphological criteria by staining with Mayer Hematoxylin. Images were captured using IM50 software (Leica). Data were statistically analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni test ($p \leq 0.05$). Results indicate an increased number of apoptotic cells in relation to the dose of LA. In treatments of 24 hours there was no significant statistical differences, where as in cultures treated for 48 hours with increasing doses of LA (1,10, and 100 nM), there was an increase in the percentage of apoptotic bodies compared to control indicating significant differences with the dose of 100 nM ($p=0.0048$).

ANT seems to behave as an antagonist partial since increased the percentage of apoptotic bodies in respect of control, but not completely abolished the inducing effect of LA in all the doses used. We conclude that LA is an inducer of apoptosis in a dose-dependent in bovine luteal cells in primary cultures stimulated for 48 hours, resulting partially blocked this effect by the antagonist ANT 100 nM dose.

Prevalence rates of morphological abnormalities in commercial bull frozen semen. Preliminary study.

GHIRARDOSI, M.S.; JORGE, A.; MALCERVELLI, D.; BLASI C.;
FISCHMAN, M.L.; CISALE H.

Sperm morphology abnormalities and their frequency may help to predict semen fertilizing capacity. Commercial doses of bull frozen semen for artificial insemination (AI), despite being subject to prior selection, have a certain percentage of morphological alterations. The aims of this study were to determine the prevalence of morphological abnormalities in frozen semen samples of beef (Angus and Polled Hereford) and dairy breeds bulls (Holstein and Jersey) and to determine the possible existence of differences between them, regarding the percentage of abnormal sperm. We analyzed 25 doses of frozen semen straws, sent to our laboratory from different AI centers for quality certification. The sperm morphology was evaluated using Bengal Rose staining (3 % m/v) and light microscopy (1000X magnification). Normality was verified using the Shapiro Wilks test and those variables which were not normally distributed were transformed to natural logarithm. To conduct inferential statistics,

Student's "t" test was performed. The mean percentage of abnormal sperm from beef breeds was $18.02\% \pm 9.14\%$ (head: $2.99\% \pm 2.71\%$; midpiece: $10.7\% \pm 6.78\%$; tail: $2\% \pm 1.4\%$) and from dairy breeds was $6.79\% \pm 3.22\%$ (head: $0.33\% \pm 0.47\%$; midpiece: $4.22\% \pm 2.35\%$; tail: $2.04\% \pm 1.51\%$). Significant differences in the percentage of abnormal sperm ($p = 0.003$) were found. When analyzing the percentage of sperm abnormalities by region, only significant differences in the percentage of midpiece abnormalities were found ($p=0.02$). To date, we conclude that the midpiece abnormalities were the most frequent, mainly the distal flexion of the tail (compensable defect). On the other hand, both biotypes differ significantly in the percentage of abnormal sperm and the percentage of midpiece abnormalities. The higher percentage of sperm abnormalities in beef breeds could be due to different selection pressure.

Eficiencia de un tratamiento de ovulación múltiple con dosis reducida de FSH-p en ovejas merino

GIBBONS, A.; PEREYRA-BONNET, F.; ESCOBAR, L.; CUETO, M.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de la producción de embriones ovinos, reduciendo la dosis del tratamiento multiovulatorio con hormona folículo estimulante. Las ovejas donantes de embriones recibieron 60 mg de MAP en esponjas intravaginales (Progespon®, Syntex, Argentina) durante 14 días (día 0, inserción de esponja). Al retiro, se administró 200 UI de eCG im (Novormon®, Syntex, Argentina). Las donantes tratadas con dosis testigo (DT: n = 11) o dosis reducida (DR: n= 43) fueron superovuladas con un total de 200 mg y 80 mg de FSHp (Folltropin®-V, Bioniche, Canadá), respectivamente, cada 12 horas -en 6 aplicaciones decrecientes (DT: 50, 50, 30, 30, 20, 20 mg - DR: 18, 18, 14, 14, 8, 8 mg)-durante los últimos 3 días del tratamiento progestacional

(días 12 a 14). Ambos grupos se inseminaron por vía laparoscópica con semen congelado (100 x 106 esp) 12 h después del inicio del estro. La recuperación quirúrgica se realizó el día 7 post retiro las esponjas. En la Tabla 1, se presenta la eficiencia de la recuperación embrionaria de ambos tratamientos.

Mediante el tratamiento de dosis reducida, se observó una menor tasa de ovulación. Sin embargo, el número de embriones recuperados y transferibles fue semejante entre ambos tratamientos. La reducción del alto costo del tratamiento multiovulatorio beneficiaría la utilización de la transferencia embrionaria en programas de mejoramiento genético ovino.

Eficiencia de la recuperación embrionaria mediante 200 mg (dosis testigo) o 80 mg (dosis reducida) de FSHp + 200 UI de eCG en ovejas Merino durante la estación reproductiva

	Dosis Reducida	Dosis Testigo
Animales (n)	43	11
Tasa de respuesta (>3 CL) (%)	98.0 a	100.0 a
Tasa de ovulación ($\bar{x}$)	13.0±0.9 a	17.5±1.8 b
Estructuras recuperadas* ($\bar{x}$)	7.4±0.7 a	10.0±1.4 a
Tasa de estructuras ováricas recuperadas (%)	59.6±3.6 a	56.3±7.1 a
Embriones recuperados ($\bar{x}$)	5.9±0.6 a	6.4±1.2 a
Tasa de embriones recuperados (%)	50.0±4.0 a	38.6±7.9 a
Embriones recuperados Grados 1-2** ($\bar{x}$)	5.0±0.6 a	5.5±1.2 a
Tasa de embriones recuperados Grados 1-2 (%)	85.0±3.8 a	82.6±7.2 a
Tasa de no fertilización (%)	9.7±4.3 a	25.1±8.4 a

a, b indican diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05)

* Embriones + ovocitos + zonas pelúcidas ** Grados 1-4, IETS 1998

Lab. Reproducción Rumiantes Menores, INTA Bariloche, Argentina.

InVet. 2010, 12(2): 213-299
ISSN(papel): 1514-6634
ISSN (on line) 1668-3498

Development of a freeze-thawing protocol for llama semen. Preliminary results

GIULIANO, S.^{1,2,3}; CARRETERO, M.I.^{1,3}; CALDEVILLA, M.¹;
FERRANTE, A.¹; SANTA CRUZ, C.R.¹; NEILD, D.^{1,3}

Artificial insemination results using frozen-thawed South American Camelid semen are currently not good. The objective of this study was to determine an optimum combination between different equilibration temperatures and cryoprotectants that would preserve sperm viability and functional membrane integrity in frozen-thawed llama spermatozoa. A total of 14 ejaculates from 7 llama males were processed (n=7, r=2). The following parameters were evaluated: sperm motility, membrane function and integrity. After initial evaluation, the samples were incubated in a 0.1% collagenase solution to decrease thread formation. Samples were then divided into 4 aliquots. Two of them were diluted, at room temperature (RT), in an egg yolk-lactose (LY) extender with either 7% glycerol (LY-G) or 7% dimethylformamide (LY-DMF). The remaining aliquots were diluted in LY, cooled to 5° C and then further diluted with either LY-G or LY-DMF. All samples were stabilized during 20 minutes and were then frozen. A paired Student's t test was

used to compare raw semen to all treatments and a factorial experimental design was used to compare the different treatments. Sperm motility of the samples frozen with LY-DMF was significantly greater, and those frozen with LY-G were significantly lower ($p \leq 0.05$), than raw semen samples. The percentages of spermatozoa with functional membranes and the percentages of live spermatozoa were significantly greater ($p \leq 0.05$) in raw semen than in frozen-thawed semen for all treatments tested. No significant interaction was observed between the different equilibration temperatures and cryoprotectants. The percentage of live thawed sperm after equilibration at 5° C, was significantly greater ($p \leq 0.05$) than that obtained after equilibration at room temperature. According to these preliminary results, equilibration at 5° C and the use of dimethylformamide would seem to be the protocol that best preserves motility, viability and membrane function and integrity in llama spermatozoa.

¹Cátedras de Teriogenología y ²Física Biológica, ³INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Maduración ovocitaria canina: efecto de la suplementación definida y atmósfera gaseosa

GONZÁLEZ, N.¹; ALBERIO, R.²; RIOS, G.²; CANIZO, J.²; MANES, J.²; GIL, L.¹

El objetivo de este trabajo ha sido definir la mezcla de gases más adecuada para llevar a cabo la maduración *in vitro* de ovocitos caninos con distintos medios de maduración, puesto que éste es un paso previo y necesario para la producción *in vitro* de embriones. Se procesaron un total de 96 ovarios. Los ovocitos fueron extraídos mediante la técnica del picado (928), distribuidos aleatoriamente en seis grupos y madurados durante 72 hs bajo dos atmósferas de gases: 5% CO₂ (A) y 5%CO₂, 5%O₂ y 90% N₂ (B). Los medios de maduración fueron: (1) TCM 199+ 10% suero perra en estro+ 50µg/ml gentamicina y TCM 199 + 0,3% BSA+ 50µg/ml gentamicina suplementado con 100 µM de cisteamina + 500µg/ml Glutamina (2) ó 2µg/ml estrógenos + 10 ng/ml EGF (3). La maduración se evaluó mediante Hoechst 33342, observando el estadio meiótico. Los resultados muestran que la utilización de las distintas mezclas de gases no

influye sobre los distintos medios de maduración utilizados. Sin embargo, los resultados fueron mejores en el caso de la mezcla de gases B: 2, 10 y 12% para los medios 1, 2 y 3 respectivamente frente a 3, 6 y 4% en el caso de la mezcla (A) de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II. Observándose, en ambos casos, A ó B, los valores más bajos para el medio 1 ($P<0,07$), acompañado de los índices más altos de degeneración ($P<0,001$): 61, 35 y 34% para los medios 1, 2 y 3 en la mezcla A y 59, 28 y 20% para la mezcla B. Los medios 2 y 3 mostraron los resultados mejores y similares entre sí, con una ligera mejora del grupo (3) en todos los estadios meióticos evaluados. Podemos concluir que, bajo nuestras condiciones de trabajo, la mezcla de gases (B) sería la más favorable, así como la suplementación definida (3) frente a la suplementación con suero de perra en estro.

¹Unidad de reproducción y obstetricia. Facultad de Veterinaria. Zaragoza. España.

²INTA Balcarce. Argentina.

Efecto del virus de la diarrea viral bovina sobre la población folicular de vaquillonas persistentemente infectadas

GONZÁLEZ ALTAMIRANDA, E.A.¹; KAISER, G.G.²; VERNA, A.E.¹; CAMPERO, C.M.¹; ODEÓN, A.O.¹

La eficiencia reproductiva es un componente crítico en la producción del ganado, tanto para leche como para carne, siendo numerosos los factores que pueden afectarla. La etiología de las fallas, o los retrasos en la ovulación, no están comprendidos con precisión pero probablemente su causa sea multietiológica. El virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) tiene una alta afinidad por el tracto reproductivo, provocando subfertilidad y respuesta deficiente a tratamientos de sincronización y estimulación ovárica en hembras persistentemente infectadas (PI) con el virus. El objetivo de este trabajo fue determinar si la presencia del vDVB en ovarios de vaquillonas PI influye sobre la población folicular. Seis vaquillonas diagnosticadas PI provenientes de dos explotaciones comerciales de la Prov. de Bs As fueron castradas por vía vaginal. Los ovarios fueron fijados en formol (10%), y procesados para el análisis histológico convencional. Para el recuento de los folículos se realizaron dos secciones de 5 µm de grosor por ovario. En cada corte se analizó por campo de observación a 400 X la presencia o ausencia

de folículos en la región cortical, considerando campos positivos, aquellos que presentaban al menos un folículo, independientemente de su fase de crecimiento y campos negativos ausencia de los mismos. Como control se procesaron y analizaron ovarios provenientes de vaquillonas faenadas negativas a vDVB por aislamiento viral. Los datos se analizaron mediante el PROC GLM (ANOVA) utilizando el paquete estadístico SAS para evaluar el efecto del virus sobre la población folicular. Se observó una disminución significativa en el número de campos con presencia de folículos en las vaquillonas PI, lo que sugiere una disminución en la población folicular presente en la región cortical de estos ovarios con respecto a los controles. Nuestros resultados permiten inferir un efecto negativo de la presencia del virus en la corteza ovárica sobre la población folicular normal, ya sea afectando el número de células germinales primordiales y/o la gametogénesis. Aportando nuevas evidencias acerca de la asociación entre infecciones por vDVB y subfertilidad.

¹Grupo de Sanidad Animal. ²Grupo de Biotecnología de la Reproducción. Área de Producción y Sanidad Animal, EEA INTA Balcarce.

Diferencias en la eficiencia reproductiva en cerdas ante el uso de la inseminación artificial con dos y tres dosis

GONZÁLEZ, M.A.¹; WILLIAMS, S.²; ACOSTA SOSA, M.¹

La eficiencia reproductiva tiene gran importancia en la producción porcina y puede estar influenciada por numerosos factores que pueden mejorarse empleando tecnologías reproductivas como la inseminación artificial (IA). El objetivo fue comparar los indicadores reproductivos (fertilidad y prolificidad) en cerdas inseminadas con dos y tres dosis por celo. El trabajo se llevó a cabo, en una granja comercial de ciclo completo, localizada en la E.E.A INTA, departamento 9 de Julio de la ciudad de Las Breñas, Chaco. Se utilizaron un total de 139 cerdas de diversa paridad. El estudio se realizó entre agosto de 2006 a julio de 2009 para las hembras que recibieron 2 dosis (2D n=66) y desde agosto 2007 a diciembre de 2009 para las que tuvieron 3 dosis (3D, n=73). La detección de celo posdestete, se realizó dos veces en el día (8:00hs y 16:00hs) y consistió en determinar la reacción que exhibía la hembra en estro a la prueba de inmovilidad. Sólo se utilizó semen con motilidad superior al 70%, menos del 20% anormalidades espermáticas y el número total de espermatozoides vivos de 4×10^9 . Las 66 hembras de 2D tuvieron diferentes protocolos de IA: 1^{er} dosis el día 5 posdestete y la 2^{da} 10 hs

después (N=28), o 24 hs después (N=11), y 1^{ra} dosis al 6^o día post-destete y la 2^{da} 12 hs después (N=27). El grupo de hembras de 3D recibieron las dosis con 12 hs de intervalo entre cada una, ya sea desde el 5^o día post-destete (N=52), o con un intervalo destete-cubrición de 6 días (N=21). Se evaluó la productividad, porcentaje de fertilidad, número de lechones nacidos totales (LNT), número de lechones nacidos vivos (LNV). El estudio comparativo entre grupos se realizó utilizando el test de Anova. El porcentaje de fertilidad difirió entre ambos grupos, siendo marcadamente mayor en las cerdas que fueron inseminadas con 3 dosis (65,15% vs 91,78%, para 2D y 3D, respectivamente). Se hallaron diferencias en la producción de lechones nacidos totales (7,50 vs 9,80) y lechones nacidos vivos (6,85 vs 7,79) para 2D y 3D, respectivamente, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas. También se hallaron diferencias en ambos grupos, según los protocolos de IA. En base a los resultados se puede concluir que la mejor eficiencia reproductiva se encontró con 3 dosis inseminantes aplicadas a partir del 5^o día post-destete.

¹ E.E.A INTA Las Breñas Ruta 94 S/N, CC38, Las Breñas, Chaco;

² Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, La Plata, Buenos Aires.

Pentose phosphate pathway activity during bovine oocyte *in vitro* maturation: consequences on developmental competence.

GUTNISKY, C.; DALVIT, G.C.; CETICA, P.D.

The glycolysis is the main pathway of the glucose consumed by the bovine oocyte-cumulus complexes (COCs) during *in vitro* maturation, but part of the glucose uptake may lead to the pentose phosphate pathway (PPP). The dehydrogenases of the PPP are regulated mainly by the NADP/NADPH ratio and can be inhibited by 6-aminonicotinamide (6-AN). The main aim of this work was to study the influence of the inhibitors (NADPH and 6-AN) and the stimulator (NADP) on the PPP (evaluated by the Brilliant Cresyl Blue staining) and the oocyte maturation (presence of metaphase II). We also study the effect of NADP stimulation during oocyte maturation on *in vitro* fertilization and embryo development. To assess nuclear maturation and the activity of the PPP maturation was carried out in 199 media supplemented with 5% of FBS and FSH + LH (control), NADP, NADPH or 6-AN at different concentrations. Prior to IVF and embryo development maturation was performed in the media describe above with and without hormonal supplementation in

the presence and absence of 12.5 mM NADP. IVF was performed using frozen-thawed semen in IVF-mSOF and assessed the cleavage rate 48 hours post fertilization. The embryo development was carried out in IVC-mSOF and the percentage of blastocyst obtained was determined on day 7 after fertilization. The oocytes in presence of NADPH and 6-AN showed a dose dependant inhibition on the meiotic maturation and activity of the PPP ($p<0.05$). The addition of NADP in the presence or absence of gonadotrophins did not affect the activity of the pathway, the meiotic maturation and cleavage rates compared with their respective controls. However, there was a decline in the percentage of embryo development obtained in the presence of gonadotropins ($p<0.05$). These results demonstrate that PPP activity is essential for bovine oocyte *in vitro* maturation. The NADP at high concentrations may be altering the redox levels of the oocyte modifying the developmental competence regardless of the gonadotrophin action.

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

Susceptibilidad espermática a la criopreservación en dos razas de conejos

HOZBOR, F.¹; BLED, L.; CANO, A.¹; MANES, J.¹; ALBERIO, R.¹

En el presente trabajo se comparó la susceptibilidad espermática a la criopreservación en dos razas de conejo, Californiana y Blanco de Nueva Zelanda, diluidos en medios con distintos crioprotectores. El trabajo se desarrolló en la EEA INTA Balcarce (37° 45' LS y 58° 18' LO). Durante los meses de primavera, semanalmente se obtuvieron muestras de semen con vagina artificial, a partir de 20 conejos adultos, 10 de cada raza. Una vez retirado el tapón mucoso, aquellas muestras que tenían un volumen mínimo de 0,3µL y movilidad espermática masal ≥ 3 (escala 0-5), fueron mezcladas y conformaron un pool por raza y día de colecta. Cada pool fue dividido en dos alícuotas, que fueron diluidas 1:3 con uno de los siguientes diluyentes: Dil K y Dil M. Ambos diluyentes se prepararon a partir de un medio base que contenía Tris (250 mM), ácido Cítrico (88 mM) y glucosa (47 mM). El Dil K, tenía una concentración final de 6% DMSO, 20% de yema de huevo y 2,5% de glicerol; el Dil M contenía 12% de DMSO, y sacarosa (50mM). Las muestras fueron diluidas a 32° C, enfriadas sobre mesada hasta los 25° C, y posteriormente refrigeradas hasta los 5° C en 45 minutos. Luego de 2 horas de equilibramiento a 5° C, las muestras fueron

congeladas en vapores de nitrógeno líquido en pajuelas de 0,25mL, y conservadas a -196° C hasta su evaluación. Las muestras fueron descongeladas a 52° C, 12 segundos, y colocadas a baño maría a 37° C. Se evaluó movilidad espermática total (MET), movilidad rectilínea progresiva (MRP; determinada sobre los espermatozoides con movilidad), integridad de la membrana plasmática (eosina/nigrosina) (IMP) y funcionalidad de la membrana plasmática (HOS test) (FMP). Las muestras fueron analizadas mediante el PROC GLM (SAS), considerando la sesión de congelación como bloque. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre razas ($P>0,05$). Las muestras diluidas y crioconservadas en el Dil K presentaron valores significativamente más elevados en todas las variables bajo estudio (MET: 28,8 $\pm$ 1,9 y 14,5 $\pm$ 1,9%; MRP: 81,1 $\pm$ 3,7 y 53,0 $\pm$ 3,7%; IMP: 52,3 $\pm$ 2,4 y 33,3 $\pm$ 2,4%; FMP: 14,0 $\pm$ 0,9 y 8,3 $\pm$ 0,9%, para Dil k y M respectivamente. Se concluye que los espermatozoides de ambas razas de conejo responden de manera similar a la criopreservación. Las muestras diluidas en el medio que combina DMSO, glicerol y yema de huevo, disminuyó los daños producidos por la criopreservación.

¹EEA INTA Balcarce

Thermoresistance test in bull frozen semen

JORGE, A.E.¹, MALCERVELLI D.M.¹, GHIRARDOSI M.S.¹, CHAN D.²,
BLASI C.¹, FISCHMAN M.L.¹, CISALE H.¹

Thermoresistance sperm test (TR) is a test that evaluates the functionality of the sperm cell through determining the progressive motility after incubation of a semen sample at a standard temperature. Hypoosmotic swelling test (HOS test) evaluates the functionality of the sperm membrane. The aims of this paper were to determine the existence of differences between the rapid and slow TR test, and the possible correlation between sperm progressive motility and HOS test once the TR test was performed. Fifteen frozen bull semen straws were evaluated, 6 Polled Hereford and 9 Angus bulls, from different artificial insemination centers (AI). The initial semen quality evaluation determined the total number of sperm per straw (Neubauer chamber), total and progressive sperm motility (phase-contrast, thermal stage), viability (Eosin-Nigrosine staining), HOS test (100 mosmol/l sodium citrate and fructose), morphology (Bengal Rose staining) and acrosomal integrity (phase-contrast light microscope). After rapid

TR (incubation at 46 °C for 30 minutes) and slow TR (incubation at 37 °C for 4 hours), samples were evaluated for progressive motility. Wilcoxon test was applied to compare sperm motility at the end of both tests and there were not statistically differences between the two distributions ($p=0.29$). Spearman correlation test was performed to determine the possible association between HOS test and sperm motility after the slow TR, and a strong positive statistical association between these variables was found ($r=0.74$, $p=0.01$). HOS test values at 120 and 240 minutes of incubation were compared using the Wilcoxon test and no statistically differences were found ($p=0.16$). Positive statistical association was found between sperm progressive motility and HOS test after 4 hours of incubation. The results of the present study indicate that HOS test could be a useful alternative to assess TR because the analysis of sperm swelling is more objective than sperm progressive motility.

¹Department of Biophysics, INITRA,

²Department of Biostatistics, Veterinary Science Faculty, Buenos Aires University

Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) and its inhibitor, noggin, on cell cycle kinetics of bovine embryos before maternal to zygotic transition (MZT).

LA ROSA, I.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, R.; SALAMONE, D.F.

BMP4 controls cell fate, differentiation, morphogenesis, growth, apoptosis, and cell cycle in many cell types. Noggin is a BMPs inhibitor necessary for correct signaling. We have studied the effects of BMP4 and Noggin during *in vitro* maturation and culture on cell cycle kinetics of bovine embryos before maternal to zygotic transition. For oocyte maturation experiment, 100 ng/ml of BMP4 or Noggin were added to maturation medium (T-199 with 20 mM cysteamine, 1% antibiotic, 2 mM FSH, 0.1 mM sodium pyruvate and 0.6% BSA). After 22-24 h, *in vitro* fertilization (IVF) or parthenogenic activation (PA) was performed. IVF: frozen-thawed semen was centrifuged twice at 490 g and resuspended in B.O. solution to a concentration of 20.106/ ml. Incubation with COCs was performed for 5 h. PA: Oocytes were denuded by vortexing with 1mg/ml hyaluronidase, rinsed and exposed to 5µM of ionomycin for 4 min, rinsed and transferred to 1.9 mM 6-DMAP in T-199 for 3 h. Zygotes were cultured in CR2. For culture experiment, oocytes were matured in maturation medium. IVF and PA were performed and zygotes were cultured in CR2 or CR2 with 100 ng/ml of BMP4 or Noggin in a 5% CO₂ humidified atmosphere. On

day 2, cleavage rate and embryos cell number were evaluated under a microscope. Cleavage rate was analyzed by Chi-square test and cell numbers were analyzed with a three by three table and Chi-square test of independence, $P < 0.05$ was considered significant. In maturation experiments, PA treated groups showed higher cleavage rates on the contrary, after IVF cleavage rate was lower in Noggin group. Embryos cell number did not differ between groups. In culture experiments, Noggin affected negatively the cleavage rates of PA and IVF embryos. In PA embryos, a marked tendency ($P = 0.057$) was observed for Noggin to delay embryo cell cycles as a lower percentage contained from 4 to 8 cells (38% vs 29%) and a higher percentage was at the 2-cell stage (15.6 % vs 17.7%). Also BMP4 tended to accelerate cell cycle as a higher percentage had from 4 to 8 cells (25.4% vs 17.7%). In IVF no differences were found. In conclusion, during maturation, BMP4 and Noggin improve cleavage rate of PA embryos. In IVF, Noggin group shows lower cleavage rate. During culture, Noggin negatively affected cleavage rates of PA and IVF embryos and tends to induce cell cycle retardation while BMP4 tended to accelerate cell cycle of PA embryos.

Efecto del método de colecta de semen y de la adición de plasma seminal sobre la calidad de espermatozoides ovinos

LEDESMA, A.¹; MANES, J.²; HOZBOR, F.²; ALLER, J.²; RÍOS, G.²; ALBERIO, R.²

Los objetivos fueron describir y comparar las características de eyaculados de carnero obtenidos con vagina artificial (VA) y con electroeyaculador (EE) y determinar el efecto del plasma seminal (PS) agregado a eyaculados colectados por ambos métodos sobre la calidad espermática. Se colectó semen de 5 carneros *Corriedale* con VA y EE, (2 veces/semana por 12 semanas, alternativamente) en el otoño de 2010. Los pooles generados en las primeras 6 semanas se destinaron a la obtención de PS. Con los eyaculados colectados con VA se realizó espermocrito para conocer la relación PS/ESP (57/43%). Los pooles de las últimas 6 semanas se destinaron a la obtención de ESP y en ellos se evaluó movilidad espermática total (MET); movilidad progresiva (MP); integridad de la membrana plasmática (IMP), funcionalidad de la membrana plasmática (FMP), actividad mitocondrial y decondensación de la cromatina nuclear. Posteriormente los pooles fueron divididos en 3 fracciones que determinaron 6 tratamientos: T1=ESP colectados con VA+PS de VA; T2-ESP colectados con VA+PS de EE; T3-ESP colectados con VA+solución de lavado; T4-ESP colectados con EE+PS de EE; T5-ESP colectados con EE+PS de VA; T6-ESP colectados con EE+solución de lavado. En cada grupo se agregó el 57% del volumen

eyaculado de PS. Luego de una incubación de 15' en los eyaculados reconstituidos se realizaron las evaluaciones antes mencionadas. En relación al método de colecta (previo a la formación de los tratamientos), los parámetros seminales evaluados en los pooles fueron similares para ambas metodologías excepto en el porcentaje de ESP con mitocondrias funcionales, que fue mayor para las muestras obtenidas con EE ($47,8 \pm 11\%$) que para las obtenidas con VA ($16,7 \pm 10,7\%$) ($P=0,001$). Los eyaculados obtenidos con EE tuvieron mayor volumen y menor concentración ($P<0,05$). Los eyaculados reconstituidos con PS obtenido con EE presentaron un mayor porcentaje de MET ($P=0,038$). Se observó un efecto significativo de la interacción entre el método de colecta de los ESP y del PS en la MP ($P=0,003$), siendo mayor en el T5. La IMP y la FMP fueron significativamente mayores ($P<0,05$) en los eyaculados constituidos por ESP colectados con EE independientemente del origen del PS agregado. Se concluye que los métodos de colecta alteran los parámetros evaluados en los ESP y en el PS. Los ESP colectados con EE presentaron una calidad superior con respecto a los obtenidos con VA, independientemente del origen del PS agregado.

¹Becaria de CIC; ²Biotecnología de la Reproducción INTA Balcarce.

Effects of *in vitro* maturation on the expression of apoptosis-associated genes in equine oocytes

LEON, P.M.M.; CAMPOS, V.F.; HAAS, C.S.; SEIXAS, F.K.; DESCHAMPS, J.C.; COLLARES, T.

Gene expression analysis from early embryo development provides a valuable biotechnology tool to improve the assisted reproduction. Apoptosis is a key regulator factor for embryo growth and is active and irreversible process of self-destruction of cells under physiological control. Apoptosis can be activated by external or internal stress stimuli as DNA lesions, cellular cycle and metabolic pathways alterations, being regulated by several genes. These study objectives evaluate the effect of *in vitro* maturation on the expression of apoptosis-related genes in equine oocytes by quantitative PCR (qRT-PCR). The *cumulus*-oocyte-complexes (COCs) were obtained from ovaries of slaughterhouse and were divided in two groups (G1 and G2) according their morphological characteristics. *In vitro* maturation (IVM) of COCs was performed on follicular fluid at 38.7° C, CO₂ 5%, over 36 h. Briefly, four pools of 60 COCs for each group were denuded on 80 UI of hyaluronidase followed by RNA extraction that was conducted using TRIzol Regent (Invitrogen®, USA). Also, was performed RNA extraction from *cumulus* cells of the same denuded oocytes.

Total RNA extracted from oocyte pool was reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, UK). Quantitative Real-Time PCR was conducted to evaluate the expression of following apoptosis-associated genes: Bax, Bcl-2, Survivin and p53, using as housekeeping the GAPDH gene. We did not detect changes in the gene expression after IVM in both G1 and G2. However, the mRNA levels of anti-apoptotic Bcl-2 gene were higher than those found in the *cumulus* cells ($p=0.019$) as detected for Survivin ($P=0.007$). Was observed a higher expression of p53 in G1 than in G2 oocytes ($P=0.025$) while no differences were found for pro-apoptotic Bax gene. We believe that these changes on expression of apoptosis-associated genes could be regulated for mechanisms as microRNAs as previous described for bovine oocytes and these events may be linked with the capacity for future fertilization. The knowledge of gene expression involved on oocyte maturation can elucidate molecular mechanisms indicating possible markers of viability and competence.

Association among TP53 SNP and reproductive parameters in mares

LEON, P.M.M.; THUROW, H.; CAMPOS, V.F.; HAAS, C.S.; HARTWIG, F.; SEIXAS, F.K.; DESCHAMPS, J.C.; COLLARES, T.

The p53 is cytoplasmatic protein with critical role in genome healthy, being involved in the cellular cycle progression and in apoptosis. Known as tumor suppressor gene in mammals, its genomic organization is conserved among several species, however, in the equine genome it was not completely characterized. Is known for humans that a p53 critical region for apoptosis signalization is localized in the exon four, where exists a single nucleotide polymorphism (SNP) in the codon 72 that produces polymorphic variants with different structural (proline CCC ou arginine CGC) biochemical and biological properties. These different variants have been associated with several cancer types and female infertility. These study objectives identify the codon 72 SNP in the equine p53 gene and associate the genotypes with reproductive parameters from Thoroughbred mares. Mares (n = 111) were used to generate an epidemiologic cohort and data from 77 of this animals regarding 3 reproductive seasons were evaluated. Genomic DNA was extracted from blood samples collected from all mares. For SNP genotyping a 199 bp region of codon 72 was amplified by PCR and RFLP analysis was performed using

BstUI restriction endonuclease. The frequencies for genotypes were: 17.1% of Arginine/Arginine (A/A) (fragments of 113bp and 86pb); 62,2% of Arginine/Proline (A/P) (199bp, 113bp e 86pb) and 20.7% Proline/Proline (P/P) (199bp). It was observed that 45,45% (35/77) of mares that required only one natural mating to show a pregnancy positive diagnostic demonstrated the following genotypes 32,4% (12/77) P/P, 52,9% (18/77) P/A e 14,7% (5/77) A/A. We do not found association with conception rates and births. In reaction to reproductive disorders, 18/77 mares had at least one abortion (16,7% A/A, 55,6% P/A and 27,8% P/P). The percentage of twin pregnancy was 3,9%, being 33,3% A/A, 66,7% P/P and no one from P/A genotype (P=0,06). In woman, the proline allele has been associated with embryonic implantation fails and abortion, however, to demonstrate this association in mares more studies are necessary. We observed a different frequency than expected for genotype P/P in mares with just a cover for a positive diagnosis of pregnancy. The observed frequency of twin pregnancies indicates a possible correlation of this parameter with the genotype of p53.

Laboratório de Embriologia Molecular, Centro de Desenvolvimento Tecnológico- Universidade Federal de Pelotas - Pelotas/ RS, Brazil.

Actividad estacional de hormonas esteroideas ováricas en el peludo (*Chaetophractus villosus*) y el piche llorón (*Chaetophractus vellerosus*), determinación por un método no invasivo

LUACES, J.P.¹; CIUCCIO, M.²; ROSSI, L.F.¹; FALETTI, A.G.³; CETICA, P.D.⁴; CASANAVE, E.B.²; MERANI, M.S.¹

Conocer la fisiología de la reproducción de los armadillos es esencial para desarrollar planes de control o de conservación *ex situ* e *in situ* en estas especies. El objetivo del presente trabajo fue establecer el estado reproductivo en hembras de *C. villosus* y *C. vellerosus* en estado silvestre monitoreando la actividad ovárica mediante la determinación de hormonas sexuales esteroideas en materia fecal. En una primera instancia se observó que los valores plasmáticos y fecales de progesterona no correlacionaron en ninguna de las dos especies cuando la materia fecal fue conservada húmeda. Sin embargo, una correlación positiva fue observada entre los valores plasmáticos y fecales cuando la materia fecal fue previamente disecada ($r=0,82$, $P < 0,05$ y $r=0,60$, $P < 0,05$ para *C. villosus* y *C. vellerosus*, respectivamente). Se estableció la línea de base promedio de las hormonas en condiciones de bioterio a lo largo de un año, donde se midieron los valores de progesterona y estradiol en materia fecal disecada (MFD) de una hembra de *C.*

villosus (línea de base promedio de progesterona y estradiol $28,72 \pm 11,75$ ng/g de MFD y $3,04 \pm 0,80$ ng/g de MFD, respectivamente) y en una hembra de *C. vellerosus* (línea de base promedio de progesterona y estradiol $14,05 \pm 3,03$ ng/g de MFD seca y $3,46 \pm 1,20$ ng/g de MFD, respectivamente), registrándose los picos hormonales desde finales del otoño hasta principios del verano. Para determinar cuando ocurren los picos hormonales en hembras en estado silvestre, se colectó materia fecal de hembras de *C. villosus* y *C. vellerosus* durante un año a campo. Los picos ocurrieron en invierno y primavera en ambas especies; no se observaron picos en verano u otoño. Por lo tanto, se observa un patrón reproductivo estacional en *C. villosus* y *C. vellerosus*. La correlación previamente establecida entre la materia fecal seca y sus concentraciones en plasma valida la metodología utilizada para monitorear el estatus reproductivo en estas especies.

¹ Laboratorio de Biología Cromosómica, Instituto de Investigaciones en Reproducción, Cátedra II del Departamento de Biología Celular, Histología, Embriología y Genética de la Facultad de Medicina, UBA; ² Laboratorio de Fisiología Animal, Dpto. de Biol. Bioq. y Farm. Universidad Nacional del Sur; ³ Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos CEFyBO, CONICET; ⁴ Cátedra de Química Biológica, INITRA, Facultad de Cs. Veterinarias, UBA

Reproducción estacional en armadillos (Mammalia, Xenarthra)

LUACES, J.P.; ROSSI, L.F.; CASTILLO, L.R.; MERANI, M.S.

El ciclo estral en peludos (*Chaetophractus villosus*) y piches llorones (*Chaetophractus vellerosus*), a diferencia de los animales tradicionales, dado que presentan, un seno urogenital, se presenta de difícil caracterización y no puede ser determinado por extendidos vaginales. En tractos reproductores, de hembras adultas de peludos y piches llorones atropelladas, colectados en distintas latitudes y estaciones del año, fijados en formaldehído al 4% fueron realizados estudios anátomo-histológicos. Se evaluó el desarrollo uterino (desarrollo endometrial) y ovárico (presencia de folículos antrales y cuerpos lúteos) a fin de determinar la actividad reproductiva al momento de la muerte. Las localidades de muestreadas fueron: para los peludos, Castelli (n=1), Pellegrini (n=2) y Loma Verde (n=10), pcia de Buenos Aires y Santo Domingo (n=2), pcia de Córdoba; para los piches llorones, Castelli (n=1) y Pellegrini (n=1), pcia de Buenos Aires y Santo Domingo (n=3), pcia de Córdoba. Durante el otoño y

principios del invierno los tractos reproductores registraron inactividad en peludos (n=3) y piches (n=5). En cambio, hacia finales del invierno, primavera y verano, los tractos reproductores registraron actividad en peludos (n=12). Hacia fines del invierno y comienzos de primavera, se registraron úteros gestantes en peludos (n=5). La inactividad observada podría indicar un periodo de anestro en las latitudes estudiadas durante el otoño y principios del invierno. El comienzo del celo podría estar asociado con la cantidad de horas de luz diarias en zonas de intensa actividad agrícola, donde el alimento no es limitante (pcia de Buenos Aires), mientras tanto las horas luz como el alimento condicionarían esta actividad en zonas donde el este último podría ser limitante (pcia de Córdoba). Se afirma así, la hipótesis de un ciclo reproductivo estacional en las latitudes estudiadas en armadillos, con copula hacia fines del invierno y comienzos de la primavera y nacimientos en primavera y verano en el peludo y el piche llorón.

Laboratorio de Biología Cromosómica, Instituto de Investigaciones en Reproducción (IdIR), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Anatomía e histología del tracto reproductivo de hembras del oso melero (*Tamandua tetradactyla*, Xenarthra)

LUACES, J.P.¹; ROSSI, L.F.¹; ALDANA MARCOS, H.J.²; CETICA, P.³; GACHEN, G.⁴; LEDESMA, M.⁵; MERANI, M.S.¹

El oso melero (*Tamandua tetradactyla*) es una especie autóctona del continente americano y su estado de conservación es potencialmente vulnerable. Debido a la caza indiscriminada, el avance de la deforestación y los accidentes de tránsito sus poblaciones se encuentran en franco descenso, por lo tanto es necesario considerar a la especie en planes de conservación. Dichos planes implican el manejo reproductivo que requiere de estudios que permitan conocer la estructura del tracto genital de esta especie. El objetivo del trabajo fue describir las características anatómicas e histológicas del tracto reproductor femenino del oso melero. Cuatro tractos genitales de especímenes provenientes de: Roque Sáenz Peña (†23/12/98), Pcia de Chaco; Santa Victoria (†21/08/10), Pcia de Salta; Iguazú (†16/01/09), Pcia de Misiones; Dos Hermanas (†12/11/09), Pcia de Misiones, fueron utilizados en el presente estudio. Los tractos fueron fijados en formaldehído al 4% y se realizaron cortes histológicos que fueron coloreados con hematoxilina-eosina, tricrómico de Crossmon modificado o PAS. Los ovarios (0,5-2,3 cm x 0,38-1,0 cm x 0,41-1,0 cm) presentaron folículos

ováricos en diferentes estadios de desarrollo, atrésicos, cuerpos lúteos y cuerpos albicans. Los oviductos se encontraron enrollados y presentaron epitelio pseudoestratificado ciliado. El útero resultó de morfología simple y piriforme (1,5-2,4 cm x 1,1-2,0 cm x 3,2-1,5 cm), revestido de epitelio cilíndrico simple y con glándulas tubulares que en todos los ejemplares estudiados presentaron un gran desarrollo. El cérvix uterino fue la región más larga del útero ocupando en promedio el 51% de su longitud; el mismo presenta un epitelio cilíndrico simple (PAS+). A partir de la unión con la uretra el epitelio cervical sufrió una transición que podría ser representativa de una vagina. Los resultados indican que el tracto femenino del oso melero no difiere apreciablemente de su pariente cercano el oso hormiguero (*Myrmecophaga tridactyla*) sin embargo presenta notables diferencias con otras especies de Xenarthra. Las características del tracto reproductor femenino de animales muertos tanto en invierno, primavera y verano apoya la hipótesis de actividad reproductiva, en hembras de oso melero, a lo largo de todo el año.

¹Laboratorio de Biología Cromosómica, Instituto de Investigaciones en Reproducción (IdIR), Facultad de Medicina, UBA. ²Laboratorio de Histología, Facultad de Cs. Exactas y Naturales, Universidad de Belgrano. ³Cátedra de Química Biológica, INITRA, Facultad de Cs. Veterinarias, UBA. ⁴Fundación Temaiken, Ruta Provincial 25 Km, 0.700 Escobar, Bs As, Argentina. ⁵Laboratorio de Genética, Parque Ecológico El Puma, Candelaria, Misiones.

Efecto del nivel nutricional pre y posparto en vacas de cría sobre la actividad ovárica

MANES, J.¹; HOZBOR, F.¹; MARESCA, S.²; QUIRÓZ, J.²; MELANI, G.³

El nivel nutricional en el período pre y posparto afecta el desempeño reproductivo de las vacas de crías. La restricción energética durante la gestación genera un bajo estado corporal (EC) al parto, alargando el intervalo parto primer celo. Si estos animales ganan peso durante el servicio, es posible incrementar los porcentajes de preñez. Sin embargo, en casos de subnutrición preparto severa, es discutida la posibilidad de mantener buenos índices de preñez sin afectar el intervalo parto-concepción. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la subnutrición severa durante la gestación y en el posparto temprano sobre el intervalo parto-ovulación. Se utilizaron 70 vacas Angus multíparas con cría al pie. En el período preparto (75 días previos) fueron divididas al azar en 4 grupos bloqueando por edad gestacional, peso y estado corporal. Se mantuvieron en uno de dos planos nutricionales (Óptimo y Bajo). Al parto el 50% de cada grupo se mantuvo en el mismo plano nutricional, mientras que al resto se lo llevó al plano nutricional opuesto. De esta forma se definieron 4 tratamientos: OO (Óptimo-Óptimo), OB (Óptimo-Baja), BO (Bajo-Óptimo) y BB (Bajo-Bajo). El consumo de alimento en el plano nutricional Óptimo fue el indicado por las tablas de requerimientos del NRC (2003) y en el plano nutricional bajo fue

del 40% de esos requerimientos. La dieta estuvo formada por verdeo de avena (70% MS) y silaje de maíz (30% MS). A partir de los $41 \pm 11,3$ días posparto y hasta los $43,7 \pm 5,1$ días se determinó semanalmente presencia de cuerpo lúteo (CL) por ecografía para determinar ciclicidad e intervalo parto-ovulación y mensualmente EC (escala 1 a 5) y peso. El peso promedio al parto de los animales del grupo de óptima fue de $445,1 \pm 52$ Kg. y el EC $3,3 \pm 0,5$ y para los de baja fue de $386,6 \pm 46$ Kg. y el EC $2,6 \pm 0,4$. A la ovulación las vacas de los grupos OO y BO mantuvieron los valores del EC ($3,3 \pm 0,5$) mientras que el BO subió su EC ($2,6 \pm 0,7$ a $3,3 \pm 0,8$) y BB bajó a $2,2 \pm 0,3$. Se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0,05$) en la tasa de ovulación (OO: 41,2a; OB: 20,0a; BO: 35,3a y BB: 0b %). El intervalo parto-ovulación fue similar ($P = 0,76$) entre los tratamientos OO (43 ± 3 días), OB ($41 \pm 4,2$ días) y BO ($45,6 \pm 6,9$ días). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que en vacas que llegan con una subnutrición severa al parto y mejoran el plano nutricional en el posparto temprano es posible lograr tasas de ovulación semejantes a las obtenidas con vacas en buen estado corporal, sin incrementar el intervalo parto - primera ovulación.

¹Biotechnología de la Reproducción EEA INTA Balcarce.

²EEA INTA Cuenca del Salado.

³CEI Chascomús MAA-INTA

Criopreservación de semen ovino: comparación *in vitro* de tres diluyentes seminales

MARECO, G.¹; CAPDEVIELLE, E.F.²; ORNSTEIN, A.M.¹; CALDEVILLA, M.²;
CASARETTO, C.²; CHAN, D.³; FLORES, M.³; FERRANTE, A.²

El efecto de la congelación profunda sobre la viabilidad de los espermatozoides depende de la calidad inicial del eyaculado y de la composición química del diluyente. En el presente trabajo se comparó el efecto protector de tres diluyentes para congelar semen ovino: Salamon modificado (A); Triladyl® - yema de huevo - agua destilada (B) y Andromed®-agua destilada (C). Se recolectaron mediante vagina artificial 32 eyaculados de 4 carneros (n=4; r=32), se dividió cada uno en tres fracciones y cada fracción se diluyó a su vez, ana:ana con cada uno de los diluyentes a probar y se mantuvieron a 30° C. Al cabo de 10 minutos de incubación, luego de la evaluación macro y microscópica, cada fracción se re-diluyó con la cantidad necesaria de diluyente correspondiente para alcanzar una dilución total 1:10 (muestra-diluyente). Luego de 10 minutos de incubación a 30° C, se envasó en pajuelas de 0,25 ml, se refrigeró a 5° C a razón de 1° C/4min y se equilibró durante 2 hs a 5° C. La curva de congelamiento se realizó sobre vapores de nitrógeno líquido, manteniendo la rampa con las pajuelas a 14 cm durante 3 minutos y luego a 3 cm, 2 minutos; finalmente las muestras fueron sumergidas en el nitrógeno. Las pajuelas

se descongelaron en agua a 38° C durante 1 min. Se evaluó la movilidad espermática progresiva (MIP) y se realizaron las pruebas de Hos y de termo-resistencia (PTR) durante una hora. Para el análisis estadístico se utilizó un diseño de bloques divididos en el tiempo con un nivel de significación del 0,05. No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de MIP en el semen fresco sin diluir ni en el semen diluido con A, B y C. Los porcentajes de MIP post descongelamiento (HO) y a la hora (H1) en las muestras diluidas con los diluyentes B y C fueron significativamente mayores que A. Del mismo modo, el vigor espermático fue significativamente superior en las muestras con los diluyentes B y C tanto a 30° C como post-descongelamiento. En la prueba de Hos post-descongelamiento no se encontraron diferencias entre los tratamientos, aunque se observó una tendencia a ser mayor en B y C respecto de A. Sería interesante comprobar en un estudio controlado de inseminación artificial con semen congelado en los mismos tres diluyentes aquí probados, si los resultados se correlacionan con las observaciones del presente estudio.

¹Cátedra de Clínica.Médica y Quirúrgica de Rumiantes; ²Cátedra de Teriogenología, INITRA; ³Cátedra de Bioestadística, Facultad de Cs. Veterinarias, UBA.

Isolation and primary culture of llama (*Lama glama*) luteal cells and oviduct epithelium

MARURI, A.¹; LOMBARDO, D.M.^{1,3}; MIRAGAYA, M.H.^{2,3}; TRASORRAS, V.L.^{2,3}; AGÜERO, A.^{2,3}

The objective of this study was to communicate the first isolation and primary culture of luteal cells (LCPC) and the primary culture of oviductal cells (OCPC), both in the llama. Ovaries and oviducts were obtained using a flank laparotomy under general anesthesia. Samples were placed in a PBS solution with antibiotics, the corpus luteum was dissected and peri-oviductal tissue was eliminated. Cells were washed successively in PBS and were dispersed by mechanic and enzymatic (0.25% trypsin) treatment. Epithelial cells from the oviduct were obtained by scraping the epithelium from the utero-tubaric portion toward the ovarian portion. Cells were counted using a Neubauer hemocytometer and viability was greater than 90% using Tripan Blue. A total of 309 cells/mm² were sown in DMEM/F12 with antibiotics and 10% FCS and were incubated at 38.5° C with 5% CO₂. The culture medium was replaced every 48 h until cell confluence (day 7/8) and then were fixed using methanol. Using an inverted microscope at 48 h of incubation,

abundant cells were observed in adhered clusters, establishing an intimate contact and reaching the stage of confluence after 7 days of *in vitro* culture. Images were captured using a light microscope and IM50 software (Leica). In the OCPC, epithelial-like cells were observed, with a centric ovoid nucleus; although spherical cells were also observed to a lesser degree. There is a predominance of euchromatin, with clumps of heterochromatin uniformly distributed. In the LCPC there were abundant epithelial-like cells, with few cytoplasmatic prolongations larger than those of the oviductal epithelial cells. The interphase nuclei present lax chromatin, with dispersed clumps of heterochromatin, and have a central location and oval shape. The vacuolated cytoplasm is indicative of the steroidogenic activity of the luteal cells. This experimental model will allow us to increase our knowledge of the reproductive physiology of this species and will contribute to improve assisted reproductive techniques in camelids.

¹Cátedras de Histología y Embriología y ²Teriogenología. ³INITRA, Facultad de Cs. Veterinarias, UBA

Effect of hydrogen peroxide on bovine oocyte *in vitro* maturation

MORADO, S.A.; CETICA, P.D.; BECONI, M.T.; DALVIT, G.C.

The role of reactive oxygen species (ROS) in the processes associated with the handling and culture of gametes and embryos *in vitro* is controversial. In cattle, it was observed that the maturation of oocytes in glucose-rich media with high oxygen tension increases ROS production affecting their developmental competence. However, the supplementation of maturation medium with antioxidants (ascorbic acid, β -mercaptoethanol, superoxide dismutase) did not increase the competence of embryonic development and maturation of the oocyte. By contrast, maintaining an environment for the cultivation reduced antioxidant capacity of nuclear maturation and / or cytoplasm of the oocyte in rats and cattle. Similarly, the addition of antioxidants through *in vitro* fertilization (IVF) in cattle negatively affected the process. The aim of this study was to determine the influence of a generator of hydrogen peroxide (H_2O_2) in ROS production and in the maturation of bovine oocytes *in vitro*. *Cumulus-*

oocyte complexes were collected from ovaries of slaughtered cows and cultured in medium 199 for 22 hours at 39 ° C in the presence and absence of xanthine (2 mM) + xanthine oxidase (1 mU / ml). ROS production was determined in previously denuded immature and matured oocytes by the ratio of 2',7'-diclorodihydro fluorescein diacetate and fluorescein diacetate techniques. The analysis was performed by digital microphotography. Meiotic maturation was assessed by the presence of metaphase II. ROS production in the presence of H_2O_2 -generating system showed no significant differences. However, there was a significant decrease in the percentage of meiotic maturation of oocytes cultured in the presence of xanthine + xanthine oxidase (33.1%) compared to the control (86.5%) ($P < 0.05$). These results suggest that increased production of H_2O_2 affects meiotic maturation of bovine oocytes without altering the levels of ROS at the end of the process.

La concentración de plásmido afecta la expresión y el desarrollo en embriones bovinos transgénicos

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

La importación de ADN exógeno (ADNex) hasta el interior nuclear representa el obstáculo principal para aumentar la eficiencia en la transgénesis embrionaria de mamíferos. Estudios preliminares en nuestro laboratorio demostraron que incrementando la microinyección de ADNex en el citoplasma ovocitario aumentaba la expresión del transgén en el embrión. En este estudio comparamos dos concentraciones diferentes de ADNex para producir embriones transgénicos en bovinos por clonación y activación partenogénica. En clonación, ovocitos madurados *in vitro* (en TCM con 10% SFB, 10 µg/ml de FSH, 0.3 mM de piruvato, 100 de µM cisteamina y 2% de antibiótico) fueron enucleados y microinfectados con células del *cumulus* como donantes de nucleos previamente incubadas con 50 o 500 ng/uL del plásmido pCX-EGFP en Citrato de Na 2,8% a 0°C. En activación partenogénica, ovocitos madurados bajo iguales condiciones fueron microinfectados con 50 y 500 ng/uL de la misma

contrucción. Los embriones reconstruidos y los ovocitos inyectados fueron activados con 5 µM Ionomicina por 4 min y en 1.9 mM de 6-DMAP por 3 h. Para permitir la reprogramación, los embriones clonados fueron dejados 2 h en gotas de TCM antes de la activación. El desarrollo embrionario fue observado diariamente hasta el día 7. La expresión de la proteína GFP fué observada los días 4 y 7 con un microscopio de fluorescencia bajo luz azul (488nm). Los resultados fueron analizados por el test de Fisher y se detallan en la tabla 1.

La menor concentración de plásmido permitió mayores tasas de expresión y desarrollo embrionario con ambas técnicas. Nuevos ensayos serán necesarios para identificar si el efecto deletéreo de la mayor concentración de plásmido es debido a la presencia de mayor ADN exógeno por sí, o es debido a la acumulación de H₂O₂ producido en la maduración de la proteína GFP.

Tabla 1. Desarrollo y expresión del transgén en embriones bovinos.

Técnica	pCX-EGFP ng/µl	No. de Ovocitos inyectados (réplicas)	Clivados (%)	Blastocistos (%)	Embriones GFP al día 4 (%)	Blastocistos GFP al día 7 (%)
Clonación	50	69 (4)	57 (82.6) ^a	24 (34.7) ^a	34 (49.2) ^a	23 (33.3) ^a
	500	86 (3)	60 (69.7) ^b	2 (2.3) ^b	19 (22.0) ^b	2 (2.3) ^b
Partenogénesis	50	56 (3)	33 (58.9) ^c	16 (28.5) ^a	14 25.0) ^b	4 (7.1) ^b
	500	74 (3)	58 (78.3) ^{ab}	18 (24.3) ^a	7 (9.4) ^c	0 (0) ^b

Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina. CONICET

Use of flunixin meglumine to increase pregnancy rates after embryo transfer in mares

PINTO, M.R.; FERRANTE, A.; BACA CASTEX, C.; MIRAGAYA, M.H.

Embryo transfer is a useful tool for genetically improving an equine population. Female donors that are competing or training are a sub-population with low embryo recovery rates (around 34 to 40%) (Sertich 1989; Mortensen *et al.*, 2008) and low post-transfer pregnancy rates (30%) (Allen and Stout, 1999). The objective of this study was to improve the efficiency of embryo recovery using deslorelin biorelease and to increase the post-transfer pregnancy rates using flunixin meglumine (Aurich *et al.*, 2008). A total of 36 donor females were used; they were subjected to a daily training program for high competition jumping. Reproductive management consisted in synchronization followed by artificial insemination with raw semen once a ≥ 30 mm follicle and uterine oedema were detected. Ovulation was induced using deslorelin biorelease (BET Pharm) (GnRH analogue). Recipient females (n=50) were synchronized using a single dose of PGF2 α (Estrumate®) when in the presence of a corpus luteum. Embryo recovery was carried out on day 8 and the embryos were non-surgically transferred using a vaginal speculum and a

cervical forceps (Wilsher and Allen, 2004). The recipients were randomly assigned to two groups: control group and treatment group. The latter received a daily dose of flunixin meglumine (Flunix® Deltavet) starting on the day of transfer and continuing for two more days. The aim was to inhibit possible inflammation produced by the manoeuvre and the consequent release of PGF2 α . Diagnosis of pregnancy was carried out 7 days after the transfer using ultrasound. All mares ovulated within 36 h post-induction. Embryo recovery was 64.58% (124/192). Post-transfer pregnancy rates were 47.1% (33/70) for the control group and 57.4% (31/54) for the treatment group. Post-transfer pregnancy rates were compared using the Wilcoxon test, observing significant differences between groups ($p=0.0001$). To conclude, these results show that it is possible to improve the embryo recovery rates for high competition donor mares and improve the post-transfer pregnancy rates if reproductive management is optimized using ovulation inductors and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors.

Efecto de la concentración del calcio en el medio de vitrificación sobre la activación de ovocitos bovinos

QUIÑONES MARTORELLO, A.S.; RÍOS, G.L.¹; CANO, A.¹; ALBERIO, R.H.¹

La alta concentración de crioprotectores empleada durante la vitrificación es capaz de producir alteraciones en la activación de los ovocitos a través de un mecanismo que es mediado por calcio (Ca^{+2}). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la concentración de Ca^{+2} en las soluciones de vitrificación (SV) y calentamiento (SC) sobre la activación de ovocitos bovinos expuestos a ellas. Las SV y SC se formularon en medio H-SOF conteniendo diferentes concentraciones de Ca^{+2} (Cl_2Ca) y las siguientes de crioprotectores: SV1- 10% EG- 10% DMSO, SV2- 20% EG, 20% DMSO y 0,5 M sac, SC1- 0, 25 M sac y SC2- 0,15 M sac. Los complejos *cumulus*-ovocito (COCs) fueron madurados *in vitro* 22 hs, parcialmente desnudados mediante pipeteo en hialuronidasa y distribuidos en 5 tratamientos: T1- control (sin exponer); T2- expuestos a SV y SC sin Cl_2Ca ; T3- SV y SC con 0,126 mg/ml Cl_2Ca ; T4- con 0,252 mg/ml Cl_2Ca y T5- con 0,378 mg/ml Cl_2Ca . Luego los COCs fueron madurados hasta alcanzar las 24 hs. Los datos fueron analizados por el PROC GENMOD (SAS). Experimento 1: los COCs se fecundaron en medio TALP con 50 mg/ml de heparina y 1 millón/ml de espermatozoides. Después de 12 hs, los COCs fueron desnudados, teñidos con bisbenzimidide y observados en microscopio de epifluorescencia. Se determinó el número de ovocitos activados

(presencia de dos cuerpos polares, pronúcleos y núcleo espermático en el citoplasma). No se observaron diferencias en la tasa de activación entre T1 (69,5%, n=95) y T2 (67,3%, n=107), mientras que T3 (56,7% n=114); T4 (49 %, n=104) y T5 (56,36%, n=110) presentaron valores menores a T1 y T2 ($P<0.05$). Experimento 2: los COCs fueron incubados en medio de fecundación sin espermatozoides durante 24 hs, luego fueron completamente desnudados y cultivados otras 24 hs en medio CR1-aa. Posteriormente fueron teñidos con bisbenzimidide y se determinó el número de ovocitos activados partenogénicamente (presencia de dos núcleos o dos células). El porcentaje de activación partenogénica no difirió entre T4 (36,2 % n=65) y T5 (33,2% n=64) y fue mayor que el control (23,83% n=62), T2 (22,1% n=55) y T3 (23,5 %, n=58), estos tres últimos grupos no presentaron diferencias entre sí. En conclusión, la activación en ovocitos bovinos expuestos a SV y SC es afectada por la presencia de Ca^{+2} en dichas soluciones, a partir de una concentración de 0,126 mg/ml, por encima de la cual no se observan variaciones en los efectos mencionados. Por otro lado, existiría un umbral de concentración de calcio (0,126 mg/ml) a partir del cual los ovocitos expuestos a SV y SC son activados partenogénicamente.

¹Biotechnología de la Reproducción, INTA-Balcarce, Argentina.

Receptores de estrógenos alfa en células inmunitarias del endometrio equino

REDOLATTI, C.^{1, 2}; HERRERA, M.F.¹; MARINONE, A.I.^{1, 3}; ACUÑA, S.⁴; TASENDE, C.⁴; FUMUSO, E.¹

Los receptores de estrógenos (RE) han sido detectados en diferentes tipos de células del sistema inmune tanto innato como adaptativo en humanos y en ratones, en diferentes tejidos y con distintas funciones. Existe evidencia que adjudica a RE alfa (RE α) un efecto modulador de la inflamación. Estudios previos, indican la presencia de subpoblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ en endometrio equino normal y un aumento de polimorfonucleares (PMN), macrófagos y linfocitos (L) T en yeguas con endometritis. Las yeguas pueden clasificarse como resistentes (YR) o susceptibles a endometritis (YS) de acuerdo a la habilidad o no de eliminar en el término de 48h el fluido producido luego de la IA. Ésta condición se asocia también a una diferente expresión de mRNA para citoquinas pro y antiinflamatorias a nivel endometrial. El objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia y distribución endometrial de RE α en células del sistema inmune en YR y YS al momento de detectado el estro. Se seleccionaron YR (n=7) y YS (n=7). Se tomaron biopsias endometriales cuando las yeguas presentaron folículos >35 mm (predominio de estrógenos). El RE α se determinó por inmunohistoquímica con el sistema avidina-

biotina-peroxidasa. El inmunomarcado a RE α fue analizado por ANOVA. Se detectó la presencia de RE α en PMN y L en el endometrio de ambos grupos de yeguas. Tanto en PMN como L, el inmunomarcado fue observado en diferentes grados de intensidad, indicando diferencias específicas en el contenido nuclear de RE. No hubo diferencias en el inmunomarcado a RE α en los PMN del endometrio entre YR y YS (P>0,05). Las YR a endometritis presentaron una mayor cantidad de L marcados a RE α que las YS, (P= 0,009). En ensayos con agonistas selectivos de RE se estableció que el RE α al unirse a su ligando puede modificar la respuesta inmune en términos de expresión de citoquinas, participando en la inmunomodulación del endometrio equino. Durante el estro en YR hay mayor expresión endometrial de mRNA para citoquinas antiinflamatorias que en YS. El mayor inmunomarcado a RE α en L, presentes en el endometrio de las yeguas resistentes al momento de la detección del estro, podría tener vinculación con la mayor resistencia a endometritis en estas yeguas, ya que dicho receptor fue relacionado con la expresión de citoquinas antiinflamatorias.

¹Laboratorio de Clínica y Reproducción Equina, FCV, UNCPBA Tandil (7000) ²Becaria CIC; ³ Becaria CONICET;

⁴Área Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Uruguay

Maduración nuclear y producción embrionaria de ovocitos bovinos madurados *in vitro* en medio definido suplementado con factor de crecimiento epidermal, hyaluronan y cisteamina

RÍOS, G.; MUCCI, N.; KAISER, G.; ALBERIO, R.

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el efecto de la sustitución del suero y la hormona folículo estimulante (FSH) por factor de crecimiento epidérmico (EGF), hyaluronan y cisteamina en los medios de maduración de ovocitos bovinos sobre su maduración nuclear y la producción *in vitro* de embriones. Los complejos ovocito *cumulus* (COCs) fueron separados en dos grupos y madurados durante 22 horas en: 1- medio TCM-199 suplementado con r-hFSH y 10% de suero fetal bovino (SFB) (control) y 2- medio TCM-199 suplementado con 10 ng/mL de EGF, 15 µg/mL de Hyaluronan y 100 µM de cisteamina (EGF/Hyal/Cist.). Experimento 1: los COCs fueron desnudados con hialuronidasa (1mg/mL). Se determinó la maduración nuclear visualizando el cuerpo polar bajo lupa estereoscópica a 40X. Experimento 2: los COCs de ambos grupos fueron fecundados y luego cultivados por 7 días en medio SOF-citrato-mioinositol. Se evaluó el porcentaje de ovocitos divididos 48

horas pos fecundación, y de mórulas (M), blastocistos tempranos (Bt), blastocistos (B) y blastocistos expandidos (Be) el día 7. El análisis se efectuó mediante el procedimiento CATMOD del paquete estadístico SAS. Los ovocitos madurados en medio libre de suero suplementado con EGF/Hyal/Cist. presentaron un porcentaje mayor de cuerpos polares (77,5%; n=470;) respecto al control (70,7%, n=458) ($P<0,05$). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de ovocitos divididos, M, Bt, Be o total de embriones a día 7. Para blastocistos se obtuvo un mayor porcentaje de embriones en el medio libre de suero suplementado con EGF/Hyal/Cist., respecto al control ($P<0,05$) (Tabla). El EGF es capaz de inducir la maduración nuclear de manera más efectiva respecto a la hormona FSH. Asimismo los resultados de producción de embriones en medio definido (EGF/Hyal/Cist) nos permite eliminar componentes indefinidos como el suero sin afectar la competencia de los ovocitos.

Tabla. Porcentaje de embriones obtenidos a partir de ovocitos madurados en medio libre de suero suplementado con EGF/Hyal/Cisteamina

Tratamientos	Ovocitos fecundados	Ovocitos clivados (%)	Mórulas (%)	Blastocito temprano (%)	Blastocito (%)	Blastocito expandido (%)	Embriones totales (%)
FSH/SFB	438	349 (79,7)	6 (1,4)	2 (0,5)	27 (4,6) ^a	68 (15,5)	103 (29,5)
EGF/Hyal/Cist	584	463 (79,3)	4 (0,7)	4 (0,7)	35 (7,9) ^b	111 (19)	154 (33,3)

^{a,b} Letras diferentes en la misma columna significa diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$)

Biotecnología de la Reproducción, INTA-Balcarce, Argentina

Use of androcoll-E™ for selecting llama sperm. Preliminary results

SANTA CRUZ, C.R.¹; CARRETERO, M.I.^{1,3}; ARRAZTOA, C.^{1,3}; NEILD, D.^{1,3}, TRASORRAS, V.I.³; MIRAGAYA, M.^{1,3}; GIULIANO, S.^{2,3}

The objective of the techniques used to prepare semen for *in vitro* embryo production is to obtain a large percentage of motile spermatozoa and to separate sperm from seminal plasma. Due to the fact that sperm selection is conditioned by the semen characteristics, density gradient centrifugation would be the method of choice for separating South American camelid spermatozoa, because it allows one to work with samples with low sperm concentrations. The use of Percoll® presents the risk of endotoxin contamination; therefore it is necessary to implement a selection method using a different medium. Androcoll-E™ is a colloid used to select normal motile equine spermatozoa. The objective of this study was to select llama spermatozoa using Androcoll-E™. Using electroejaculation, a total of 10 semen samples were obtained from 6 llama males. The ejaculates

were incubated in a solution of 0.1% collagenase in H-TALP-BSA and were then centrifuged at 800 g for 8 min to decrease thread formation in seminal plasma. The pellet was then re-diluted in 2 ml of H-TALP-BSA, was placed over a 2 ml column of Androcoll-E™ and was centrifuged at 600 g for 20 min. The pellet was re-diluted in 0.5 ml Fertil-TALP and sperm concentration, motility and viability were evaluated (the latter using the fluorochromes 6-caboxifluorescein diacetate and propidium iodide, CFDA/Pi). Sperm concentration in the pellets ranged between 10 to 40 x 10⁶ spermatozoa/ml, showed 20 to 60% progressive motility and 20 to 80% live spermatozoa. These results would indicate that it is possible to select progressively motile llama sperm using Androcoll-E™. More studies are necessary to optimize this sperm selection technique in the llama.

¹Cátedras de Teriogenología¹ y Física Biológica ²INITRA ³Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina. smgiulia@fvet.uba.ar

Efecto del estrés digestivo en la producción ovina y su influencia sobre la calidad seminal

SCHUH, A.¹; JORGE, A.²; MIRALLES, M.¹; DECAMINADA, E.¹; COPPOLA, M.¹; GHIRARDI, P.M.¹; VEKSLER HESS, J.¹

Las técnicas de intensificación pueden crear disfunciones en el organismo del animal. El hábitat y el manejo a que están sometidos exigen un reajuste excesivo en su fisiología y comportamiento, de tal manera que pueden inducir un auténtico estado de estrés. El objetivo del presente trabajo fue evaluar las variaciones de ciertos parámetros de calidad seminal en carneros sometidos a estrés digestivo mediante dietas acidóticas. El trabajo se desarrolló de acuerdo a las normativas del CICUAL. Se utilizaron 4 carneros de raza frisona de 1 año y medio de edad de los cuales 3 (tres) siguieron el tratamiento A (dieta a base de grano de maíz entero y fardo de alfalfa) y 1 (uno) carnero se utilizó como testigo ingiriendo fardo de alfalfa ad libitum. Los animales tratados consumieron hasta 1.200 g de maíz entero, momento en que los mismos se autolimitaban en la ingesta por el grado de acidosis alcanzado en forma creciente. La oferta de grano fue aumentando gradualmente, a razón

de 300 g por semana. La extracción de semen se realizó periódicamente por el método de vagina artificial, utilizando para cada carnero una vagina individual con características propias inherentes a cada individuo. Los parámetros evaluados de 36 eyaculados (n=36) fueron: Volumen (V), Motilidad Masal (MM), Concentración (C) y pH. Para la determinación de comparación de medias se utilizó el Test de Tukey con una $P \leq 0,05$. Los resultados mostraron que, con respecto al testigo, no hubo diferencias significativas en los valores tomados al comienzo de la experiencia en los carneros sometidos al tratamiento A en la etapa previa a producirse el estrés acidótico. En cambio una vez producido el estado de estrés digestivo hubo diferencias significativas en el V, MM y pH, no así en la C. En conclusión, estas diferencias significativas marcarían el efecto que produce el estrés digestivo sobre la calidad seminal de los carneros sometidos a una dieta acidótica.

¹Cátedra de Producción Ovina. 2 Cátedra de Física Biológica, Facultad de Cs. Veterinarias, UBA

Expresión de activina *in situ* en ovarios de vacas con quistes foliculares

SILVA, M.A.; STANGAFERRO, M.L.; SALVETTI, N.R.; ALFARO, N.S.;
AMWEG, A.N.; ORTEGA, H.H.

La enfermedad quística ovárica (del inglés *Cystic Ovarian Disease*: COD) es frecuente durante el periodo posparto en el ganado bovino lechero y es una de las principales causas de fallas reproductivas y pérdidas económicas. Se ha determinado que la progresión a través de los sucesivos estadios de desarrollo folicular requiere de una estrecha comunicación entre las distintas células y muchas de las moléculas implicadas pertenecen a la superfamilia del Transforming Growth Factor β (TGF- β), entre ellas activina, la que contribuye positivamente al desarrollo folicular. El objetivo del presente trabajo fue determinar la expresión de activina en estructuras foliculares ováricas de vacas con quistes y normales, tratando de dilucidar parte de la patogenia intraovárica de la COD. Se utilizaron 10 vaquillonas las que se dividieron en dos grupos. A un grupo se le indujo la COD mediante la administración de ACTH durante 7 días partir del día 15 del ciclo estral y el otro grupo permaneció sin tratamientos como control. Además se obtuvieron quistes ováricos de frigorífico. Sobre las muestras de ovario se realizó inmunohistoquímica indirecta

para la determinación de activina. La reacción fue revelada utilizando 3,3' diaminobencidina y se cuantificó, mediante análisis digital de imágenes, el porcentaje de área inmunomarcada en granulosa y teca interna para los folículos en crecimiento y atrésicos de ambos grupos, y para los folículos quísticos inducidos y de frigorífico. Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el programa estadístico SPSS 11.0.1 para Windows. Se observó en todas las estructuras una mayor expresión de activina en granulosa en comparación con teca interna. En granulosa, los quistes mostraron mayor expresión ($P < 0.05$) que el resto de las estructuras foliculares. La teca interna evidenció un patrón de marcación similar a la granulosa, pero sólo se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los quistes de frigoríficos en relación al resto de las categorías estudiadas. Debido a las múltiples funciones estimuladoras directas de la activina sobre el desarrollo folicular, así como indirectas a través de la secreción de FSH hipofisaria, queda claro que una alteración en su patrón de expresión podría formar parte de la patogenia de la COD.

A preliminary study of the composition of internal oviductal fluid in the llama

TRASORRAS, V.L.¹; DE SIMONE, E.²; CHAVES, M.G.¹; ÁLVAREZ, E.²; MIRAGAYA, M.H.¹; CHIAPPE M.A.²; AGÜERO, A.¹

Mammal's oviducts undergo morphologic, biochemical and physiological changes under the influence of the hormones that govern the phases of ovarian dynamics. These changes facilitate the function of gametes, fertilization and embryonic development. The objective was to determine the ionic and protein composition of the fluid obtained after flushing the oviducts. One female in follicular phase and 3 females in luteal phase were used. Oviducts were extracted by flank laparotomy under general anesthesia. They were dissected and washed, making three sequential passages, beginning with 3.0 ml of physiological solution, collecting 1 ml after each passage for future analysis. The Na⁺, Mg⁺⁺, K⁺ and Ca⁺⁺ concentrations were measured using atomic spectrophotometer absorption, P was measured by a calorimetric method and proteins

were measured using Bradford's method. The following means and concentration increments in the second and third flushings were obtained respectively in follicular phase: Ca⁺⁺: 1.37 mg/dl, 11% and 38%; P: 0.48 mg/dl, 14.5% and 60%; Mg⁺⁺: 0.43 mg/dl, 9.3% and 23.4%; K⁺: 1 meq/l, in the third flushing. For the Na⁺: 182 meq/l but in this case, with minimum fluctuations in increase and reduction in the second and third flushings. The data collected in the luteal phase are expressed in table 1.

To conclude, the Ca⁺⁺ and K⁺ concentrations present differences between the two phases, whereas this does not happen with the Mg⁺⁺ and Na⁺. The mean value of proteins appears constant, suffering an increase at each of the passages in luteal phase, and decreasing in the follicular phase.

Table 1. Values represent means $\pm$ SE

Passage	Calcium (mg/dl)	Phosphorus (mg/dl)	Magnesium (mg/dl)	Sodium (meq/l)	Potassium (meq/l)	Protein (mg/dl)
Simple	0.30 $\pm$ 0.26	0.19 $\pm$ 0.07	0.05 $\pm$ 0.04	144.6 $\pm$ 3.8	0.66 $\pm$ 0.3	0.27 $\pm$ 0.11
Double	0.52 $\pm$ 0.45	0.21 $\pm$ 0.11	0.08 $\pm$ 0.05	144 $\pm$ 3,7	1 $\pm$ 0	0.88 $\pm$ 0.27
Triple	0.68 $\pm$ 0.55	0.87 $\pm$ 0.33	0.11 $\pm$ 0.04	146 $\pm$ 3	1 $\pm$ 0	0.97 $\pm$ 0.11

¹Cátedra de Teriogenología, INITRA; ²Cátedra de Fisiología Animal, Facultad de Cs. Veterinarias, UBA.

In vitro production of llama embryos

TRASORRAS, V.L.¹; GIULIANO, S.^{1,2}; CHAVES, M.G.¹; BACA CASTEX, C.¹;
CARRETERO, M.I.¹; NEGRO, V.¹; RODRIGUEZ, D.¹; MIRAGAYA, M.H.¹

Over the last few years, an increasing interest in the production of South American Camelids has been developed, not only in South American countries but also in different countries around the world. Because these species have a long gestation period (335 to 360 days) and only deliver one young per year, it is of interest to apply assisted reproductive techniques to optimize the reproductive handling of the genetically superior females and to increase the genetic progress of these species. The aim of the present study was to carry out *in vitro* fertilization with spermatozoa selected using Androcoll-ETM and to evaluate the efficiency of the DMEM/F12 culture medium for *in vitro* embryo development in the llama. Six adult females were used as oocyte donors. They were superstimulated with a single IM dose (1500 IU) of eCG (Novormon®). After five days, and in the presence of two or more dominant follicles, females received a single IV dose (8 µg) of buserelin to induce oocyte maturation. Twenty hours post-injection, follicular aspiration was conducted by flank laparotomy. Semen was collected from males with proven fertility by electroejaculation under general anaesthesia.

The ejaculates were processed with a 0.1% collagenase solution and an Androcoll-ETM column was used to enrich the sample with normal and motile spermatozoa. A total of 58 follicles were aspirated, with 48 COC's being recovered (83% recovery). Only expanded COC's were used (n=46); they were randomly placed in groups of 1-5 in microdroplets (40 µl) of Fertil-TALP and were inseminated with 20 x 10⁶ live spermatozoa/ml. After 24 hs, they were randomly placed in two culture mediums: SOF (control; n=24) and DMEM (n=22) and incubated for 6 days at 38° C in humidified atmosphere. The blastocyst rate was 25% (6/24) in SOF medium: 3 were hatched, 2 expanded and 1 was an early blastocyst. In DMEM medium, an 18% (4/22) blastocyst rate was obtained, all of them in expanded blastocyst stage. These results would indicate that it is possible to use Androcoll-ETM to select spermatozoa for *in vitro* fertilization and to produce llama embryos in DMEM medium until stages transferable to recipient females. Nevertheless, it is necessary to increase the number of cultivated embryos to evaluate if this improves the results.

¹Cátedra de Teriogenología, ²Cátedra de Física Biológica, INITRA, ³Cátedra de Cirugía, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina. vtrasorras@fvvet.uba.ar

Association between sperm viability and seminal plasma proteins in rabbits submitted to gene doping

URTIAGA, G.; CAMPOS, V.F.; COLLARES, T.F.; SELAU, L.;
SEIXAS, F.K.; DESCHAMPS, J.C.; COLLARES, T.

The gene doping is characterized by non-therapeutic utilization of genes, genetic elements and/or cells that enhanced athletic performance. The erythropoietin (EPO) is a candidate for gene doping practices, which was recognized for increasing aerobic capacity and has been illegally used for performance enhancement. However, we did not know the effects of EPO administration on reproductive performance. This study objective evaluates the association between seminal plasma proteins and sperm viability on rabbits submitted to treatment with expression vector containing EPO rabbit gene. Were used 12 male New Zeland white rabbits divided into 3 groups: the first group receive 3 weekly subcutaneous injections of commercial recombinant human EPO (rhEPO), the second receive 2 intramuscular injections of plasmid vector containing the rabbit EPO cDNA and CMV promoter in the day zero and the third group (control) receive only the plasmidial vector without the EPO cDNA. The EPO-containing vector was previously tested in eukaryotic cell culture. An ejaculate per male was weekly

collected over 5 week's period. Seminal plasma proteins were evaluated in 15% SDS-PAGE gels and *in silico* analyzed through computer image analysis. Sperm viability was evaluated using LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit (Invitrogen®, USA) according manufacturer's instructions. Data analysis was performed using Mann-Whitney non-parametric test. From *in silico* analysis were chosen ten protein bands more clearly visualized in the day zero of experiment. In rabbits submitted to gene doping (group II) the protein factor of 18 kDa are associated with high levels of sperm viability (> 80%). In rabbits treated with recombinant human EPO the protein factors with 26 kDa and 40 kDa are also associated with high levels of sperm viability (> 80%). Control rabbits did not show associations between sperm viability and evaluated protein factors. These results suggest that (rhEPO) administration and EPO gene doping cause changes in the seminal plasma protein profile and consequently generating alterations on sperm viability.

Laboratório de Embriologia Molecular, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Brazil.

Canine spermatozoa DNA damage in a milk based cooling extender: a preliminary report

VALIENTE, C.^{1,2}; DIAZ, J.D.^{1,2}; PICCO, S.^{1,2}; CORRADA, Y.^{1,2}; ABEYA, M.¹; GOBELLO, C.^{1,2}

Skimmed milk is a low-cost, user- friendly extender for cooling canine semen (Valiente *et al.*, 2010). Semen chilling facilitates destabilization in the chromatin structure of spermatozoa which is associated with poor pregnancy outcome. The objective of this study was to investigate the effect of cooling (4°C), in a milk-based extender, on canine spermatozoa DNA. The relationship between motility and DNA damage was also described throughout the study period. The second fraction of ejaculates was collected by manual stimulation from 6 male dogs at weekly intervals during a month. The fractions were pooled, diluted to 75-100 10⁶ sperm/ml in non-fat dry skimmed milk [Ilolay®, Argentina] with antibiotics [benzyl penicillin 1mg/ml and dihydrostreptomycin sulphate 1 mg/ml] and then cooled and stored at 4° C during 4 days.

Percentages of motility and DNA integrity (modified Comet assay; Singh *et al.*, 1988) were assessed at four time points: immediately after dilution and then 24, 60 and 96 hours later. Data were expressed as mean±SEM and cell damage and motility were correlated by the Spearman test. Percentages of DNA damaged spermatozoa in the four progressive observations were 2.2±0.3, 5.2±3.3, 7.4±2.2 and 10.8±0.3. Percentage motility decreased from 91.8±0.9 to 53.7±4.4 throughout the study period. Correlation between DNA damage and motility was $r = -0.97$ ($P < 0.05$). To conclude, canine spermatozoa DNA damage during storage at 4° C in a milk-based extender seems to be mild and slowly progressive. Further work using this extender is warranted.

¹Laboratorio de Nutrición Mineral y Fisiología Reproductiva, Universidad de La Plata -

²CONICET

Efecto de la criopreservación sobre la calidad de semen porcino y diferencias según individuos

WILLIAMS, S.; FERNÁNDEZ, V.; PRENNA, G.; BARRALES, H.; DE LA SOTA, R.L.

La conservación del semen porcino se realiza generalmente a 15°C, ya que es particularmente sensible al proceso de congelación, alterándose drásticamente la integridad de los espermatozoides. La congelación comprende una serie de etapas que responden a las características propias de la especie. El objetivo de este estudio fue determinar las variaciones en la calidad seminal durante el proceso de congelación, y si existen diferencias entre individuos. Para el presente estudio se utilizaron eyaculados de animales de +1 año, de línea terminal comercial, ya sea proveniente de padrillos alojados en el campus de la Facultad, como de establecimientos comerciales. Las dosis se recibían en el Laboratorio de Reproducción Animal (FCV-UNLP), diluidas con una concentración de 6.000 millones de espermatozoides. Al arribo de las dosis, se comprobaban los parámetros mínimos de calidad seminal: motilidad (> 70%) y presencia de anomalías espermáticas (< 20%). Una vez contrastadas, se iniciaba el proceso de criopreservación, utilizando una técnica con modificaciones al método de Westendorf. Durante el proceso de la congelación, se tomaron muestras para contrastar la calidad seminal: motilidad y vigor (sobre platina térmica), vitalidad (tinción de eosina/nigrosina) e integridad del acrosoma (con microcopio de contraste de fases). Las variaciones en la calidad

seminal se estudiaron en las siguientes etapas: 1) a 15° C, 2) luego de la centrifugación y previo al enfriamiento (a 15° C, diluido en medio comercial, Boarciphos A, IMV®), 3) al finalizar el enfriamiento y antes de la congelación (previa dilución con medio comercial Boarciphos B, IMV®) y 4) en la descongelación, previa dilución en medio comercial de descongelación. Los datos obtenidos, se utilizaron para confeccionar curvas y demostrar las variaciones de la calidad de semen durante el proceso de la criopreservación. La calidad seminal se mantuvo estable hasta los 15° C, mostrando un descenso luego del enfriamiento y una marcada disminución en la descongelación. Para muestras descongeladas, los valores hallados fueron (media±DS): 23,33±15,28; 44,67±21,36 y 61,50±7,78 para motilidad, vitalidad e integridad de acrosoma, respectivamente, hallándose altos valores en los desvíos, debido a la gran variabilidad individual encontrada. Se puede concluir, sobre la base de los presentes resultados, que el proceso de la congelación produce alteraciones en la calidad seminal, posiblemente como consecuencia de cambios en la fluidez de la membrana espermática, siendo necesario relacionar la variabilidad individual con diferencias en la composición de ácidos grasos y con la lipoperoxidación.

Cátedra y Servicio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, La Plata, Buenos Aires.

