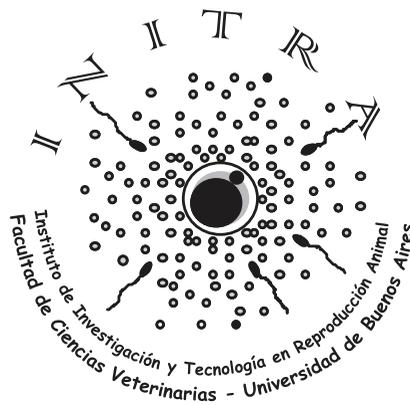


**Terceras Jornadas Internacionales
del Instituto de Investigación y
Tecnología en Reproducción Animal
INITRA**



**Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA
15 y 16 de noviembre de 2012
Buenos Aires, Argentina**

Conferencias Plenarias

<i>Ecotoxicología y daño espermatogénico</i> Bustos Obregón, E.	225
<i>Capacitación y reacción acrosomal versus el metabolismo espermático</i> Córdoba M.	226
<i>Mecanismos moleculares involucrados en el proceso de interacción de gametas: desde el ratón al humano</i> Da Ros, V.	228
<i>Equine semen evaluation for use in assisted reproductive techniques</i> Neild, D.	229
<i>Efectos de la época del año y la nutrición sobre el testículo ovino</i> Pérez-Clariget, R.	231
<i>Efecto del factor inductor de ovulación presente en el plasma seminal de llamas sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal</i> Ratto, M.H.	233
<i>El espermatozoide bovino como efector del neurotransmisor gama- aminobutírico (GABA), inductor de capacitación y reacción acrosomal</i> Ritta, M.	237
<i>Avances en micromanipulación y transgénesis</i> Salamone, D.	239
<i>¿Qué hacemos para mejorar la eficiencia en la producción de semen congelado bovino?</i> Sara, R.C.	241

Ecotoxicología y daño espermatogénico

BUSTOS OBREGÓN, E.¹

La contaminación química ambiental es un problema actual en todos los países del mundo, debido a su impacto sobre la biota. El daño reproductivo ha sido estudiado en el humano y muchas especies productivas así como en modelos de animales de laboratorio, en el área denominada "Testicular toxicants".

Se presenta un modelo experimental animal referido a los órganos fosforados como tóxicos testiculares y su acción deletérea sobre la espermatogénesis, considerando también el efecto sobre trabajadores agrícolas

(riesgo ocupacional). Se describen también, brevemente, casos clásicos como la intoxicación por plomo y otros menos conocidos, incluyendo el efecto del Boro ingerido en el agua de bebida.

Finalmente se ilustra el tema de las especies biocentinelas (una de agua dulce como es *Daphnia magna* y otra de agua salina *Artemia salina*).

El estudio global del tema permite concluir que la salud medio ambiental está íntimamente relacionada con la salud reproductiva de todos los seres vivos.

¹Laboratorio de Biología de la Reproducción, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Capacitación y reacción acrosomal versus el metabolismo espermático

CÓRDOBA M.¹

El metabolismo energético es crucial para el mantenimiento de la función biológica de todas las células. Las fuentes de energía y el estado redox son dependientes del metabolismo oxidativo de los sustratos disponibles en el medio. Muchos procesos celulares requieren energía proveniente de la mitocondria y de vías metabólicas citosólicas. Las gametas son células muy particulares y el metabolismo que sostiene su viabilidad y función permite la fertilización en todas las especies. Los espermatozoides sufren modificaciones bioquímicas, incluyendo procesos catabólicos que producen energía para inducir la capacitación y reacción acrosomal. Es así que fue de interés estudiar en el espermatozoide bovino, las actividades de las enzimas claves del metabolismo mitocondrial y citosólico (isocitrato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa y creatina quinasa) y el consumo de oxígeno en la capacitación y reacción acrosomal. La capacitación fue inducida por la heparina y la reacción acrosomal con progesterona. La función de la cadena respiratoria se monitoreó a través de la evaluación polarográfica del consumo de oxígeno. Las actividades de las enzimas fueron determinadas espectrofotométricamente. Se observó una relación de las actividades enzimáticas de 2:1 y 3:1 para isocitrato deshidrogenasa (IDH)-NADP/NAD y malato deshidrogenasa (MDH)-

NADP/NAD respectivamente. La actividad de MDH-NADP permaneció constante con los distintos tratamientos, mientras que la MDH-NAD disminuyó en la capacitación y en la reacción acrosomal del espermatozoide ($P < 0.05$). Este perfil enzimático, demuestra que la capacitación y la reacción acrosomal ligadas a las lanzaderas de malato-aspartato, lactato piruvato y la de isocitrato citosólica y mitocondrial, están definiendo un metabolismo diferencial. Los niveles de NADPH tienen un rol importante en la interacción con el ovocito. El NADH y NADPH están asociados con las enzimas antes mencionadas y relacionadas con vías enzimáticas del citosol y matriz mitocondrial, ya que son enzimas del ciclo de Krebs. El consumo de oxígeno es otra medida de evaluación de la actividad mitocondrial, donde sus variaciones nos indican los cambios de la fosforilación oxidativa. Nuestro estudio permitió demostrar que en el espermatozoide bovino, la heparina incrementa significativamente el consumo de oxígeno mientras que la progesterona provoca un menor consumo durante la reacción acrosomal. De esta manera, la capacitación con heparina está provocando un incremento de obtención de ATP, vía fosforilación oxidativa para proveer de energía al proceso espermático, efecto que no se evidencia utilizando ácido hialurónico como inductor de la capacitación. Se registró un descenso de la actividad de creatina quinasa B en

¹Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad de Buenos Aires.

la capacitación, vinculando este dato con el burst respiratorio, sugiriendo que la mayor fuente de ATP del espermatozoide capacitado proviene de la fosforilación oxidativa. Las variaciones en las actividades enzimáticas y el consumo de oxígeno van construyendo un mapa de vías enzimáticas que definen el patrón metabólico de la capacitación y de la reacción acrosomal en el espermatozoide

bovino. Los conocimientos del estado metabólico espermático provocado por un inductor, permiten evaluar la carga energética celular disponible para numerosos procesos intracelulares. En estos procesos se encuentra incluido el sistema de señales comandadas por quinasas, que definen los caminos que llevan a la preparación del espermatozoide para la fertilización.

Mecanismos moleculares involucrados en el proceso de interacción de gametas: desde el ratón al humano

DA ROS, V.¹

El proceso de interacción espermatozoide-ovocito ocurre a través de mecanismos de tipo ligando-receptor entre moléculas complementarias presentes en ambas gametas. Una de las moléculas postuladas como mediadoras de este proceso es la proteína epididimaria CRISP1 (Cysteine-Rich Secretory Protein 1), la cual se asocia a los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo. Las evidencias indican la existencia de dos poblaciones de CRISP1 sobre el espermatozoide: una mayoritaria, débilmente unida, que se libera durante la capacitación y que actuaría como factor decapacitante, y otra minoritaria, fuertemente unida, que permanece en la célula aún luego de la capacitación, y que participa en la interacción de gametas. Recientes observaciones indican que mientras la proteína débilmente unida se asociaría al espermatozoide a través de la formación de complejos con el zinc, la población fuertemente unida, lo haría a través de su transferencia desde unas vesículas membranosas presentes en el fluido epididimario denominadas "epididimosomas".

Originalmente localizada en la región dorsal del acrosoma, la proteína CRISP1 fuertemente unida migra al segmento ecuatorial luego de la capacitación. Consistente con estas dos localizaciones, los resultados de experimentos de fertilización *in vitro* realizados en presencia de CRISP1 purificada o de su correspondiente anticuerpo, revelaron la participación de esta proteína tanto en la primera etapa de interacción

con la zona pellucida (ZP) (proteína en la región dorsal) como en la etapa siguiente de fusión con el oolema (proteína en el segmento ecuatorial), en ambos casos a través de la unión de CRISP1 a sitios complementarios en el ovocito. Los potenciales roles de CRISP1 en capacitación y fertilización fueron posteriormente confirmados por resultados mostrando que espermatozoides capacitados provenientes de ratones knock out para CRISP1, generados en nuestro laboratorio, exhibían menores niveles de fosforilación en tirosina y una menor capacidad de los espermatozoides de interactuar con la ZP y con el oolema *in vitro*.

La existencia de un homólogo a CRISP1 en el humano (hCRISP1) nos llevó a investigar su posible participación en el proceso de fertilización. Los resultados obtenidos al realizar estudios funcionales *in vitro* en presencia de hCRISP1 recombinante o su anticuerpo, indicaron que hCRISP1 también participaría en las etapas de interacción con la ZP y fusión de membranas a través de sitios de unión presentes en el ovocito humano.

En conjunto, estos resultados apoyan la idea de que CRISP1 sería una molécula multifuncional durante la fertilización, contribuyendo así no solo a una mayor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de interacción de gametas sino también al desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y regulación de la fertilidad humana.

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET). Vuelta de Obligado 2490 Buenos Aires, (1428) Argentina.

Equine semen evaluation for use in assisted reproductive techniques

NEILD, D.¹

The general objective of semen evaluation is to assess the possible fertility of individual stallions or of particular semen samples, either for use in artificial insemination (AI), for preservation or for use in other more complex assisted reproductive techniques (ART). Despite many seminal parameters being currently evaluated, it is accepted that it is still virtually impossible to predict a stallion's fertility with precision. The attempt to find a good correlation between fertility and quantitative semen analysis, using either standard or more sophisticated evaluations, has failed in various species, including equines (Rodríguez Martínez, 2003; Colenbrander et al., 2003; Kuisma et al., 2006). The relationship between seminal quality (as evaluated by the different tests) and field fertility is quite disputable and this could be due to the use of a limited number of animals (both male and female) and/or the use of unreliable fertility indices. Notwithstanding the above, diverse techniques for analysing semen quality are still used both before and after applying reproductive technologies, to verify the results.

Seminal quality can be described in terms of the total number of viable, morphologically normal sperm with progressive motility, intact and functional membranes and intact DNA. Seminal plasma is considered beneficial for sperm function but detrimental for sperm survival. Some of the factors that preserve sperm function are known, such as decapacitating

and antioxidative factors, while others decrease survival, such as reactive oxygen species (ROS). Nevertheless, which fractions of seminal plasma contain each one and which accessory gland produces them is still unknown. On the other hand, *in vivo* sperm must go through various barriers in the female genital tract to get to the site of fertilization, thus creating a natural filter for the less viable spermatozoa. A more active selection seems to occur at the level of sperm-oviduct epithelial cells, resulting in a further selection of viable, motile sperm capable of carrying out capacitation and acrosome reaction and of binding to the zona pellucida. These natural selection processes can occur when some ART are applied, such as AI and oocyte transfer (OT), but selection is carried out in the lab in others, such as *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Sperm selection has also been used to obtain improved semen samples, either for insemination (in the uterine body or deep insemination at the papilla) or to obtain better results with cryopreservation and semen sexing. Selection methods include: sperm migration techniques (swim-up, swim-down); filtration (through glass wool, Sephadex or a combination of them); sperm centrifugation through colloids (simple or density gradients). The efficiency of each one of these methods is verified by evaluating different seminal and sperm parameters: number of cells recovered,

¹Cátedra de Teriogenología, INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA

motility, morphology, viability, plasma and acrosomal membrane integrity, membrane function, capacitation, chromatin condensation and integrity.

Sperm motility can be evaluated using phase contrast microscopy or with computerized systems such as Computer Assisted Semen Analysis (CASA), that allows for a more objective analysis of different aspects of motility. There are also mitochondrial membrane function assays that have been positively correlated with sperm motility and viability. Morphology has classically been evaluated using stained smears or for fixed fluid samples, on a slide with a coverslip using phase contrast or differential interference contrast microscopy (DIC). Morphometry using computerized systems can also be used. Currently, viability is evaluated using the same techniques that evaluate plasma membrane integrity, mainly using fluorescent stains (generally combining fluorochromes) but non-fluorescent stains can also be employed. Among the advantages of fluorescent stains is the possibility of using flow cytometry to evaluate large numbers of cells more objectively. For membrane function,

the hypoosmotic-swelling test has mostly been adopted, due to its simplicity and low cost. Also related to membrane function are all the assays to evaluate sperm capacitation and acrosome reaction. Among them, acquisition of hiperactivated motility, tyrosine phosphorylation, calcium movement and that of membrane lipids such as cholesterol and phosphatidylserine, indicating membrane fluidity, can be mentioned. Also included are techniques to verify acrosome integrity and the response of spermatozoa to acrosome reaction inducers. Lastly, techniques for evaluating both chromatin condensation and integrity have been included, being especially important because it has been confirmed that sperm with altered DNA can fertilize an oocyte but subsequent embryo development is compromised, leading to early embryo loss.

To conclude, methods for evaluating each sperm characteristic are very varied and each laboratory adopts those that are best adapted to their requirements and particular conditions and to the reproductive biotechnology they wish to apply to obtain a live foal, especially from animals of high genetic or sports value.

References:

1. Rodríguez Martínez H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod. Domest. Anim.* 38:312.
2. Colenbrander B, Gadella B, Stout T. 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod. Domest. Anim.* 38:305.
3. Kuisma P, Andersson M, Koskinen E, Katila T. 2006. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Vet. Scand.* 48:14-21.

Efectos de la época del año y la nutrición sobre el testículo ovino

PÉREZ-CLARIGET, R.¹

Los ovinos son una especie que manifiesta estacionalidad reproductiva, sin embargo ésta es influida por varios factores, entre los que se destacan la latitud, la nutrición y la raza. Si bien es cierto que el fotoperiodo es la señal más importante en latitudes alejadas del Ecuador¹, las señales nutricionales aumentan su importancia a medida que nos acercamos al mismo, en forma especial en razas menos dependientes del fotoperiodo como la Merino². La nutrición, además, no solo influye al individuo adulto sino también puede modificar la programación fetal durante la gestación del individuo³. Por otra parte, existen diferencias en la susceptibilidad al fotoperiodo entre razas ovinas, lo que constituye otra fuente de variación⁴.

El carnero Corriedale, raza sintética producida con el cruzamiento de hembras Merino con padres Lincoln, Leicester y Border Leicester, manifiesta en Uruguay un ciclo reproductivo anual similar al del carnero Merino. El ciclo testicular en ambas razas se caracteriza por presentar la máxima circunferencia escrotal a finales del verano y principio del otoño, decrecimiento otoñal con los mínimos valores en el invierno y crecimiento durante la primavera⁵. Sin embargo, la nutrición modula pero no contrarresta el efecto de la época del año como lo hace en los carneros adaptados al clima "mediterráneo" de Australia Occidental². En efecto, la suplementación durante el otoño⁶ o primavera⁷ no contrarrestó

el efecto de la época del año sobre el testículo, pero se observó que los carneros suplementados en otoño sufrían una menor disminución de la circunferencia escrotal y del diámetro de los túbulos seminíferos comparados con los no suplementados⁶. Mientras que, en primavera los carneros suplementados tuvieron un mayor crecimiento de la circunferencia escrotal, pero un plano nutricional que mantuvo el peso corporal no impidió el crecimiento testicular⁷. Por otra parte, se han observado cambios en la morfología espermática, con el porcentaje de espermatozoides anormales incrementándose en primavera y siendo máximo en el verano, sin que se evidenciaran efectos del plano nutricional⁸.

Los efectos de la nutrición sobre la programación fetal del testículo ha sido motivo de estudio en años más recientes y aún queda mucho por dilucidar. Existen evidencias de que la subnutrición restringida a la etapa intrauterina en el macho ovino no afectaría el tamaño testicular o la producción de semen en la etapa adulta, pero modificaría la respuesta hipofisaria a la hormona liberadora de gonadotrofinas y el patrón de esteroidogénesis testicular³, sin embargo, estos estudios se basan en aspectos endocrinológicos y mediciones de la masa testicular fetal, sin profundizar en la histología testicular. Por otra parte, los efectos de la nutrición sobre el desarrollo reproductivo del macho durante la etapa fetal parecen depender del momento en

¹Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Departamento de Morfología y Desarrollo, Facultad de Veterinaria, Udelar, Uruguay

que la subnutrición se produce. Nuestro equipo ha postulado que la célula de Sertoli puede, por sus características, ser candidata a programación fetal. Estas células juegan un rol fundamental en el testículo regulando la esteroidogénesis a través de su influencia sobre las células de Leydig y la espermatogénesis a través de su fuerte influencia sobre la proliferación y diferenciación de las células germinales⁹ y su número en los testículos está altamente correlacionado con el tamaño testicular en el adulto y con la producción espermática máxima. Trabajando con hembras Merino

en condiciones controladas de alimentación, hemos encontrado una disminución del número de células de Sertoli en corderos recién nacidos cuyas madres eran alimentadas con el 70% de los requerimientos de energía metabolizable desde la 10ma semana de gestación hasta el parto, comparado con los corderos cuyas madres fueron alimentadas durante el mismo periodo con 110% de sus requerimientos¹⁰. Estos hallazgos confirman la evidencia que se había reportado cuando se trabajó con hembras Corriedale en condiciones de pastoreo¹¹.

Referencias

1. Lincoln, G.A., Short, R.V., 1980. Seasonal breeding: Nature's contraceptive. *Recen Prog Hormone Res* 36: 1-52.
2. Martin, G.B., Walkden-Brown, S.W., 1995. Nutritional influences on reproduction in mature male sheep and goats. In: *Reproduction in domestic ruminants III*, Scaramuzzi R.J., Nancarrow C. D. and Doberska C. (Eds) *J. Reprod Fert Supp* 49: 437-449.
3. Rhind, S.M., 2004. Effects of maternal nutrition on fetal and neonatal reproductive development and function. *Anim. Reprod. Sci.*, 82-83:169-181.
4. Lincoln, G.A.; Lincoln, C.E.; McNeilly, A.S., 1990. Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breed of sheep. *J Reprod Fert* 88: 623-633.
5. Pérez-Clariget, R.; Forsberg, M.; Rodríguez-Martínez, H., 1998. Seasonal variation in live weight, testes size, testosterone, LH secretion, melatonin and thyroxine in Merino and Corriedale rams in a subtropical Climate. *Acta vet. Scand* 39: 35-47.
6. Bielli, A.; Gastel, T.; Pérez, R.; López, P.; Castrillejo, A.; Regueiro, M.; Forsberg, M.; Lundeheim, N.; Rodríguez-Martínez, H., 1997. Influence of nutrition on seasonal variation in testicular morphology and function in Corriedale rams. *J Reprod Dev* 43: 171-180.
7. Pérez-Clariget, R.; Bermúdez, J.; Andersson, H.; Burgueño, J., 1998. Influence of nutrition on testicular growth in Corriedale rams during spring. *Reprod Nutr Dev* 38(5): 529-38.
8. López, A.; Regueiro, M.; Castrillejo, A.; Pérez-Clariget, R., 2011. La época del año y el plano nutricional y su influencia sobre la morfología espermática de carneros Corriedale en pastoreo. *Veterinaria (Montevideo)* 47(182): 15-21
9. Petersen, C.; Söder, O., 2006. The Sertoli cell-A hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm. Res.* 66. 153-161
10. Bielli, A.; Pérez, R.; Pedrana, G.; Milton, J. T.B.; Lopez, A.; Blackberry, M.A.; Duncombe, G.; Rodriguez-Martinez, H.; Martin, G.B., 2003. Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reprod Fert Dev*, 14: 333-337.
11. Bielli, A.; Katz, H.; Pedrana, G.; Gastel, M.T.; Moraña, A.; Castrillejo, A.; Lundeheim, M.; Forsberg, M.; Rodriguez-Martinez, H., 2001. Nutritional management during fetal and postnatal life, and the influence on testicular stereology and Sertoli cell numbers in Corriedale ram lambs. *Small Ruminant Research* 40(1): 63-71

Efecto del factor inductor de ovulación presente en el plasma seminal de llamas sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal

RATTO, M.H.¹

Introducción

La ovulación en los mamíferos involucra la secreción pulsátil de GnRH desde el núcleo medio basal del hipotálamo a los capilares del sistema portal hipofisiario, con la consecuente descarga de LH desde los gonadótropos a la circulación general. La concentración elevada de LH induce una secuencia de cambios dentro del folículo preovulatorio, que culminan con la ruptura de su pared y la liberación del ovocito conjuntamente con el fluido folicular.

Las hembras de las distintas especies animales han sido clasificadas, en base al mecanismo de ovulación, en dos grandes categorías: ovuladoras espontáneas e inducidas. En el caso de ovuladoras espontáneas, como las hembras bovinas, ovinas, equinas y porcinas, la liberación de GnRH desde el hipotálamo es inducida cuando, en presencia de bajas concentraciones de progesterona, los niveles sanguíneos de estradiol sobrepasan cierto umbral. Por otra parte, en hembras ovuladoras inducidas como la coneja, gata, llama y alpaca la secreción de GnRH desde el hipotálamo se desencadena por señales neurales provenientes de la estimulación mecánica que recibe la hembra durante la intromisión peneana en la cópula. Esto finalmente determina la liberación de LH desde la hipófisis y consecuentemente la ovulación.

Aunque el fenómeno de ovulación inducida ha sido demostrado en llamas, alpacas y camellos, los factores relacionados con este mecanismo de

ovulación son aún desconocidos. Por muchos años se ha establecido como un dogma que en estas especies la ovulación solo ocurre si la hembra recibe la cópula de un macho. Sin embargo, este concepto ha sido cuestionado recientemente debido al descubrimiento de un factor inductor de ovulación presente en el semen de llamas y alpacas (Adams *et al.*, 2001; 2005).

Aunque ha sido demostrado que en llamas y alpacas la administración intramuscular de este factor inductor de ovulación desencadena un incremento de la concentración sistémica de LH, se desconoce como esta molécula opera a nivel del eje hipotálamo-hipófisis gonadal. Por lo tanto, el objetivo de esta revisión es dar a conocer antecedentes existentes sobre este factor y algunos resultados obtenidos en nuestro laboratorio relacionados con caracterización funcional del factor inductor de ovulación presente en el plasma seminal de llamas.

¿Existe un factor inductor de ovulación en el semen?

Investigadores Chinos (Chen *et al.*, 1985.) trabajando con camellos bactrianos documentaron hace más de 20 años la inducción de ovulación en 3 de 5 hembras posterior al depósito intravaginal de plasma seminal. Este hecho fue posteriormente corroborado por otros investigadores usando la misma especie

¹Departamento de Ciencia Animal y Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, Department of Veterinary Biomedical Science, WCVM, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canadá.
Autor correspondencia: marceloratto@uach.cl

(Zhao *et al.*, 1990), induciendo ovulaciones mediante la administración intramuscular de plasma seminal. Por lo tanto, estos estudios fueron los primeros en sostener la hipótesis de la presencia de un factor inductor de ovulación en el semen de estas especies. Recientemente, se ha documentado la purificación de fracciones con actividad ovulatoria del plasma seminal de camello bactriano mediante cromatografía líquida (Zhao *et al.*, 2001). Estas fracciones bioactivas inducen la secreción de LH pero no de FSH a partir de pequeños trozos de hipófisis de rata cultivadas *in vitro*. Autores chinos reportaron que el factor inductor de ovulación presente en el plasma seminal del camello bactriano es un péptido de 74 residuos aminoacídicos con actividad biológica similar a GnRH, sin embargo, de acuerdo a su análisis de la secuencia aminoacídica es una molécula diferente a la GnRH nativa, LH, hCG, eCG y PGF2 α (Pan *et al.*, 2001).

Estudios realizados en otras especies ovuladoras inducidas, han demostrado también el efecto facilitador de la ovulación del plasma seminal. En el caso de los koalas (*Phascolarctos cinereus*), el depósito de semen de la misma especie en el seno urogenital de 18 hembras indujo la ovulación en 11 de ellas (Johnston *et al.*, 2004). Por el contrario, el estímulo mecánico utilizando un vástago de vidrio para simular una cópula natural, no indujo la ovulación.

Estudios recientes en camélidos sudamericanos han informado la presencia de un factor inductor de ovulación (FIO) en el plasma seminal de llamas y alpacas (Adams *et al.*, 2001; 2005). La administración intramuscular del plasma seminal de llamas en hembras de la misma especie indujo ovulación en más de un 90%, siendo la ovulación precedida por una descarga preovulatoria de LH de mayor magnitud cuando fue comparada con el perfil hormonal inducido en las hembras tratadas con GnRH (Adams *et al.*, 2005). Este estudio corroboró además antecedentes aportados anteriormente (Adams *et al.*, 2001) con respecto al potencial del plasma seminal de alpaca de inducir eficientemente la ovulación en hembras de la misma especie inyectadas intramuscularmente.

Trabajos posteriores realizados en alpacas, han reportado una tasa de ovulación del 93% con la administración intramuscular y del 41% con el depósito intrauterino de plasma seminal de la misma especie, logrando aumentar esta última tasa a un 67% con el curetaje de la superficie endometrial (Ratto *et al.*, 2005), lo que facilitó la absorción del factor desde el lumen uterino. Complementariamente, se ha demostrado que el plasma seminal de alpaca induce la liberación de LH desde cultivos *in vitro* de células hipofisarias de rata y que este efecto se mantiene incluso al adicionar al medio anticuerpos anti GnRH, lo que implica que el factor presente en este fluido es diferente a la hormona liberadora de gonadotrofinas (Paolicchi *et al.*, 1999). Esto ha sido reforzado por estudios *in vivo* que demuestran características funcionales diferentes entre el GnRH y el factor inductor de ovulación (Adams *et al.*, 2005).

El factor inductor de ovulación (FIO) presente en el plasma seminal de llamas y alpacas es una proteína termoestable que tiene un peso molecular de 14 kD, sensible a la digestión enzimática con pronasa A (Ratto *et al.*, 2010; 2011).

Se ha demostrado que el efecto inductor de ovulación del FIO es dosis dependiente (Tanco *et al.*, 2007). Se reporta además, que este factor podría estar conservado en especies de ovulación espontánea puesto que ovulaciones en llama se observaron luego de la administración intramuscular de plasma seminal de bovino (Ratto *et al.*, 2006). Finalmente, estudios recientes en llamas indican que la secuencia de este factor corresponde al Factor de Crecimiento Nervioso conocido como NGF (Ratto *et al.*, 2012)

Rol del Factor Inductor de Ovulación sobre el eje Hipotálamo-Hipófisis

Dos estudios fueron llevados a cabo recientemente en nuestro laboratorio. El primero de ellos se planteó la hipótesis que el Factor Inductor de Ovulación (FIO) presente en el plasma seminal de las llamas desencadena la liberación de la hormona luteinizante (LH) actuando directamente a nivel central del eje

hipotálamo-hipófisis, siendo su acción modulada por los esteroides ováricos. Por lo tanto se desarrolló un modelo de llama ovariectomizada las cuales fueron tratadas con la molécula de FIO purificada. Se observó que el alza de LH en estas hembras fue menor al compararlo con el inducido en los animales enteros. Sin embargo, esta alza fue recuperada al valor de las intactas cuando las hembras ovariectomizadas fueron tratadas previamente con una dosis de benzoato de estradiol (Silva *et al.*, 2011). Los resultados de este estudio permitieron aceptar la hipótesis que el FIO actúa a nivel hipotálamo-hipófisis y que su acción sobre la secreción de LH es regulada por la concentración de estradiol. En el segundo estudio, se determinó si el lugar de acción del FIO era a nivel del hipotálamo o hipófisis. Por lo tanto, se desarrolló llamas fueron tratadas con un antagonista de GnRH,

Cetrorelix, previo a la administración de GnRH o FIO. Las hembras tratadas con el antagonista, Cetrorelix, no ovularon y tampoco presentaron secreción preovulatoria de LH. Los resultados de este estudio sugieren que FIO induce secreción de LH mediante previa estimulación directa o indirecta de las neuronas hipotalámicas de GnRH (Silva *et al.*, 2012)

Conclusión

La presencia de estos factores en el plasma seminal de diferentes especies son potenciales moléculas capaces de regular la actividad ovárica y uterina. En el caso del FIO de llama es un potente inductor de ovulación con la formación de un cuerpo lúteo funcional. Si bien sabemos que esta molécula actúa a nivel hipotalámico se desconoce actualmente como sería su mecanismo de acción para inducir la secreción de GnRH.

Agradecimientos: Trabajo financiado por proyecto FONDECYT 11080141; 1120518 Gobierno de Chile.

Referencias

- Adams G. P., M. H. Ratto, W. Huanca and J. Sumar. 2001. Ovulation inducing factor in the seminal plasma of Alpacas. En: Proceedings of the 47th annual meeting of the Canadian Fertility and Andrology Society, Whistler, British Columbia, Abst. 39.
- Adams G. P., M. H. Ratto, W. Huanca, J. Singh. 2005. Ovulation inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biology of Reproduction* 73:452-457.
- Chen B. X., Z. X. Yuen and G. W. Pan. 1985. Semen-induced ovulation in the Bactrian Camel (*Camelus bactrianus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 73:335-339.
- Johnston S. D., P. O'Callaghan, K. Nilsson, G. Tzipori and J. D. Curlewis. 2004. Semen-induced luteal phase and identification of a LH surge in the Koala (*Phascolarctos cinereus*). *Reproduction* 128, 629-634.
- Pan G., Z. Chen, X. Liu, D. Li, Q. Xie, F. Ling and L. Fang. 2001. Isolation and purification of the ovulation-inducing factor from seminal plasma in the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Theriogenology* 55(9): 1863-1879.
- Paolicchi F., B. Urquieta, L. Del Valle, E. Bustos-Obregón. 1999. Biological activity of the seminal plasma of alpacas: stimulus for the production of LH by pituitary cells. *Animal Reproduction . Science*. 54: 203-210.
- Ratto M. H., W. Wanca, J. Singh and G. P. Adams. 2005. Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3: 29-44.
- Ratto M. H., W. Wanca, J. Singh and G. P. Adams. 2006. Comparison of the effect of natural mating, LH and GnRH on interval to ovulation and luteal function in llamas. *Animal Reproduction Science* 91: 299-306.
- Ratto MH, Delbaere LTJ, Leduc YA, Pierson RA, Adams GP. 2011. Biochemical isolation and purification of ovulation-inducing factor (OIF) in seminal plasma of llamas. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2011, 9:24 doi:10.1186/1477-7827-9-24
- Ratto M H, Huanca, Adams G P. 2010. Ovulation-inducing factor: a protein component of llama seminal plasma. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8: 44.
- Ratto MH, Leduc YA, Valderrama PX, von Straaten K, Delbaere LTJ, Pierson RA, Adams GP. 2012. The nerve of ovulation-inducing factor in semen. *Proceedings National Academy of Sciences*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1206273109.

- Silva M., Smulders J.P., Guerra M, Valderrama XP, Letelier C, Adams G.P, Ratto M.H. 2011. Cetrorelix suppresses the preovulatory LH surge and ovulation induced by ovulation-inducing factor (OIF) present in llama seminal plasma, *Reproductive Biology and Endocrinology* 9: 74.
- Silva M, Recabarren M, Recabarren S, Adams GP, Ratto MH. 2012. Ovarian estradiol modulates the stimulatory effect of ovulation-inducing factor (OIF) on pituitary LH secretion in llamas . *Theriogenology*.
- Tanco V. M, M. H. Ratto, M. Lazzarotto, G. P. Adams. 2007. Dose response to ovulation-inducing factor (OIF) in llamas. *Theriogenology* 68:514 (Abst).
- Zhao X. X., G. W. Pan and Y. M. Huang. 1990. Studies on the ovulation-inducing factors in the seminal plasma of Bactrian camel. En: Saint-Martin G. (Eds), *Proceedings of the workshop Is it possible to improve the reproductive performance of the camel?*, CIRAD-EMVT, Paris, Francia, 197-208.
- Zhao X. X., X. L. Li and B. X. Chen. 2001. Isolation of ovulation-inducing factors in the seminal plasma of Bactrian camels (*Camelus bactrianus*) by DEAE-cellulose chromatography. *Reproduction in Domestic Animals* 36:177-181.

El espermatozoide bovino como efector del neurotransmisor gama- aminobutírico (GABA), inductor de capacitación y reacción acrosomal

RITTA, M.¹

El proceso de fecundación representa una situación particular que involucra múltiples interacciones entre los componentes aportados por ambos individuos. Sin duda, entre los fenómenos claves que regulan la fecundación, deben considerarse la capacitación espermática y la reacción acrosomal. El espermatozoide recién eyaculado o congelado/ descongelado es capaz de fecundar al ovocito luego de su tránsito por el tracto reproductivo femenino o incubado bajo condiciones especiales, situaciones ambas en las que adquiere la capacidad fecundante, fenómeno denominado capacitación espermática. Se han descrito una serie de fenómenos asociados al inicio y desarrollo de la capacitación: incremento del Ca^{2+} , bicarbonato y peróxido de hidrógeno intracelulares, activación de la adenilciclasa y de la quinasa de proteínas A y la fosforilación de ciertas proteínas, etc.

Entre los numerosos factores capacitantes y/o inductores de reacción acrosomal propuestos en los últimos años, el neurotransmisor GABA ha surgido como un posible regulador fisiológico de la funcionalidad espermática. En nuestro laboratorio demostramos la presencia de GABA en semen bovino en concentraciones comparables y aún mayores a las reportadas en numerosos tejidos periféricos de mamíferos. GABA puede ser localmente sintetizado por el espermatozoide o ser captado del fluido seminal por un mecanismo de transporte activo como el que describiésemos en gametas frescas. Demostramos la existencia de sitios de

reconocimiento de GABA en espermatozoides bovinos mediante el estudio de la asociación de [³H]-muscimol a membranas espermáticas totales crudas. La caracterización bioquímica y farmacológica de esos sitios receptores evidencian su carácter tipo A, presentando una afinidad, calculada de acuerdo con el método de Scatchard, comparable a los valores hallados en otros tipos celulares periféricos. Asimismo, comprobamos la capacitación y la reacción acrosomal inducidas por GABA, visualizadas con el antibiótico CTC, el cual fluoresce permitiendo el monitoreo del desplazamiento de Ca^{2+} en la cabeza del espermatozoide. El efecto símil-GABA desencadenado por el agonista del receptor tipo A muscimol indica claramente la participación del receptor que describiéramos en el desarrollo de ambos fenómenos. Aún más, este hecho es también apoyado por la falta de efecto de los agonistas de receptores GABAérgicos tipos B y C (baclofen y CACA, respectivamente) y por la reversión de los efectos sobre gametas incubadas en presencia de GABA y del antagonista del receptor tipo A bicuculina.

Un hecho importante de destacar es que tanto el efecto capacitante de GABA como el efecto inductor de reacción acrosomal sólo resultan evidentes cuando se expone a las gametas a una concentración del neurotransmisor del orden micromolar. ¿Cómo se puede considerar este efecto fisiológico cuando la K_d para el [³H]-muscimol es nanomolar? La respuesta a esta pregunta está en la presencia de un mecanismo

¹CONICET – Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora.

de captación activa de GABA, que resultaría en una concentración de GABA disminuida frente al sitio de reconocimiento. Por otro lado, si se considera que la concentración de GABA en el oviducto es comparable a la descrita en el cerebro, los efectos de GABA que observáramos, aún a concentraciones micromolares, pueden resultar de relevancia fisiológica. Otro factor importante a tener en cuenta es el hecho que los esteroides neuroactivos (por ejemplo la alopregnanolona) y los compuestos endógenos con actividad benzodiazepínica pueden potenciar los efectos de GABA *in vivo*.

En conclusión, GABA en concentraciones compatibles con la constante de disociación del receptor que describiéramos en el espermatozoide bovino, es capaz de inducir la reacción acrosomal y la capacitación. Sin embargo, en contraste con lo descrito para el receptor de espermatozoide humano, la progesterona no actúa sobre el receptor GABAérgico, sino aparentemente, sobre el sitio específico de reconocimiento de esteroide localizado en la membrana del

espermatozoide bovino generando una secuencia de mecanismos intracelulares independientes de los desencadenados por el GABA al unirse a su sitio receptor específico.

El desarrollo de las biotecnologías en los procesos fisiológicos, genéticos y productivos de los animales de interés zootécnico ha constituido un factor económico importante en la reproducción y producción animal. La fertilización *in vitro* de ovocitos ha centrado la atención de los investigadores y productores pecuarios debido a las ventajas potenciales de producir a bajo costo un elevado número de embriones. La identificación de los factores presentes en los fluidos cervicales, uterinos y oviductales responsables de la inducción de la capacitación espermática permitiría el desarrollo de medios químicamente definidos a utilizar en técnicas de fertilización *in vitro*. El estudio de la regulación GABAérgica del espermatozoide bovino constituye un nuevo enfoque para lograr la optimización de estas tecnologías de amplia aplicación en el sistema productivo nacional.

Avances en micromanipulación y transgénesis

SALAMONE, D.¹

Esta revisión resume, brevemente, nuestra experiencia en micromanipulación embrionaria incluyendo la clonación. El objetivo final de las tecnologías usadas será reproducir animales de élite, preservar especies en peligro de extinción y producir animales transgénicos. Hemos utilizado diferentes técnicas de clonación homoespecíficas en bovinos, caprinos, ovinos, equinos, porcinos y felinos y heteroespecíficas en equinos, tigre y chitas. Se obtiene una buena eficiencia en la enucleación de ovocitos en metafase II utilizando colorantes vitales específicos de ADN y usando técnicas de micromanipulación con zona pelúcida (ZP) o sin ella. En ambos casos realizamos la fusión de la célula somática donante con los ovocitos enucleados (ooplastos) por un pulso eléctrico. En algunas experiencias se inyecta la célula donante al ooplasto. Esta variante de la técnica permitirá utilizar células donantes con la membrana plasmática dañada, por haber sido previamente congeladas sin utilizar una técnica de criopreservación apropiada. El mayor problema con los diferentes sistemas de transferencia nuclear es la baja supervivencia de los embriones y fetos producidos por clonación. Para mejorar el desarrollo embrionario se evaluó en equinos una nueva técnica de clonación, que consiste en agregar hasta 3 embriones libres de ZP producidos por clonación de células genéticamente idénticas. La agregación de embriones mejoró la calidad e incrementó las tasas de preñez. Diferentes estrategias

se han utilizado con éxito para multiplicar embriones transgénicos, entre ellas la separación de blastómeros transgénicos seguido por la agregación con: a) embriones tetraploides (producidos por la fusión de embriones de 2 células) y/o b) blastómeros asincrónicos, multiplicando así embriones de interés por complementación trofoblástica. De esta forma se induce a la localización de las células de interés en el macizo celular interno. Las técnicas de complementación trofoblástica también podrán ser utilizadas para producir embriones a partir de células madres pluripotentes inducidas (iPS) de animales de alto valor genético. Otra técnica de micromanipulación que se desarrolló fue la clonación de gametos. Hemos demostrado que espermatozoides y ovocitos pueden ser eficientemente clonados. Este enfoque tiene un gran potencial, ya que permite la determinación del sexo del núcleo del espermatozoide antes de realizar la fertilización. También es posible clonar ovocitos seguido de la reconstrucción de embriones bovinos biparentales. Esto abre la posibilidad de utilizar la clonación del genoma tanto de los espermatozoides como del ovocito multiplicándolos como una línea celular haploide. Permitiendo que se pueda hacer un análisis profundo del genotipo de las líneas haploides y que las combinaciones durante el proceso reproductivo no sean aleatorias. Esto tendría el potencial para generar un número ilimitado de embriones biparentales mediante

¹Laboratorio de Biotecnología Animal, Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, CONICET. Argentina.

la combinación de estas células haploides con oocitos o androgenotas haploides del sexo opuesto. También hemos desarrollado un nuevo método para replicar uno o bajo número de cromosomas, utilizando micronúcleos y la maquinaria de replicación de ooplasto. Posibilitando la manipulación de cromosomas individuales lo que permitirá intercambiar cromosomas sexuales del embrión o de una línea celular. Este enfoque tiene un enorme potencial para su uso en la producción lechera dado que será posible clonar una vaca pero cambiando los cromosomas sexuales y tener una cría que será un toro, aumentando el potencial reproductivo y conociendo las características de producción de dicho genotipo.

Una de las técnicas que inicialmente utilizamos para generar vacas genéticamente modificadas fue la transfección de células somáticas modificadas genéticamente para luego utilizarlas en transferencia nuclear. Usando esta técnica, hemos producido vacas transgénicas capaces de producir hormona de crecimiento humana en la leche y descendencia viables después de la reclonación de estos animales transgénicos. Otra técnica que aplicamos para producir animales transgénicos fue la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI). Con esta técnica, pudimos obtener embriones transgénicos en cinco diferentes especies domésticas (bovino,

ovino, porcino, felino, y equino). Para mejorar la eficiencia de la transgénesis por ICSI en el ganado, se evaluaron diferentes tratamientos de activación química, incluyendo ionomicina seguido por 6-dimetilaminopurina, cloruro de estroncio y etanol. Además, en los últimos años, nuestro grupo ha desarrollado varios métodos alternativos para producir animales transgénicos que implican la inyección de vesículas ooplasmáticas, liposomas o células previamente incubadas con el transgén, en cigotos u ovocitos enucleados respectivamente. Todos estos tratamientos han demostrado ser eficaces para inducir la expresión de ADN exógeno en embriones tempranos pero con alto nivel de mosaicismo. Por esa razón, se probaron diferentes enfoques para revertirlo, incluyendo las técnicas de clonación de gametas anteriormente mencionadas. Concluimos esta reseña con una breve descripción de nuevas herramientas moleculares para la transgénesis que incrementarán la integración del ADN exógeno incluyendo el uso de enzimas como las transposasas, integrasas, “nucleasas proteínas dedo de zinc” y Talem.

Las variantes de clonación y transgénesis descritas en esta revisión tienen por objeto mejorar la eficiencia y simplificar estas técnicas para hacerlas accesibles a un mayor número de grupos de investigación y profesionales que quieran aplicarlas comercialmente.

¿Qué hacemos para mejorar la eficiencia en la producción de semen congelado bovino?

SARA, R.C.¹

La Inseminación Artificial (IA) es una biotecnología aplicada en el manejo reproductivo bovino que aporta un doble efecto: previene la difusión de enfermedades venéreas e incorpora efectivamente el material genético deseable de toros probados, dentro de una población de hembras.

Para garantizar el mayor resultado posible de la IA, los toros genéticamente seleccionados son controlados andrológicamente para definir su aptitud reproductiva. En aquellos considerados aptos para la reproducción, se colecta semen que es examinado en forma periódica para determinar su normalidad. El procesado se lleva a cabo usando los mejores métodos de preservación, incluyendo la criopreservación y el descongelado.

En Argentina durante los últimos 10 años se produjo un desplazamiento geográfico sustancial del ganado para producción de carne, desde la pampa húmeda central hacia zonas marginales del oeste, noreste y noroeste argentino. Dichas zonas, por sus características geográficas y climáticas, reciben sólo ganadería con cruzamientos de razas índicas (Brangus y Braford). Esta situación conlleva al aumento de la demanda de semen congelado de esas razas.

El Centro de Reproducción Bovina (CRB) es un Centro de Inseminación Artificial (CIA) que elabora semen congelado, exclusivamente para toros de terceros: empresas que comercializan semen y productores que lo destinan a uso

propio. El servicio implica para el cliente un costo, en pesos, por dosis elaboradas; por ello, requiere que se logre máxima eficiencia en la producción de número de dosis y en la calidad.

En los últimos 15 años se elaboraron 4,7 millones de dosis, produciéndose un cambio sustancial en la demanda de elaboración de dosis respecto de las razas. Disminuyó la demanda para ganado lechero (por el uso de semen importado) y aumentó para las carniceras taurinas y sus cruza índicas Brangus y Braford. Estas últimas, requieren un manejo diferenciado en la colecta de sus eyaculados, por su timidez a la monta en presencia del hombre y por su recelo al desvío de pene para la colecta de semen en vagina artificial.

En un CIA, la eficiencia de elaboración, en cuanto a calidad y cantidad de dosis, está directamente relacionada con el número de colectas semanales. En las razas carniceras (especialmente en las sintéticas y las índicas), donde la libido es sustancialmente menor a las razas lecheras, es necesario modificar e innovar la metodología durante la colecta, con el fin de lograr y mantener varias colectas semanales durante periodos prolongados.

Un recurso clave para mejorar la eficiencia de la producción es la frecuencia de la colecta. Es el aspecto de mayor incidencia sobre la calidad de los eyaculados y la cantidad de dosis elaboradas. La calidad seminal mejora con una mayor frecuencia de colecta. Considerando que

¹Centro de Reproducción Bovina SRL, Ruta 41, km 70, San Antonio de Areco, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

la producción fisiológica de espermatozoides por día equivale a un eyaculado, debería colectarse esa población espermática diariamente para mantener el equilibrio entre la producción testicular y su extracción. De esta manera, cada eyaculado tendría menos espermatozoides muertos y/o sobremaduros, que no resisten la injuria de la congelación-descongelación.

La mayor frecuencia de colecta, favorece la espermatogénesis, disminuye las anomalías morfológicas y mejora la congelabilidad del eyaculado, con un mayor número de espermatozoides viables por dosis elaborada. La colecta de un eyaculado por día, es la más eficiente en calidad y cantidad; las limitaciones radican en la paulatina pérdida de interés de monta del toro y en el manejo operativo del centro elaborador. Un programa de colecta adecuado y posible sería: dos veces por semana, con dos o tres eyaculados por día de trabajo (4 a 6 eyaculados semanales). La frecuencia variará con la edad y la producción seminal de cada toro. Implementar un programa de alta frecuencia de colecta semanal, ha servido para mejorar la calidad seminal en: a) toros después de un reposo sexual; b) toros con degeneración testicular reversible de verano; c) toros con eyaculados de alta concentración espermática y d) toros con disturbios en la espermatogénesis por cebamiento.

La elaboración de miles de dosis de un toro que tiene alta demanda, requiere la extracción frecuente de muchos eyaculados durante un largo periodo de tiempo. Para lograr dos o tres eyaculados por día, dos veces por semana, con los mismos súcubos, el mismo lugar e idéntico manejo (rutina), se requiere aplicar varias

herramientas para mantener el deseo de monta: 1) el uso de varios súcubos móviles: vacas y novillos estrogenizados; 2) el toro suelto (sin bozal) en pequeños corrales; 3) evitar el uso del brete de salto; 4) el uso de un toro como súcubo, sujeto en el brete de salto; 5) realizar la colecta en su piquete; 6) tener un periodo de estimulación sexual prolongado; 7) la estimulación a la monta en competencia con otros toros y 8) la electroeyaculación con previa estimulación.

Podemos mencionar tres condiciones necesarias para mejorar la eficiencia:

1) Estado corporal: La gordura impacta negativamente en la calidad seminal, especialmente en las razas carniceras *bos taurus* (Angus y P. Hereford), y es frecuente después de exposiciones y/o remates. Es necesario un descenso progresivo del peso, para favorecer la monta y normalizar la espermatogénesis (atleta sexual).

2) Bienestar Animal y Manejo: El piquete de alojamiento debe asegurar el bienestar animal: sombra, piso seco, reparos y ejercicio. El manejo por parte del personal debe ser adecuado. Lo contrario provoca estrés y alteración de la espermatogénesis.

3) Sanidad: Incluye la salud general, andrológica, sanitaria y especialmente la de sus patas. Las frecuentes patologías podales, deben ser rápidamente atendidas y medicadas porque tienen un fuerte impacto negativo sobre la espermatogénesis, con aumento de espermatozoides muertos, anomalías morfológicas y disminución de la congelabilidad. La patología genital más frecuente es la adenitis vesicular subclínica con piospermia.

Resúmenes de Posters

<i>Diseño experimental para evaluar el impacto de la castración quirúrgica e inmunológica sobre el bienestar animal del ganado porcino. Informe preliminar.</i> Acerbo, M.; Miguez, M.; Cisale, H.	249
<i>Variation on mitochondrial and oxidative activities of pig oocytes during in vitro maturation with glycolytic pathway modulators</i> Alvarez, G; Casiró, S; Dalvit, G; Cetica, P.	250
<i>Expresión del receptor de glucocorticoides en ovarios bovinos con Enfermedad Quística Ovárica (EQO).</i> Amweg, AN; Rodriguez, FM; Huber, E; Salvetti, NR; Rey, F; Ortega, HH.	251
<i>Embryo effect in Nodal-Lefty oviduct expression during the early pregnancy</i> Argañaraz, ME; Apichela, SA; Angiono, G; Jimenez Diaz, MA; Lombardo, D; Miceli, DC.	252
<i>Sperm vitrification in llama</i> Arraztoa, C; Miragaya, M; Carretero, Mi; Santa Cruz, R; Gambarotta, M; Neild, D.	253
<i>Boar sperm vitrification</i> Arraztoa, C; Miragaya, M; Pendola, C; Gambarotta, M; Neild D.	254
<i>Estudios morfológicos e histológicos de quistes ováricos en reproductoras porcinas y su relación con la actividad ovárica</i> Barrales, HS; Zequin, M; Cappuccio, JA; Machuca, MA; Williams, SI.	255
<i>Efecto de la adición de dimetilformamida a un diluyente Tris Base sobre la supervivencia de espermatozoides epididimales felinos post descongelación</i> Bonauro, MC; Praderio, R; Nuñez Favre, R; Tittarelli CM; Stornelli, MA.	256
<i>Evaluation of capacitation in llama sperm. Preliminary results.</i> Caldevilla, M; Ferrante, A; Trasorras, V; Arraztoa, C; Carretero, Mi; Santa Cruz, R; Giuliano, S; Neild, D.	257
<i>Influence of the estrous cycle in the response of granulosa cells against bovine ovarian GnRH analogues in vitro</i> Carou, MC; Cruzans, PR; Lombardo, DM.	258

<i>Effect of freeze-thawing on llama sperm DNA fragmentation. Preliminary results.</i> Carretero, MI; Neild, D; Arraztoa, CC; Ferrante, A; Caldevilla, M; Giuliano, SM.	259
<i>Effect of cooling on llama sperm DNA</i> Carretero, Mi; Santa Cruz, Rc; Arraztoa, Cc;Giuliano, Sm; Neild, D.	260
<i>Variables histométricas y cuantitativas de la espermatogénesis y epididimo en cerdos de 6 meses de edad.</i> Bustos, E; Castro, R.	261
<i>Anatomo-histological and histochemical changes in the oviduct of the Spotted Nothura (Nothura maculosa, tinamidae) during the annual cycle</i> Claver, JA; Soñez, MC; Rosa, JM; Gazzaneo, P; Lombardo, DM.	263
<i>Uso de plasma seminal homólogo en la criopreservación de semen ovino</i> Colombo, R; Manes, J; Hozbor, F.	264
<i>Effect of hematopoietic growth factors on apoptosis of cumulus cells during bovine oocyte in vitro maturation</i> Conde, P; Alvarez, G; Smitz, J; Cetica, P; Gentile, T.	265
<i>Optimización de un protocolo de IATF en rodeos de carne con cría al pie</i> Confalonieri, AJ; Larosa, S; Carretero, MI; Péndola, CH.	266
<i>Expresión de los receptores de andrógenos en el eje hipófiso-gonadal en vizcachas machos en relación a la edad</i> Cruceño, A; Chaves, M; Godoy, D; Filippa, V; Aguilera Merlo, C; Mohamed, F; Dominguez, S; Scardapane, L.	267
<i>Modelo de persistencia folicular: una herramienta para la comprensión de la dinámica folicular en la enfermedad quística ovárica bovina (EQO)</i> Díaz, PU; Stangafarro, ML; Gareis, NC; Leiva, CJ; Matiller, V; Panzani, CG; Rey, F; Salvetti, NR; Ortega, HH.	268
<i>Biological validation of a simple extraction method for fecal testosterone determination in male cats</i> Faya, M; Carranza, A; Furlan, P; De La Sota, P; Gobello, C.	269
<i>Sperm metabolism differences in heparin Vs. hyaluronic acid capacitation</i> Fernández, S. y Córdoba, M.	270
<i>Membrane fluidity evaluation in capacitated equine spermatozoa using electron spin resonance (ESR)</i> Ferrante, A; Rubín De Celis, E; Caldevilla, ML; Piehl, L; Neild D.	271
<i>Effect of a GnRH analogue on the semen quality of a subfertile stallion</i> Ferrante, A; Baca Castex, C; Besso, MJ; Caldevilla, M; Vazquez-Levin, MH; Miragaya, M.	272

<i>Estudio inmunohistoquímico y ultraestructural de los receptores de andrógenos y las gonadotropas en hipófisis de vizcachas machos adultos castrados</i>	
Filippa, V; Godoy, D; Perez, E; Mohamed, F.	273
<i>Sperm changes during epididimal transit of armadillo in non-breeding period</i>	
Filosa, A; Pérez Marchetta, G; Marquínez, A; Rossi, L; Merani, S; Córdoba, M.	274
<i>Recuperación de la ciclicidad sexual y de la morfología ovárica en ratas mediante el uso de terapia génica para IGF-I</i>	
Alicia M. Flamini, Silvia S. Rodríguez, Martha C. Bohn, Rodolfo G. Goya, Claudio G. Barbeito.	275
<i>Efecto nutricional en hembras porcinas antes del primer servicio</i>	
Garber, J; Zanel, W; González, MA; Borelli, V.	276
<i>Evaluación de la fertilidad posaborto en gatas tratadas con cloprostenol</i>	
García Mitacek, MC; Stornelli, MC; Tittarelli, CM; Williams, SI; De La Sota, RL; Stornelli, MA.	277
<i>Morphological abnormalities in commercial bull frozen semen and conception rate</i>	
Ghirardosi, MS; Jorge, A; Gonzalez, L; Chan, D; Fischman, ML; Cisale, H.	278
<i>Use of coomassie blue to evaluate acrosomal status in Llama Spermatozoa. Preliminary results.</i>	
Giuliano, S; Bisiau, C; Carretero, MI; Arraztoa, C; Neild, D.	279
<i>Consecuencias de la exposición de ovocitos bovinos al VDVB al inicio de la maduración in vitro</i>	
González Altamiranda, EA; Kaiser, GG; Ríos, GL; Odeón, AO.	280
<i>Nuclear tests in quality control of frozen bovine semen</i>	
González, LO; Malcervelli, D; Suhevic, J; Miguel, J; Jorge, A; Ghirardosi, MS; Cisale, HO; Fischman, ML.	281
<i>Comportamiento productivo de cerdas con el uso de diferentes modelos de parideras a campo</i>	
González, MA; Borelli, V; Zanel, W.	282
<i>Effect of amp on the oxidative metabolism of the bovine oocyte during in vitro maturation</i>	
Gutnisky, C; Morado, S; Dalvit, G; Thompson, J y Cetica P.	283
<i>Determination of proliferation index in primary bovine cell cultures of corpus luteum stimulated with leuprolide acetate, GnRH analogue</i>	
Hamer, CS; Germano, P; Gambarotta, M; Lombardo, DM; Soñez, MC.	284
<i>El método de colecta de semen afecta la composición del plasma seminal en carneros</i>	
Ledesma, A; Manes, J; Ríos, G; Hozbor, F; Cesari, A; Alberio, R.	285
<i>Comparative analysis of two different techniques to obtain porcine cumulus-oocyte complexes</i>	
Lorenzo, MS; Tello, MF; Maruri, A; Gambarotta, M; Fischman, ML; Lombardo, DM.	286

<i>Utilización de la gonadotropina coriónica humana (hCG) para el tratamiento de la infertilidad en el macho canino. Estudio retrospectivo.</i>	
Loza, ME; Monachesi, NE; Comercio, EA; Kaliman, FR; Wanke, MM.	287
<i>Expresión de isoformas de foliculostatina en folículos quísticos de bovinos con enfermedad quística ovárica (EQO).</i>	
Matiller, V; Stangaferro, ML; Rodriguez, FM; Rey, F; Ortega, HH; Salvetti, NR.	288
<i>Reactive oxygen species and redox state participation in bovine oocyte activation in vitro</i>	
Morado, S; Cetica, PD; Beconi, MT; Thompson, JG; Dalvit, G.	289
<i>Evaluación de infusiones de antibióticos, mediante citología endometrial, en vacas de cría con endometritis subclínica</i>	
Moscuzza, C; Ambros, L; Alvarez, G; Gutiérrez, B; Zurita, M; Tropeano, M; Perna, R.	290
<i>Aspectos morfológicos de la mucosa del ampulla y la unión ampulla-istmo del oviducto de la yegua durante la estación anovulatoria</i>	
Mouguelar, H; Apichela, SA; Aguilar, JJ; Losinno, L.	291
<i>Folliculogenesis in columba livia (birds: columbiformes)</i>	
Olea, GB; Sandoval, MT; Carou, MC; Hernando, AB & Lombardo, DM.	292
<i>Expresión de componentes de la cascada de señalización de la insulina en folículos ováricos de bovinos con enfermedad quística.</i>	
Panzani, CG; Rodriguez, FM; Benitez, G; Salvetti, NR; Ortega, HH; Rey, F.	293
<i>Daño ultraestructural en la membrana de espermatozoides porcinos durante el proceso de congelación-descongelación</i>	
Prenna, G; Miglio, A; Peralta, R; Jurado, S; Williams, S.	294
<i>Seguimiento del comportamiento del celo mediante observación visual y pintura en base de la cola asociado a estructura folicular y/o ovulación en bovinos lecheros sincronizados con protocolos de IA</i>	
Regalado, E; Sarramone, C; Scilipoti, G; Santa María, M; Dick, A.	295
<i>Anatomía e histología del tracto reproductor masculino del oso melero (Myrmecophagidae, Xenarthra).</i>	
Rossi, LF; Meyer, C; Baldoma, V; Merani, MS.	296
<i>Use of 2 and 4% dimethylformamide as the cryoprotectant for freezing llama semen</i>	
Santa Cruz, R; Arraztoa, C; Carretero, MI; Ferrante, A; Caldevilla, M; Moncalvo, E; Giuliano, S.	297
<i>Sperm selection in llama cooled semen using different Percoll® gradients</i>	
Santa Cruz, R; Arraztoa, C; Carretero, MI; Ferrante, A; Caldevilla, M; Moncalvo, E; Giuliano, S.	298
<i>IATF en vaquillonas comparando dos protocolos de sincronización</i>	
Schinoni, J; Confalonieri, AJ; Carretero, MI; Péndola, CH.	299

<i>Uso de la combinación de melatonina y prostaglandinas para la sincronización del estro en ovejas de raza rasa aragonesa</i>	
Silva, Manuel Agustín; Abecia, José Alfonso	300
<i>Sincronización de celos en ovejas de aptitud lechera según la edad y el protocolo</i>	
Simonetti, L; Lynch, GM; Mc Cormick, M; Carou, N.	301
<i>Glucocorticoid receptors (GRs) expression and morphometric indices of GH-tropes population in hypophysis of pregnant rats under chronic stress by immobilization</i>	
Soñez, MC; Soñez, CA; Mugnaini, MT; Monedero Cobeta, I; Bozzo, AA; Gazzaneo, P; Gauna, HF.	302
<i>Mediciones de progesterona en perras tratadas con eCG</i>	
Stornelli, MC; García Mitacek, MC; Bonaura, MC; Nuñez Favre, R; De La Sota, RL; Stornelli, MA.	303
<i>Sistema informático para control de gestión de empresas porcinas</i>	
Suárez, R; Lomello, V; Giovannini, F; Giovannini, N; Campagna, D; Silva, P; Brunori, J; Cottura, G; Braun, R; Cervellini, J; Muñoz, V; Faner, C; Coca, L.	304
<i>Assessment and distribution of apoptosis in immature cumulus oocyte complexes in sows</i>	
Tello, MF; Lorenzo, MS; Maruri, A; Casiró, S; Cética, P; Gambarotta, MC; Lombardo, DM.	305
<i>Comparison of qualitative and quantitative evaluation of porcine primordial and primary follicles</i>	
Torres, P; Gabriel, P; Fratto, C; Boviez, J; Cisale, H; Lombardo, DM; Fischman ML.	306
<i>First alpacas born in Argentina by extra-species embryo transfer</i>	
Trasorras, VL; Caldevilla, M; Baca Castex, C; Chaves, MG; Agüero, A; Neild, DM; Pinto, M; Miragaya, MH.	307
<i>Activity of key enzymes of the energetic metabolism in porcine gametes</i>	
Vecchi, B; Dubois, D; Satorre, M; Alvarez, G; Gutnisky, C; Rodriguez, P; Breininger, E.	308
<i>Efecto del estrés térmico en carneros por esquila tardía sobre la calidad seminal</i>	
Veksler Hess, J; Schuh, A; Jorge, A; Decaminada, E; Miralles, M; Coppola, M; Ghirardi, M.	309
<i>Determinación de receptores de progesterona isoforma A, en ovarios y tejidos placentarios fetales y maternos de cerdas preñadas</i>	
Viglierchio, M; Williams, S; García, Mg; Riesco, O; Lacolla, D; Riesco, S; Witt, S; Koncurat, M; Yaful, G.	310
<i>MMP9 expression and localization in llama oviduct</i>	
Zampini, R; Apichela, SA; Argañaraz, ME; Angiono, G; Lombardo, D; Miceli, DC.	311

Diseño experimental para evaluar el impacto de la castración quirúrgica e inmunológica sobre el bienestar animal del ganado porcino. Informe preliminar.

ACERBO, M.¹; MIGUEZ, M.¹; CISALE, H.²

La carne de cerdos sin castrar tiene un defecto sensorial que se conoce como “*olor sexual*”. Éste se atribuye a la androstenona y al escatol, y es evitado con la castración que actualmente se realiza en forma quirúrgica sin anestesia. Esta práctica induce cambios fisiológicos y comportamentales claramente indicativos de dolor. La castración inmunológica consiste en inyectar una forma modificada del GnRH (hormona liberadora de Gonadotropina) para inducir la formación de anticuerpos frente a dicho factor. La inmunocastración mejora las condiciones de bienestar animal, lo que redundará en mejores resultados productivos. Como diseño experimental para medir el factor de estrés se evalúan machos desde el parto hasta la faena, los cuales se dividen en 2 grupos: animales castrados quirúrgicamente (Grupo 1) y animales inmunocastrados (Grupo 2). A los 7 días de nacidos se realiza la castración quirúrgica del grupo 1. Al momento de la castración se toma la primera muestra de sangre para medición de cortisol a la totalidad de los animales (grupo 1 y 2), maniobra que se ejecuta cada 14 días.

Se realizan filmaciones de los boxes en tres turnos diarios de dos horas cada uno, cada 14 días, a fin de confeccionar un etograma. La inmunocastración se lleva a cabo en el grupo 2 con dos administraciones del producto durante el periodo de engorde, separadas por cuatro semanas. Todos los animales están estabulados bajo las mismas condiciones de producción, respetando las condiciones de bienestar animal, de acuerdo a las reglamentaciones internacionales (evitar niveles de ruido continuo superiores a 85 dB, iluminación de 40 lux al menos 8 horas al día, acceso permanente a una cantidad suficiente de agua fresca, superficie de 1 m²/animal, temperatura entre 18 a 22°C, alimentación balanceada). La castración quirúrgica fue abolida en Bélgica a partir de enero del 2012, y no estará permitida como práctica en el Mercado Común Europeo a partir de enero de 2018. En un futuro cercano, las normativas de bienestar animal serán una *barrera paraarancelaria* que pondrá un freno a las exportaciones pecuarias. Eliminar este problema es crucial para fortalecer el ingreso de divisas del sector agropecuario.

¹Cátedra de Producción Porcina, ²Cátedra de Física Biológica Facultad de Ciencias Veterinarias UBA, Av. Chorroarín 280 CABA.

Variation on mitochondrial and oxidative activities of pig oocytes during *in vitro* maturation with glycolytic pathway modulators

ALVAREZ, G; CASIRÓ, S; DALVIT, G; CETICA, P.

We have previously demonstrated the inhibition of glycolysis in the porcine cumulus oocyte complex (COC) by NaF and ATP during *in vitro* maturation (IVM). We have also observed that AMP has no effect on this pathway during porcine COC IVM. The regulation of glycolysis could affect the redox status of the oocyte. Our goal was to evaluate the influence of physiological (AMP and ATP) and pharmacological (NaF) effectors of the glycolytic pathway in the mitochondrial and oxidative activities of pig oocytes during IVM. The COCs were obtained by aspiration of antral follicles (3-8mm) of ovaries from slaughter sows. The IVM was performed for 48 hours at 39°C, 5% CO₂ in medium 199 supplemented with gonadotropins (control) and with 40 mM AMP, 10 mM ATP or 5 mM NaF. Mitochondrial and oxidative activities of oocytes were determined at 0, 24, 32, 40 and 44 h (for being hours related to key events of maturation), using the fluorescent staining of Mito Tracker Green FM and Redox

Sensor Red CC- 1, respectively. Statistical analysis was performed by ANOVA. A decrease in mitochondrial and oxidative activities was observed in control oocytes until 32 h. of IVM and a slight increase in later times ($p < 0.05$). The NaF increased the mitochondrial and oxidative activities ($p < 0.05$). With the addition of ATP and AMP we observed a decrease in both activities ($p < 0.05$). Mitochondrial and oxidative activities seem to decrease in metaphase I, recovering the level observed during germinal vesicle breakdown for the extrusion of the 1st polar body and metaphase II. Inhibition of glycolysis by the physiological effector (ATP) decreased mitochondrial and oxidative activities of the oocyte. The pharmacological inhibitor (NaF) could produce an increase in both activities, maybe due to their influence in other metabolic pathways. The AMP would have the ability to modify these activities without affecting glycolysis.

Expresión del receptor de glucocorticoides en ovarios bovinos con Enfermedad Quística Ovárica (EQO).

AMWEG, AN^{1,2}; RODRIGUEZ, FM^{1,2}; HUBER, E¹; SALVETTI, NR^{1,2};
REY, F^{1,2}; ORTEGA, HH^{1,2}.

La ovulación es un evento inflamatorio caracterizado por el incremento de citoquinas y prostaglandinas, por lo que el aumento en los glucocorticoides (GCs) anti-inflamatorios puede representar un mecanismo fisiológico para limitar dicho proceso. El exceso de cortisol de origen adrenal o el estímulo directo de la ACTH sobre el ovario a través de sus receptores, podrían llevar a una acción antiinflamatoria local exacerbada que lograría inhibir la ovulación, favoreciendo la persistencia folicular y la posterior formación de quistes. Esta acción de los GCs estaría mediada por la activación de receptores de GCs intracelulares (GC-R). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión del GC-R en ovarios de vacas con quistes espontáneos y controles. Se evaluó la expresión *in situ* de la proteína GC-R por inmunohistoquímica indirecta y su ARNm por PCR en tiempo real. Se observó una mayor expresión de la proteína del GC-R en células de la granulosa en comparación con células de la teca en las distintas estructuras foliculares

analizadas. Los niveles de expresión del GC-R en células de la granulosa no mostraron diferencias significativas entre los folículos controles y los quistes. La expresión del GC-R en células de la teca fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en folículos terciarios provenientes de animales con quistes comparados con las demás estructuras foliculares. No hubo diferencias significativas en la expresión génica del GC-R en las diferentes estructuras foliculares analizadas. Los cambios encontrados en los folículos terciarios de animales afectados, podrían relacionarse con los procesos de recambio descritos en ovarios con EQO. Por otra parte, considerando que la expresión de esta proteína estaría relacionada con la ovulación, es probable que la ausencia de diferencias significativas observadas en otras estructuras pueda estar relacionada con el tiempo de persistencia de los quistes. Por ello, sería importante analizar la expresión de proteínas relacionadas con el proceso inflamatorio asociado a la ovulación en estadios tempranos de la persistencia folicular.

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

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Embryo effect in Nodal-Lefty oviduct expression during the early pregnancy

ARGAÑARAZ, ME¹; APICHELA, SA¹; ANGIOÑO, G²; JIMENEZ DIAZ, MA¹;
LOMBARDO, D²; MICELI, DC¹.

Growth factors are involved in the early embryonic development and implantation, events whose success depends on an accurate communication maternal-embryonic. Even though, numerous molecules secreted by the endometrial that affect the potential embryonic and/or fetal development and growth were indentified, little is known about how embryo presence influences the transcriptome and secretome of the maternal reproductive tract. In our laboratory LEFTY, which is expressed differentially in the oviduct of pregnant rat whose maximum expression is on the 4th day of pregnancy, was isolated. In this work the embryo effect over NODAL-LEFTY signaling system on rat oviducts on the 4th day of pregnancy was examined. NODAL induces LEFTY expression, while LEFTY inhibits NODAL. In the experiment 3 months animals with regular estrous cycles and right partial salpingectomy to avoid oocyte fecundation were used, while the left oviduct was left intact to allow normal embryonic development and transport. Once

recovered from surgery, the animals were mated and on the 4th day of pregnancy oviducts were removed, perfused to remove the embryos and processed for gene expression analysis (complete oviducts) and immunohistochemistry (ampulla and isthmus). Through RT-qPCR we could determin that LEFTY is expressed 0,72 less times in oviducts containing embryos, while no differences were observed regard to the expression levels of NODAL. Both LEFTY and NODAL are located epithelially, with the same pattern in ampulla and isthmus. LEFTY is located apically with an irregular and intracellular diffuse pattern, with a faint signal in pregnant females. NODAL is mostly located in epithelial cells with diffuse irregular signal. These data indicate that NODAL-LEFTY system is functional in oviduct during pregnancy and LEFTY expression depends on the presence and/or absences of embryo, and not only of the hormonal state of pregnancy, suggesting that this signaling system take part in the maternal-embryonic dialogue that occurs in the oviduct.

¹ Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (CONICET-UNT). San Miguel de Tucumán. ² Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. E-mail: mearganaraz@fbqf.unt.edu.ar

Sperm vitrification in llama

ARRAZTOA, C^{1,3}; MIRAGAYA, M^{1,3}; CARRETERO, MI^{1,3}; SANTA CRUZ, R¹;
GAMBAROTTA, M²; NEILD, D^{1,3}.

Vitrification of sperm in the absence of cryoprotectants, is a method recently used with success in human semen. This technique requires improving the sample, in addition to very high rates of freezing and warming. The objective of this study was to evaluate llama sperm vitrification in the presence (WC) or absence (AC) of cryoprotectants. Semen was obtained by electroejaculation under general anaesthesia (n=5, r=3) and incubated with collagenase to improve the sample. Spermatozoa were vitrified in cryoloops (L) and spheres (S), at a concentration of 20 and 5 x 10⁶ esp./ml TALP (AC) or TALP + 5% dimethylformamide (WC) respectively, and then stored in liquid nitrogen a minimum of 24 h before evaluation. The samples were warmed, in TALP medium, rapidly at 37°C/30" or ultra-rapidly at 75°C/7" followed by 37°C/30". Motility, plasma membrane function (HOS test) and sperm viability (CFDA-Pi stain) were evaluated. The degrees of sperm chromatin decondensation (Toluidine Blue stain) and sperm chromatin fragmentation (Sperm Chromatin Dispersion Test) were also analysed. None of

the vitrification methods maintained any of the viability parameters when compared to pre-vitrification samples; however viable cells were observed with the spheres method when warmed at 37°C/30". No significant differences ($p>0.05$) were observed in DNA condensation between any of the samples evaluated. Regarding DNA integrity, no significant differences ($p>0.05$) were observed between pre-vitrification samples and those vitrified in spheres without cryoprotectant and warmed either rapidly or ultra-rapidly nor with spheres with cryoprotectant, warmed rapidly. On the other hand, vitrification in cryoloops (both WC and AC), using either warming method, showed a significant decrease in DNA integrity ($p<0.05$). In conclusion, the best results would seem to be obtained by vitrifying with spheres, in the absence of cryoprotectants and warming at 37°C/30". The vitrification process negatively affects the sperm viability parameters evaluated without affecting the DNA, indicating the possibility of using vitrified llama sperm in assisted reproductive techniques such as intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

¹Cátedra de Teriogenología, ²Cátedra de Biostatística, ³INITRA, FCV, UBA.

Boar sperm vitrification

ARRAZTOA, C^{1,4}; MIRAGAYA, M^{1,4}; PENDOLA, C^{1,2,4};
GAMBAROTTA, M³; NEILD D^{1,4}.

Recently human sperm vitrification without cryoprotectants has been successfully implemented. This method involves very high rates of freezing and warming and requires prior selection of the sample. Our aim was to vitrify boar spermatozoa in the absence or presence of cryoprotectants (AC and WC respectively). Raw boar semen (n=3, r=4) and semen diluted in a commercial medium (n=5, r=2) were used and both were improved by glass-wool filtration. TALP (T) was used for the AC medium and T+4% dimethylformamide and T+4% Glycerol were used for the WC medium. Samples were vitrified in cryoloops and spheres at a concentration of 20 and 5 x 10⁶ sperm/ml respectively, kept in liquid nitrogen for at least 24 h and warmed in T medium either rapidly at 37°C/30" or ultra-rapidly at 75°C/7" followed by 37°C/30". Sperm motility, plasma membrane function (HOS), viability (CFDA-Pi) and acrosomal integrity (phase contrast) were evaluated in all samples. Also, the degree of chromatin condensation (Toluidine Blue stain) and susceptibility to acid denaturation (Acridine Orange stain) were analysed. Sperm viability parameters weren't maintained in the vitrified and warmed samples. It should be noted that no

viable cells were observed in any of the samples vitrified using cryoloops but viable cells were found in samples vitrified using spheres without cryoprotectant. The warming method did not affect vitrification results. In raw semen samples, chromatin condensation was not significantly modified after vitrifying with cryoloops (both WC and in AC) but was significantly decreased when using spheres and dimethylformamide as the cryoprotectant. In semen samples diluted in commercial medium, sperm chromatin condensation was not significantly altered using cryoloops with either cryoprotectant, but decreased significantly using spheres (both WC and in AC). No significant differences ($p>0.05$) were observed in sperm chromatin susceptibility to acid denaturation between any vitrified sample and the samples prior to vitrification. Using raw semen for vitrification maintains DNA condensation better than when using semen diluted in a commercial medium. Vitrification of boar semen doesn't preserve sperm viability parameters but does maintain chromatin condensation and integrity. Therefore vitrification is a means of sperm cryopreservation useful for biotechnologies such as ICSI.

¹Cátedra de Teriogenología, ²Cátedra de Producción en Porcinos, ³Cátedra de Bioestadística, ⁴INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

Estudios morfológicos e histológicos de quistes ováricos en reproductoras porcinas y su relación con la actividad ovárica

BARRALES, HS^{1,5}; ZEQUIN, M²; CAPPUCCIO, JA^{3,4};
MACHUCA, MA³; WILLIAMS, SI⁵.

El objetivo del presente trabajo es describir la morfología y el tipo histológico de los quistes ováricos en reproductoras porcinas y su relación con la actividad ovárica y la cantidad de estructuras presentes en los ovarios. Se inspeccionaron 81 aparatos genitales (AG) de cerdas descartadas y enviadas a frigorífico. Los AG fueron recolectados e identificados de forma individual. Se estudió la morfología de los ovarios registrando: cantidad de folículos (FL) y cuerpos lúteos (CL). Para el diagnóstico de los quistes ováricos (Qov) y la determinación de la actividad cíclica se utilizó un ecógrafo Pie Medical Aquila con sonda convexa de 5-7,5 MHZ, se consideró Qov a toda estructura que supere los 10 mm de diámetro y ovarios activos a los que presentaban CL o FL de más de 3 mm de diámetro. Se realizó un estudio histológico de la pared de los Qov, clasificándolos en foliculares (QovF) o luteinizados (QovL). Las diferencias en la cantidad de FL y CL entre hembras con o sin Qov se evaluó por prueba t de Student. Se seleccionó al azar un grupo control, cerdas sin quistes y con igual cantidad de partos (n=11). Del total de AG examinados, el 13,58% (n=11) presentó Qov, el diámetro promedio de los Qov

fue de $19,35 \pm 11,07$ mm (promedio \pm SD). De las 11 cerdas con Qov, 9 presentaron QovL, una QovF y la restante presentó 2 QovL y un QovF. La cantidad de Qov/cerda no superó el número de 4, con la salvedad de una cerda que presentó una degeneración ovárica quística presentando 22 Qov. Del total de hembras con Qov el 90,9% presentaron actividad cíclica en ambos ovarios. La cerda restante (9,1%) fue la que presentó la degeneración ovárica quística. La cantidad de estructuras presentes en los ovarios, con y sin quistes, fue de $30,36 \pm 15,40$ y de $45,55 \pm 24,32$, respectivamente, no hallándose diferencias estadísticamente significativas, si bien el grupo de cerdas sin Qov tuvo un 50% más de estructuras presentes. De los resultados se puede concluir que el tipo de Qov presente no puede determinarse macroscópicamente ni por ultrasonografía, es necesario un estudio histológico de la pared de los mismos. La presencia de Qov podría influir en el número total de estructuras ováricas observadas, pero no influiría sobre la actividad cíclica de la cerda. Se harían necesarios más estudios para relacionar esto último con la eficiencia reproductiva de las cerdas.

¹Becario SCyT, UNLP. ² Becaria alumna SCyT, FCV, UNLP. ³Cátedra de Patología Especial, ⁴Cátedra de Clínica de Grandes Animales, ⁵Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, La Plata.

Efecto de la adición de dimetilformamida a un diluyente Tris Base sobre la supervivencia de espermatozoides epididimales felinos post descongelación

BONAURA, MC^{1,2}; PRADERIO, R²; NUÑEZ FAVRE, R^{1,2}; TITTARELLI CM¹; STORNELLI, MA¹.

La recuperación de espermatozoides epididimales (EE) es de gran valor en la conservación de la biodiversidad de especies y animales en peligro de extinción. La adición de amidas a un diluyente, en reemplazo de parte del glicerol, podría mejorar la supervivencia de EE al descongelado al reducir los efectos tóxicos del glicerol sobre la célula espermática. El objetivo fue evaluar el efecto de la adición de Dimetilformamida (DMF) al diluyente (DIL) TRIS sobre la supervivencia de EE al descongelado. Se utilizaron 14 gatos mestizos, sanos, con un peso de entre 3.5 y 4 Kg los cuales formaron parte de un plan urbano de control de la reproducción en felinos. Luego de la orquiectomía bilateral, los testículos y epidídimos fueron transportados y procesados dentro de la hora de obtenidos. Los EE fueron obtenidos mediante la técnica de *cutting*. Para realizar la congelación de los EE se utilizaron dos diluyentes (DIL =2) diferentes, un DIL TRIS sin agregado de DMF [TRIS] o con el agregado de 0,5% de DMF [TRIS-DMF]. Luego de la equilibración,

el semen diluido fue envasado y congelado sobre vapores de nitrógeno líquido. La descongelación de los EE se realizó a 37°C durante 1 minuto. Se realizaron pruebas de evaluación microscópicas *in vitro*: Concentración Espermática (CE; 10⁶/ml), Movilidad Progresiva Individual (MI; %), vigor (VI; escala 1-5), Acrosomas intactos (AI; %AI), Integridad de membrana (IM; % membranas intactas) en los EE luego de la recuperación y en los EE congelados/descongelados. Se observaron diferencias significativas en todos los parámetros seminales entre los EE (4) precongelación y los EE congelados/descongelados ($p < 0.001$). Los EE congelados con TRIS-DMF no mostraron diferencias significativas en ninguno de sus parámetros cuando se los comparó con los valores obtenidos en los EE congelados/descongelados con TRIS. El agregado de 0,5% de DMF no ejerció efectos protectores sobre los EE cuando se lo comparó con TRIS. El agregado de un mayor porcentaje de DMF al DIL podría mostrar efectos benéficos sobre la protección de los EE al descongelado.

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata B1900AVW, BA, Argentina; ²CONICET, Av. Rivadavia 1917, Capital Federal C1033AAJ, Argentina; ³CIC, 526 (10 y 11) 1900 La Plata, BA, Argentina.

Evaluation of capacitation in llama sperm. Preliminary results.

CALDEVILLA, M¹; FERRANTE, A¹; TRASORRAS, V¹; ARRAZTOA, C¹; CARRETERO, MI¹;
SANTA CRUZ, R¹; GIULIANO, S²; NEILD, D¹.

Sperm capacitation is a complex process that is extremely important for fertilization. There are no studies on capacitation in llama; therefore the objective of this study was to evaluate sperm capacitation in llamas using the chlortetracycline stain (CTC). Materials and methods: Semen was collected from two male llamas (n=2; r=3) and capacitation was carried out using Fertil-TALP, containing sodium bicarbonate and bovine serum albumin as capacitation inducers, and incubating at 37°C, with 5% CO₂, in a humidified atmosphere for 24 h. Spermatozoa were prepared for *in vitro* fertilization as follows: incubation with collagenase and centrifugation with a column of Androcoll-ETM to improve the samples. CTC evaluations were performed every hour for the first 4 h and then a final assessment at 24 h. Routine semen evaluations were also carried out in raw semen (sperm motility, viability and membrane function). Results: To date, no significant differences were

found in the different CTC staining patterns (non-capacitated, capacitated, acrosome reacted sperm) between the different incubation times (1-4 h) and raw semen; but a significant increase ($p < 0.0006$) was observed in acrosome reacted sperm after 24 h of incubation. The samples showed hyperactivated motility even after 24 h of incubation. No significant differences ($p > 0.05$) were observed in the percentages of non-capacitated, capacitated and acrosome reacted sperm between the raw samples, and those incubated with collagenase or with those centrifuged through Androcoll-ETM. Conclusions: there seems to be a significant proportion of capacitated spermatozoa in ejaculated llama semen (between 10% and 30%) and that at least 24 h in capacitating conditions are required to induce acrosome reaction. This phenomenon would be linked to the induced ovulation and oocyte maturation period in this species.

¹Cátedra de Teriogenología, ²Cátedra de Física Biológica, INITRA, Facultad de Ciencias. Veterinarias, UBA.

Influence of the estrous cycle in the response of granulosa cells against bovine ovarian GnRH analogues *in vitro*

CAROU, MC; CRUZANS, PR; LOMBARDO, DM.

Numerous studies show the presence of GnRH receptors (GnRHR) in granulosa cells (GC) of ovaries in different species. Its relationship with gonadal function was demonstrated by the induction of apoptosis *in vitro* and *in vivo* using different GnRH agonists. Our laboratory experiments on cells from bovine ovarian like the established line (BGC-1) that were incubated for 24 and 48 h, showed that the agonist, leuprolide acetate (LA) induced apoptosis in a dose dependent manner and increased significantly at 100 nM concentration. Our objective was to study the regulation of apoptosis by the LA in primary culture GC (CPGB) from bovine follicles. To this end we proceeded to analyze the regulation of apoptosis by the LA in a dose-response (1, 10 and 100 nM) curve at incubation time (24 and 48 hours) and the presence or absence of corpora lutea (CL). Two experiments were performed in

triplicate and analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni means comparison with a significance level of 5%. In CPGB, dose-dependent response against LA was variable, perhaps reflecting the degree of differentiation of GC (spontaneous luteinization *in vitro*). Two patterns were observed to respond to the induction of apoptosis by the LA. Cultures from ovaries with CL (luteal phase with P₄ concentration greater than 0.8ng/cell in the follicular fluid-FF, as determined by RIA) developed in direct response to the concentration of LA being significant at 100 nM (response type 1, similar to that observed in BGC-1), while crops from ovaries without CL (follicular phase or luteal regression, with concentrations less than 0.8ng/cell in the FF) induction of apoptosis produced versus low doses of agonist (1 nM LA), type 2 response. We propose that according to the degree of GC differentiation they expressed different GnRHR conformations.

Effect of freeze-thawing on llama sperm DNA fragmentation. Preliminary results.

CARRETERO, MI^{1,3}; NEILD, D^{1,3}; ARRAZTOA, CC^{1,3}; FERRANTE, A^{1,3};
CALDEVILLA, M¹; GIULIANO, SM^{1,2,3}.

In the last years, knowledge of seminal characteristics of male South American Camelids (SAC) has advanced; however, an efficient freeze-thawing protocol has not yet been developed. Furthermore, in these species, the main cryoprotectant used has been glycerol with a stabilization temperature of 4-5°C, observing lower pregnancy rates when using cryopreserved semen. One of the reasons could be because of damage that sperm chromatin suffers after cryopreservation. The objective of this study was to evaluate the effect of freeze-thawing on llama sperm DNA fragmentation, using the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) assay and dimethylformamide as the cryoprotectant and evaluating two stabilization temperatures. Fourteen ejaculates (n=7; r=2) were collected using electroejaculation under general anesthesia. Each ejaculate was diluted 4:1 in 0.1% collagenase in H-TALP-BSA medium and incubated 4 minutes at 37°C; then, it was divided into two aliquots. One of these was diluted with lactose-EDTA-egg yolk (LEY) with 7% dimethylformamide (LEY-DMF) and stabilized at room temperature

(RT) during 20 minutes. The other was diluted with LEY, cooled to 5°C, and then LEY-DMF was added and the sample was stabilized at 5°C during 20 minutes. After each stabilization period, deep-freezing was carried out. The following slides were prepared to evaluate using SCD: (a) raw semen, (b) semen + LEY/5°C, (c) semen + LEY-DMF/5°C, (d) thawed semen (LEY-DMF/RT) and (e) thawed semen (LEY-DMF/5°C). Friedman's test was used for statistical analysis of the data. No significant differences were observed in the percentages of sperm with DNA fragmentation between the different stages of freeze-thawing. To conclude, these preliminary results would indicate that dimethylformamide, used at a concentration of 7%, does not seem to affect llama sperm DNA fragmentation. In addition, both stabilization temperatures were effective for preserving chromatin integrity. However, more studies should be carried out to compare different cryoprotectants at different concentrations and stabilization temperatures with the objective of improving the current cryopreservation protocols used in SAC.

¹ Cátedra de Teriogenología, ² Cátedra de Física Biológica, ³ INITRA. FCV-UBA.

Effect of cooling on llama sperm DNA

CARRETERO, MI^{1,3}; SANTA CRUZ, RC¹; ARRAZTOA, CC^{1,3};
GIULIANO, SM^{1,2,3}; NEILD, D^{1,3}.

Artificial insemination, using both raw and cryopreserved semen, was the first biotechnology applied with the objective of improving the reproductive and genetic quality of farm animals. It is generally accepted that a substantial number of sperm are damaged during cryopreservation because different types of alterations occur at different levels of the sperm cell. DNA evaluation provides additional information on spermatid function, contributing to a more complete seminal assessment. The objective of this study was to evaluate the effect of cooling on the DNA condensation and fragmentation of llama sperm, using the Toluidine blue stain and the Sperm Chromatin Dispersion assay, respectively. Eighteen ejaculates were collected from 6 male llamas, using electroejaculation under general anesthesia. Part of the ejaculate was used to evaluate raw semen and the rest was cooled. For cooling, each ejaculate was diluted (1:0.5) in 11% lactose (80%) and egg yolk (20%), at 37°C. Then, it was submitted to a cooling curve over two and a half hours, until

it reached 5°C. After 24 h of preservation at 5°C, the cooled samples were incubated at 37°C prior to carrying out routine and DNA semen evaluations. For statistical analysis, a factorial design was used to compare routine seminal characteristics and DNA status between raw and cooled semen, using the male as a blocking factor. The cooling process significantly decreased motility ($p= 0.005$) without affecting membrane function and integrity. With regard to DNA evaluations, cooling significantly increased chromatin decondensation ($p\leq 0.05$), without altering the percentage of sperm with DNA fragmentation. These results would indicate that the process of cooling used in this study, increased sperm chromatin decondensation without altering DNA fragmentation in llama spermatozoa. It is probable that chromatin decondensation increases susceptibility to fragmentation and consequently decreases fertility, making it necessary to shorten the time between ovulation and artificial insemination when using cooled semen in this species.

¹ Cátedra de Teriogenología, ² Cátedra de Física Biológica, ³ INITRA- FCV-UBA.

VARIABLES HISTOMÉTRICAS Y CUANTITATIVAS DE LA ESPERMATOGÉNESIS Y EPIDÍDIMO EN CERDOS DE 6 MESES DE EDAD.

BUSTOS, E¹; CASTRO, R².

En los suinos, se han llevado a cabo diversos estudios que describen los cambios testiculares durante la pubertad. En jabalí se reconoce un incremento del tamaño testicular y del diámetro de los túbulos seminíferos, así como también un cambio dinámico en las poblaciones celulares que conforman los estadios del epitelio seminífero (Murta *et al.*, 2012). En el cerdo doméstico Ford y Wise (2011) describen el aumento del diámetro testicular en etapa puberal, sin embargo, aún se desconoce el comportamiento de sus variables histométricas y celulares durante la espermatogénesis inicial. Esto último es el objetivo del presente trabajo. Desde un matadero se obtuvieron los testículos y epidídimos de 8 cerdos domésticos de 6 meses de edad. Se separaron testículo de epidídimos, seccionando este último en cabeza, cuerpo y cola. Un pequeño trozo de cada segmento fue procesado para técnica histológica y morfométrica registrando: diámetro tubular, altura del epitelio y diámetro luminal para ambos órganos. En cortes de testículo se cuantificaron las poblaciones celulares de Sertoli (S), espermatogonias (G), espermatocitos preleptoténicos (EPL) y espermatocitos en paquíteno (EPQ), calculando los siguientes índices G/S, EPL/S, EPQ/S. Se

aplico análisis de varianza con posterior prueba de Bon Ferronni ($p < 0,05$).

Resultados y discusiones: dada la homogeneidad de edad de los individuos, las variables testiculares muestran poca dispersión de valores, como es esperable y no difiere de lo reportado por Ford y Wise (2011) a la misma edad (6 meses). En epidídimos, desde cabeza a cola incrementan los diámetros tubular y luminal, de modo que el mayor volumen luminal se encuentra en cola, que corresponde al sitio de almacenamiento y maduración espermática en la mayoría de las especies. Concomitantemente, la altura del epitelio disminuye desde un epitelio cilíndrico alto a un epitelio cuboideo en cauda, como se observa en la histología del órgano (Tabla 1), variaciones que se han correlacionado con el balance entre secreción y reabsorción del fluido epididimario a lo largo de este conducto. En otro estudio cuantitativo, en esta misma población de cerdos (Castro y Bustos, 2012) a los 6 meses de edad se constata una apreciable cantidad de espermatozoides en cauda, ya a esta edad, sugiriendo que la función de este segmento epididimario ya está establecida. Los recuentos de células germinales indican, sin embargo, que la eficiencia del proceso espermatogénico

¹Facultad de Medicina Universidad de Chile, Laboratorio de Biología de la Reproducción ICBM. ²Programa de Doctorado en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias, Universidad de Chile.

es aún baja (índices células germinales/Sertoli decreciente), sugerente de apoptosis en la primera profase meiótica a esta edad) (Tabla 2). Las células de Sertoli, aparentemente han estabilizado su número, aún cuando esto se

cita a los 7 u 8 meses para el jabalí, en el cual aparecen EPL a los 8 meses, pero no se menciona la edad en la cual hay espermatidas alongadas. En nuestro trabajo anterior ellas ya están presentes a los 6 meses.

Tabla 1. Variables histométricas de testículo y epidídimo (um) (Promedio + ds)

	Diámetro tubular	Diámetro Luminal	Altura epitelial
Testículo	267,55 ± 25,5	114,60 ± 24,44	64,90 ± 8,23
Cabeza	291,58 ± 10,11	152,48 ± 6,06	49,38 ± 6,06
Cuerpo	419,38 ± 9,42	381,38 ± 4,91	47,61 ± 8,38
Cola	501,14 ± 9,77	461,33 ± 9,11	32,97 ± 7,84

N= 50 túbulos por cerdo

Tabla 2. Número de células germinales / Sertoli, en sección transversal de túbulos seminíferos

	S	G	EPL	EPO
N células/túbulo	10,15 ± 3,06	65,83 ± 3,93	56,52 ± 4,41	50,15 ± 5,24
Índice CG/S	---	6,48 ± 0,8	5,56 ± 0,6	4,94 ± 0,8

= 50 túbulos por cerdo

En el cerdo doméstico de línea productiva, ya a los 6 meses de edad puede reconocerse que el diámetro tubular y luminal del epidídimo aumentan desde cabeza a cola, en cambio la altura epitelial disminuye, reconociéndose, cauda, como segmento de almacenamiento y maduración. La espermatogénesis inicial se

caracteriza por una menor eficiencia denotada por los índices CG/S explicada posiblemente por apoptosis en este período. El número de las células de Sertoli es estable en la edad estudiada (baja desviación Standard), lo que en la mayoría de los mamíferos se correlaciona con pubertad final e inicio de la edad reproductiva.

Anatomo-histological and histochemical changes in the oviduct of the Spotted Nothura (*Nothura maculosa*, tinamidae) during the annual cycle

CLAVER, JA; SOÑEZ, MC; ROSA, JM; GAZZANEO, P; LOMBARDO, DM.

The oviduct of birds shows morpho-functional variations in species with seasonal reproduction. The objective of this work was to describe the anatomical, histological and histochemical changes of the Spotted Nothura oviduct during the annual cycle. Complete oviducts of adult female *Nothura maculosa* were obtained in reproductive recess periods (P1: March to May and P2: June to August) and reproductive periods (P3: September to November and P4: December to February); which were fixed in Bouin and post-fixation were measured. The regions of the oviduct (infundibulum, magnum, isthmus, uterus and vagina) were conventionally processed and embedded in paraffin or historesin (LEICA®). Longitudinal and cross sections were stained with H/E, Masson trichrome and PAS/H. Macroscopic and microscopic images were obtained and analyzed with the software Leica Qwin, measuring different parameters. All variables showed minimal values during P1-P2 while in P3-P4 were determined the maximum ones. The total length of oviduct ranged from 69 mm during P1 to 163.19 mm

in P3. The development of the oviduct was also evident in the height changes and the degree of development of epithelial apical different regions, in the length of the cilia and in the amount of secretory cells. During involution, the amount of secretory cells decreases, lacking PAS positive granules and the typical pseudostratification of active epithelium changes to a simple epithelium of low height in all regions. The folds in the infundibulum ranged from 42.08 to 192.6 µm (P1 to P3), in the magnum are wide and lined with epithelium which increases in height (P1: 5.86 to P3: 15.49 µm), with PAS + cells. In the uterus the folds are branched of 696.26 µm in height in P4, with abundant PAS (+) glands during P3-P4. In the vagina, sperm storage tubules were observed full of sperm cells only during P3 and P4. In all regions the connective tissue predominated during P1 and P2 while it was scarce in P3 and P4, periods in which the glands doubled its size and increased its content. The observed features are related to glandular secretory activity levels and changes that we have described in the pituitary-gonadal axis of this species in the same periods of the annual cycle.

Uso de plasma seminal homólogo en la criopreservación de semen ovino

COLOMBO, R¹; MANES, J²; HOZBOR, F³.

El plasma seminal (PS) posee componentes que revierten el daño ocasionado por la criopreservación. Teniendo en cuenta que los espermatozoides ovinos son muy sensibles a la congelación, el objetivo del presente trabajo fue determinar si el agregado de PS homólogo al medio de congelación de semen mejora los parámetros cualitativos de los espermatozoides ovinos descongelados. Se extrajo semen con vagina artificial dos veces por semana a 5 carneros Poll Dorset durante la estación reproductiva (marzo-abril), utilizándose sólo aquellos eyaculados con una motilidad masal microscópica (MMM) ≥ 4 . Para la obtención del PS, los eyaculados obtenidos en el mes de marzo fueron enfriados (5°C, 45 minutos) y posteriormente centrifugados (7300xg, 10 minutos). Se extrajo el sobrenadante y se lo centrifugó nuevamente en iguales condiciones. Se conformaron pooles por fecha de colecta, los cuales se conservaron a -18°C hasta su utilización. Los pooles de PS fueron descongelados, filtrados a través de una membrana de acetato de celulosa (0,22 μm , Microclar®, India) e incorporados al diluyente (Tris, yema de huevo 10% y glicerol 7%) en diferentes proporciones para constituir

los siguientes tratamientos: 0% (control), 5%, 10%, 20% y 30%. En abril, los eyaculados fueron utilizados para conformar un pool por fecha de colecta, donde cada carnero aportó igual número de espermatozoides (250 x 10⁶/mL). Cada pool fue alicuotado, diluido en cada uno de los 5 tratamientos y posteriormente enfriado y congelado en vapores de nitrógeno. Luego de la descongelación (30", 37°C), en cada muestra se determinó: motilidad espermática total (MET), motilidad rectilínea progresiva (MRP), integridad (IMP) y funcionalidad de la membrana plasmática (FMP). El valor de significancia establecido fue $p < 0,05$. Las variables MET (control: 52,7 \pm 5,2; 5%PS: 60,7 \pm 4,8; 10%PS: 53,3 \pm 4,8; 20%PS: 50,23 \pm 4,8; 30%PS: 36,5 \pm 4,8) y la MRP (control: 20,6 \pm 0,5; 5%PS: 22,1 \pm 0,4; 10%PS: 20,7 \pm 0,4; 20%PS: 21,7 \pm 0,4; 30%PS: 9,5 \pm 0,4) fueron significativamente menores cuando se agregó 30% de PS. No hubo diferencias significativas para FMP e IMP. Se concluye que el agregado de PS homólogo previo a la congelación no mejora los parámetros cualitativos de los espermatozoides ovinos descongelados y que el PS en altas concentraciones (30%) tiene un efecto detrimental sobre la motilidad espermática.

¹Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad Nacional de Mar del Plata; ²Biocología de la Reproducción, INTA Balcarce 1regi_bio@hotmail.com; ³fhozbor@balcarce.inta.gov.ar

Effect of hematopoietic growth factors on apoptosis of *cumulus* cells during bovine oocyte *in vitro* maturation

CONDE, P^{1,2}; ALVAREZ, G²; SMITZ, J³; CETICA, P²; GENTILE, T¹.

Erythropoietin (Epo) and kit ligand (KITL) are growth factors which known functions are related to hematopoiesis. Recently, it had been found the production of Epo, KITL and their receptors in ovarian tissue. The role of these hematopoietic growth factors during oocyte maturation is still uncertain. We have previously observed that the presence of Epo or KITL during *in vitro* maturation of bovine *cumulus* oocyte complexes (COCs) has no effect on nuclear maturation of oocytes, but would have a positive effect on cytoplasmic maturation, as we observed an increase in the number of 2-4 cells embryos. It is known that the *cumulus* cells play a nutritional and regulatory role during the maturation process. The aim of this study was to evaluate the effect of adding Epo and KITL during *in vitro* maturation of bovine COCs on apoptosis level of *cumulus* cells surrounding the oocyte. COCs were recovered from antral follicles of ovaries from slaughtered cows and matured in medium 199 + gonadotropins at

39°C, 5% CO₂ in air, supplemented with 1) bovine serum albumin (BSA, negative control), 2) BSA + Epo (20 or 80 mU/ml) 3) BSA + KITL (5 or 50 ng/ml), 4) fetal bovine serum (FBS, positive control). After 22 hours of incubation, COCs were fixed with 4% paraformaldehyde for 1 hour and apoptotic cells were determined by TUNEL technique (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche). Data were analyzed according to Anguita *et al.*, 2009 for COCs. Supplementation of *in vitro* maturation medium with 5 or 50 ng/ml of KITL significantly decreased the percentage of apoptosis in the cumulus cells respect to both controls ($p < 0.05$). Moreover, the addition of 20 or 80 mU/ml of Epo did not change significantly the percentage of apoptosis in the *cumulus*, although there was a tendency to decrease this rate. The hematopoietic growth factors could have a beneficial effect in preventing apoptosis in cumulus cells of bovine COCs and this could be associated with a better cytoplasmic maturation capability of the oocyte.

¹IDEHU, FFyB, UBA-CONICET; ²INITRA, FCV, UBA; ³UZBrussel-VUB.

Optimización de un protocolo de IATF en rodeos de carne con cría al pie

CONFALONIERI, AJ¹; LAROSA, S¹; CARRETERO, MI^{1,2}; PÉNDOLA, CH¹.

La Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) en vacas con cría al pie utilizando progestágenos ha tenido una amplia difusión en los últimos años, brindando beneficios de alto impacto sobre la producción. El objetivo de este trabajo fue comparar dos protocolos con progestágenos (DIB: dispositivo intravaginal bovino), uno de 4 movimientos utilizando benzoato de estradiol (Be) y el otro de 3 movimientos usando cipionato de estradiol (Ci). Se utilizaron 700 vacas reproductivamente aptas, pertenecientes a 2 establecimientos (C1 y C2) de la Cuenca del Salado, con un post parto de 40 a 75 días y una condición corporal promedio de 2,75. Cada establecimiento de 350 vacas fue dividido aleatoriamente en dos grupos de 175 vacas cada uno: en los grupos C1-Be y C2-Be se utilizó un protocolo de 4 movimientos (día 0:

Be + DIB; día 7,5: retiro DIB + PGF2 α + eCG; día 8,5: Be; y en los grupos C1-Ci y C2-Ci un protocolo de 3 movimientos (día 0: Be + DIB; día 7,5: retiro DIB + PGF2 α + eCG + Ci). La IATF se realizó a las 52/56 h posteriores al retiro del DIB, con semen de fertilidad probada. Las hembras vacías de la primera ronda se volvieron a dividir aleatoriamente, se sincronizaron y se realizó una segunda ronda de IATF. Las vacas vacías de esta segunda ronda fueron a servicio natural con toros sanitariamente aptos, completando un servicio de tres meses. En todos los casos se trabajó con un solo equipo de operarios. El diagnóstico de gestación se realizó por ecografía a los 30 días post IATF. Se utilizó un test de Chi-cuadrado para comparar los porcentajes de preñez. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla.

Tasa preñez (%)	Tratamiento Be		Tratamiento Ci		Total
	C1-Be	C2-Be	C1-Ci	C2Ci	
1ª ronda	52,57 (92/175) ^a	49,71 (87/175) ^a	40,57 (71/175) ^b	38,86(68/175) ^b	45,43 (318/700)
2ª ronda	58,06 (54/93) ^a	58,76 (57/97) ^a	47,87 (45/94) ^a	46,94 (46/98) ^a	52,88 (202/382)
C1 1ª+2ª ronda	78,92 (146/185) ^a	-	70,30 (116/165) ^a	-	74,86 (262/350)
C2 1ª+2ª ronda	-	78,26 (144/184) ^a	-	68,67 (114/166) ^b	73,71 (258/350)
Be/Ci	78,59 (290/369) ^a		69,49 (230/331) ^b		74,29 (520/700)

^{a,b} Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Podemos concluir que utilizando el protocolo tradicional de IATF de 4 movimientos, se obtuvo una mayor tasa de preñez total, indicando que con el uso de eCG (al retiro), combinado con

la administración de benzoato de estradiol 24 hs. post retiro del dispositivo intravaginal, se produciría un mejor desarrollo folicular y una más ajustada sincronización de la ovulación.

¹ Cátedra de Teriogenología, ² INITRA- FCV- UBA.

Expresión de los receptores de andrógenos en el eje hipófiso-gonadal en vizcachas machos en relación a la edad

CRUCEÑO, A¹; CHAVES, M^{1,2}; GODOY, D¹; FILIPPA, V^{1,2}; AGUILERA MERLO, C¹; MOHAMED, F¹; DOMINGUEZ, S¹; SCARDAPANE, L¹.

Los andrógenos son hormonas esteroideas fundamentales para la maduración sexual y ejercen su acción luego de unirse a sus receptores específicos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la expresión del receptor de andrógenos (RA) en el eje hipófiso-gonadal de vizcachas machos de diferentes edades mediante inmunohistoquímica. Animales capturados en su hábitat fueron clasificados en impúberes (n=4), prepúberes (n=4) y adultos (n=4) de acuerdo al peso corporal e histología testicular. Se extrajeron muestras de sangre de animales anestesiados que posteriormente fueron sacrificados. Hipófisis, testículos y epidídimos se procesaron para microscopía óptica. Niveles de testosterona sérica fueron medidos por enzimoimmunoensayo quimioluminiscente. Los RA se localizaron con el anticuerpo anti-AR (N-20):sc816 y el sistema revelador de biotina-estreptavidina (cromógeno DAB). Los niveles de testosterona medidos en impúberes fueron menores a 20 ng/dl, en prepúberes $139,74 \pm 30,77$ ng/dl y en adultos $490,66 \pm 40,76$ ng/dl. En impúberes se encontraron

escasos núcleos positivos en la región central de pars distalis (PD) hipofisaria. En prepúberes aumentó la intensidad y cantidad de células inmunomarcadas en el extremo caudal, observándose marcación nuclear y citoplasmática. En adultos la marcación fue principalmente nuclear, siendo más intensa y numerosa en las regiones ventral, dorsal y extremo caudal. Los testículos de impúberes y prepúberes mostraron numerosas células germinales primitivas expresando RA. Mientras que en animales adultos los RA se localizaron sólo en células de Sertoli. Células de Leydig y conectivas se observaron siempre marcadas. En el epitelio de segmento inicial y cabeza epididimaria disminuyó la expresión de RA en las diferentes poblaciones celulares. Las células conectivas de la lámina propia mostraron una continua marcación en función a la edad del animal. Nuestros resultados sugieren que los RA modifican su expresión en el eje hipófiso-gonadal de acuerdo al estado de maduración sexual del animal, garantizando así el inicio y mantenimiento de la actividad de dicho eje.

¹Lab. de Histología, Fac. de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis; ² CONICET.

Modelo de persistencia folicular: una herramienta para la comprensión de la dinámica folicular en la enfermedad quística ovárica bovina (EQO)

DÍAZ, PU^{1,3}; STANGAFERRO, ML²; GAREIS, NC¹; LEIVA, CJ¹; MATILLER, V¹; PANZANI, CG¹; REY, F^{1,3}; SALVETTI, NR^{1,3}; ORTEGA, HH^{1,3}.

La EQO es una de las causas principales de infertilidad en vacas lecheras. Una hipótesis sobre su patogenia es que existe un desequilibrio neuroendócrino en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, con falla en el pico preovulatorio de hormona luteinizante (LH). Estudios previos han demostrado que concentraciones subluteales de progesterona (P4) pueden bloquear este pico de LH evitando la ovulación sin inhibir la secreción tónica de LH de manera que el folículo dominante puede seguir creciendo. En orden de comprender la dinámica folicular inicial en la EQO, propusimos desarrollar un modelo experimental que abarque la etapa de formación de folículos persistentes. Para ello se utilizaron 6 vacas Holstein divididas en dos grupos, uno control (C, n=3) y uno tratado (T, n=3). Se realizó la sincronización utilizando un protocolo G6G-Ovsynch al cabo del cual y por 15 días se colocó a los animales T un dispositivo intravaginal de P4 para conseguir concentraciones subluteales. Con el fin de describir la dinámica folicular se realizaron ecografías diarias (Transductor lineal transrectal

5 MHz, Honda HS101V, Japón). En los animales tratados las concentraciones subluteales de P4 permitieron la permanencia de folículos preovulatorios de 12,6 +/- 3 mm al inicio del proestro. Éstos establecieron su persistencia con un tamaño de 16,3 +/- 3mm en el día 1 (momento esperado de ovulación), llegando a 18,3 +/- 2,1mm a los 5 días y a 18 +/- 3,6 mm el día 10 de persistencia, respectivamente. En el día 15 se observó un tamaño del folículo persistente de 14 +/- 4,6mm. A los 10 días de persistencia, en 2 de los animales tratados se estableció una nueva onda de crecimiento folicular con el surgimiento de nuevos folículos de 4 y 7 mm, que se mantuvieron hasta el final del protocolo alcanzando los 15 y 22 mm respectivamente. En función de estos resultados, podemos concluir que este modelo es válido para inducir folículos persistentes y quistes *in vivo*. La información obtenida a partir de este trabajo permitirá, conjuntamente con la evaluación hormonal y molecular, comprender mejor la dinámica de formación inicial de folículos persistentes como base de la etiopatogenia de la EQO.

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular. ²Cátedra de Teriogenología. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL. ³CONICET.

Biological validation of a simple extraction method for fecal testosterone determination in male cats

FAYA, M²; CARRANZA, A¹; FURLAN, P²; DE LA SOTA, P¹; GOBELLO, C¹.

Non invasive techniques to measure hormone metabolites appear as attractive alternatives to avoid animal stress during blood sampling manipulation and restraint. In the domestic cats (*Felis catus*), 85% of testosterone (T) metabolites are excreted in feces.¹

The objective of this trial was to biologically validate a simple method for T fecal metabolites extraction in domestic felids.

Fecal samples were collected from entire (n=11), and castrated (n=11) 1-4 years, male cats of our institutional experimental colony.² Fecal steroids were extracted as based on general

methods described by Brown et al. (2008)³ with some authors' modifications.⁴ Fecal hormones were determined by electrochemiluminescence (Elecsys®Testo II, Roche Diagnostics). Values were compared between groups by Students T test.

Mean ± SEM fecal T concentrations (ng/g) differed between entire and castrated males (60.1±12.5 vs. 24.2±6.1; p<0.05).

It was concluded that, in the male domestic cat, this simple extraction method for fecal testosterone extraction appears useful to differentiate neutered vs. intact animals.

¹Laboratory of Reproductive Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, National University of La Plata-CONICET, ²Catholic University of Córdoba, Argentina. cgobello@fcv.unlp.edu.ar

Sperm metabolism differences in heparin Vs. hyaluronic acid capacitation

FERNÁNDEZ, S. Y CÓRDOBA, M.

Processes that allow sperm to prepare for fertilization of the oocyte require energy, either to use it to hypermotility and induction of intracellular signals kinases dependent. Hyaluronic acid and heparin are glycosaminoglycans present in genital tract of bovine female. Mitochondria is an organelle which is involved to energy production, process associated with oxygen consumption. The shuttle creatine kinase (CK) is a connection between mitochondria and cytosol. The aim of this study was to determine oxygen consumption, CK activity and cryopreserved bovine spermatozoa capacitation with heparin or hyaluronic acid. CK activity was determined spectrophotometrically at 37°C and oxygen consumption was measured polarographically with an oxygen electrode modified Clark type. Capacitation was evaluated by the chlortetracycline epifluorescent technique

and viability and acrosome integrity by Trypan blue stain/DIC. Data was analyzed by ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$). Oxygen consumption was significantly higher in heparin samples ($14.76 \pm 2.89 \mu\text{LO}_2/\text{h}/10^8 \text{ sp}$) than hyaluronic acid ($7.29 \pm 1.86 \mu\text{LO}_2/\text{h}/10^8 \text{ sp}$) ($p < 0.05$). CK activity in heparin capacitated sperm ($20.57 \pm 4.17 \text{ U}/10^8 \text{ sp} \times 10^2$) was significantly lower than hyaluronic acid samples ($33.50 \pm 9.67 \text{ U}/10^8 \text{ sp} \times 10^2$) ($p < 0.05$). Capacitation with heparin ($32.54 \pm 2.02\%$) determined with CTC was significantly higher than hyaluronic acid treatment ($21.43 \pm 4.58\%$) ($p < 0.05$). Metabolic patterns obtained with both inductors suggest that energy production for capacitation process induced by heparin is mainly dependent on oxidative phosphorylation in contrast with energy sources used for capacitation induced by hyaluronic acid.

Membrane fluidity evaluation in capacitated equine spermatozoa using electron spin resonance (ESR)

FERRANTE, A¹; RUBÍN DE CELIS, E²; CALDEVILLA, M¹; PIEHL, L²; NEILD D¹.

Changes in sperm membrane fluidity are a consequence of the biochemical changes produced during capacitation, for example, phospholipids redistribution and cholesterol efflux. It is important to study capacitation in equines to improve *in vitro* capacitation and to be able to apply improvements in sperm preservation to avoid or minimize cryocapacitation in the future. The objective of this study was to evaluate equine sperm membrane fluidity using spin probes and electron spin resonance (ESR) spectroscopy and to compare this method to the classic chlortetracycline (CTC) evaluation. Semen was collected from two stallions (n=2; r=3) using an artificial vagina and semen samples were evaluated before and after 3 h of capacitation in H-TALP media with the addition of bicarbonate and albumin. Capacitation was determined using the CTC stain and membrane fluidity using liposoluble spin probes inserted into the membrane lipid bilayer for determining: 1) the order parameter S (which gives a measurement

of the degree of membrane structural order) and 2) the correlation rotational time T (an direct indicator of membrane viscosity). Significant increases in capacitated ($p < 0.003$) and reacted ($p < 0.04$) sperm were observed after 3 h of capacitation as compared to the raw samples using the CTC stain, with the concomitant significant decrease in non-capacitated sperm ($p < 0.003$). With regard to membrane fluidity, when using the 5-doxil estearic probe, a significant decrease in S parameter was observed in capacitated sperm ($p < 0.05$) when compared to untreated sperm, whereas no significant differences were observed in T ($p > 0.05$) when the 16-doxil estearic probe was used. This indicates an increase in sperm membrane fluidity in the area close to the phospholipid polar heads, related to capacitation, without detectable changes in the hydrophobic core of the membrane. To conclude, studying membrane fluidity changes with spin probes and ESR could be useful for evaluating both *in vitro* capacitation and the changes produced during cryopreservation.

¹Cátedra de Teriogenología, INITRA, Facultad de Cs. Veterinarias, UBA; ²Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Effect of a GnRH analogue on the semen quality of a subfertile stallion

FERRANTE, A^{1,2}; BACA CASTEX, C¹; BESSO, MJ²; CALDEVILLA, M¹;
VAZQUEZ-LEVIN, MH^{2*}; MIRAGAYA, M^{1*}

Subfertility in stallions generates significant economic losses in equine production. The aim of our study was: 1) to evaluate the effect on semen parameters of treating a subfertile stallion with a GnRH analogue (deslorelin) and 2) to compare the protein profiles of the ejaculate before and after treatment. We used a subfertile Thoroughbred stallion, 10 years old, with testicular degeneration evidenced by hypogonadism, low sperm motility, increased number of sperm with primary morphological abnormalities in the ejaculate and low field fertility. The stallion received 1 ml deslorelin intramuscular every 7 days. Semen was collected with an artificial vagina and volume, motility, concentration and sperm morphology were assessed. Sperm were separated from the seminal plasma (SP) by centrifugation to analyze the protein components of the ejaculate. Protein extracts were prepared from both fractions and were quantified using the Bradford method. Components were separated by electrophoresis in 7, 10 and 15% polyacrylamide gels. Seminal parameters were analyzed using a factorial design

(analysis of variance). Results of the seminal evaluations conducted on samples taken before and up to 2.5 months after treatment were: 1) no changes in the volume of the ejaculate nor sperm concentration, 2) an increase in the percentage and total number of motile and progressively motile sperm was observed ($p=0.0001$ in each case), 3) an increase in the proportion of morphologically normal sperm was observed ($p=0.0093$) 4) an increase in the protein signal of the sperm extract, of a molecular weight above 45 Kda, and a decrease in SP proteins between 66-97 kDa were identified. These results show a significant improvement in semen parameters of the treated stallion's ejaculate, as reflected by the increase in the percentages of sperm motility and morphology, that could be partly associated to changes in the protein composition of the ejaculate. Additional studies will help determine the fertilizing capacity of the ejaculate by evaluating field fertility and identifying the proteins that showed changes in their signal when comparing the extracts before and after treatment.

¹Cátedra de Teriogenología, INITRA, Facultad de Cs. Veterinarias, UBA. ²Laboratorio de Estudios de Interacción Celular en Reproducción y Cáncer, IBYME, CONICET-UBA (* equal contribution)

Estudio inmunohistoquímico y ultraestructural de los receptores de andrógenos y las gonadotropas en hipófisis de vizcachas machos adultos castrados

FILIPPA, V¹; GODOY, D; PEREZ, E; MOHAMED, F.

Las hormonas esteroidales sexuales desempeñan funciones importantes en el control del comportamiento y funciones metabólicas en los animales machos. En el eje hipotálamo-hipófisis gonadal los andrógenos regulan negativamente la secreción de gonadotropinas y así controlan la reproducción. Estas hormonas actúan a través de los receptores de andrógenos (RA), los cuales se expresan en diferentes tejidos, incluyendo la hipófisis. Los objetivos del trabajo fueron: estudiar si la castración provoca cambios inmunohistoquímicos cuantitativos en las células que expresan RA (RA-ir), las gonadotropas LH y FSH de las diferentes regiones de la pars distalis (PD) hipofisaria; analizar la co-localización del RA y las gonadotropinas; y evaluar los cambios ultraestructurales en relación con los datos inmunohistoquímicos. Se emplearon vizcachas machos adultas divididas en dos grupos, grupo control (n=7) y grupo de animales castrados quirúrgicamente (n=7). Las hipófisis se procesaron para microscopía óptica y electrónica. Se realizaron inmunomarcaciones simples y dobles para microscopía óptica con los anticuerpos anti-human(h)AR (N-20) sc:816 (1/200, Santa Cruz Biotechnology), anti-hLH (1/100, Biogenex) y anti-hFSH (1/200, Biogenex). El estudio morfométrico realizado con el sistema de análisis de imágenes Image Pro Plus 5.0, permitió analizar el

porcentaje de células con marcación nuclear (%RAn-ir) y citoplasmática (%RAc-ir), porcentaje de las gonadotropas (%LH-ir y %FSH-ir), y porcentaje de células que expresan gonadotropinas y RA (%LH-ir/RA-ir y %FSH-ir/RA-ir). Los RA se distribuyeron en toda la PD. El patrón de inmunomarcación fue principalmente nuclear. Se observaron numerosos e intensos núcleos positivos en el extremo caudal. Gonadotropas-LH y -FSH se encontraron principalmente en la región ventral y extremo rostral. 45-66% de gonadotropas-LH y 49-57% de gonadotropas-FSH expresaron RA nuclear. En los animales castrados, se observó una disminución de los %RAn-ir, %RAc-ir, %LH-ir, %FSH-ir y %FSH-ir/RA-ir. Además, numerosas células del tipo gonadotropas presentaron alteraciones ultraestructurales, principalmente dilatación del REG y disminución de los gránulos secretorios. En conclusión, la castración provocó cambios en la expresión de RA, LH y FSH en las células de PD. Además, la co-localización de RA y FSH es la más afectada por la falta de andrógenos gonadales, sugiriendo la existencia de subpoblaciones de gonadotropas con diferentes mecanismos de regulación de la síntesis, almacenamiento y secreción hormonal.

Sperm changes during epididymal transit of armadillo in non-breeding period

FILOSA, A¹; PÉREZ MARCHETTA, G¹; MARQUÍNEZ, A¹; ROSSI, L²; MERANI, S²; CÓRDOBA, M³.

The armadillo *Chaetophractus villosus*, commonly known as hairy armadillo, belongs to the family Dasypodidae (armadillos) the superorder Xenarthra. It is distributed from Gran Chaco (Bolivia), Paraguay, the Region of Magallanes in Chile and Argentina to Tierra del Fuego. There is limited information on the reproductive biology of this species; the reproductive period is between late winter and early spring. In spermatogenesis, eight stages in the cycle of the seminiferous epithelium were determined. The objective was to establish DNA damage, acrosomal integrity and changes in tyrosine phosphorylation of proteins during epididymal transit in nonbreeding of Armadillo. Sperm extended were analyzed from different regions of epididymis of 3 males in non-breeding season. Tyrosine phosphorylation was determined by immunohistochemical technique, nuclear damage by the Toluidine Blue stain and acrosomal integrity by Giemsa stain. The nuclei evaluated with toluidine blue

staining showed three patterns: a) Light Blue / without damage or compact chromatin, b) violet light blue / with some degree of chromatin decondensation c) Violet / high degree of decondensation. The patterns average of nuclear DNA damage did not differ significantly between regions $76.0 \pm 20.0\%$, $91.3 \pm 3.0\%$ and $84.0 \pm 6.0\%$ for head, body and tail epididymal, respectively. The immunohistochemistry showed different fluorescence patterns: 1) head and midpiece fluorescent and 2) fluorescent midpiece, there were no differences between epididymal regions. There is a correlation between the fluorescent pattern 1 (head and midpiece fluorescence, $84.66 \pm 10.0\%$, $90.0 \pm 2.0\%$ and $88.66 \pm 1.15\%$ for head, body and tail of the epididymal, respectively) and acrosomal integrity determined with Giemsa. This study of sperm parameters based on tyrosine protein phosphorylation, acrosome integrity and nuclear damage, is a contribution that will help to understand the reproductive biology of *Chaetophractus villosus*.

¹Cátedra de Química Biológica, Facultad Ciencias Veterinarias – UBA. ²Instituto de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina UBA. ³Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal.

Recuperación de la ciclicidad sexual y de la morfología ovárica en ratas mediante el uso de terapia génica para IGF-I

ALICIA M. FLAMINI¹, SILVIA S. RODRÍGUEZ^{2*}, MARTHA C. BOHN³, RODOLFO G. GOYA^{2*},
CLAUDIO G. BARBEITO^{1*}

Introducción: el factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1 (IGF-1) regula diversos aspectos de la función ovárica. En la rata hembra existe, a partir de los 9 meses de vida, una disrupción paulatina de la ciclicidad estral originada por una alteración en la secreción del factor liberador de gonadotropina (GnRH). A su vez se considera que el IGF-1 regula la vía del GnRH. En trabajos previos recuperamos la función reproductiva alterada en ratones nude mediante terapia génica. **Objetivo:** El presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de la terapia génica sobre la ciclicidad y la morfología ovárica utilizando un vector asociado a adenovirus (AAV) que porta los genes del IGF-I y de la proteína fluorescente roja. **Materiales y métodos:** el vector se introdujo en la región medio-basal del hipotálamo de ratas de 34 semanas de edad. Se utilizaron controles sin tratar y otros que recibieron un vector que portaba solamente el gen de la proteína fluorescente roja. Para determinar los cambios cíclicos de la función reproductiva se

realizaron extendidos vaginales diarios en todas las hembras hasta las 49,5 semanas de vida, en ese momento los animales fueron sacrificados y se extrajeron los ovarios para su estudio histológico. **Resultados:** las ratas de ambos grupos controles perdieron su ciclicidad estral normal a lo largo del estudio, lo que coincidió con las características de la morfología ovárica que incluyeron escasa cantidad de folículos en desarrollo, ausencia de folículos maduros y de cuerpos lúteos y abundantes formaciones quísticas. En un porcentaje de los animales tratados con el vector que contenía el gen del IGF-I se recuperó la actividad ovárica cíclica. En concordancia con esta observación los ovarios presentaron evidencias morfológicas de actividad (coexistencia de cuerpos lúteos, folículos en crecimiento, folículos atrésicos y folículos maduros). **Conclusiones:** estos resultados demuestran la importancia de IGF-I en la regulación de la fisiología ovárica en la rata y la posibilidad del uso de terapia génica para recuperar la función reproductiva.

¹Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP. ²INIBIOLP- HistologíaB-PatologíaB, Facultad de Ciencias Médicas UNLP. La Plata Buenos Aires Argentina. ³Neurobiology Program, Children's Hospital of Chicago Research Center, Northwestern University, Chicago, IL. * CONICET.

Efecto nutricional en hembras porcinas antes del primer servicio

GARBER, J; ZANEL,W; GONZÁLEZ, MA; BORELLI, V.

Las cerdas de reposición son un componente crucial en las explotaciones porcinas, ya que, de ellas depende el futuro de la granja. La eficiencia reproductiva de las futuras madres depende de la habilidad que estas tengan para presentar celos regulares, concebir y producir camadas; lo cual esta estrechamente ligado a factores nutricionales, ambientales, sanitarios y de manejo.

El presente trabajo tuvo como objetivo general evaluar el efecto nutricional resultante de dos dietas con distintos niveles de proteína en hembras porcinas antes del primer servicio con respecto a precocidad, ganancia de peso vivo y eficiencia reproductiva. La experiencia se realizó en la E.E.A INTA Las Breñas, Chaco, desde el mes de mayo hasta septiembre del 2012, con un total de 12 hembras seleccionadas a partir de los 30,5 Kg de peso vivo promedio las cuales fueron separadas aleatoriamente en 2 grupos; el grupo 1 recibió una dieta balanceada con 18% de proteína bruta, mientras que en el grupo 2 la ración estuvo constituida por 16% de proteína bruta. En los 2 casos el alimento fue ofrecido a

discreción en el periodo comprendido entre los 60 y 100 Kg de peso vivo promedio. A partir de los 100 Kg de peso vivo se racionó el alimento a 2.5 Kg/animal/día en el lapso de dos semanas y se ofreció en dicha cantidad hasta que las hembras alcanzaron los 130 Kg de peso. En este período no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos tratamientos con respecto a ganancia de peso diaria y conversión alimenticia en ambas etapas. Cuando se evaluó la eficiencia reproductiva, se encontraron las mayores diferencias, debido a que el tratamiento 1 (18% de proteína bruta) tuvo un porcentaje de preñez de 50%, mientras que el tratamiento 2 (16% de proteína bruta) obtuvo el 83,3%. Con respecto a la precocidad de las cachorras no se observaron diferencias importantes, ya que, en ambos tratamientos el primer celo se manifestó entre los 164 y 169 días de edad. De acuerdo a nuestros estudios y resultados obtenidos se concluye que no se justifica utilizar una dieta con mayor porcentaje de proteína bruta en cachorras de reposición.

Evaluación de la fertilidad posaborto en gatas tratadas con cloprostenol

GARCÍA MITACEK, MC^{1,2}; STORNELLI, MC¹; TITTARELLI, CM¹; WILLIAMS, SI¹;
DE LA SOTA, RL^{1,2}; STORNELLI, MA¹.

El cloprostenol, prostaglandina F2 α sintética, es una droga luteolítica que puede ser usada asociada con agonistas dopaminérgicos, como la cabergolina, para interrumpir la gestación en felinos. En la mayoría de los estudios en los que se utilizan drogas para interrumpir la gestación no se comunica la fertilidad posterior al tratamiento. Sin embargo este dato resulta de gran importancia para preservar la salud reproductiva de cualquier hembra en especial de aquellas que forman parte de un plantel reproductivo, por lo cual se busca que el protocolo implementado no afecte su futura fertilidad. El objetivo de este estudio fue evaluar la fertilidad y el desarrollo de una gestación normal luego del tratamiento con cloprostenol durante la gestación temprana. Se utilizaron 10 gatas de raza mestiza, de entre 24 y 36 meses de edad, las cuales habían sido tratadas entre el día (d) 21-22 de gestación con 5 μ g/kg de cloprostenol subcutáneo (Ciclar, p.a.®, Zoovet, Argentina; CLO) durante tres días consecutivos. Luego del tratamiento con CLO las gatas fueron controladas diariamente mediante citología

vaginal y signología conductual del estro registrándose el momento en que los animales comenzaron a ciclar nuevamente. Entre 4 y 12 meses postratamiento las hembras ingresaron al plantel reproductivo de la colonia. Al tercer d de presentar citología vaginal correspondiente al celo, las gatas se colocaron junto con el macho y se documentó el primer servicio. Veinte días posteriores al d del servicio se confirmó la gestación por palpación abdominal y ultrasonografía. El intervalo entre el tratamiento con CLO y el retorno al estro fue de 49 ± 6.57 d. La totalidad de las gatas tratadas quedaron preñadas en el primer servicio postratamiento. Se realizaron controles ultrasonográficos semanales que permitieron comprobar un desarrollo embrionario y fetal normal. Los partos fueron eutócicos en todos los animales. El promedio de crías nacidas por gata fue de 3 ± 0.29 . Los resultados obtenidos muestran que la administración de CLO no afecta la fertilidad y puede ser usado para interrumpir gestaciones no deseadas sin poner en riesgo la salud reproductiva de los animales tratados.

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata B1900AVW, BA, Argentina; ²CONICET, Av. Rivadavia 1917, Capital Federal C1033AAJ, Argentina.

Morphological abnormalities in commercial bull frozen semen and conception rate

GHIRARDOSI, MS¹; JORGE, A¹; GONZALEZ, L¹; CHAN, D²; FISCHMAN, ML¹; CISALE, H¹.

The evaluation of semen quality and bull fertility are essential in artificial insemination (AI) industry. Commercial doses of bull frozen semen for AI, despite being subject to prior selection, have a certain percentage of morphological defects. The aims of this study were to determine the prevalence of morphological abnormalities of head (H), midpiece (M) and principal piece (P) in frozen semen samples (n=55, r=2) of dairy (Holstein and Jersey) and beef breeds bulls (Angus, Polled Hereford, Simmental and Tuli) and to determine the possible existence of differences between them, regarding the percentage of abnormal sperm. The interrelation of abnormalities in different sperm regions was analyzed and we studied the possible existence of differences between groups of bulls of different level of fertility (conception rate) in the percentage of sperm abnormalities. At least 200 sperm per sample were evaluated using Bengal Rose stain (3% m/v) and light microscopy (1000X magnification). The mean percentage of abnormal sperm samples from dairy breeds was 7.19± 4.91% (H: 1.47±2.14%; M: 3.77±2.49%; P: 1.61±2.23% and abnormalities in two sperm

regions: 0.26± 0.45%) and from beef breeds was 15.83± 9.28% (H: 3.45±3.18%, M: 9.5±7.3%; P: 2.08± 1.79% and abnormalities in two sperm regions: 0.8± 1.68%). By comparing the medians between samples belonging to dairy biotype and beef biotype, significant differences ($p<0.05$) were found in the proportion of abnormal sperm, sperm with abnormal head, abnormal midpiece and in the proportion of sperm with two abnormal regions. There was no statistical association ($p>0.05$) between the percentages of abnormalities of head, midpiece and principal piece (Spearman test). There were no significant differences ($p>0.05$) in the total percentage of sperm abnormalities between groups with different levels of field fertility (Kruskal Wallis test). It was observed that the percentage of abnormalities was not a fertility level predictor for the commercial samples of frozen bovine semen used in this study. The low prevalence of morphological abnormalities in commercial samples of frozen bovine semen could be due to the selection done before freezing. We conclude that, in both biotypes, the midpiece abnormalities were the most frequent, mainly its distal flexion.

Use of coomassie blue to evaluate acrosomal status in Llama Spermatozoa. Preliminary results.

GIULIANO, S^{2,3}; BISIAU, C¹; CARRETERO, MI^{1,3}; ARRAZTOA, C^{1,3}; NEILD, D^{1,3}.

The use of Artificial Reproductive Techniques (ART) in different species allows us to reduce the generation gap, aid a quicker genetic propagation of superior animals and to form a gene bank through gamete cryopreservation. The acrosome is very important for fertilization; therefore the use of evaluation techniques in llama would be very advantageous for assessing the effects of different biotechnologies. In llama semen, it is not possible to evaluate the acrosome using phase contrast microscopy, because it is not distinguishable as in other species. The aim of this study was to evaluate the acrosomal status of llama spermatozoa using the Coomassie Blue stain. Materials and methods: to evaluate the feasibility of this technique in llama sperm, different samples were assessed: raw semen, semen incubated with collagenase, cooled semen and frozen/thawed semen. Smears were made with the samples, air dried, fixed

with paraformaldehyde in PBS (5% final concentration) during 15 minutes and then washed once with PBS. The smears were stained 5 minutes with 0.22% Coomassie Blue B250n. Then washed three times to avoid excess dye. Using this dye, sperm with intact acrosomes, take up the stain whereas those that have lost the acrosome don't. Results: in all samples, spermatozoa with and without stained acrosomes (blue colouring) were observed. The percentages of spermatozoa without acrosomes obtained were: 1 to 15% in raw semen, 2 to 13% in semen incubated with collagenase, 17 to 26% in cooled semen and 32 to 45% in frozen/thawed semen. Conclusions: it was possible to use the Coomassie Blue stain to evaluate llama sperm acrosomes despite semen viscosity and its concomitant problems. These results would also indicate that is possible to ascertain acrosome damage occurring during cryopreservation of llama spermatozoa.

Consecuencias de la exposición de ovocitos bovinos al VDVB al inicio de la maduración *in vitro*

GONZÁLEZ ALTAMIRANDA, EA¹; KAISER, GG²; RÍOS, GL²; ODEÓN, AO¹.

La tecnología de producción *in vitro* (PIV) de embriones representa un cambio potencialmente significativo para la producción comercial de ganado bovino. Sin embargo, estos sistemas ofrecen numerosas oportunidades para que agentes infecciosos, se multipliquen y finalmente sean transmitidos a receptoras susceptibles a través de la transferencia de embriones. El virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) es uno de los principales agentes infecciosos asociados a estos sistemas, debido a que los materiales de origen animal que se emplean en la PIV de embriones pueden estar contaminados con el virus (suero, albumina sérica). El objetivo de este trabajo fue evaluar las consecuencias de la infección de ovocitos con vDVB al inicio de la maduración *in vitro* (MIV) sobre el procedimiento de FIV.

Un total de 96 ovocitos obtenidos a partir de la punción folicular de ovarios de matadero fueron seleccionados para FIV. Los ovocitos fueron separados en dos grupos (48 ovocitos) y chequeados libres de vDVB por aislamiento viral a partir de células de la granulosa. Al inicio de la etapa de maduración *in vitro*, el grupo tratamiento fue inoculado con una cepa no-citopática (ncp) de vDVB ($1 \times 10^{4.6}$ TCID₅₀/ml), y al grupo control

se le adicionó el mismo volumen de medio MEM 10%. Luego de 24 hs. de maduración, los ovocitos de ambos grupos fueron lavados, y co-incubados con espermatozoides libres de vDVB (2×10^6 espermatozoides/ml). Los presuntos cigotos fueron cultivados hasta los días 7 y 8, tratados con pronasa para remover la zona pelúcida (ZP) y evaluados para la determinar presencia de vDVB mediante *nested* rt-PCR, al igual que los medios empleados durante la PIV. Se desarrollaron un total de 8 blastocistos por grupo. Un fragmento de 171 pb, característico del vDVB, fue detectado mediante electroforesis en gel de agarosa en 2/4 blastocistos (día 7) y en 1/4 blastocistos (día 8) del grupo inoculado con vDVB al inicio de la maduración *in vitro*. Aunque la presencia de vDVB durante la MIV no afectó el número de embriones desarrollados no puede concluirse sobre la futura evolución de los embriones que resultaron positivos al virus. Por otra parte, la presencia de cepas ncp en el medio de MIV posiblemente no afecte inicialmente el desarrollo inicial, pero la replicación en células embrionarias podría ser una potencial fuente de infección en las hembras receptoras de los embriones.

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

Nuclear tests in quality control of frozen bovine semen

GONZÁLEZ, LO; MALCERVELLI, D; SUHEVIC, J; MIGUEL, J;
JORGE, A; GHIRARDOSI, MS; CISALE, HO; FISCHMAN, ML.

The set of *in vitro* tests performed in Artificial Insemination Centers (CIA) allows us to estimate spermatozoa fertilizing ability. These tests could predict the spermatozoa behavior from insemination to fusion with the oocyte. The decondensation capability of the sperm head, the male pronucleus formation and the early embryonic development, all depend in some way on the spermatid nucleus characteristics. The aim of this work was to show the importance of nuclear tests in semen quality control. Samples of bovine frozen semen from different CIA were employed (n=15; r=3). These were classified in high, medium and low fertility according to field results. In each classification, there were five bulls. Straws were thawed at 37°C for 30s and incubated

at the same temperature until processing. At nuclear level, we analyzed: morphology (Feülgen Reaction; MN), percentage of nucleus without histones replacement (Aniline Blue; AB+), maturation and condensation of the chromatin (Toluidine Blue; nucleus with chromatin alteration: TB+), Nuclear Chromatin Decondensation test (NCD), NCD (categories NCD I to IV, crescent degree of decondensation). Total and progressive motility (MT and MP; phase contrast microscopy and thermal plate), viability (Eosin-Nigrosin), morphology (Aq. Bengal Rose 3%), acrosomal integrity (phase contrast microscopy) and hypoosmotic swelling test. The most important results of descriptive statistics are summed up in Table 1.

Table 1: Means \pm Standard deviation of the percentage of MT, MP, MN, AB+ y NCD III y IV according to fertility classification.

Fertility	MT	MP	MN	AB +	NCD III y IV
High	60 \pm 6,12	54 \pm 5,48	94 \pm 2,04	0 \pm 0	39 \pm 2,65
Medium	49 \pm 2,24	42 \pm 2,74	93 \pm 3,96	0,07 \pm 0,15	53 \pm 9,17
Low	35 \pm 20	28 \pm 18,23	86 \pm 5,11	3 \pm 4,08	76 \pm 3,60

Significative differences were found between fertility and this variables: MT, MP, MN, AB + nucleus and categories III and IV of the NCD test (Kruskal Wallis;

$p < 0,05$). This results show that including nuclear tests in sperm quality control may help in predicting field response of frozen semen straws.

Comportamiento productivo de cerdas con el uso de diferentes modelos de parideras a campo

GONZÁLEZ, MA; BORELLI, V; ZANEL, W.

La producción de cerdos a campo representa una interesante alternativa dentro de los distintos sistemas de producción por la menor inversión de capital, con costos fijos de amortización mucho menor en comparación a los sistemas bajo confinamiento y con posibilidades de performances físicas iguales o ligeramente inferiores a las obtenidas en sistemas bajo confinamiento. En un sistema de cría la instalación fundamental es la paridera. La mortalidad durante la lactancia expresa de manera conjunta la habilidad materna y las seguridades que brinda la paridera.

El objetivo de este trabajo fue evaluar dos modelos de parideras de campo y la época de parto, sobre la productividad de las cerdas.

El trabajo se llevó a cabo, en una granja comercial de ciclo completo, localizada en la E.E.A INTA Las Breñas (Las Breñas, Chaco), con un clima caracterizado por temperaturas medias anuales de 28°C. El estudio abarcó las

4 estaciones del año, utilizando programas de pariciones mensuales, de entre 10 a 12 cerdas. Se realizaron 2 tratamientos: TRT1: Paridera Iglú: 2,5 largo x 2,0 ancho x 1,2 m de altura con dos ventanas, y TRT2: Paridera Alpina: de forma triangular, 2.5 mts largo x 2.0 ancho x 1,6 m de alto, los extremos presentan aberturas de 0.60 m (ancho) x 1.00 m (altura). Las parideras se ubicaron en piquetes de 20 x 50 m, empastados con alfalfa y delimitados por alambres eléctricos. Las variables registradas en cada paridera fueron: N° de lechones nacidos vivos (LNV). N° de lechones nacidos muertos (LNM). N° de lechones destetados (LD) y época del año (estival e invernal). Se realizó estadística descriptiva, ANOVA y comparación de medias.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el N° LD: alpina = 9.39 LD vs. Iglú = 8.36 LD, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en la época de parto.

Effect of amp on the oxidative metabolism of the bovine oocyte during *in vitro* maturation

GUTNISKY, C¹; MORADO, S¹; DALVIT, G¹; THOMPSON, J² y CETICA P¹.

The uptaken glucose by cumulus-oocyte complexes (COCs) during *in vitro* maturation might be involved in the regulation of oxidative metabolism. The aim of this work was to study the effect of the COC glycolytic pathway stimulation on the glucose uptake, lactate production and *in vitro* maturation of the oocyte. A further aim was to determine the effect of stimulation of COC glycolysis on oocyte oxidative and mitochondrial activities. COCs were matured individually in medium 199 + 5% FBS with or without gonadotrophic supplementation (control) and without hormonal supplementation but with AMP (0, 1, 10, 20 and 40 mM). Glucose uptake and lactate production from spent media was measured by spectrophotometric assays. The cytoplasmic maturation was evaluated by the ratio of cleaved embryos after *in vitro* fertilization. The oxidative and mitochondrial activities of the oocytes were measured at 4 different time points (0, 9, 15, 22 h), oocytes were stained with the fluorescent probes Redox Sensor Red CC-1 and

MitoTracker Green FM and observed by laser scanning confocal microscopy. The images were analysed using Photoshop 9.0 software. COCs matured with AMP had no effect on glucose uptake and lactate production. However, in the absence of gonadotrophins a dose dependent stimulatory effect was observed ($p < 0.05$). While AMP had no effect on nuclear maturation, a significant decrease in the cleavage rates was registered respect to both control groups ($p < 0.05$). Oocytes showed changes in their oxidative and mitochondrial activities throughout maturation ($p < 0.05$). Oocytes matured with AMP had a significant increase in oxidative and mitochondrial activities at 22 h of maturation ($p < 0.05$). These results demonstrate that the dose dependent stimulation of the glycolytic pathway by AMP is not synergic with gonadotrophin stimulation. The maintenance of high oxidative and mitochondrial activities by AMP during IVM might be related with a decrease in the cytoplasmic maturation of the oocyte.

¹INITRA, Química Biológica, Facultad de Cs. Veterinarias, UBA. ²The Robinson Institute, The University of Adelaide, Australia.

Determination of proliferation index in primary bovine cell cultures of corpus luteum stimulated with leuprolide acetate, GnRH analogue

HAMER, CS¹; GERMANO, P¹; GAMBAROTTA, M²; LOMBARDO, DM¹; SOÑEZ, MC¹.

GnRH, ovarian endogenous peptide, modulates follicular development and probably the formation of the corpus luteum in bovine through the regulation of apoptosis, role which was demonstrated on the granulosa cells of this species. Their participation on cell proliferation has been partially studied. The objective was to determine the effects *in vitro* of leuprolide acetate (LA, GnRH analogue) on the proliferation of bovine luteal cells (BLC) at doses of 10 and 100 nM during 48 hours. BLC from slaughter animals were cultured during 7 days in DMEM + F12 supplemented medium. Three experiments, in triplicates in each, were performed with the following treatments: 5% FBS (control), LA 10nM and LA 100 nM. After 48 hours the cells were fixed with Bouin solution, 15 min. To identify proliferative cells, an indirect immunocytochemical LSAB method (LSAB System Kit HRP, Dako) was applied, using anti-human monoclonal antibody Ki-67 Clone MIB-1 (Dako) 1:100, with negative controls

omitting the primary antibody incubation and positive controls on sections of human tonsil. The antigen-antibody complex was revealed with 3,3' diaminobenzidine (DAB) 0.003% (Dako), ending with slight contrasting with Mayer's hematoxylin, dehydrated and mounted. 1260 images were captured using XnView and the total Ki67 positive and negative nuclei were counted. The data were statistically analyzed by InfoStat software applying parametric ANOVA ($p < 0.05$). The amount of positive nuclei anti-Ki67, an indicator of cell proliferation, was similar for both doses of LA with significant decrease compared with the control ($p = 0.002$). It is concluded that the rate of proliferation of bovine luteal cells which were treated in culture for 48 hours with leuprolide acetate, GnRH analogue, was dose independent, decreasing significantly related to the controls, indicating that the analogue reduced the level of proliferation of bovine luteal cells *in vitro* under these conditions.

¹Histology and Embriology, INITRA, ²Biostatistics, Faculty of Veterinary Science, University of Buenos Aires, Argentina. mcsonez@fvet.uba.ar; cecihamer@yahoo.com.ar

El método de colecta de semen afecta la composición del plasma seminal en carneros

LEDESMA, A¹; MANES, J²; RÍOS, G²; HOZBOR, F²; CESARI, A³; ALBERIO, R².

En el plasma seminal (PS) se han identificado fracciones proteicas de bajo peso molecular, que al ser agregadas al medio de los espermatozoides (SZ) antes o después de la criopreservación, mejorarían su capacidad fecundante. El uso de electroeyaculador (EE) para obtener semen induce la producción de eyaculados con elevado volumen de PS debido a la estimulación que ejerce sobre las glándulas sexuales. El objetivo del trabajo fue determinar si existen diferencias entre la composición del plasma seminal colectado con EE y vagina artificial (VA). Para ello se colectó semen de 5 carneros raza *Corriedale* dos veces por semana con EE y VA, alternativamente, durante marzo y abril del 2010. Eyaculados con concentración espermática $\geq 600 \times 10^6/\text{ml}$ y movilidad masal microscópica ≥ 4 formaron parte de un pool por método y sesión de colecta. Los pools fueron centrifugados a 2000 g durante 15 minutos a 4°C. En el sobrenadante recuperado se evaluó volumen, pH, osmolaridad y concentración de proteínas totales. Las proteínas de 12 a 225 KDa fueron caracterizadas mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y teñidas con Coomassie Brilliant Blue. Las proporciones relativas de cada banda se analizaron mediante Gel pro analyzer versión

3.1 (MediaCybernetics®). El PS obtenido con EE tuvo mayor volumen y osmolaridad ($4500 \pm 265 \mu\text{l}$ y $322,6 \pm 4 \text{ mosm/l}$) que el obtenido con VA ($2.100 \pm 265 \mu\text{l}$ y $322,6 \pm 4 \text{ mosm/l}$ con $p=0.0004$ y 0.001 respectivamente) pero menor pH (EE 6.3 ± 0.12 y VA 6.8 ± 0.12 ; $p=0.02$). La concentración de proteínas totales no difirió entre ambos métodos, sin embargo, se observó una tendencia a una mayor concentración en el PS colectado con VA ($66,6 \pm 11,5 \text{ mg/ml}$ vs $45,5 \pm 11,5 \text{ mg/ml}$). En el PS obtenido con EE se observó un aumento en la intensidad de las bandas correspondientes a proteínas de bajo peso molecular ($>30 \text{ kDa}$). Por el contrario, en el PS obtenido con VA se observó un aumento en la intensidad de las bandas correspondientes a proteínas de alto peso molecular. Se concluye que el método de colecta de semen afecta la osmolaridad, el pH, el volumen y la composición proteica del PS ovino. De acuerdo a lo reportado previamente por nosotros y por otros autores, el enriquecimiento en proteínas de bajo peso molecular en el PS de los eyaculados colectados con EE podría aumentar la capacidad del PS para reducir los daños provocados en los SZ por la criopreservación y por lo tanto se mejorar su capacidad fecundante.

¹Universidad Nacional de Mar del Plata; ²Biotecnología de la Reproducción INTA Balcarce; ³Instituto de Investigaciones Biológicas-UNMDP-CONICET albalesma@hotmail.com.ar

Comparative analysis of two different techniques to obtain porcine *cumulus*-oocyte complexes

LORENZO, MS; TELLO, MF; MARURI, A; GAMBAROTTA, M; FISCHMAN, ML; LOMBARDO, DM.

The oocyte quality is one of the factors that determine the success of *in vitro* embryo production; the methodology used to obtain *cumulus* oocytes complexes (COCs) affects this quality. In others species it has been reported that the amount of oocytes collected per ovary with slicing is higher than with others techniques such as follicles aspiration and dissection; in addition it has been demonstrated that the recovery of oocytes by slicing technique decreases the apoptosis rates in immature COCs. Apoptosis can be used as a quality indicator because most of the follicles degenerate during their developmental by a process, follicular atresia, in which apoptosis is involved. The aim of this study was to compare two methods to obtain porcine COCs from slaughter ovaries. In aspiration technique, follicles from 3 to 6 mm were puncture using a 18G needle an a 10 mL syringe, whereas in slicing COCs were obtained by slice ovary surface. They were classified under stereomicroscope basing on their morphology and those who had at least a complete layer of *cumulus* cells surrounding the oocyte were selected to *in vitro* maturation (IVM). In oocytes and *cumulus* cells from immature and *in vitro*

maturated COCs Annexin V essay was made to evidence early apoptosis, while late apoptosis was assessed by TUNEL technique. After 44-48 h of IVM the percentage of nuclear maturation was measured by staining denuded oocytes whit Hoechst 33342 (observing the metaphase II and the first polar body extrusion). The amount of COCS recovered per ovary (average) was higher using slicing (11, 79 versus 26, 66). The nuclear maturation rates differed between techniques, obtaining 62% by aspiration and only 34% by slicing. Both early and late apoptosis were found in *cumulus* cells but only early apoptosis was found in oocytes from immature COCs whereas in *in vitro* maturated COCs early and late apoptosis was observed both in *cumulus* cells and oocytes. Results were contradictory when comparing apoptosis between techniques. Although slicing method allowed us to draw on pre pubertal ovaries, those smaller follicles contain lower quality oocytes, affecting their ability to mature *in vitro*. There was an increase in apoptosis during *in vitro* maturation, supporting the theory that biochemical changes occurring during atresia are similar to those that happen in oocyte maturation.

Utilización de la gonadotropina coriónica humana (hCG) para el tratamiento de la infertilidad en el macho canino. Estudio retrospectivo.

LOZA, ME^{1,2}; MONACHESI, NE^{1,2}; COMERCIO, EA^{1,2}; KALIMAN, FR³; WANKE, MM^{1,2}.

Los trastornos de fertilidad en el macho canino están frecuentemente asociados a la función del eje hipotálamo-hipofisiario, y su alteración puede afectar la calidad seminal. El objetivo del presente trabajo fue comprobar el efecto de la aplicación repetida de HCG sobre la calidad espermática en casos clínicos de infertilidad y subfertilidad.

Se estudiaron 20 machos caninos de diferentes razas de entre 3 y 6 años con trastornos de fertilidad (infertilidad n=12 o subfertilidad n=8). Se registraron porcentajes de preñez y número de cachorros nacidos entre un año antes y un año después de iniciado el tratamiento. Se realizó un espermograma previo al tratamiento y otro a los 60 días de iniciado el mismo. Se aplicaron 500 UI de HCG por vía subcutánea una vez por semana durante 2 meses. Luego del espermograma de control, se continuó el tratamiento de los perros que habían respondido al tratamiento durante por lo menos un año.

Inicialmente todos los perros mostraron oligospermia. En los perros subfértiles el número total de espermatozoides varió entre 80 y 150 x 10⁶ (95 x 10⁶ x ± 25 x 10⁶) y en los infértiles

entre 15 y 45 x 10⁶ (29 x 10⁶ ± 8 x 10⁶). En los espermogramas pos-tratamiento se observó un aumento de la cantidad total de espermatozoides que osciló entre 250 y 800 x 10⁶ en 16 casos. Antes del tratamiento, los perros subfértiles presentaron porcentajes de preñez de entre 15 y 30% con lechigadas de 1 a 3 cachorros que pasaron a 72-90% con lechigadas de 6 a 9 cachorros en el primer año de tratamiento, y los infértiles presentaron luego del tratamiento porcentajes de preñez de entre 50 y 87% con promedio de lechigadas de 5 a 8 cachorros. Se comparó la cantidad total de espermatozoides, porcentajes de preñez y tamaños de las lechigadas antes y después del tratamiento resultando diferencias significativas ($p < 0,0001$ con un nivel de significación del 5%). Estos hallazgos coinciden con trabajos previos realizados con inyecciones únicas de la hormona, y comprueban que el tratamiento puede prolongarse en el tiempo sin producir efectos adversos.

Estos resultados sugieren que el tratamiento prolongado con HCG puede mejorar la calidad del semen y la fertilidad en perros oligospermicos.

¹Cátedra de Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires; ²INITRA; ³Cátedra de Bioestadística, FCV, UBA

Expresión de isoformas de foliculostatina en folículos quísticos de bovinos con enfermedad quística ovárica (EQO).

MATILLER, V¹; STANGAFERRO, ML^{1,2}; RODRIGUEZ, FM^{1,3};
REY, F^{1,3}; ORTEGA, HH^{1,3}; SALVETTI, NR^{1,3}.

La foliculostatina se comporta como una proteína de unión a diferentes ligandos integrantes de la Superfamilia del Transforming Growth Factor β (TGF- β) y presenta elevada afinidad por la activina, disminuyendo su disponibilidad e impidiendo su interacción con sus receptores. Así, neutraliza sus efectos biológicos sobre la hipófisis y modula la función de las células de la granulosa a favor de la luteinización o atresia. El objetivo del presente trabajo fue evaluar posibles variaciones en la expresión de diferentes isoformas de foliculostatina en folículos ováricos de bovinos con EQO. Mediante western blot se detectaron bandas correspondientes a las isoformas de 31, 35, 37, 41 y 65 kDa en muestras de pared de folículos terciarios controles pequeños, medianos y grandes, y de quistes de animales con EQO bovina. Se realizó electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), sembrando 40 μ g de proteína por línea, y luego se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, sobre la que se detectó foliculostatina/ β -actina (normalizador) con anticuerpos primarios y se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. La

reacción se visualizó por quimioluminiscencia en placas radiográficas. Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando un ANOVA con posttest de Duncan (SPSS 11.0.1). Se observó una tendencia ($p=0,086$) a aumentar la expresión de la isoforma de 31 kDa en los quistes en relación a los folículos antrales grandes y una tendencia ($p=0,097$) a aumentar en la isoforma de 41 kDa en los folículos medianos en relación a los quistes y folículos pequeños. Resultados previos nos permitieron determinar un marcado incremento en la expresión de foliculostatina total en folículos antrales y quistes foliculares de animales con EQO en relación a folículos controles de diferentes categorías. Los resultados obtenidos nos permiten suponer que dicho incremento podría deberse a un desbalance tendiente a incrementar los niveles de las isoformas de menor peso molecular de foliculostatina en ovarios provenientes de animales con la enfermedad. Considerando las funciones de esta importante proteína de unión, es probable que una mayor expresión de alguna de las isoformas de menor peso permita una disminución en la biodisponibilidad de activina.

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular. ² Cátedra de Teriogenología. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral. ³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Reactive oxygen species and redox state participation in bovine oocyte activation *in vitro*

MORADO, S1; CETICA, PD1; BECONI, MT1; THOMPSON, JG2; DALVIT, G1.

The role of reactive oxygen species (ROS) and their association with the reduction-oxidation (redox) state in oocyte activation is still controversial. Therefore, the aim of this study was to determine ROS production and redox state during the early development of sperm mediated or parthenogenetic activated oocytes. Cumulus-oocyte complexes (COCs) obtained by aspiration of antral follicles from slaughtered cattle ovaries were grown in medium 199 for 22 h in an atmosphere of 5% CO₂ in humidified air. *In vitro* fertilization was performed with frozen-thawed semen in IVF-mSOF with a final concentration of 2x10⁶ motile spermatozoa/ml. Parthenogenetically activated oocytes were previously denuded and then incubated 5 min in TALP + BSA + ionomycin, 3 hours in mSOF + 6-dimethylaminopurine + cytochalasin B and finally 21 hours in mSOF + BSA. Non-activated oocytes were used as controls. ROS levels and redox state were determined starting at the time of activation by 2', 7'-diclorodihidrodiacetato

fluorescein and Redox Sensor Red CC-1 respectively. Nuclear stage was determined by Hoechst. A significant difference was found in both ROS levels and redox state in parthenogenetically and sperm mediated activated oocytes compared with non-activated oocytes ($p < 0.05$). In sperm activated oocytes, oxidative activity showed an increase between 15 and 19 h ($p < 0.05$) and then returned to baseline levels. In parthenogenetically activated oocytes the oxidative activity showed a decrease at 9 h ($p < 0.05$) and then increased and maintained at baseline levels with minor fluctuations until 24 h. ROS production presented peaks at 7, 19 and 24 hours ($p < 0.05$) in sperm activated oocytes, while in parthenogenetically activated oocytes peaks were detected at 7, 11 and 17 hours ($p < 0.05$). The different behavior observed in redox state and ROS levels between non-activated oocytes and oocytes activated by both protocols may in part explain the better developmental competence of sperm activated oocytes.

¹Area of Biochemistry, Institute of Research and Technology in Animal Reproduction, School of Veterinary Sciences, University of Buenos Aires; ²The Robinson Institute, School of Paediatrics and Reproductive Health, The University of Adelaide, Australia.

Evaluación de infusiones de antibióticos, mediante citología endometrial, en vacas de cría con endometritis subclínica

MOSCUZZA, C¹; AMBROS, L²; ALVAREZ, G¹; GUTIÉRREZ, B¹;
ZURITA, M¹; TROPEANO, M¹; PERNA, R¹.

En los rodeos de cría, se refuga sistemáticamente a las hembras distócicas. En estos casos, una citología endometrial efectuada en aquellas hembras con involución normal de la anatomía del útero, es una herramienta económica y de sencilla realización para detectar endometritis subclínicas. Como tratamiento para este tipo de patologías están descriptos distintos antibióticos de administración intrauterina. Sin embargo, debe evaluarse su efectividad a fin de incorporar nuevamente esos animales a servicio. El objetivo del trabajo fue evaluar tratamientos con antibióticos administrados vía intrauterina a vacas de cría con endometritis subclínicas a través de la citología endometrial, comparando los resultados obtenidos con los hallazgos observados en cultivos bacterianos uterinos (técnica diagnóstica de referencia). Se utilizaron 42 vaquillonas Angus con 90 ± 15 días post parto, afectadas por endometritis subclínica (polimorfonucleares $\geq 5\%$). A todos los animales se realizó una toma de muestras para cultivo bacteriano inicial. Al azar se formaron 3 grupos de doce animales y 6 quedaron como control. Los antibióticos aplicados en cada grupo vía infusión uterina fueron Gentamicina (2g), Ceftiofur (1g), Cefapirina (0,5g). Los controles

recibieron solución fisiológica. A los 15 días se tomaron nuevamente muestras de útero para citología y cultivo bacteriano. Las muestras para citología se tiñeron con una tinción tipo Romanowsky (T15). Las muestras para cultivo fueron sometidas a técnicas microbiológicas convencionales.

En comparación con el diagnóstico citológico de endometritis, el 78,6% de las muestras iniciales de cultivos uterinos fueron positivas hallándose *Bacillus sp.*, *Escherichia Coli* y *Proteus Mirabilis*. Las muestras post-infusión fueron 100% negativas en citología y cultivo para ceftiofur. Para cefapirina, el 50% permanecieron positivas (citología y cultivo) y, en el caso de gentamicina, el 50% de las citologías permanecieron positivas aunque la totalidad de los cultivos fueron negativos. Se encontraron diferencias significativas entre citologías de animales tratados y no tratados ($p= 0,0487$).

Concluyendo, la citología endometrial es una herramienta de gran utilidad para la evaluación de los tratamientos uterinos. Permite una mejor predicción del estado del endometrio comparado con el cultivo bacteriano ya que los procesos inflamatorios pueden continuar aún en casos de cultivos negativos.

Aspectos morfológicos de la mucosa del ampulla y la unión ampulla-istmo del oviducto de la yegua durante la estación anovulatoria

MOUGUELAR, H¹; APICHELA, SA²; AGUILAR, JJ³; LOSINNO, L³.

Introducción: en la región del ampulla y unión ampulla-istmo (UAI) se establece el microambiente necesario para llevar a cabo la fertilización; el desarrollo y mantenimiento del embrión en sus primeros estadios. Objetivos: describir las características de la mucosa de la región ampular y UAI durante el período anovulatorio de la yegua. Materiales y Métodos: para evaluar la arquitectura de la mucosa oviductal de yeguas anovulatorias (n=7, con folículos ≤ 15 mm, sin cuerpo lúteo), se realizó el estudio mesoscópico de moldes tridimensionales del lumen; histología y microscopía electrónica de barrido [MEB]. Resultados: pliegues primarios ($648,2 \pm 239,5\mu\text{m}$ de longitud), secundarios ($341,9 \pm 138,7\mu\text{m}$), terciarios ($187,6 \pm 63,3\mu\text{m}$) y en algunos casos cuaternarios ($128,5 \pm 30,7\mu\text{m}$), fueron identificados en el ampulla y UAI de todas las secciones histológicas evaluadas. En la UAI los pliegues primarios protruían hacia el lumen creando un trayecto sinuoso. En correspondencia con este hallazgo histológico, dichos pliegues marcaron surcos transversales, profundos y alternados cada $1482 \pm 254 \mu\text{m}$ en

los moldes tridimensionales. Fueron observadas células ciliadas ($9,62 \pm 1,56 \mu\text{m}$ de altura) y secretorias ($7,12 \pm 0,74 \mu\text{m}$) en ambas regiones, con predominio de las no ciliadas. Sobre la superficie apical de estas últimas, se proyectaron microvellosidades de baja altura, sin alcanzar en ningún caso la longitud de las cilias ($3,07 \pm 0,5 \mu\text{m}$). Mediante MEB, fueron visualizados surcos intercelulares delimitando células secretorias vecinas, hecho poco evidente entre las células ciliadas. Secreción mucofilamentosa fue hallada en la profundidad de algunos surcos y sobre la superficie epitelial de ambos segmentos. Protrusiones celulares, con predominio en las células secretorias, fueron observadas en los cortes histológicos y bajo MEB, conteniendo en ciertas ocasiones al núcleo celular. Estructuras vesiculares y globosas contenidas entre las cilias y sobre las células secretorias fue otro hallazgo observado en ambas regiones. Conclusiones: la presencia de secreciones y de estructuras vesiculares dispersas implicaría cierta actividad durante este período. Para poder comprender estos hallazgos y otros de los mencionados será necesario continuar con los estudios.

¹Anatomía Veterinaria, ³ Producción Equina, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto; ²Instituto Superior de Investigaciones Biológicas, CONICET-Universidad Nacional de Tucumán.

Folliculogenesis in *Columba livia* (birds: columbiformes)

OLEA, GB¹; SANDOVAL, MT¹; CAROU, MC²; HERNANDO, AB¹ & LOMBARDO, DM².

During ovarian ontogeny of birds can recognize five key events: migration and colonization of primordial germ cells, oogonia differentiation and proliferation, germinal nests organization, the meiotic process beginning and folliculogenesis. The knowledge of these events is crucial for the interpretation of the processes involved in the differentiation of female gametes. This paper describes the changes and cellular events involved in the formation of the follicles of *Columba livia*. To do this, we examined the histology ovarian from stage embryos E42 and neonates, 2, 5, 7, 10 and 14 days post hatch. Samples were processed according to conventional techniques for paraffin embedding and staining with hematoxylin and eosin. The

observations made it possible to identify four stages of folliculogenesis. In stage I the oogonia nests are grouped surrounded by a layer of pre follicular cells. Stage II is characterized by the initiation and meiotic arrest of prophase and primary oocytes. From stage III starts follicular cells surrounding each oocyte culminating in the organization of primordial follicles (stage IV). The results obtained show that in *Columba livia*, unlike the other species studied, folliculogenesis begins after hatching, and raising new questions about the mechanisms of control of folliculogenesis. Future studies will focus on the analysis of differentiation processes of follicular cells and endocrine control in the process.

¹Laboratorio de Herpetología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste. ²Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires.

Expresión de componentes de la cascada de señalización de la insulina en folículos ováricos de bovinos con enfermedad quística.

PANZANI, CG¹; RODRIGUEZ, FM^{1,2}; BENITEZ, G¹; SALVETTI, NR^{1,2}; ORTEGA, HH^{1,2}; REY, F^{1,2}.

La Enfermedad Quística Ovárica (COD) es uno de los desórdenes reproductivos más frecuentes y que mayores pérdidas económicas ocasiona en vacas lecheras de alta producción. Su etiopatogenia es compleja e involucra diversos factores metabólicos y hormonales como principales mediadores. En el ovario la insulina actúa sobre la esteroidogénesis y el crecimiento de células de la granulosa y teca. Nuestra hipótesis de trabajo postula que variaciones en componentes intervinientes en la señalización de insulina podrían afectar el desarrollo y funcionalidad ovárica y predisponer al desarrollo de la COD. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los perfiles de expresión del receptor de insulina tipo β (IR β), la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y el sustrato del receptor tipo I (IRS-1) en diferentes poblaciones foliculares. Se utilizaron ovarios de animales con COD espontánea (n=10), con COD inducida experimentalmente mediante administración de ACTH (n=5), y un grupo control (n=5). Las muestras obtenidas mediante ovariectomía fueron fijadas en formaldehído (4%) y procesadas histológicamente hasta su inclusión en parafina. Se realizó la técnica de

inmunohistoquímica indirecta utilizando anticuerpos específicos para la detección de IR β , IRS-1 y PI3K sobre secciones de tejido. La inmunomarcación en células de la granulosa y de la teca en folículos en crecimiento y en estructuras quísticas fue analizada digitalmente (Image Pro-Plus 3.0). Los resultados obtenidos muestran niveles de expresión similares para PI3K en las diferentes estructuras analizadas y una disminución en la expresión del IR β y de IRS-1 en quistes respecto a folículos primarios controles ($p < 0.05$). Además se observó una disminución en la expresión de IRS1 en los folículos terciarios de animales con COD en relación a la misma categoría en los controles. Estos cambios podrían estar indicando una menor capacidad de respuesta a insulina en vacas afectadas con la enfermedad. Por otra parte, se podría inferir que modificaciones en la expresión de miembros de la cascada de señalización de la insulina podrían afectar la funcionalidad ovárica y participar en el desarrollo de diversas alteraciones relacionadas con la COD, tales como disminución en los niveles de proliferación y apoptosis, esteroidogénesis y diferenciación.

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL. ²Conicet.

Daño ultraestructural en la membrana de espermatozoides porcinos durante el proceso de congelación-descongelación

PRENNA, G¹; MIGLIO, A²; PERALTA, R³; JURADO, S³; WILLIAMS, S⁴.

Durante el proceso de congelación se produce una inevitable reducción de la proporción de espermatozoides que mantiene la normal integridad de membrana, su composición química y ultraestructura, siendo el espermatozoide del cerdo de gran susceptibilidad. Las alteraciones pueden ser diagnosticadas mediante el microscopio óptico, pudiéndose complementar con la microscopía electrónica para evaluar el daño ultraestructural que sufre la célula espermática durante el proceso de congelación. El objetivo de este trabajo fue realizar un diagnóstico de daño ultraestructural en la membrana citoplasmática de la cabeza en espermatozoides porcinos utilizando el microscopio electrónico de transmisión, luego del proceso de congelación y descongelación. Se utilizaron muestras de semen, a las que se les comprobaron los parámetros mínimos de calidad seminal. La congelación se realizó mediante una técnica con modificaciones al método de Westendorf. Previo al enfriamiento se prepararon dos alícuotas, las que fueron diluidas con diferentes volúmenes de los diluyentes de enfriamiento, lo cual hizo que la concentración final de cada pajuela (0.5 ml) fuera de 300 ó 750 x 10⁶ espermatozoides

(T300 y T750 respectivamente). Se tomaron muestras pos-enfriamiento (5°C) y al momento de la descongelación (T300 y T750), las que fueron centrifugadas y fijadas para ser remitidas al Servicio de Microscopía Electrónica. Se analizaron 177 imágenes por muestra (independientemente de la concentración espermática) con el programa de procesamiento de imagen ImageJ, considerando el grado de deformación de la membrana citoplasmática, a razón de 3 medidas en la cabeza/espermatozoide, expresadas en micras. Se calcularon los promedios (cuadrados mínimos medios ± error estándar), que se compararon por análisis de varianza (procedimiento CATMOD de SAS[®], 2002). El promedio de la separación entre membranas fue de 0.05±0,01; 0.28±0,13, y 0.61±0.42 a los 5°C y a la descongelación para T300 y T750, respectivamente, hallándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre 5°C y T750. De los datos obtenidos se puede concluir que la microscopía electrónica es una herramienta útil para confirmar el daño ultraestructural, y pone en evidencia el efecto deletéreo del aumento del número de espermatozoides por pajuela.

¹Becaria de estudio de la CIC; ²Becaria de C y T; ³Servicio Central de Microscopía Electrónica; ⁴Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, La Plata, Buenos Aires

Seguimiento del comportamiento del celo mediante observación visual y pintura en base de la cola asociado a estructura folicular y/o ovulación en bovinos lecheros sincronizados con protocolos de IA

REGALADO, E¹; SARRAMONE, C¹; SCILIPOTI, G²; SANTA MARÍA, M²; DICK, A¹.

El factor con mayor incidencia y el más rápido de modificar para disminuir el intervalo entre partos (IEP) es el porcentaje de detección de celos (PDC). Para lograrlo se utilizan ayudas, como es la pintura en la base de la cola. El inicio de celo (aceptación de la primera monta) determina el momento de ovulación, y cuándo inseminarlas. Los objetivos de este trabajo fueron describir el comportamiento de celo y determinar el momento de ovulación en relación al celo, en vacas y vaquillonas lecheras, sincronizadas para IA. Ensayo 1: vacas (15) en lactación se sincronizaron con dispositivo intravaginal de progesterona durante 8 días y 2 mg de BE al día 0. Al día 8 se les aplicó prostaglandina y pintura en la base de la cola. El día 9 recibieron 1 mg de BE. Ensayo 2: vaquillonas (27) se sincronizaron con protocolo de doble aplicación de prostaglandina (día 0 y 14; y pintura en la base de la cola el día 15). El seguimiento del comportamiento estral se inició al día 10 y 16 para vacas y vaquillonas, respectivamente, cada 2 h durante 15 minutos. A medida que los animales mostraban signos externos de celo, se

les realizó ecografía cada 12 h hasta determinar ovulación (desaparición del folículo ovulatorio). Se utilizó test de student para las comparaciones de tiempo. La duración promedio de celo fue de 8,1 (DS 3.84, coef. variabilidad 43.8%), y de 12,5 h (DS 6.14, coef. variabilidad 52.5%) en vacas y vaquillonas, respectivamente. El inicio del mismo para los siguientes rangos horarios de 00:00-06:00, 06:00-12:00, 12:00-18:00 y 18:00-24:00 en vacas fue del 29, 50, 14 y 7% respectivamente, y en vaquillonas resultó del 10,5, 58, 21 y 10,5% respectivamente. El intervalo promedio celo-ovulación fue de 27,6 h para vacas y 23,8 h para vaquillonas; siendo los porcentajes para los siguientes rangos en horas de 8-16, 17-24, 25-30, 31-36 y 37-44 en vacas del 8, 23, 46, 15 y 8% respectivamente, y en vaquillonas resultó del 32, 26, 21, 10,5 y 10,5% respectivamente. Concluyendo en la importancia de la sincronía celo-IA-ovulación porque aunque en promedio fue similar en ambas categorías, existen diferencias individuales que probablemente hagan variar el resultado de fertilidad a la IA.

¹Facultad de Ciencias Veterinarias-UNCPBA, Tandil. ²Act. Privada, Tandil/Bolivar.

Anatomía e histología del tracto reproductor masculino del oso melero (*Myrmecophagidae*, *Xenarthra*).

ROSSI, LF¹; MEYER, C¹; BALDOMA, V¹; MERANI, MS¹.

El oso melero (*Tamandua tetradactyla*), cuyo estado de conservación es potencialmente vulnerable, es una especie autóctona del continente americano. Debido a la caza indiscriminada y el avance de la deforestación es necesario considerarla en planes de conservación. Estos implican, manejos reproductivos que requieren de estudios que permitan conocer la estructura del tracto genital. De 6 ejemplares muertos por causas naturales, se estudiaron las características anatómicas e histológicas del tracto reproductor masculino junto a detalles de la estructura fina de la espermatogénesis y de morfología espermática. Los tractos fueron fijados en formaldehído al 4% y se realizaron cortes histológicos que fueron coloreados con H-E, tricrómico de Crossmon o PAS. Una muestra del parénquima testicular fue fijado en 2,5% glutaraldehído para microscopía electrónica de las células germinales, y se fotografiaron 150 espermatozoides de extendidos obtenidos de epidídimo, coloreados con nitrato de plata. Los órganos reproductivos están representados por un par de testículos internos, epidídimo, vesícula seminal, la próstata, la uretra y el pene. Los testículos son ovoides (2,86 x 1,80 x 1,16 cm), localizados en

la cavidad pélvica y unidos entre sí por una fina capa de peritoneo visceral. El conducto deferente es alargado (4,25-4,49 cm) y la próstata presentó una forma bilobulada, situada dorsalmente a la uretra. Las vesículas seminales eran conductos enrollados, elongados y finos (2,04 cm). Las glándulas bulbouretrales presentaron una forma oval (1,22 x 0,77 x 0,60 cm) en posición ventral a la uretra en la base del pene. Sin un perineo distinguible se observó el pene cuyo largo fue de 2,00-3,50 cm. El cuerpo esponjoso delgado en el extremo hace que anatómicamente e histológicamente no se evidencie un glándula. El epitelio seminífero presentó células de Sertoli con indentaciones nucleolares, espermatogonias con grumos de cromatina, espermatoцитos en diferentes estadios de maduración y 3 tipos de espermátidas identificables morfológicamente de acuerdo a la forma de la cabeza, desarrollo del acrosoma y condensación de la cromatina. La cabeza del espermatozoide es de forma oval y el largo total fue de $67,33 \pm 1,60$ micras. La comprensión funcional de la morfología permite inferir mecanismos de la biología reproductiva básicos que podrán ser aplicados en biotecnología reproductiva.

¹Laboratorio de Biología Cromosómica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Use of 2 and 4% dimethylformamide as the cryoprotectant for freezing llama semen

SANTA CRUZ, R^{1,3}; ARRAZTOA, C^{1,3}; CARRETERO, MI^{1,3}; FERRANTE, A^{1,3};
CALDEVILLA, M^{1,3}; MONCALVO, E^{1,3}; GIULIANO, S^{1,2,3}.

In earlier studies it was determined that using 7% dimethylformamide (DMF) as a cryoprotectant preserved motility and functional integrity of llama sperm during deep freezing. The objective of this study was to establish whether it was possible to use DMF concentrations lower than 7% to preserve llama sperm viability and functional integrity during freeze-thawing. Nine ejaculates from six males were evaluated. The samples were incubated in a 0.1% collagenase solution. Subsequently, each sample was divided into 4 aliquots: two of them were diluted, at room temperature (RT), in an egg yolk-lactose (LY) extender with either 2% DMF (RT-2%) or 4% DMF (RT-4%) and stabilized for 20 minutes at that temperature. The remaining aliquots were diluted in LY, cooled to 5°C and then LY with 2% or 4% DMF was added and samples were then stabilized at 5°C for 20 minutes (5°-2% and 5°-4%, respectively). After stabilization, deep freezing was performed. The following parameters were evaluated in raw semen and after thawing: sperm motility, (between slide

and coverslip over a warming plate at 37°C), membrane function and integrity (using the hypoosmotic test and the fluorochromes 6-carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide respectively). A factorial design with 5 levels was used to compare among the different treatments and with raw semen samples. No significant difference was observed in the percentage of spermatozoa with progressive motility between raw semen and the different treatments ($p > 0.05$). The percentage of live spermatozoa and spermatozoa with functional membranes was significantly lower in all treatments compared to raw semen ($p \leq 0.05$). No significant differences were observed between treatments for any of the variables tested ($p > 0.05$). In conclusion, according to these results, none of the combinations between the different equilibration temperatures (room temperature and 5°C), with either concentrations of DMF (2% and 4%) were effective for preserving sperm viability and functional membrane integrity in frozen-thawed llama spermatozoa.

Sperm selection in llama cooled semen using different Percoll® gradients

SANTA CRUZ, R^{1,3}; ARRAZTOA, C^{1,3}; CARRETERO, MI^{1,3}; FERRANTE, A^{1,3}; CALDEVILLA, M^{1,3}; MONCALVO, E^{1,3}; GIULIANO, S^{1,2,3}.

Sperm selection allows obtaining samples with improved quality and separating spermatozoa from the medium in which they are suspended. The objective of this study was to compare sperm selection achieved in cooled llama semen using two Percoll® density gradients. Twelve ejaculates were evaluated (n = 6, r = 2). The samples were incubated in a 0.1% collagenase solution. Subsequently, each sample was divided into two aliquots: the first one was diluted 2:1 in an egg yolk-lactose (LY) extender (R) and the other was centrifuged to separate the seminal plasma and resuspended in 2 ml of LY (Rc). Both aliquots were refrigerated to 5° C for 24 h, and then centrifuged through two Percoll® gradients: 45% -70% (R70 and Rc70) and 45% -80% (R80 and Rc80) respectively. Sperm motility, concentration, morphology, plasma membrane function and integrity were evaluated in raw semen and after each treatment. A factorial design was used to compare between

treatments and with raw semen. Progressive sperm motility of samples from R70, Rc70 and Rc80 was significantly higher ($p \leq 0.05$) than in raw semen and R80. Sperm concentration from R80 was significantly lower ($p \leq 0.05$) than all other treatments. The percentage of hypoosmotic swelling was not significantly different ($p > 0.05$) between treatments or in raw semen. No significant differences were detected in the percentage of live sperm in Rc80 ($p > 0.05$) when compared to raw semen, whereas the other treatments showed significantly less live sperm ($p \leq 0.05$). Only the 45%-80% gradient was able to separate the spermatozoa from the egg yolk. In conclusion, centrifugation of cooled llama semen through a 45%-80% Percoll® gradient would be suitable for separating sperm from the diluent (lactose-yolk), obtaining samples with progressive sperm motility and a higher percentage of viability in samples refrigerated without seminal plasma.

IATF en vaquillonas comparando dos protocolos de sincronización

SCHINONI, J¹; CONFALONIERI, AJ²; CARRETERO, MI^{2,3}; PÉNDOLA, CH².

El uso de progestágenos en la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en vaquillonas (Vq.) es una práctica de uso corriente cuando se planifica la reposición del rodeo. El objetivo de este trabajo fue comparar dos protocolos con progestágenos (DIB: dispositivo intravaginal bovino), uno de 7 días de duración utilizando cipionato de estradiol y eCG y el otro de 5 días utilizando GnRH. Se utilizaron 80 Vq., raza Angus negro y colorado que se dividieron en dos lotes: La: 40 Vq. de 24 meses edad que habían quedado vacías luego de tres inseminaciones, sin presentar ninguna patología ni alteración útero-ováricas y Lb: 40 Vq. de 18-20 meses, con un grado de desarrollo reproductivo 2 (en la escala de 1 a 4), evaluado por ecografía, con folículos de 8 mm de diámetro como máximo y cuernos uterinos con un diámetro de 5 a 10 mm. Estos lotes se dividieron a su vez en dos de

20 Vq. cada uno: La1 y La2 y por otro lado Lb1 y Lb2. Luego de esto se conformaron los lotes del ensayo quedando de la siguiente manera **lote "I"** integrado por La1 + Lb1 tratados con el protocolo de 7 días: día 0: Be + DIB; día 7: retiro DIB + PGF2 α + eCG + cipionato; IATF 52/56 hs post retiro y **lote "II"** integrado por La2 + Lb2 tratados con el protocolo de 5 días: día 0: DIB + GnRH, día 5: retiro DIB + primera dosis de PGF2 α + segunda dosis de PGF2 α a las 8 a 12 h posteriores a la primera aplicación, día 8: IATF + GnRH. Para la IATF se utilizó semen de fertilidad probada y el personal y los operarios fueron los mismos para ambos lotes. La evaluación se realizó por ecografía 30 días post IATF. Se utilizó un test de Chi cuadrado para comparar los porcentajes de preñez. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Lote "I"			Lote "II"		
% Preñez total	% Preñez La1	% Preñez Lb1	% Preñez total	% preñez La2	% Preñez Lb2
32,5 (13/40) ^a	40 (8/20) ^a	25 (5/20) ^a	45 (18/40) ^a	45 (9/20) ^a	45 (9/20) ^a

^a ($P > 0,05$)

Conclusión: A pesar de no observarse diferencias significativas entre los protocolos de sincronización, la utilización del dispositivo intravaginal durante 5 días evidencia un

incremento en la tasa de preñez para ambos lotes de vaquillonas. Sin embargo, sería conveniente realizar más ensayos comparando ambos protocolos.

¹Actividad privada, ²Cátedra de Teriogenología, ³INITRA- FCV- UBA.

Uso de la combinación de melatonina y prostaglandinas para la sincronización del estro en ovejas de raza rasa aragonesa

SILVA, MANUEL AGUSTIN; ABECIA, JOSE ALFONSO

La inducción del ciclo estral en el ganado ovino permite su reproducción durante la primavera con partos en el otoño, momento en el cual los precios están en alza y las condiciones y oportunidades de mercado favorecen su comercialización. Entre los métodos utilizados se encuentra la melatonina, en forma de implantes subcutáneos. El objetivo del presente trabajo ha sido utilizar la melatonina exógena en combinación con prostaglandinas F2 α (PGF2 α) en primavera para estudiar la eficacia de dicha combinación en la sincronización de celos en ovejas, además de permitir la utilización de esta última hormona fuera de la temporada reproductiva. Se trabajó con 51 hembras de la raza Rasa Aragonesa. Las ovejas se dividieron en tres grupos experimentales (n=17/grupo): un grupo se trató con melatonina (grupo M), en otro se combinó melatonina con una única inyección de PGF2 α en el momento de introducir los machos (45 días tras colocar los implantes) (grupo MP), siendo el resto el grupo control (grupo C). Machos y hembras se mantuvieron separados hasta el término de dichos tratamientos para provocar efecto

macho. Se tomaron muestras sanguíneas para determinar las concentraciones de progesterona siete días antes de la introducción de machos y el día de la introducción, evidenciando que el 100% de las ovejas presentaban actividad cíclica previa a la introducción de machos. Las hembras salieron en celo a partir del día de introducción de los machos (día 0), mostrando el grupo MP una sincronía de sus celos (día 2, 41% de los individuos en celo, día 3, 65%; $p<0,01$ respecto a los otros grupos). Los otros dos grupos se cubrieron en un lapso de 18 días, hecho que se puede adjudicar a que las hembras ya se encontraban cíclicas y a un posible efecto de "simpatía" con el lote MP. La tasa de gestación fue de un 82% en los grupos C y M y de un 94% en el grupo MP. La tasa de prolificidad fue de 1,29, 1,50 y 1,31 corderos/parto para los grupos C, M y MP respectivamente, y la tasa de fecundación fue de 1,06 para los grupos M y P y de 1,24 corderos/oveja para el grupo MP.

En conclusión, la combinación de implantes de melatonina y una única inyección de PGF2 α en primavera ha demostrado una gran capacidad de sincronizar los celos.

Sincronización de celos en ovejas de aptitud lechera según la edad y el protocolo

SIMONETTI, L¹; LYNCH, GM¹; MC CORMICK, M¹; CAROU, N².

El tambo ovino es una alternativa promisoriosa de diversificación e intensificación de las actividades agropecuarias, especialmente para Pradera Pampeana. Sin embargo, los trabajos realizados en nuestro medio son escasos. La sincronización de celos en ovinos permite: facilitar servicios más intensivos (monta a corral, dirigida o IA), mejorar la supervisión de los partos, obtener mayor uniformidad en las crías con ventajas para el manejo y la comercialización, hacer un uso más eficiente de los recursos forrajeros y, en el caso de tambo, programar el comienzo del ordeño. El objetivo fue evaluar la sincronización de celos según la edad y el protocolo, en ovejas de aptitud lechera. El ensayo fue realizado durante la estación reproductiva del otoño en un tambo ovino ubicado en Urubelarrea, provincia de Buenos Aires, desarrollado en condiciones pastoriles. Se utilizaron hembras Frisonas puras y cruza, de tres categorías de edad: diente de leche (8 meses de edad; DL; n= 14), dos dientes (18 meses de edad; 2D; n= 12 y 2D+eCG; n=23) y cuatro a seis dientes (30 meses de edad; 4-6D; n=12), las que fueron sincronizadas con esponjas intravaginales (60 mg MAP) durante 14 días, únicamente (DL, 2D y 4-6D) o combinado con 300 UI eCG

i.m. a su retiro (2D+eCG). Los celos fueron detectados cada 6 h mediante carneros con delantal y arnés con tiza marcadora. Se registró el porcentaje de celos, que fue analizado por test exacto de Fisher, y el intervalo entre el final del tratamiento progestacional y el inicio del celo, analizado por ANVA. El porcentaje de sincronización de celos dependió de la edad, siendo del 64,3% en DL y del 100% tanto en 2D como en 4-6D ($p<0,01$). La categoría más joven, borregas DL, presentó sus celos más tardíamente (41,3±2,7 h, con un rango entre 30 y 54 h) en comparación con los grupos 2D (32,0±2,0 h, entre 24 y 48 h) y 4-6D (28,0±1,3 h, entre 24 y 36 h) ($p<0,01$). En las hembras dos dientes la inclusión de eCG al protocolo de sincronización (grupo 2D+eCG) no afectó el porcentaje de celos (91,3%) ni el intervalo a su presentación (30,6±1,0 h, entre 24 y 36 h) ($p>0,10$). En conclusión, se aporta información local sobre la sincronización de celos en ovejas de aptitud lechera. Esta tecnología, puede aplicarse incluso en categorías de edad temprana (borrega DL) no tradicionalmente destinadas al servicio en nuestras majadas. La inclusión de eCG, que acarrea mayor costo, no genera ventajas en la presentación ni en la distribución de los celos.

¹Cátedra de Ovinos, Caprinos y Camélidos Sudamericanos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora;

²Cátedra de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora.

Glucocorticoid receptors (GRs) expression and morphometric indices of GH-tropes population in hypophysis of pregnant rats under chronic stress by immobilization

SOÑEZ, MC¹; SOÑEZ, CA²; MUGNAINI, MT²; MONEDERO COBETA, I³; BOZZO, AA²; GAZZANEO, P¹; GAUNA, HF⁴.

The involvement of glucocorticoid receptors (GRs) and pituitary somatotrope cells as effectors of the HPA axis in chronic stress during pregnancy has been poorly studied. The objective was to determine the effects of chronic stress by immobilization (IMO) on the GH synthesis- secretion and expression of GRs in the adenohipophysis of pregnant rats. Pituitaries from stressed rats (SR) by IMO and control rats (CR) were processed by conventional histological technique at 12, 17 and 21 days of gestation. Indirect immunocytochemical method was applied (LSAB2 (R) System-HRP, Dako) on serial sections, using antibodies mGR 1:10, pGH 1:200 (Novocastra Labs), including negative and positive controls, revealing with 0.003% DAB (Dako). Stereological image processing was performed with Image J software and all statistical analyzes with *IBM SPSS Statistics v.19*. The following variables were studied: 1-vascular area ($AV_{\mu m^2}$), 2-GH indices

(cellular, glandular and total), 3-GR nuclear area and 4- percentage of total GR positive area. Multistage sampling and Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U tests were applied. By comparing the responses of CR *vs* SR, GRs expression showed significant increases at 12 and 21d of gestation, decreasing to 17d ($p = 0.0001$) whereas in CR was decreased progressively and greater to 21d. GH indices indicated a reduction to 12d ($p = 0.0001$), increased to 17d ($p = 0.047 / 0.028 / 0.047$), while no significant differences were found to 21d. The vascular area of SR *vs* CR increased at 12d ($p = 0.047$) and was reduced at 17 and 21d. It is concluded that stress by IMO in rats alters the expression of GRs in adenohipophysial cells, increasing towards the last day of pregnancy, whereas in this day GH rates are equalized between SR *vs* CR. These are likely effects of attenuation of stress responses which have been reported in this species at the end of gestation.

¹Histology and Embriology, INITRA, Faculty of Veterinary Sciences, University of Buenos Aires; ²Cellular Biology and Embriology, Faculty of Agronomy and Veterinary, National University of Río Cuarto (UNRC); ³Physiology, Faculty of Sciences, Autonomous University of Madrid; ⁴Physiology, Faculty of Sciences, Physical-Chemistry and Natural, UNRC, Argentina. mcsones@fvet.uba.ar

Mediciones de progesterona en perras tratadas con eCG

STORNELLI, MC¹; GARCÍA MITACEK, MC^{1,2}; BONAURA, MC^{1,3}; NUÑEZ FAVRE, R^{1,2};
DE LA SOTA, RL^{1,2}; STORNELLI, MA¹.

Existen controversias sobre el uso de hCG para inducir la ovulación, cuando se implementan protocolos de inducción de ciclos en la perra, debido a que en esta especie la ovulación es espontánea. Así mismo se ha comprobado que eCG posee efecto FSH y LH pudiendo el estímulo ser suficiente para lograr la ovulación. El objetivo fue estudiar el aumento de P₄ sérica en relación a la ovulación y formación de cuerpo lúteo luego de la administración de eCG. Se utilizaron perras (n=6) mestizas, sanas, en anestro. Se confirmó el anestro mediante citología vaginal y concentraciones de P₄ en suero. El primer día del protocolo, las perras recibieron una única dosis de eCG (50 UI/kg IM; Novormon®, Syntex SA). Las perras fueron controladas diariamente para evaluar comportamiento y signología de estro, realizándose citología vaginal diaria para evaluar la respuesta al tratamiento. De cada animal se obtuvo una muestra de sangre antes de administrar la eCG y otra el primer día del diestro citológico. Las concentraciones de P₄ fueron determinadas mediante RIA. Dos a siete

días (3,3±0.94 d) posteriores a la administración de eCG, todas las perras manifestaron signología y citología vaginal de celo. Al analizar las concentraciones de P₄ de las muestras obtenidas del primer día del diestro citológico se observó que tres de las perras mostraron valores basales de P₄ (grupo 1), mientras que las 3 restantes (grupo 2) mostraron valores de P₄ séricos significativamente superiores en comparación con las 3 primeras (2,80 vs. 85,33±6,18 ng/mL; *p*<0,01). Las altas concentraciones séricas de P₄ del grupo 2 estarían relacionadas con la ocurrencia de ovulación y formación de cuerpo lúteo. Por otra parte, las concentraciones de P₄ séricas al momento de la administración de eCG fueron similares en todas las perras (0,23±0,08 ng/mL; *p*>0,37). Nuestros resultados muestran que no en todas las perras en las que se induce desarrollo folicular utilizando eCG logran ovular. Estas observaciones indicarían que cuando se implementan protocolos de inducción de ciclos con eCG es necesario administrar hCG para lograr la ovulación en todos los animales.

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata B1900AVW, BA, Argentina; ²CONICET, Av. Rivadavia 1917, Capital Federal C1033AAJ, Argentina; ³CIC, 526 (10 y 11) 1900 La Plata, BA, Argentina.

Sistema informático para control de gestión de empresas porcinas

SUÁREZ, R¹; LOMELLO, V¹; GIOVANNINI, F¹; GIOVANNINI, N¹; CAMPAGNA, D²; SILVA, P²; BRUNORI, J³; COTTURA, G³; BRAUN, R⁴; CERVELLINI, J⁴; MUÑOZ, V⁴; FANER, C⁵; COCA, L⁵.

La producción porcina en Argentina reúne condiciones para su desarrollo competitivo respecto a otros países. Vincula más de 60.000 productores, mayoritariamente ligados a pymes que trabajan con elevadas ineficiencias productivas, generando pérdidas para sus economías y el país. El escaso empleo de sistemas de información para controlar manejos reproductivos, productivos y económicos dificulta que se identifiquen aciertos y desaciertos de los procesos de toma de decisiones. Tras el propósito de fortalecer las gestiones productivas y generar información de valor para el sector se dispuso crear el sistema informático “Seguimiento de Actividades Porcinas SAP”. Su desarrollo respetó las etapas de análisis de requisitos, diseño de evolución de estado, diseño de hipermedia, implementación y testeo. Actualmente se encuentra disponible en www.ciap.org.ar. Permite almacenar datos de: altas y bajas de reproductores; servicios; partos; destetes; existencias, movimientos y mortandad de animales; consumos de alimentos; valores económicos de animales e insumos determinantes de costos. A partir de los datos

almacenados, combinando diferentes criterios, se pueden generar indicadores para analizar aspectos como: dinámicas poblacionales de reproductores y de categorías de engorde; performance reproductiva del rodeo, de grupos o individuos; fechas probables de repetición de celo, partos y destetes; producciones, consumos y conversiones globales y por categorías; gestiones comerciales de insumos y productos y resultados económicos. El productor puede obtener informes de resultados de su emprendimiento y los técnicos e instituciones sobre grupos de productores. El SAP ha sido utilizado por 400 emprendimientos localizados en 16 provincias de Argentina y en otros 6 países; y ha permitido almacenar información sobre 18.643 reproductores, 42.085 servicios, 27.602 partos, 23.393 destetes y 5.000 operaciones de ventas, entre otros. Su sostenimiento gratuito permite fortalecer gestiones reproductivas, productivas, comerciales y económicas de pymes porcinas; apoyar actividades de asesoramiento y capacitación de técnicos; y almacenar información sobre gestiones disponible para el sector.

¹Universidad Nacional Río Cuarto. ²Universidad Nacional Rosario. ³INTA EEA Marcos Juárez. ⁴Universidad Nacional La Pampa. ⁵Universidad Católica Córdoba.

Assessment and distribution of apoptosis in immature *cumulus* oocyte complexes in sows

TELLO, MF; LORENZO, MS; MARURI, A; CASIRÓ, S; CÉTICA, P;
GAMBAROTTA, MC; LOMBARDO, DM

The oocyte quality assessment and its connection with the presence of apoptosis has become greatly relevant over the past few years. The selection of high quality oocytes is key to succeeding in the production of *in vitro* embryos. However, the issue raises a number of controversies. This study aimed at assessing the presence and distribution of apoptosis in *Cumulus* - Oocyte Complexes (COCs) in sows and their relation to morphology. COCs were classified into six categories (A1, A2, B1, B2, C, D) under a stereoscopic microscope based on their morphology. For the evaluation of early apoptosis in each category the staining of Annexin-V was performed. The percentage of positive oocytes and the percentage of positive *cumulus* cells inside these ranges [0-25%];[25-50%];[50-75%];[75-100%] was obtained. For the evaluation of late apoptosis the technique was the TUNEL assay. It was observed that the percentage of COCs in each category is variable. Both early and late apoptosis were found in cumulus cells but only

early apoptosis was found in oocytes. While there was an increase in apoptosis related to the declining quality evaluated morphologically, the increase is not consistent with the categories into which COCs were classified. Both oocytes and cumulus dead cells were found, irrespective of the COCs morphological characteristics or the category to which they belong. Based on the findings of apoptosis assessment, there arise the possibility of modifying certain selection/ classification parameters in order to accelerate the finding of appropriate COCs for *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF). However, the morphological evaluation of COCs under a stereoscopic microscope by itself does not allow for a selection of COCs with no damage and no apoptosis. For Annexin-V, Chi square Test, test of Independence and Regression analysis were performed. TUNEL assay was analysis using no parametric ANOVA and Regression analysis. Differences were considered significant when $p < 0.01$.

Comparison of qualitative and quantitative evaluation of porcine primordial and primary follicles

TORRES, P¹; GABRIEL, P¹; FRATTO, C¹; BOVIEZ, J²; CISALE, H¹;
LOMBARDO, DM²; FISCHMAN ML¹.

Digital image analysis provides information about preantral follicles morphology that cannot be obtained by optic qualitative evaluation. This method allows measurement of the nuclear (AN) and cytoplasmic area (AC), the oocyte size and circularity and the AN/AC relation. Our objective was to compare the qualitative histological assessment of primordial and primary porcine follicles with data obtained from quantitative evaluation by digital image analysis. Samples were taken from ovaries of slaughtered animals (n=10) and oocytes from primordial and primary follicles were evaluated (n=54 and n=32 respectively). Ovary cortex sheets were stained with hematoxylin and eosin and examined using an upright microscope (x400). Oocytes were classified in abnormal (A): cytoplasm and/or nucleus were damaged; or normal (N): both structures intact. Nucleus and cytoplasm were also classified as N or A. For this purpose, the degree of nuclear pyknosis, the integrity of the nuclear membrane and the degree of cytoplasmic vacuolization and/

or eosinophilia were taken into account. The quantitative analysis was performed on digital photographs of the same follicles, using Qwin Plus[®]. The following parameters were measured: AC; AN; total area (AT=AC+AN), AN/AC relation, oocyte circularity (RO) and nuclear circularity (RN). Oocyte classification as N or A was compared with AN/AC relation, AT and RO. Nuclear classification as N or A was compared with AN and RN. Finally cytoplasm classification as N or A was compared with AC and RO. Data was analyzed using the median test, given the non-normal distribution of the variables. Significant differences ($p < 0,05$) were found in AN/AC relation between N y A, both in primordial (A Me: 0,39; N Me: 0,59) and primary (A Me: 0,45; N Me: 0,61) follicles. Results show that in A oocytes, AC is proportionally bigger than AN, compared with N, in both primordial and primary follicles. AN/AC relation would be a useful quantitative parameter as an indicator of N/A in preantral porcine follicles.

¹Cátedra Física Biológica, ²Cátedra Histología, ^{1,2}INITRA, FCV, UBA.

First alpacas born in Argentina by extra-species embryo transfer

TRASORRAS, VL; CALDEVILLA, M; BACA CASTEX, C; CHAVES, MG; AGÜERO, A; NEILD, DM; PINTO, M; MIRAGAYA, MH.

There are very few alpacas in Argentina (about 600) and Peru has the majority of these animals. It would be of interest to breed alpacas in our country due to their fine fiber, but it remains necessary to increase their population. The objective of our study was to synchronize follicular waves between alpaca embryo donors, to obtain alpaca embryos by uterine flushing and to transfer alpaca embryos to female llama recipients that will carry the alpaca gestation to term. Two alpaca donors, two alpaca males and 5 llama recipients were used at the breeding field "Los Cedros" in Cañuelas, Buenos Aires. A single IM dose of 180 mg of long-acting progesterone (BioRelease® LA 300, BETPharm) together with 0.5 mg of Estradiol benzoate (EB; Estradiol 10®, Lab. Río de Janeiro) IM were used in the donor females to inhibit follicle growth. After 7 days and in the absence of follicles > 5 mm by transrectal ultrasonography, ovarian superstimulation was carried out in the alpacas using 700 IU eCG (Novormon®, Syntex) IM. Five days later, the donors were mated with a *Vicugna pacos* male of proven fertility and a single IV dose of 8 µg busserelin was administered. Embryo recovery was

performed 7 days post-mating by transcervical uterine flushing. Control of ovarian dynamics was carried out in recipient llamas until a dominant follicle (≥ 7 mm) was detected in the left ovary. Ovulation (day 0) was induced 1 day after the first mating of the alpaca donor and embryo transfer (ET) was realized the day of embryo recovery (day 6 of the recipient), depositing the embryo in the left uterine horn. An alpaca embryo was recovered from each of the donors and both were transcervically transferred to llama recipients. Pregnancy diagnosis was done 14 days after the ET by transrectal ultrasonography, observing the presence of an embryonic vesicle in each of the recipients. November 3rd and 7th 2011, a female and a male alpacas were born respectively, both gestated by llama recipients. These results would indicate that it is possible to synchronize alpaca embryo donors and to inhibit the follicular wave in the alpaca using BioRelease® progesterone together with EB. Moreover, it is possible to obtain alpaca offspring by ET to recipient llamas that take gestation to term. This is the first work in our country to obtain alpaca newborns by the application of extra-species ET technique.

Activity of key enzymes of the energetic metabolism in porcine gametes

VECCHI, B¹; DUBOIS, D¹; SATORRE, M^{1,2}; ALVAREZ, G^{1,2};
GUTNISKY, C^{1,2}; RODRIGUEZ, P^{1,2}; BREININGER, E^{1,2}.

The participation of glycolysis and tricarboxylic acid cycle on the production of the energy needed for the process of *in vitro* fertilization in porcine gametes has not been fully elucidated. Freezing of sperm is a common method for preserving the male gamete during long periods of time. However, in porcine this method is not efficient. The objective of the present work was to determine the activity of the key enzymes of the glycolytic pathway (phosphofructokinase, PFK) and the tricarboxylic acid cycle (isocitrate dehydrogenase, IDH and malate dehydrogenase, MDH) in enzyme extracts of porcine sperm (Z) and cumulus-oocyte complex (COC). The enzyme activity was determined by spectrophotometry on extracts of fresh semen or frozen semen in 0.5 ml straws and in COCs. The extracts of the Z and immature COCs were resuspended in distilled water, sonicated (4 min, 50%) and then centrifuged (17000xg, 20 min, 4°C), being the activity determined in the supernatant. For PFK,

enzyme unit (U) was defined as the amount of enzyme that catalyze the formation of 1 μmol of fructose 1,6-bisphosphate/min measured as the oxidation of 2 μmoles of NADH/min. For the IDH and MDH, the U was defined as the amount of enzyme that catalyzes the reduction of 1 μmol of NAD/min. The results were expressed as mean ± SD. The activity of the PFK was 1.4±0.6 and 1.1±0.3 U/10¹⁰Z for fresh and frozen Z, respectively, and 2.5±0.6 x10⁻⁵ U/COC. The IDH activity was 0.6±0.3 and 0.0002±0.0001 U/10¹⁰Z for fresh and frozen Z, respectively; and 2.7±0.9 x10⁻⁶ U/COC. Finally, the MDH activity was 10.8±5.7 and 8.9±2.0 U/10¹⁰Z for fresh and frozen Z, respectively; and 3.2±0.3 x10⁻⁵ U/COC. The results of this study contribute to elucidate the importance of the glycolytic pathway and the tricarboxylic acid cycle in porcine gametes and its relationship with the process of sperm cryopreservation. The knowledge of these variables might be applied to the process of *in vitro* fertilization.

¹Química Biológica, ²INITRA, FCV-UBA.

Efecto del estrés térmico en carneros por esquila tardía sobre la calidad seminal

VEKSLER HESS, J^{1*}; SCHUH, A¹; JORGE, A²; DECAMINADA, E¹; MIRALLES, M¹; COPPOLA, M¹; GHIRARDI, M¹.

La baja productividad individual en las majadas ovinas hace necesario la implementación de programas de mejora genética, siendo la ejecución de programas de inseminación artificial, una herramienta fundamental. La toma de decisiones de manejos en los sistemas de producción puede provocar profundas modificaciones en desempeño productivo. Decisiones inoportunas pueden crear complicaciones en el organismo del animal y afectar el manejo reproductivo. El hábitat y el manejo a que están sometidos los ovinos, exigen un reajuste excesivo en su fisiología y comportamiento, pudiendo inducir un auténtico estado de estrés. El objetivo del presente trabajo fue evaluar las variaciones de parámetros de calidad seminal en carneros sometidos a estrés calórico por la esquila tardía. Se utilizaron 4 carneros de raza frisona de 1 año y medio de edad de los cuales 3 (tres) siguieron el tratamiento A (Esquila Tardía) y 1 (un) carnero se utilizó como testigo, realizando la esquila tradicional de pradera pampeana. Los animales tratados fueron alojados en un potrero de 40 m². Todos ingirieron fardo de alfalfa ad libitum con libre acceso al agua de bebida. Los carneros sometidos al tratamiento A, se los clasificó en 2 etapas: Etapa Normal (EN), 14 días post esquila del testigo y Etapa Estresado (EET), luego de la tercera semana post esquila del testigo, hasta la quinta semana sin esquila. Se

tomó como parámetro del estrés los niveles del cortisol plasmático. Se evaluaron 36 eyaculados (n=36). La extracción de semen se realizó cada 7 días por el método de vagina artificial, utilizando para cada animal una vagina individual. Se realizarán valoraciones del volumen (V), pH, concentración (C), motilidad masal (MM), motilidad individual progresiva (MIP), Test de Endósmosis (Hos), integridad acrosómica (I.Acr.) y morfología (Morf.) Para la determinación de comparación de medias se utilizó el Test de Tukey con una $p < 0,05$. Los resultados mostraron que en animales sometidos al tratamiento A con respecto al testigo, en la etapa EN previo a producirse el estrés por estrés térmico, no hubo diferencias significativas con los valores tomados al comienzo de la experiencia. En cambio una vez producido el estado de estrés por falta de esquila (EET), hubo diferencias significativas en V, C, MM, MIP, Hos, I.Acr. y Morf., no así en el pH. Relacionando dichos parámetros seminales con el cortisol plasmático, no se produjeron diferencias significativas entre el carnero testigo (55 nmol/l) y los que se encontraban en EN (57,34 nmol/l), pero sí entre estos 2 grupos y los de la EET (100,27 nmol/l). Dichas diferencias significativas marcarían el efecto que produce el estrés por falta de esquila en la calidad seminal de los carneros sometidos al tratamiento A.

¹Cátedra de Producción Ovina. ²Cátedra de Física Biológica - Facultad de Ciencias Veterinarias – UBA.

Determinación de receptores de progesterona isoforma A, en ovarios y tejidos placentarios fetales y maternos de cerdas preñadas

VIGLIERCHIO, M¹; WILLIAMS, S²; GARCÍA, MG¹; RIESCO, O¹; LACOLLA, D¹; RIESCO, S¹; WITT, S¹; KONCURAT, M¹; YAFUL, G^{1,3}.

La placenta es un órgano transitorio indispensable para el desarrollo de la gestación. En la cerda la placenta es epiteliocorial, difusa, adecidua, plegada y no invasiva. Para el mantenimiento de la preñez se requiere de interacciones recíprocas entre los productos y el endometrio. A diferencia de otras especies, durante la preñez porcina, la progesterona (P₄) producida por el cuerpo lúteo, cumple una función vital en la preparación, recepción de embriones y mantenimiento de la gestación. Los efectos de la P₄ están mediados por la interacción de la hormona con sus receptores intracelulares específicos, RP isoforma A (RP-A) y RP isoforma B (RP-B), que poseen efectos fisiológicos diferentes; siendo el RP-A unido a la P₄ un receptor inhibitor de la expresión génica de las células. El objetivo de este estudio fue determinar la localización de los RP-A en muestras de ovario y placentas porcinas provenientes de hembras gestantes de ± 32 días de gestación. Se utilizaron muestras placentarias y ovarios de cerdas mestizas (n=4). Se separó cuidadosamente la porción placentaria fetal de la materna, para la realización de cortes

histológicos. La presencia de los RP-A se realizó a través de inmunohistoquímica mediante la técnica de inmunoperoxidasa indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón (NCL PGR 312: RP-A clone 16 Novocastra, Newcastle, UK). La inmunomarcación de los RP-A se expresó en forma semicualitativa en función de la coloración detectada, determinando que: (-) negativo; (+) baja positividad; (++) positividad intermedia y (+++) alta positividad. Se observó expresión de los RP-A (+) en el citoplasma de las células de la granulosa así como en las células del cuerpo lúteo, mientras que se obtuvo (+++) en el endotelio vascular de los ovarios. En el tejido placentario fetal la inmunomarcación de los RP-A se encontró en la zona apical del epitelio trofoblástico y en el endodermo fetal (+/+++). Mientras que en la porción placentaria materna, las marcaciones se hallaron en las glándulas uterinas (++) y en el miometrio (+++). En conclusión, se identificaron los RP-A durante el período estudiado y se postula que su expresión podría relacionarse con el rol que desempeña la progesterona proveniente de las células luteales durante la preñez porcina.

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa; ²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata; ³Escuela de Veterinaria, Universidad Nacional de Río Negro.

MMP9 expression and localization in llama oviduct

ZAMPINI, R¹; APICHELA, SA^{1,2}; ARGANARAZ, ME^{1,3}; ANGIO, G⁴;
LOMBARDO, D⁴; MICELI, DC^{1,3}.

Metalloproteinases (MMPs) were associated with cumulus expansion, oocyte-espem interaction and semen fluidization. It is unknown whether the camels oviduct synthesize and secrete MMPs. The objectives of this study were determine the MMP9 full gene sequence in llama, study their oviduct expression and localize the protein in different oviductal segments. We worked with female oviducts of nonlactating, nonpregnant llama belonging to CEA-INTA Abra Pampa (Jujuy, Argentina), which were processed to obtain total ARN or fixed in 10% formalin-PBS and embedded in paraffin. To determine MMP9 sequence primer were designed from nucleotic sequence already known of several mammals and from total RNA fragments was amplified, cloned and sequenced by RT-PCR. MMP9 expression levels were studied in ampulla, isthmus, utero-

tubal junction and papilla of the oviduct by gPCR. To locate MMP9 in the llama oviduct immunohistochemistry was performed on 4 oviductal segments with a polyclonal antibody against MMP9 produced in rabbits (1:100 dilutions). In this work we describe for the first time the complete MMP9 sequence in llama and its expression in the oviduct. MMP9 is expressed in the all oviductal segments studied, significant differences in levels of expression weren't detected. Immunostaining stands out in the oviductal epithelium, with changes in the distribution of labeling pattern in different oviductal segments. Overall, the results indicate that llama oviducts produce MMP9, which could be secreted into the lumen, suggesting a possible role in reproductive events taking place in the oviduct.

¹Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (CONICET-UNT). San Miguel de Tucumán. ²Facultad de Agronomía y Zootecnia. UNT ³Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. UNT. ⁴Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. E-mail: sapichela@fbqf.unt.edu.ar

