



UBA

Universidad de Buenos Aires



Facultad de Ciencias
VETERINARIAS
Universidad de Buenos Aires



INITRA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
Y TECNOLOGÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL
Facultad de Ciencias Veterinarias UBA

Libro de Resúmenes

**V JORNADAS INTERNACIONALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA
EN REPRODUCCIÓN ANIMAL (INITRA)**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS – UBA
16 AL 19 DE MAYO DE 2017**

Índice de contenidos

Conferencias plenarias y simposios

Sperm form, function and fertility: patterns of evolution and selective forces. <i>Roldán, E.</i>	57
Male reproductive function and the development of assisted reproduction in endangered felids and ungulates. <i>Roldán, E.</i>	58
Advances in ftai in cattle: duration of proestrus and fertility. <i>Bó, G.A.; De la Mata, J.; Vera Cedeño, A.; Re, M.; Huguenine, E. & Menchaca, A.</i>	59
<i>In vitro</i> fertilization (IVF): research and development in bovine in Argentina. <i>Hiriart, M.I.; Abba, V.; Bonadeo B Lopepe, E. & Tejedo M.E.</i>	60
Progress in bovine oocyte metabolic studies. Oocyte quality indicators for it application in biotechnologies. <i>Gutnisky, G.</i>	61
The endometrium of farm animals as a source of mesenchymal progenitor/stem cells: implications for the treatment of reproductive diseases and for translational applications to humans. <i>Ovidio Castro, F.; Cabezas, J.; Lara, E.; Rojas, D.; Ramírez, G.; Navarrete, F.; Pacha, P.; Veraguas, D.; Velásquez, A.; Pailamilla, N.; Navarro, A.; Omón, C.; Saravia, F & Rodríguez, L.</i>	62
Andean condor conservation program. <i>Jacome, L. & Astore, V.</i>	63
Reproductive biotechnologies in wild felids. <i>Moro, L.N.; Hiriart, M.I.; Buemo, C.; Jarazo, J.; Sestelo, A.; Veraguas, D.; Rodriguez Alvarez, L. & Salamone, D.F.</i>	65
<i>In vitro</i> embryo production in sheep: a useful tool for farming and bench. <i>Menchaca, A.; Dos Santos Neto, P.C. & Barrera, N.</i>	66
Reproductive experiences in artificial insemination and embryo transfer in sheep and goats in patagonia. <i>Gibbons, A.E.</i>	67
Refrigeration of Llama's embryos. <i>Trasorras, V.L. & Miragaya, M.H.</i>	68

Biología de la reproducción

Morfometría e histoquímica de oviductos de alpaca (<i>Vicugna pacos</i>). Diferencias pre y postovulación en hembras inducidas con buserelina y servicio natural. <i>Angiono, G.M.; Fernández Fernández, F.; Reategui Ordoñez J.; Pacheco, V.; Olivera Morocho, L.; Boviez, J.D.; Apichela, S.A. & Lombardo, D.M.</i>	71
Caracterización de un cultivo de células epiteliales oviductales porcinas como modelo para el cocultivo con embriones porcinos producidos <i>in vitro</i> . <i>Bertonazzi, A.; Lorenzo, M.S.; Teplitz, G.M.; Maruri, A. & Lombardo, D.M.</i>	72
Evaluación de la actividad de enzimas relacionadas con el estado redox en gametas porcinas. <i>Breiningen, E.; Pereyra, V.; Paris Duprat, M.L.; Rodriguez, P.; Satorre, M.M.; Alvarez, G.; Gutnisky, C. & Cetica, P.</i>	73
Modificación del test de dispersión de cromatina para la evaluación del ADN espermático equino. <i>Caldevilla, M.; Carretero, M. & Neild, D.</i>	74
Uso de distintas concentraciones de luteína en la conservación de semen porcino. <i>Compagnoni, M.; Tittarelli, C.; Gavazza, M.; Marmuntti, M. & Williams, S.</i>	75
Efecto de la inclusión de luteína según la temperatura y tiempo de conservación en semen porcino. <i>Compagnoni, M.; Tittarelli, C.; Fernandez, V.; De La Sota, L. & Williams, S.</i>	76
Pigmentación testicular en <i>melanophryniscus klappenbachii</i> (Anura: bufonidae). <i>Cuzziol Boccioni, A.P.; Olea, G.B.; Cheij, E.O.; Arias, A.M.; Cespedez, J.A. & Lombardo, D.M.</i>	77
Actividad de isocitrato deshidrogenasa e inhibición de tirosina quinasa en la capacitación con ácido hialurónico y heparina del espermatozoide bovino. <i>Fernández, S. & Córdoba, M.</i>	78
Regulación de la adenilato ciclasa de membrana en la capacitación espermática con ácido hialurónico, su efecto en el metabolismo oxidativo del espermatozoide y del potencial cigoto bovino. <i>Fernández, S.; Morado, S.; Cetica P. & Córdoba, M.</i>	79
The administration of hCG or GnRH induce the formation of accessory corpora lutea. <i>Fernández, J.; Bruno Galarraga, M.; Lacau, I.; Soto, A.; De la Sota, R.; Cueto, M.; & Gibbons, A.</i>	80
Cambios en la actividad mitocondrial inducidos por heparina en el espermatozoide criopreservado bovino. <i>Filosa, A. & Córdoba, M.</i>	81
Efecto de la vitrificación de ovocitos bovinos sobre la competencia de desarrollo embrionario. <i>Gadze, T.; Cetica, P. & Gutnisky C.</i>	82

Evaluación de la movilidad, la vitalidad, la concentración espermática y la integridad acrosomal en espermatozoides de vizcacha (<i>Lagostomus maximus</i>). <i>Giacchino, M.; Rodríguez P.C.; Muscariel Isla, M.L.; Inserra Pif; Lange F.D.; Ferraris, S.R.; Breining, E. & Vitullo, A.D.</i>	83
Rol de la autofagia en la eliminación/sobrevivencia de la célula germinal en el ovario adulto de <i>Lagostomus maximus</i> . <i>Leopardo, N.P.; Velázquez, M.E. & Vitullo, A.D.</i>	84
Ultraestructura de la cáscara de huevo durante el desarrollo embrionario en <i>Mimus saturninus</i> (Aves: Mimidae). <i>Lezcano, D.M.; Olea, G.B.; Cuzziol Boccioni, A.P.; Céspedes, J.A. & Lombardo, D.M.</i>	85
Las células del cumulus como predictoras de la competencia para el desarrollo de ovocitos porcinos tratados con dimetiltiliurea. <i>Lorenzo, M.S.; Cruzans, P.R.; Teplitz, G.M.; Maruri, A.; Tello, M.F. & Lombardo, D.M.</i>	86
Parámetros morfométricos durante el desarrollo postnatal de dos hembras de peludo (<i>ChaetophRACTUS villosus</i>) en condiciones de bioterio. <i>Luaces, J.P.; Barroso Clemente Rocha, I.; Rosseti Picinin Arruda Vieira, B.; Lopes de Souza, E.R.; Saiz, M.Y.; Castelo Branco, F.S. & Iodice, O.H.</i>	87
Eventos tempranos del proceso apoptótico en espermatozoides porcinos expuestos a diferentes concentraciones de glicerol. <i>Malcervelli, D.; Torres, P.; Suhevic, J.; Cisale, H. & Fischman, M.L.</i>	88
Detección del antígeno de proliferación celular KI-67 como predictor del desarrollo <i>in vitro</i> de embriones bovinos. <i>Maruri, A.; Lorenzo, M.S.; Tello, M.F.; Cruzans, P.R.; Teplitz, G.M. & Lombardo, D.M.</i>	89
El uso de moduladores de ampc aumenta la producción y calidad de embriones bovinos. <i>Navarro, M.; Waremkraut, M.; Mutto, A.A. & Blugermann, C.</i>	90
Expresión de caspasa 3 activa durante la meiosis en <i>Columba livia</i> (Aves: Columbiformes). <i>Olea, G.B.; Aguirre, M.V.; Todaro, S.; Stoyanoff, T.R. & Lombardo, D.M.</i>	91
Estudio preliminar de la histología ovárica de <i>Eumops patagonicus</i> (Chiroptera: Molossidae). <i>Rodríguez, F.E.; Olea, G.B.; Argoitia, M.A.; Aguirre, M.V. & Lombardo, D.M.</i>	92
Folículos poliovulares en hembras adultas del peludo (<i>ChaetophRACTUS villosus</i>). <i>Rossi, L.F.; Luaces, J.P.; Aldana Marcos, H.J. & Merani, M.S.</i>	93
Factor de crecimiento nervioso beta (β -NGF) y su receptor trka en el sistema reproductor del macho de llama. Localización en espermatozoides. <i>Sari, L.M.; Carretero, M.I.; Zampini, R.; Fumuso, F.; Barraza, D.; Argañaraz, M.E.; Ratto, M. & Apichela, S.A.</i>	94

Efecto del cocultivo de células luteales porcinas y del medio de cultivo condicionado sobre la maduración nuclear <i>in vitro</i> . <i>Teplitz, G.M.; Lorenzo, M.S.; Cruzans, P.R.; Maruri, A. & Lombardo, D.M.</i>	95
Respuesta a la capacitación de espermatozoides porcinos durante el proceso de enfriamiento. <i>Torres, P.; Malcervelli, D.; Suhevic, J.; Fischman, M.L. & Cisale, H.</i>	96
Variaciones estacionales del peso corporal, circunferencia escrotal y niveles séricos de testosterona en machos caprinos criollos jóvenes en condiciones extensivas de pastoreo en La Rioja-Argentina. <i>Vera, T.A.; Vaninetti, M. E.; Chagra Dib, E.P.; Leguiza, H.D.; Brizuela, E.R. & Matellón, G.F.</i>	97

Reproducción aplicada

Estrategias para mejorar la técnica de aspiración folicular transvaginal ecoguiada en yeguas, con folículos de 10 a 20 mm. <i>Andruet, M.; Ferrante, A.; Santa Cruz, R.; Mertian, J.; Anaya M.; Ivanissevich, S.; Von Meyeren, M.; Pinto, M. & Mutto, A.</i>	101
Determinación del estado redox en ovocitos porcinos vitrificados. <i>Apario, F.; Pinchetti, D.; Cetica, P. & Morado, S.</i>	102
Análisis del colágeno endometrial durante el periodo preimplantacional de la preñez en alpacas (<i>Vicugna pacos</i>). <i>Barraza, D.E.; Apichela, S.A.; Pacheco, J.I.; Lombardo, D. & Argañaraz, M.E.</i>	103
Efecto de un protocolo con GnRH y prostaglandina F2 α sobre la actividad folicular en llamas. <i>Bianchi, C.P.; Simonetti, M.; Benavente, M. & Aba, M.A.</i>	104
El trolox disminuye el porcentaje de espermatozoides precapacitados del semen porcino refrigerado. <i>Camporino, A. & Córdoba, M.</i>	105
Factores relacionados con las yeguas receptoras que afectan la eficiencia en la transferencia embrionaria. <i>Cantatore, S.E.; Bruno, S.; Brust, A. & Fumuso, E.A.</i>	106
Comparison of two freeze-thawing protocols for llama semen: with and without collagenase and seminal plasma in the medium. Preliminary results. <i>Carretero, M.I.; Fumuso, F.G.; Chaves, M.G.; Miragaya, M.H.; Neild, D.M.; Cetica, P. & Giuliano, S.M.</i>	108
Impacto de la endometritis subclínica sobre el intervalo parto-parto en vacas lecheras en pastoreo. <i>Cieslowski, B.; Vega, M.; Frana, E.; Bernardi, S. & Marini, P.R.</i>	109
Optimización de curvas de enfriamiento y congelado para mejorar la preservación del semen ovino. <i>Confalonieri, J.; Suhevic, J.; Malcervelli, D.; Fasolo, P.; Sabrina, R.; Dodds, S.; Carballo, E. & Capdevielle, E.</i>	110

The administration of hCG OR GnRH Induce the formation of accessory corpora lutea. <i>Fernández, J.; Bruno Galarraga, M.; Lacau, I.; Soto, A.; De la Sota, R.; Cueto, M.</i> <i>¿ Gibbons, A.</i>	111
Evaluación de niveles de β -hidroxibutirato en vacas lecheras en transición y su relación con los anticuerpos naturales. <i>Dunleavy, M.V.; Mongiardino, M.E.; Scándolo, D.E.; Maciel, M. Fernandez, B.</i> <i>¿ Mundo, S.L.</i>	112
Correlación entre características externas del estro, cristalización del moco cervical y ultrasonografía folicular, en vacas lecheras, para optimizar el tiempo de la inseminación artificial. Santa Rita de Sigüas, Arequipa – 2016. <i>Fernández, F.; Reátegui, J.; Cuadros, S.; Bernardi, S.; Pacheco, V. ¿ Begazo N.</i>	113
Evaluación de algunos parámetros reproductivos en alpacas (<i>Lama pacos</i>) de la raza huacaya a través de la inseminación artificial con 2-3 siembras y usando un dilutor, en el distrito de Palca, Lampa, Perú. <i>Fernández, F.; Fernán Zegarra, J.; Pacheco, V.; Salas, J.; Borja, J.; Alemán, C. ¿ Torres, R.</i>	114
Efectividad del protocolo ovsynch 56 horas en ganado vacuno (<i>Bos taurus</i>) mestizo en el distrito de Puyca, La Unión, Arequipa. <i>Fernández, F.; Reátegui, J.; Cuadros, S.; Pacheco, V.; Salas, J.; Alemán C.; Torres R.</i> <i>¿ Borja, J.</i>	116
Caracterización biométrica e histológica de los ovarios en alpacas (<i>Vicugna pacos</i>) de Puno, Perú. <i>Fernández, F.; Reátegui, J.; Pacheco, V.; Salas, J.; Borja J.; Alemán C.; Torres, R.</i> <i>¿ Del Carpio, M.</i>	117
Combinación de la tinción azul de coomassie con la prueba hipoosmótica para evaluar espermatozoides equinos y porcinos. <i>Ferrante, A.; Caldevilla, M. ¿ Miragaya, M.</i>	119
El enfrentamiento físico entre machos de llama previo a la extracción de semen no modifica la calidad del eyaculado. <i>Fumuso, F.G.; Giuliano, S.M.; Chaves, M.G.; Neild, D.M.; Miragaya, M.H.</i> <i>¿ Carretero, M.I.</i>	120
Efecto de diferentes sistemas de soporte en la vitrificación de folículos preantrales porcinos contenidos en láminas de corteza ovárica. <i>Gabriel, P.; Fratto, M.C.; Cisale, H.; Lombardo, D. ¿ Fischman, M.L.</i>	121
Importancia de la incorporación de pruebas nucleares en el control de la calidad espermática en el bovino. <i>González, L.O.; Ghirardosi, M.S.; López, M.S.; Ferrari, M.R.; Fischman, M.L.</i> <i>¿ Cisale, H.</i>	122
Transferencia embrionaria quirúrgica y no quirúrgica en porcinos: experiencia inicial. <i>Luchetti, C.G.; Renoulin, E.G.; Salamone, D.F. ¿ Lombardo, D.M.</i>	123

La condensación de la cromatina espermática no correlaciona con los parámetros seminales de rutina del eyaculado canino. <i>Monachesi, N. & Carretero, M.I.</i>	124
Viabilidad de embriones bovinos producidos in vitro vitrificados en diferentes estadios de desarrollo. <i>Gómez Oquendo, J.; Matura Mena, D.; Varela Giraldo, E. & Restrepo Betancur, G.</i>	125
Evaluación de especies reactivas del oxígeno en ovocitos porcinos sometidos al proceso de vitrificación-atemperado. <i>Pinchetti, D.; Aparicio, A.; Cética, P.; Álvarez, G. & Morado, S.</i>	126
Efecto de la adición de gelatina sobre las características del semen de conejo refrigerado a 15° c durante 24 y 48 h. <i>Puente, M. & Tartaglione, M.</i>	127
Uso de cloprostenol para la interrupción de gestación canina. <i>Sánchez Riquelme, A. & Arias Ruiz, F.</i>	128
Relación entre il-1b, $\alpha\text{v}\beta 3$ y fibronectina durante la gestación porcina. <i>Vélez, C.; Williamson, D.; Clauzure, M. & Koncurat, M.</i>	129

Conferencias plenarias y simposios

Sperm form, function and fertility: patterns of evolution and selective forces

EDUARDO ROLDAN

Males exhibit an enormous diversity in reproductive traits. For example, they display wide variation in testes mass relative to body mass, in testis architecture and also in kinetics of the spermatogenic cycle. These differences translate into variations in relative sperm numbers. Males also show wide divergence in the morphology, size and function of spermatozoa. Sperm numbers and sperm design, which are key determinants of fertility, are likely to be under the influence of selective forces and modes of gamete transport and fertilization. Competition between spermatozoa from rival males takes place when females mate with two or more males in the same receptive period. Sperm competition to gain fertilizations has been shown to represent a powerful selective force influencing male's reproductive biology including sperm traits. A general response to sperm competition is an increase in the number of sperm produced and transferred to the female tract. An overall improvement of sperm quality (e.g., high

percentages of motile and normal spermatozoa) is also widely observed. Sperm swimming velocity, which is crucial to negotiate barriers in the female tract, reach the site of fertilization and penetrate ovum vestments, is strongly related to the intensity of sperm competition. The velocity of spermatozoa is influenced by several factors, namely the morphology of the sperm head, sperm dimensions (the longer the sperm, the faster their speed) and ATP levels (required to fuel cell propulsion), all of which are influenced by sperm competition. Genes coding for proteins involved in reproduction are also under strong selective pressure. Among these genes, protamines are important for chromatin condensation and, thus, for determination of head morphology. Rodents and primates have two types of protamines (PRM1 and PRM2) and the proportion between them seems crucial for normal sperm formation. Sperm competition influences evolution and regulation of these genes but in a very complex way.

Male reproductive function and the development of assisted reproduction in endangered felids and ungulates

EDUARDO ROLDAN

Among endangered species it is important to assess the impact of inbreeding on reproduction, to develop methods to bank genetic resources, particularly gametes and embryos, and to develop assisted reproductive techniques to facilitate genetic management. Inbreeding is known to cause deleterious effects upon reproduction and survival. The relation between inbreeding, heterozygosity, and reproductive fitness has been scarcely studied in endangered populations and there is considerable debate as to whether inbreeding (determined from pedigrees) or marker heterozygosity (calculated from microsatellites) better reflect inbreeding depression. In our experience, in captive breeding programmes of critically endangered Mohor gazelle and the Iberian lynx, marker heterozygosity (but not inbreeding coefficient) was associated with semen quality (proportion of normal sperm in the ejaculate). Thus, examination of heterozygosity-fitness correlations was found to be an effective way to detect inbreeding depression, particularly if the pedigree does not accurately reflect the history of inbreeding. We have also analyzed, among endangered gazelles, the relationship between inbreeding and sperm DNA integrity, and whether levels of sperm DNA fragmentation are associated with semen quality. There was an extremely high prevalence of sperm DNA damage in two gazelle species with high levels of

inbreeding (*Gazella cuvieri* and *G. dama mhorr*) when compared to a species with low levels of inbreeding (*G. dorcas*), and to values previously reported for outbred populations. Increased DNA damage in sperm was associated with increased sperm head abnormalities and poor motility. The deleterious effects of inbreeding upon the paternal genome likely decrease male fertility and may cause genetic damage to future generations. Furthermore, sperm DNA damage may influence offspring survival; this possibility has not been explored before. We therefore examined maternal, paternal and individual factors that may influence offspring survival in the species of endangered gazelles with a very high inbreeding levels (*G. cuvieri*). We found that sperm DNA damage had an important impact upon offspring mortality with a significant interaction between this variable and maternal factors, so that offspring born to primiparous mothers were more likely to die if their father had high levels of sperm DNA damage. As part of our effort to develop semen evaluation protocols and assisted reproduction methods we have characterized, for both gazelles and the Iberian lynx, techniques for in vitro fertilization and artificial insemination. We have also developed methods of xenotransplantation of testicular tissue for the generation of spermatozoa from males that die before reaching reproductive maturity.

Grupo de Evolución y Biología de la Reproducción, Museo Nacional de Ciencias Naturales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, España.

Advances in FTAI in cattle: duration of proestrus and fertility

GABRIEL A. BÓ^{1,2}, JAVIER DE LA MATA³ ANDRES VERA CEDEÑO³, MARTIN RE³, EMILIO HUGUENINE³
& ALEJO MENCHACA⁴

Fixed-Time Artificial Insemination (FTAI) has been considered the most useful method to increase the number of cows inseminated in bovine herds. The main treatments are based on the use of GnRH or estradiol and progesterone (P4) to synchronize follicular waves and ovulation, with a mean pregnancy rate (P/AI) of about 50% in beef cattle. However, it has been reported that newer protocols based on GnRH (termed 5-d Co-Synch) or estradiol (termed J-Synch) which reduce the insertion period of the device with P4 and extend the period from removal of the device to the time of FTAI may result in higher P/AI rates. The proposed hypothesis is that the implementation of a FTAI protocol that is characterized by the prolongation of proestrus and the reduction of the insertion period of the device with P4 increases pregnancy rates compared to a conventional treatment due to the ovulation of a more estrogenically active follicle with a competent oocyte and whose embryo is going to develop in a favorable uterine environment. In studies performed in USA with beef cows and heifers, a 5-d Co-Synch protocol (with a P4 device) and FTAI at 72 h resulted in higher P/IA than a 7-d Co-Synch (with a P4

device) protocol and FTAI at 60 h. In 2012, a new treatment was developed called J-Synch, which was based on the use of estradiol and a P4 device inserted for a period of 6 days instead of 7 or 8 days as in conventional treatments with estradiol cypionate; and using GnRH to induce ovulation 72 h after P4 device withdrawal. In dairy heifers, although in all replicates P/IA was numerically higher in the groups with prolonged proestrus (J-Synch: 120/185, 64.9%, Co-Synch 5d: 120/189, 64.6%) than in the conventional group (110/188, 58.5%), differences were not significant ($P>0.1$). However, in beef heifers P/IA was higher ($P<0.01$) in heifers treated with the J-Synch protocol (56.1%, 631/1,125) than those treated with the conventional treatment (50.7%; 620/1,224). In addition, preliminary results suggest that this protocol could be used for FTAI with sexed semen. In summary, the FTAI protocols have facilitated the widespread application of AI in cattle, mainly eliminating the need for estrus detection. Protocols that prolong the proestrus are new interesting alternatives to obtain a few extra points in P/IA, and together with the re-synchronization programs, they facilitate the massive use of AI in breeding programs.

¹ Institute of Animal Reproduction Córdoba (IRAC), Córdoba, Argentina.

² Instituto A.P. Of Basic and Applied Sciences, National University of Villa María, Córdoba

³ Private Activity and Master's Degree in Bovine Reproduction, IRAC-Faculty of Agricultural Sciences, National University of Córdoba, Argentina

⁴ IRAUy Foundation, Institute of Animal Reproduction Uruguay, Montevideo, Uruguay.

***In vitro* fertilization (IVF): research and development in bovine in Argentina**

HIRIART, MI¹, ABBA V², BONADEO B³, LOPEPE E⁴ & TEJEDO ME²

IVF is becoming prevalent in Argentina as one of the techniques of choice when it comes to the production of elite and large-scale embryos in bovine. There are myths and commercial realities that must be of public knowledge to interact in a market that needs the application of embryonic biotechnologies, which also include artificial insemination and superovulation and embryo transfer. The purpose of this talk is to provide an integrated overview of the application of animal biotechnology in different areas of the country, to encourage the formation of a greater number of specialized veterinarians and integral commercial programs that directly benefit bovine production in Argentina. In particular, from IHO - in vitro in cattle, we worked in European breeds (Holando, Angus, Hereford, Murray Gray) with fewer oocytes available per session of follicular aspiration and an average production of 3 to 4 embryos per cow, with the exception of More than 6 embryos when a selection of donors is made, fundamental feature to expand the service to commercial breeding. The percentages of pregnancy are greater than 50%, counting with the support of the clients who bet to offer us the best recipients to achieve the best results. In this sense, procedures can be

repeated even weekly, improving oocyte quality and doubling the pregnancy in a short period of time, without the need to stimulate donors or to comply with expensive protocols. The calves are and always were normal and healthy, so it is possible to clear several concerns when you know what you work with. In the same way, promoting the application of technologies such as genomics and sexed semen brings more benefits and efficiency to the technique; while cryopreservation continues with its limitations. At this point, it is where the interaction with superovulation and embryo transfer is crucially important in order to avoid affecting the results at any point. For all of the above, the boom of IVF in Argentina is a fact and, therefore, professionals must be on guard, informed and updated to know how to adapt to the needs of customers and offer the most efficient answers, convinced that reproductive biotechnology is the basis of genetic improvement and the business of all is to achieve the pregnancy of all cows in the country with better embryos, based on comprehensive assessments of production, applying public developments that are the basis for strengthening and uncertainty added value that the world demands.

¹Directora y fundadora de IHO – in vitro en bovinos, Dra. de la Universidad de Buenos Aires, área Cs. Agropecuarias y Lic. en Biotecnología.

²IHO – in vitro en bovinos,

³Responsable técnico y fundador de Centro Genético del Sudeste (CGS), Napaleofú, Tandil, Argentina.

⁴Director técnico y fundador de Centro Genético del Sudeste (CGS), Napaleofú, Tandil, Argentina.

Progress in bovine oocyte metabolic studies. Oocyte quality indicators for its application in biotechnologies.

CYNTHIA GUTNISKY^{1,2}

Embryo *in vitro* production has a great potential in livestock species. However, the rate of *in vitro* bovine embryo production is still deficient being around 40%. This result is still significant lower than the rate of *in vivo* embryo production. Being the factors involved to the low efficiency the great heterogeneity of the oocyte population and the deficiency in competence acquisition that is obtained during maturation. Because of these factors, the ability to identify “high quality” oocytes becomes a real challenge. Metabolic studies during the maturation process allow to know what kind of requirements the COCs (cumulus-oocyte complexes), the fate of metabolites, the energetic metabolism and the way these parameters influence the oocyte maturation process and developmental competence. The COC is considered a morphological - functional complex with a characteristic metabolism, being the cumulus mainly anaerobic and the oocyte aerobic. Cumulus cells energetic metabolism

is based on glucose oxidation through the glycolytic pathway being pyruvate and/or lactate the main products. These metabolites can be catabolized as energetic substrates by the oocyte. Another fate of the consumed glucose can be oxidized through the pentose phosphate pathway (PPP) by the cumulus cells and the oocyte. The glycolytic activity of the oocyte during maturation can be evaluated by glucose uptake and lactate production, while PPP activity can be estimated by the ability to reduce the Brilliant Cresyl Blue stain. Another way to evaluate oxidative activity is using the dual fluorescent stain of Redoxsensor red and Mitotracker green. The obtained results of the cited tests and their relationship with the maturation process will be shown. Considering the requirements and metabolism of the oocyte, non-invasive metabolic studies can be used as markers of oocyte quality to improve blastocyst rates however its application is still in early stages.

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

The endometrium of farm animals as a source of mesenchymal progenitor/stem cells: implications for the treatment of reproductive diseases and for translational applications to humans

FIDEL OVIDIO CASTRO¹, JOEL CABEZAS¹, EVELYN LARA¹, DANIELA ROJAS¹, GHYSLAINE RAMÍREZ¹, FELIPE NAVARRETE¹, PAULINA PACHA¹, DANIEL VERAGUAS¹, ALEJANDRA VELÁSQUEZ¹, NATHALY PAILAMILLA¹, ANDREA NAVARRO¹, CLAUDIO OMÓN², FERNANDO SARAVIA¹ & LLERETNY RODRÍGUEZ¹

Background: The uterine endometrium is a dynamic changing tissue that proliferates, differentiates and sheds on a cyclic basis and it is central to implantation in mammals. Mesenchymal stem cells (MSCs) have been identified in the endometrium of humans, mice and pigs. However scarce information is available for same cells in ruminants or horses. We hypothesized that the endometrium of these animals harbors MSCs, which can be isolated and used for regenerative studies.

Goal: Our research is aimed to demonstrate the presence of MSCs in the endometrium of cycling cows and mares throughout the estrus cycle and during different uterine pathologies such as endometritis and endometrosis, and to compare their main biological attributes with cells derived from other “conventional” tissues such as subcutaneous fat.

Methods: Cattle: biopsies were taken from the endometrium of cows in the follicular, early or luteal phases of the oestrus, as well as from cattle with chronic or acute endometritis according to the criteria of Sheldon et al., 2008. Mares: Uterine endometrial biopsies were taken from fertile mares during the breeding season as well as from barren mares which failed to get pregnant for two years in a row. Independently of the tissue origin, all samples were subjected

to cell disaggregation and expansion, and were searched for the presence of embryonic and mesenchymal markers of stemness both at the mRNA or protein levels, differentiative tri-potency to mesenchymal derivatives, and other cellular attributes of MSCs, such as migration and exosome secretion. To assess our goals, a combination of molecular, cellular and immunological tools was used, including RT-qPCR, induced differentiation and specific staining for each differentiated lineage, immune staining, *in situ* hybridization, exosome isolation and characterization, western blot and microarray analysis linked to bioinformatics.

Results: In short, we identified, isolated and characterized MSCs from the endometrium of ruminants and horses in spite of the physiological and/or pathological conditions. Detailed results will be discussed.

Conclusions: There are MSCs in the uterine tract of farm animals. The implications of these findings for future regenerative therapies in these and other animal models is of great importance.

Acknowledgments: This research has been funded by grants from the Chilean Ministry of Education: FONDECYT-Regular-1110642 and 1150757. Help with sampling by Nicolás Letelier (Fundo Rondador, Cato, Chillán, Chile) and Fabiola Matamala is greatly appreciated.

¹Department of Animal Science. Faculty of Veterinary Sciences. Universidad de Concepción. Avenida Vicente Méndez 595, Chillán, Chile, ²Haras Don Alberto, Los Angeles, VIII Región, Chile

Andean Condor Conservation Program

LUIS JACOME¹ & VANESA ASTORE^{1,2}

For thousands of years, the Andean Condor (*Vultur gryphus*), the largest flight bird in the world, has been honored by indigenous communities in South America who consider it a sacred link between space and men. Once abundant, this emblematic animal, a symbolic link to our past, has been converted, unfortunately, into a conservation challenge. The condors' range has shrunk rapidly in the last hundred years and it was even pronounced extinct in Venezuela in 1965. The Condor is classified as CITES I, is listed as in Danger of Extinction by the USFWS, in addition to being on the IUCN's red list and characterized as Vulnerable by the Secretary of the Environment and Sustainable Development in Argentina. For this reason, in 1991, the Andean Condor Conservation Program (PCCA) was founded in Argentina. The PCCA started by performing genetic studies and documenting the captive condor population in a Latin American Studbook (248 specimens registered) under a cooperative management program. The PCCA developed artificial incubation programs and techniques for raising the birds in isolation from human contact and worked to rescue and rehabilitate wild condors. In relation to the breeding program, 63 chicks have hatched, four (6%) of which did not survive the first few months of life. Of the remaining 59 (94%), two were transferred to ex situ conservation programs, two were born in 2016 and are being bred to be released during 2017 and 55 were reintroduced in South America. On the other hand, the PCCA's Rescue and Rehabilitation

Center (CRCA) receives condors that have been victims of hunters, injured in traps or poisoned by the illegal use of toxic baits, or that have collided with high-tension wires or fallen into the hands of illegal traffickers. The CRCA, located at the Ecoparque Buenos Aires, works to facilitate the rescue and rehabilitation of wild condors with the aim of releasing them back into their natural environment or integrating them into ex situ conservation plans. The PCCA took part in the rescue of 199 condors. From the breeding and rescue programs, the PCCA has reintroduced 164 condors, 96 individuals with flight experience and 68 condors without flight experience. Within the framework of the Binational Program, the PCCA has succeeded in releasing 28 of those condors in Chile. The PCCA has also participated in the reintroduction of 3 in Colombia, 6 in Venezuela, 3 in Bolivia and 124 in Argentina, resulting in a total number of 164 Andean condors reintroduced in South America.

Post-release tracking and population studies are carried out by the PCCA. The PCCA uses various systems of identification and tracking, including the application of microchips, the use of vinyl wing bands, and radio and satellite transmission. The use and application of these devices makes it possible not only to monitor the movement of the birds across enormous and isolated areas, such as the Andes Mountains, but also enables a better understanding about how the birds use their environment. While breeding and rescue program are a powerful tool, education is key to

¹ Fundación Bioandina Argentina. Juan de Castro 1457 (1406) CABA, Argentina.

² Ecoparque Buenos Aires, República de la India 3000 (1425) CABA, Argentina.

producing a cultural shift in society. The PCCA carries out programs of education with schools, residents and farmers in rural communities, as well as those in big cities, reaching thousands of students and members of the community.

To add to this, the PCCA has published numerous brochures, educational booklets, books, videos, documentaries and educational materials, which are distributed to educational institutions and local communities.

Reproductive biotechnologies in wild felids

L.N. MORO^{1,2}, M.I. HIRIART^{1,2}, C. BUENO^{1,2}, J. JARAZO¹, A. SESTELO³, D. VERAGUAS⁴, L. RODRIGUEZ-ALVAREZ⁴
& D.F. SALAMONE^{1,2}

The extinction of animals is one of the most alarming consequences caused by environmental degradation, and deprives us of unique genetic materials. The *Felidae* family does not escape to this problem and it is for this reason that reproductive biotechnologies become very useful tools for the conservation of these species.

Due to the limited availability of oocytes from wild cats, domestic cat oocytes (DC) were used as an experimental model to develop different reproductive techniques. Thus, our principal objective was to adapt the existing biotechnologies to reproduce and preserve endangered felid species by using DC oocytes.

In our first experiment, we evaluated different conditions of maturation and embryo culture in DC embryos generated by ICSI. Once the ICSI technique was working in the DC, we generated interspecific embryos by injecting cheetah (Ch, *Acinonyx jubatus*) and leopard (Leo, *Panthera pardus*) spermatozoa in DC oocytes. In this experiment, we obtained similar blastocyst rates in both the DC homoespecific ICSI and the interspecific ICSI, without the need of chemical activation after sperm injection.

After that, we studied the somatic cell nuclear transfer (SCNT) in the DC and interspecific SCNT (iSCNT) by using DC oocytes felids and bengal (Be, an hybrid between DC and asian leopard), cheetah y tigre (Ti, *Panthera tigris*) cells as nuclear donors. The aim

was to develop new strategies to improve this technique in the Dc and wild felids. Moreover, the effect of embryo aggregation was also assessed by culturing ZP free reconstructed embryos in microwells, individually (1X), or 2 clones of the same species together (2X, aggregated embryos). In this experiment, we obtained embryos until the blastocyst stage of all the groups. Aggregation improved embryonic development in all the species and the quality of Ti2X and Gd2X blastocysts. Furthermore, the relative expression of genes related to pluripotency and early differentiation (*OCT4*, *NANOG*, *SOX2* and *CDX2*) was studied in Dc, Be and Ch clone blastocysts. This analysis found that aggregated cat embryos normalized their relative levels of gene expression as those of the IVF control.

In conclusion, the ICSI technique represents a method directly applicable to wild felids reproduction, especially when semen samples are of poor quality. With respect to SCNT and iSCNT, DC oocytes were able to reprogram wild felid cells and to generate blastocysts. Furthermore, clone aggregation has shown to improve embryo development in all the groups and to normalize the relative gene expression only in the DC but not in interspecific embryos. The SCNT is an alternative technique to generate animals that are not in good reproductive conditions or that have died and their cells were cryopreserved.

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

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina

³ Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas, Jardín Zoológico de Buenos Aires, Argentina

⁴ Departamento de Investigaciones Animales, Facultad de Veterinaria, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.

***In vitro* embryo production in sheep: a useful tool for farming and bench**

ALEJO MENCHACA, PEDRO C. DOS SANTOS NETO & NATALIBETH BARRERA.

The latest advances in *in vitro* embryo technology in sheep have improved its use in diverse systems and applications. Major developments and some limitations found in our Laboratory are summarized at the INITRA meeting. With the aim to improve the use of live animals as donors for embryo production, hormonal follicular manipulation to enhance oocyte quality for laparoscopic assisted follicle aspiration is discussed. The *in vitro* production (IVP) system used in our Lab, including oocyte maturation, fertilization and embryo culture has been standardized to achieve acceptable and highly repeatable blastocyst rates usually close to 30-40%. However, the main limiting factor of expansion of *in vitro* embryo production is related to the low cryotolerance of IVP embryos, and thus, the need for continuous availability of recipient females. For this reason, new protocols for fixed time embryo transfer (FTET) are discussed avoiding estrous detection and making easier recipient management, facilitating the implementation of this technology on-farm. Relative to the low cryotolerance of IVP embryos, it seems to be partially solved by the novel vitrification methods with minimum volume such as the Cryotop like systems. In a recent experiment, we obtain acceptable pregnancy rate after FTET of IVP blastocysts submitted to vitrification/warming by this minimum volume method, which was around 40% vs. <10% obtained with conventional slow freezing with ethylene glycol. Furthermore, the use of Cryotop method also improved pregnancy outcome of

in vivo derived embryos when compared with conventionally frozen embryos (around 68% vs. 46%, respectively; $P<0.05$). Interestingly, on 453 transferred embryos, IVP vitrified blastocysts using Cryotop method had a similar survival rate (fetuses/transferred embryos) compared with the currently default method using *in vivo* derived blastocysts frozen with ethylene glycol ($P=NS$). This finding suggests that Cryotop could be applied to *in vitro* embryo programs, and also may be interesting for conventional MOET programs. In addition, the optimal number of IVP embryos to be transferred per female is depending on the maternal ability of the breed used as recipients, but in general, in our experience this should be adjusted to obtain no more than one lamb per ewe. Although we found that more embryos transferred per female improved the percentage of pregnant/transferred ewes, multiple embryo transfer did not improve the number of fetuses/transferred embryos. In addition, birth of twins resulted in lower birth weight with reduced lamb survival rate when compared to singleton. As consequence, the number of live lambs from total transferred embryos was greater in singleton births. Along with these enhancements, we use the IVP embryos in our Lab for genetic improvement programs, research projects, and also for the generation of transgenic and CRISPR genome edited sheep. Thus, the latest refinements of *in vitro* embryo technology have enabled its implementation in a wide range of systems, generating great progress for basic and applied science.

Reproductive experiences in artificial insemination and embryo transfer in sheep and goats in Patagonia

GIBBONS, A.E.

Some of the experiences performed in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep and goats by the Reproduction Group of INTA Bariloche will be presented in the lecture. The AI with fresh semen, as well as the possibility of cryopreserving semen, has been a priority research topic since AI was considered as an appropriate technique to disseminate the productive characteristics of high-genetic value males. The information refers to the different types of AI that have been used in the breeding programs carried out by INTA Bariloche in collaboration with breeders associations (Mohair Program-Angora, Provino-Merino). The need to apply AI within a genetic breeding program will be emphasized and a series of indications and suggestions will be considered to successfully carry out this technique. Different alternatives of hormonal treatments for estrus synchronization, semen preservation methods and expected reproductive efficiencies will be presented.

The ET is an assisted reproduction method whose purpose is to obtain multiple offspring of a female donor, with characteristics of high production. Also it allows increasing the reproductive potential of females of high-genetic value by means of a greater use of the large stock of oocytes present in their ovaries. Hormonal stimulation triggers multiple ovulation, resulting in a considerable number of genetically superior embryos, which are transferred to recipient females. It should be noted that an embryo donor can be part of a transfer program in more

than one opportunity, so that it is possible to multiply its reproductive potential by using females of low-genetic value as embryo recipients to carry on gestation. The increase in the commercialization of frozen embryos of sheep and goats demonstrates the importance of this technique as health reinsurance against exotic diseases and as a tool of genetic improvement for animal production. It has also made it possible to generate germplasm banks for the conservation of these species. A number of intrinsic and extrinsic factors will be discussed that are determinants of the rate of ovulation, fertilization, as well as the number and quality of recovered embryos. In summary, the lecture will consider information in the following points: Ovarian stimulation for multiple ovulation. Factors involved in the response to multiple ovulation. Induction of ovulation in recipient females and synchronization of estrus between donor and recipient. Fertilization in the donor female. Collection and transfer of embryos. Selection of donors to achieve high efficiency in the production of embryos. Considerable advances have been made in the last 25 years in the selection of the female donors, through studies that verified the repeatability and recurrence in the ovarian response to superovulation treatments, allowing to increase the reproductive efficiency of ET programs. In spite of these advances, future research will be necessary to reduce the cost per lamb obtained by female donor or frozen embryo to enable the recommendation of its commercial use.

Refrigeration of Llama's embryos

TRASORRAS, V.L. & MIRAGAYA, M.H.

South American Camelids (SACs) are represented by four species, two of which, alpaca (*Vicugna pacos*) and llama (*Lama glama*) are domestic, while guanaco (*Lama guanicoe*) and vicuna (*Vicugna vicugna*) are wild. The domestic and wild camelids played an important role on native inhabitants life of South America. After the European conquest of our continent, SACs population began a prolonged period of decline caused by the hunting of wild species and the replacement of domestic species by cattle, sheep and goats. However, as camelids evolved alongside the Andean and Patagonian ecosystem, they are particularly adapted to areas of poor forage supply and adverse climatic conditions. In addition, these animals are indigenous livestock resources because of their production of meat and fiber. In native countries of SACs, such as Peru, Chile, Argentina and Bolivia, as well as in the United States, Italy and Australia, there is a huge interest around the camelid world. Some of these interests result from the quality of vicuña and alpaca fiber, which are smaller in diameter than the sheep. In other cases there is just curiosity about the reproduction of these species, since they have many distinctive characteristics.

The aim of the application of biotechnological techniques in camelids is to handover these techniques to human groups involved in

this type of production and interested in improving the quality of their animals through ecological-environmental awareness, training and technological advice. Because these species present a long period of gestation, ranging from 335 to 360 days, and only delivered one young per year, the application of biotechnologies to genetically superior females, such as ovarian superstimulation, embryo refrigeration and embryo transfer, would increase the production of a significant number of embryos of high genetic quality, would reduce the generation interval and improve the reproductive efficiency of these species, both domestic and wild.

There are few publications about llama embryos cryopreservation. One of the reasons is the large size that embryos have at the time of their recovery, making techniques such as freezing and vitrification extremely difficult to apply and with limited results. Faced with this reality, refrigeration is a useful alternative, easy to perform and with low cost, apt to be applied in the field. Refrigeration of embryos, regardless of their size, would allow the delay of the recovery-transfer time interval, transport the embryos without the need to have the recipients in the same location and also transport the embryos from the field to the laboratory and then apply freezing or vitrification methods.

Jueves 18 de mayo de 2017

Biología de la Reproducción

Morfometría e histoquímica de oviductos de alpaca (*Vicugna pacos*). Diferencias pre y postovulación en hembras inducidas con buserelina y servicio natural.

ANGIONO, G.M.¹; FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, F.²; REATEGUI ORDOÑEZ J.²; PACHECO, V.²; OLIVERA MOROCHO, L.³; BOVIEZ, J.D.¹; APICHELA, S.A.^{4,5} & LOMBARDO, D.M.¹

El oviducto de los camélidos sudamericanos posee tres regiones, infundíbulo, ampolla e istmo, y la utero-tubárica (UTT) presentando una papila prominente. El objetivo del trabajo, fue analizar características histoquímicas y morfométricas de la mucosa oviductal en alpacas pre y postovulación. Se trabajó con 8 hembras y 2 machos (Centro Experimental UNA, Puno, Perú). Se indujo la ovulación en hembras con folículos de 7-10 mm; 4 hembras recibieron Buserelina 8 µG vía IM y 4 servicio natural. La toma de muestras se realizó entre 12 a 24 h (preovulatorias) y entre 24 a 48 h (postovulatorias).

Los oviductos se fijaron en formol 10% y se procesaron los segmentos ampolla, istmo, UTT y papila para hematoxilina y eosina, tricómico de Mallory, ácido periódico de Schiff (PAS) y azul de Alcian (AA). Se utilizó un microscopio de campo claro (Leica DM 4000B) y los programas de captura y análisis LASZ y QWin Plus 3.0 (Leica Co), respectivamente. Se midió: altura del epitelio de revestimiento y caveolar; profundidad de cavéolas y criptas, proporción de la mucosa. Por histoquímica se analizó: cantidad de células marcadas, patrón de marcación, y ubicación intracelular de la marcación con PAS y AA. Las diferencias estadísticas se establecieron por

ANOVA (test de comparación de Tukey) y Chi Cuadrado ($p \leq 0.05$), para variables cuantitativas y cualitativas respectivamente.

En el istmo, se observaron diferencias en el tipo de epitelio, principalmente cilíndrico en preovulatorias y cúbico en postovulatorias. En la papila de hembras con servicio natural se observaron zonas de erosión epitelial, presentando en el corion gran cantidad de polimorfonucleares e imágenes compatibles con espermatozoides. En istmo, la altura del epitelio caveolar, fue menor en las postovulatorias. No se observaron diferencias en la proporción de la mucosa. Respecto de la cantidad de células PAS (+) predominó el nivel de más de 10 células en preovulatorias, con ubicación intracelular de la marca principalmente en apical e intracelular difusa. Con AA predominó el nivel de 1 a 4 células en postovulatorias. En la papila, el patrón de marcación con PAS mostró mayor variación en postovulatorias. En éste grupo predominó el nivel de más de 10 vesículas PAS (+), mientras que con AA predominó la ausencia de células marcadas en preovulatorias. Estas diferencias histoquímicas y morfométricas en el oviducto de alpacas pre y postovulación podrían justificar cambios en los estadios reproductivos y relacionarlos con eventos fisiológicos que allí ocurren.

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Cs. Veterinarias, INITRA, Argentina. ²UCSM. Laboratorio de Biotecnología Animal. Arequipa, Perú. ³UNA. Facultad Cs. Veterinarias. Puno, Perú. ⁴INSIBIO CONICET – UNT. ⁵UTN. Facultad de Agronomía y Zootecnia. Tucumán, Argentina.

Caracterización de un cultivo de células epiteliales oviductales porcinas como modelo para el cocultivo con embriones porcinos producidos *in vitro*

BERTONAZZI, A.¹; LORENZO, M.S.¹; TEPLITZ, G.M.¹; MARURI, A.¹ & LOMBARDO, D.M.¹

El oviducto interviene en la maduración ovocitaria, el transporte de gametas, la capacitación espermática, la fecundación, el desarrollo embrionario temprano y el transporte de los embriones hacia el útero. Las células epiteliales que tapizan el oviducto sintetizan macromoléculas que son secretadas al lumen junto a proteínas plasmáticas conformando el fluido oviductal y generando un ambiente adecuado para las funciones oviductales. Existen variaciones fisiológicas en el epitelio oviductal según el momento del ciclo estral, influenciadas por la acción de estrógenos y progesterona. El objetivo de este trabajo fue obtener y caracterizar un cultivo primario de células epiteliales oviductales porcinas para ser utilizadas en cocultivo con embriones porcinos producidos *in vitro*. Se utilizaron oviductos de cerdas cuyos ovarios presentaban cuerpos lúteos, a los cuales se les efectuó presión externa suave con portaobjetos, obteniéndose una suspensión celular. La misma se disgregó con jeringa 1 mL y aguja 21G, se pasó por vortex y se dejó decantar en estufa, la operación se repitió 3 veces. La suspensión celular se sembró a una concentración de 3×10^5 células por cubreobjetos de 18 x 18 mm, en placas de cultivo con medio DMEM suplementado con 20% SFB, gentamicina 1000 U/mL y fungizona 1000 U/mL. El medio se renovó a las 72 h de iniciado el cultivo

y luego cada 48 h por 7-8 días. Se obtuvo un cultivo mixto, con células epiteliales oviductales formando monocapa y vesículas esféricas en suspensión. El carácter epitelial se reveló por inmunocitoquímica (ICQ) anti caderina E y por la visualización de cilios en la superficie de las vesículas esféricas, mediante microscopia de contraste de fase. Se observó en la monocapa la presencia de gotas intracitoplasmáticas negativas a la tinción con hematoxilina, la naturaleza lipídica de las mismas se confirmó mediante tinción con rojo Nilo (contraste nuclear con Hoechst) y la observación con microscopio de fluorescencia. La caracterización se completó por ICQ con anticuerpos anti receptores de estrógenos y progesterona. El 6,6% ($\pm 0,06\%$) de las células ($n=1556$) expresó receptores nucleares de estrógenos, mientras que el 43,88% ($\pm 0,017\%$) ($n=1796$) expresó receptores nucleares de progesterona. Los resultados obtenidos hasta el momento serán complementados con la caracterización de la naturaleza epitelioide de las vesículas esféricas por medio de inmunofluorescencia y ensayos de cocultivo con embriones porcinos producidos *in vitro*. La utilización de un sistema de cocultivo de embriones con células oviductales porcinas apuntaría a mejorar los porcentajes de desarrollo embrionario y la calidad de los embriones obtenidos.

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Cátedra de Histología y Embriología.

Evaluación de la actividad de enzimas relacionadas con el estado redox en gametas porcinas

BREININGER, E.^{1,2}; PEREYRA, V.¹; PARIS DUPRAT, M.L.¹; RODRIGUEZ, P.¹; SATORRE, M.M.¹; ALVAREZ, G.^{1,2}; GUTNISKY, C.^{1,2} & CETICA, P.^{1,2}

La biotecnología de la reproducción en la especie porcina, contrariamente a lo observado en la especie bovina, tiene escaso desarrollo, limitándose únicamente al uso de semen refrigerado en inseminación artificial. La utilización restringida de las técnicas biotecnológicas a tareas de investigación o a establecimientos pecuarios que emplean material genético de alto valor se debe principalmente a los resultados subóptimos alcanzados tanto en el congelamiento como en la fecundación y la producción de embriones *in vitro*. En esta especie existen relativamente pocos estudios que demuestren a nivel bioquímico la relación existente entre la actividad enzimática y los procesos conducentes a la adquisición de gametas viables para la fecundación y producción de embriones *in vitro*. Varias son las enzimas que tienen un rol fundamental en el metabolismo de las gametas que requieren NAD(P)/NAD(P)H; sin embargo, la fuente de estos equivalentes de reducción aún no ha sido bien establecida. El objetivo del presente trabajo fue determinar en extractos provenientes de espermatozoides (Z) y complejos ovocitos-cumulus (COCs) porcinos la actividad de enzimas relacionadas con el estado redox: isocitrato deshidrogenasa NADP dependiente (IDH-NADP) y lactato deshidrogenasa (LDH). La actividad enzimática

se determinó por espectrofotometría en extractos de Z provenientes de semen fresco o criopreservados en pajuelas y en COCs. Para la obtención de los extractos, los Z y los COCs inmaduros se resuspendieron en agua destilada, se sonicaron (4 min, 50%), se centrifugaron (17000xg, 20 min, 4°C) y las actividades enzimáticas se determinaron en los sobrenadantes. Las unidades enzimáticas (U) se definieron en función de cada enzima evaluada. Para la IDH-NADP la U se definió como la cantidad de enzima cataliza la reducción de 1 µmol de NAD/min. En la enzima LDH la U se definió como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 µmol de NADH/min. Los resultados se expresaron como media ± SD. La actividad de IDH-NADP fue 8,43±3,89 y 1,20±0,57 U/10¹⁰ Z en Z frescos y criopreservados, respectivamente y 2,81±0,64 x10⁻⁵ U/COC. Para la LDH fue 3,90±0,53 y 0,65±0,09 U/10¹⁰ Z en Z frescos y criopreservados, respectivamente y 1,3±0,4 x10⁻⁴ U/COC. La determinación de la actividad enzimática constituye un punto de partida para la determinación de la participación de diferentes vías en el metabolismo de las gametas porcinas. Dicha información puede ser útil para la formulación de medios de cultivo específicos para ser usados en las técnicas biotecnológicas.

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

Modificación del test de dispersión de cromatina para la evaluación del ADN espermático equino

CALDEVILLA, M.¹; CARRETERO, M.¹ & NEILD, D.¹

En los últimos años existe un interés creciente en incluir la valoración del ADN espermático dentro de la evaluación de rutina de las características seminales, debido a algunos trabajos que correlacionan el grado de daño del ADN con varios índices de fertilidad como tasas de: fertilización, división celular, desarrollo embrionario, implantación, preñez y parición. Sin embargo, las pruebas de evaluación del ADN no se encuentran dentro de las técnicas que comúnmente se utilizan para determinar la calidad seminal, generalmente por la complejidad de las mismas. Existen diferentes métodos para evaluar ADN espermático, uno de ellos es el "Sperm Chromatin Dispersion assay" (SCD) que se basa en la desproteinización nuclear luego de exponer espermatozoides a soluciones de lisis, formando o no un halo de dispersión de la cromatina según la fragmentación del ADN. El SCD es una técnica compleja que requiere del uso de varias soluciones que deben ser preparadas en el momento, lo que alarga los tiempos de realización de la misma. El objetivo de este trabajo fue simplificar la técnica SCD para evaluar la fragmentación del ADN en espermatozoides equinos, utilizando solo una solución de lisis en lugar de dos. Se evaluaron un total de 10 eyaculados de semen equino congelado provenientes de 5 padrillos (n=5, r=2). Para realizar la técnica del halo se utilizó el siguiente protocolo: las muestras se diluyeron con PBS para obtener una concentración final

de 5 a 10 millones de espermatozoides/ml. Luego, se mezcló 40 µl semen con 100 µl agarosa y se colocaron gotas sobre un portaobjetos con agarosa de punto de fusión normal e inmediatamente se cubrieron con cubreobjetos. Se dejaron solidificar 10 minutos a 4 °C, luego los cubreobjetos se retiraron cuidadosamente y los portaobjetos se incubaron con una solución ácida. Posteriormente, un portaobjeto fue incubado sucesivamente en dos soluciones de lisis (protocolo habitual) y otro portaobjeto fue incubado en una única solución de lisis (protocolo simplificado). Finalmente, ambos se deshidrataron en alcoholes (70°, 85° y 96°) y se tiñeron con Giemsa durante 15 minutos. Se observaron 100 espermatozoides con microscopio óptico (1000x). El análisis estadístico se realizó mediante una t de Student apareada. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los porcentajes de espermatozoides equinos con ADN intacto y los espermatozoides equinos con ADN fragmentado entre la técnica habitual ($97 \pm 1,26$ y $2,5 \pm 1,27$ respectivamente) y la versión simplificada ($97,5 \pm 0,97$ y $2,5 \pm 0,98$ respectivamente). Como conclusión podemos decir que es posible simplificar la técnica de SCD en espermatozoides de semen equino, permitiendo acortar los tiempos de realización de la misma, además de reducir los costos. Esto permitiría incluirlo en las valoraciones espermáticas de rutina, contribuyendo a una evaluación seminal más completa.

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

Uso de distintas concentraciones de luteína en la conservación de semen porcino

COMPAGNONI, M.¹; TITTARELLI, C.¹; GAVAZZA, M.²; MARMUNTTI, M.² & WILLIAMS, S.¹

En los últimos años se ha investigado sobre la adición de diferentes antioxidantes (Ax) al diluyente de refrigeración. Algunos autores han trabajado sobre varios tipos de estos compuestos como por ejemplo: alginato, superóxido dismutasa, vitamina E, glutatión, cisteína, hipotaurina y *Rosemary*. Los mismos han logrado determinar las concentraciones apropiadas para maximizar los efectos reductores de los Ax. Dichas sustancias tienen, la capacidad de preservar la calidad espermática al neutralizar la acción de los radicales libres de oxígeno (ROS) sobre las membranas celulares. La luteína es un Ax natural del grupo de los α -carotenos. En trabajos previos, hemos observado que la adición de luteína en el diluyente comercial no ejercería un efecto sobre la calidad espermática durante la conservación, ya que no se han hallado diferencias significativas en ninguno de los parámetros seminales evaluados. Por tal razón, el objetivo de este trabajo fue valorar el efecto de distintas concentraciones de luteína a diferentes temperaturas y tiempos de conservación. Se utilizaron eyaculados provenientes de 2 padrillos (n=5) alojados en sistemas confinados, procedentes de criaderos comerciales de la provincia de Buenos Aires. Las dosis de 6 mil millones diluidas 1:4 con diluyente comercial, se enviaron refrigeradas a 15°C al Laboratorio de Reproducción Animal. Al arribo se evaluaron los parámetros básicos

de calidad: motilidad, vigor, porcentaje de vivos y de morfoanomalías. Posteriormente, se fraccionaron en 6 alícuotas y se incorporó el Ax en diferentes proporciones: 0,15 mg/ml (Ax15) y 0,25 mg/ml (Ax25), quedando el siguiente diseño experimental: 1) a 15°C con Ax15 (I), con Ax25 (II) y sin Ax (III); 2) a 4°C con diluyente de refrigeración, con Ax15 (IV), con Ax25 (V) y sin Ax (VI). Luego del agregado del Ax a 15°C, las dosis se conservaron a 15°C o a 4°C, evaluándose los parámetros básicos de calidad a las 24 y 48 hs. Los datos se analizaron utilizando el procedimiento GLM de SAS®. Si bien los valores obtenidos no mostraron diferencias estadísticamente significativas, se observó que el agregado de Ax en una concentración de 0,15 mg/ml tuvo un efecto beneficioso sobre la motilidad y la viabilidad seminal (porcentaje de espermatozoides vivos) de ambos padrillos en comparación con 0,25 mg/ml, tanto a 15°C como a 4°C durante la conservación. Por otro lado la adición de 0,15 mg/ml de luteína mejoró la calidad seminal respecto al control durante la conservación, en uno de los padrillos. Sobre la base de estos resultados, se puede concluir que la adición de una antioxidante natural, como la luteína, en una concentración de 0,15 mg/ml mejora la calidad seminal durante la conservación, y que este efecto podría estar influenciado por la variación individual.

¹Laboratorio de Reproducción Animal. ²Cátedra de Bioquímica. FCV, UNLP. Calle 60 y 118 B1900AVW, La Plata.

Efecto de la inclusión de luteína según la temperatura y tiempo de conservación en semen porcino

COMPAGNONI, M.¹; TITTARELLI, C.¹; FERNANDEZ, V.¹; DE LA SOTA, L.¹ & WILLIAMS, S.¹

Actualmente, el semen porcino se conserva a 15°C, preservando la calidad seminal por un tiempo finito. En los últimos años, se ha trabajado sobre la etapa de enfriamiento, periodo en el que se producen alteraciones en la integridad de la membrana plasmática. Éstas se deben especialmente a una desestabilización en el sistema antioxidante del espermatozoide. Dicho sistema preserva a las células espermáticas del estrés oxidativo, que afecta su sobrevivencia y capacidad fecundante. El espermatozoide del verraco es especialmente susceptible al daño peroxidativo generado por los radicales libres de oxígeno (ROS), por la alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados presentes en sus membranas. Los ROS se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y están involucrados en las funciones espermáticas fisiológicas. Cuando el equilibrio entre la producción de ROS y su neutralización por parte de los antioxidantes (Ax) se interrumpe, el exceso de ROS crea un estrés oxidativo, que bloquea el metabolismo celular y disminuye la motilidad espermática. La adición de Ax en la refrigeración podría minimizar el daño espermático generado por los ROS. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inclusión de luteína (Ax natural) sobre la calidad seminal, según la temperatura y tiempo de conservación. Se utilizaron eyaculados de 3 padrillos (n=9) alojados en

sistemas confinados, uno proveniente de la Facultad y los restantes de criaderos comerciales de la provincia de Buenos Aires. Las dosis de 6 mil millones diluidas 1:4 con diluyente comercial, se recibieron refrigeradas a 15°C en el Laboratorio de Reproducción Animal. Se evaluó la motilidad, vigor, porcentaje de vivos y de morfoanomalías de dichas dosis para luego fraccionarlas en 4 alícuotas según el siguiente diseño experimental: 1) 15°C con Ax (I) y sin Ax (II); 2) 4°C con diluyente de refrigeración con Ax (III) y sin Ax (IV). Luego del agregado del Ax, las dosis se equilibraron a 15°C o a 4°C, y se procedió a la evaluación de rutina de parámetros de calidad. A las muestras conservadas a 4°C (III y IV) se les realizaron pruebas de funcionalidad de membrana (test hipoosmótico) y de integridad acrosomal (tinción fluorescente) contrastándolas con aquellas conservadas a 15°C sin Ax (II, control). Los datos fueron analizados por el procedimiento GLM de SAS®. El efecto de la inclusión de la luteína según las variables temperatura (15°C y 4°C) y tiempo de conservación (24 y 48 h), se determinó a través de las pruebas rutinarias de contrastación. Si bien los valores encontrados no mostraron diferencias significativas, se observó un efecto beneficioso en la integridad de los acrosomas a 4°C, fundamentalmente en animales con menor calidad inicial. Futuros estudios serán necesarios para ajustar el grado de inclusión del Ax en los medios.

¹ Laboratorio de Reproducción Animal. FCV, UNLP. Calle 60 y 118. B1900AVW, La Plata.

Pigmentación testicular en *Melanophryniscus klappenbachii* (Anura: Bufonidae)

CUZZIOL BOCCIONI, A.P.¹; OLEA, G.B.²; CHEIJ, E.O.; ARIAS, A.M.; CESPEDez, J.A.¹ & LOMBARDO, D.M.³

Las células pigmentarias se hallan distribuidas en el tegumento de los vertebrados. En los anfibios en particular, los melanocitos y melanóforos se concentran entre la dermis y epidermis, y confieren un patrón de coloración especie-específico. Además de las células productoras y acumuladoras de melanina halladas en la piel, se han descripto para ectotermos, células de características semejantes dispuestas en distintas regiones del cuerpo, constituyendo el denominado sistema pigmentario extracutáneo. Se registran células pigmentarias en hígado, riñones y gónadas, de función incierta, aunque se han interpretado en algunos casos como macrófagos con función fagocítica. La pigmentación testicular se ha constatado para algunas especies de anuros, aunque el fenómeno es considerado poco usual. El objetivo fundamental de este trabajo es analizar la pigmentación testicular de *Melanophryniscus klappenbachii* (Anura: Bufonidae). Se colectaron 9 individuos machos en un campo privado en La Leonesa (Chaco-Argentina), durante el periodo de reproducción explosiva. Los ejemplares juveniles (3) y adultos (6) fueron anestesiados y sacrificados siguiendo el protocolo establecido en la Guía para la Eutanasia Animal propuesta por la IACUC. Luego de ser diseccionados, el sistema urogenital fue aislado y fijado en solución de Bouin y conservado en formol 10%. Los testículos fueron analizados morfológicamente mediante lupa estereoscópica, e histológicamente por la técnica histológica

convencional con tinción de hematoxilina-eosina, y PAS. Los resultados revelan una estructura testicular similar a la de otros anuros, con una organización cística de las células sexuales en túbulos seminíferos. No se observó pigmentación en los testículos de los ejemplares juveniles, siendo de color blanquecinos. En el análisis de las gónadas adultas, se registraron diferentes grados de pigmentación entre ejemplares: desde una coloración tenue y dispersa hasta testículos completamente negruzcos. A nivel histológico, las células denominadas por algunos autores como melanomacróforos, se disponen en la túnica albugínea y en el tejido intersticial, también rodeando a los vasos sanguíneos. Se distinguen por un gran tamaño, contorno irregular, y la abundancia de melanosomas. Aunque, su función es aún incierta, se las ha asociado por sus similitudes a las células de Kulpffer, macrófagos del hígado; también se sugiere una relación con la exposición a contaminantes en el medio, mientras que otros sostienen su variación asociada a cambios fisiológicos durante la época reproductiva. Estudios posteriores incluirían un análisis de osteocronología de los individuos que presentan pigmentación para así establecer una correspondencia temporal de la acumulación de pigmentos, lo que revelaría la adquisición gradual del pigmento, ya sea por mecanismos intrínsecos del desarrollo o a causa de contaminantes que puedan acumularse a lo largo del tiempo.

¹Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Laboratorio de Herpetología. ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Medicina. Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas (LIBIM). ³Universidad de Buenos Aires. Facultad de Cs Veterinarias. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA).

Actividad de isocitrato deshidrogenasa e inhibición de tirosina quinasa en la capacitación con ácido hialurónico y heparina del espermatozoide bovino

FERNÁNDEZ, S.¹ & CÓRDOBA, M.¹

La enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH) cataliza la conversión de isocitrato a alfa-cetoglutarato, generando coenzimas NADH o NADPH de acuerdo a su localización intracelular. Estas coenzimas reducidas son necesarias en diversas vías metabólicas en el espermatozoide, una célula metabólicamente activa. Durante la capacitación espermática, requerida para que la gameta masculina adquiera capacidad fecundante, han sido identificadas vías de señalización intracelulares mediadas por tirosina quinasa. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad de las enzimas isocitrato deshidrogenasa dependiente de coenzimas NAD⁺ y NADP⁺ en la capacitación de espermatozoides bovinos criopreservados y en presencia de un inhibidor de tirosina quinasa. El ácido hialurónico y la heparina fueron utilizados como inductores de la capacitación y la genisteína como inhibidor de tirosina quinasa. La actividad de IDH fue determinada por espectrofotometría a 340 nm. La capacitación fue evaluada por la técnica epifluorescente de clortetraciclina y la viabilidad e integridad de membranas por la tinción vital de azul tripán con contraste diferencial interferencial. Los datos fueron analizados por ANOVA y test

de Tukey ($P < 0,05$). La genisteína inhibió la capacitación con ácido hialurónico y con heparina ($14,00 \pm 2,62\%$ y $14,25 \pm 4,06\%$, respectivamente). La actividad de IDH-NAD⁺ en muestras con heparina ($0,12 \pm 0,02$ U/ 10^8 esp $\times 10^{-2}$) evidenció un aumento significativo respecto al ácido hialurónico ($0,07 \pm 0,01$ U/ 10^8 esp $\times 10^{-2}$) y el control sin inductores. En cambio, el ácido hialurónico produjo un aumento significativo de la actividad de IDH-NADP⁺ ($0,60 \pm 0,10$ U/ 10^8 esp $\times 10^{-2}$) respecto a la heparina ($0,18 \pm 0,09$ U/ 10^8 esp $\times 10^{-2}$) y el control sin inductores. La inhibición de la tirosina quinasa en muestras incubadas con ácido hialurónico o heparina produjo una disminución de la actividad de IDH-NADP⁺ con respecto a las muestras capacitadas con cada inductor, mientras que dicha inhibición sólo produjo una menor actividad de IDH-NAD⁺ en las muestras tratadas con heparina. El ácido hialurónico como inductor de la capacitación espermática produce una mayor actividad de isocitrato deshidrogenasa dependiente de coenzima NADP respecto a la heparina, y dicha actividad se encuentra modulada por tirosina quinasa, generando un poder reductor necesario para el mantenimiento del estado redox celular.

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

Regulación de la adenilato ciclasa de membrana en la capacitación espermática con ácido hialurónico, su efecto en el metabolismo oxidativo del espermatozoide y del potencial cigoto bovino

FERNÁNDEZ, S.¹; MORADO, S.¹; CETICA P.¹ & CÓRDOBA, M.¹

Para ser capaces de fecundar al ovocito, los espermatozoides de mamíferos requieren atravesar cambios fisiológicos durante su tránsito por el tracto reproductor femenino conocidos en conjunto como capacitación espermática. Si bien la heparina es el inductor de la capacitación más utilizado *in vitro* en rumiantes, el ácido hialurónico comenzó a ser utilizado como inductor de la capacitación y en otras biotecnologías reproductivas como la selección espermática y la fecundación *in vitro* (FIV). La adenilato ciclasa de membrana (ACm) es una enzima que participa en las señales intracelulares desencadenadas en la capacitación espermática con heparina y ácido hialurónico. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la inhibición de la ACm sobre la capacitación espermática con ácido hialurónico, la actividad oxidativa del potencial cigoto y el porcentaje de clivaje embrionario. Se utilizaron semen congelado/descongelado, el ácido hialurónico como inductor de la capacitación y la 2',5'- dideoxiadenosina (2,5-D) como inhibidor específico de ACm. La capacitación fue evaluada por la técnica epifluorescente de clortetraciclina, la viabilidad espermática por la tinción vital de azul tripán y el consumo de oxígeno espermático fue determinado por

polarografía. La FIV se realizó en medio mSOF adicionado con ácido hialurónico, coincubando complejos ovocito-*cúmulus* con espermatozoides a una concentración final de 2×10^6 células/mL a 39°C y 5% CO₂ en aire humidificado durante 21 h. La actividad oxidativa del potencial cigoto se determinó utilizando Redox Sensor Red CC-1 a las 7 h luego de la FIV. Los datos fueron analizados por ANOVA y test de Tukey ($P < 0,05$). La 2,5-D inhibió la capacitación con ácido hialurónico con respecto a las muestras sin inhibidor ($14,33 \pm 2,34\%$ vs. $24,67 \pm 2,42\%$), sin afectar la viabilidad y el consumo de oxígeno. La actividad oxidativa de los potenciales cigotos fue significativamente menor en las muestras tratadas con 2,5-D ($0,79 \pm 0,38 \times 10^6$ unidades arbitrarias/ovocito vs. $1,22 \pm 0,45 \times 10^6$ unidades arbitrarias/ovocito), sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de clivaje embrionario entre tratamientos. La menor actividad oxidativa de los potenciales cigotos a las 7 h luego de la FIV podría estar relacionada con la disminución en la capacitación espermática observada con el inhibidor de la ACm debido a que la inhibición retardaría la activación del ovocito. Esa disminución, sin embargo, no afectaría el número de embriones clivados.

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

The administration of hCG or GnRH induce the formation of accessory corpora lutea

FERNÁNDEZ, J.¹; BRUNO GALARRAGA, M.¹; LACAU, I.²; SOTO, A.³; DE LA SOTA, R.³; CUETO, M.¹; & GIBBONS, A.¹

The aim of this study was to evaluate the effect of the administration of hCG or GnRH at day 4 post fixed-time artificial insemination (FTAI) on the formation of accessory corpora lutea (acc-CL) and the concentration of serum progesterone (P_4) in sheep. Multiparous adult Merino ewes ($n=36$) were treated for estrus synchronization using two intramuscular (i.m.) injections of prostaglandins (PG, 125 μ g Cloprostenol, Cycloclase[®], Syntex, Argentine) with an interval of 14 days. At 53-56 h after the second PG application, FTAI was performed vaginally with a dose of 100 million spermatozoa of fresh semen. The ewes were assigned randomly to three groups on day 4 post FTAI: GnRH group ($n=12$) received 4 μ g i.m. of GnRH analogue (Buserelin, Receptal[®], Intervet, Argentine), hCG group ($n=12$) received 300 IU i.m. of hCG (Gonacor[®], Ferring, Argentine) and Control group ($n=12$) received 1 ml i.m. of saline solution. Two laparoscopic examinations were performed at day 4 and 10 post-FTAI. In the first observation, we determined the number and distribution of post ovulation corpora lutea (po-CL) and the number and diameter of follicles present in both ovaries. In the second laparoscopy, we observed the number of po-CL and acc-CL. The sizes of the follicles that generated the acc-CL were determined according to the position of the follicles observed in the first laparoscopy. Blood samples were collected from the jugular vein at 4, 7, 10, 13, 17 and 21 days post FTAI. Serum concentration of P_4 was determined

by chemiluminescence (Elecsys[®], P_4 ; Roche, Germany). A similar follicular population in number and size was observed in the three experimental groups before the beginning of treatments (Follicles 2 mm: 6.4 ± 3.7 , 3 mm: 3.0 ± 2.3 , 4 mm: 1.1 ± 0.5 , 5 mm: 1.4 ± 0.8 ; $P<0.05$). The formation of one acc-CL was only observed in GnRH and hCG treated animals ($P<0.05$). The acc-CL induced by the hormonal treatments were generated from follicles of 3, 4 or 5 mm and did not differ between both treatments ($P<0.05$). The hCG group had higher mean concentrations of P_4 on days 7, 10, 13 and 17 post FTAI (4.1 ± 1.3 , 10.5 ± 2.0 , 9.4 ± 1.9 , 7.4 ± 2.1 ng/ml, $P<0.05$) compared with the GnRH group (2.3 ± 1.1 , 5.6 ± 2.5 , 5.6 ± 2.9 , 5.7 ± 1.8 ng/ml) and the Control group (2.5 ± 1.1 , 5.3 ± 4.5 , 2.0 ± 3.2 , 4.8 ± 2.5 ng/ml), while no differences were observed between these two latter groups. Mean P_4 concentrations showed no differences according to the size of the follicle which formed the acc-CL ($P>0.05$). Administration of hCG or GnRH at 4 days post FTAI induced the formation of acc-CL from follicles greater than or equal to 3 mm indistinctly. However, serum concentration of P_4 increased significantly only in the hCG group. Differences in the pharmacodynamics of these two hormones might induce corpora lutea with a different steroidogenic capacity to produce P_4 . Further research should be done to assess the effect of these hormones on the histological and functional characteristics of po-CL and acc-CL.

¹INTA EEA Bariloche. ²IBYME CONICET. ³Facultad de Cs. Veterinarias - UNLP.

Cambios en la actividad mitocondrial inducidos por heparina en el espermatozoide criopreservado bovino

FILOSA, A.^{1,2,3} & CÓRDOBA, M.^{1,2,3}

La heparina (HP) es un glicosaminoglicano presente en el tracto genital de la hembra bovina usado para la capacitación in vitro en dicha especie. Trabajos previos de nuestro laboratorio la vincula con cambios metabólicos, aumento de consumo de oxígeno celular (Burst) y modulación de adenilato ciclasa, tirosina quinasa y proteína quinasa C que favorecen la inducción del proceso espermático. El objetivo de este trabajo es estudiar la variación del potencial de membrana mitocondrial en espermatozoides criopreservados de bovino capacitados con heparina durante 15 minutos en medio TALP. La motilidad y vigor se evaluó por microscopia óptica en platina térmica a 37°C. La capacitación por medio de la coloración epifluorescente de Clorotetraciclina (CTC). La tinción mitocondrial 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-yoduro de tetra-etil-benzimidazolil-carbocianina (JC-1) permite distinguir entre alta y baja proporción de mitocondrias espermáticas activas. Cuando JC-1 se acumula como agregados dentro de la mitocondria, los espermatozoides presentan

coloración rojiza, indicando alto potencial de membrana, mientras que cuando se acumula como monómeros lo hacen en verde (bajo potencial). Dicha evaluación se realizó mediante el uso de un citómetro de flujo BD FACS Canto II con 488 nm de EX y filtros FL1 (EM: 530/30 nm) y FL2 (EM: 585 nm). La emisión verde fue analizada con FL1 y la roja con FL2. Los datos fueron analizados por ANOVA y test de Tukey ($p < 0,05$). Se observó que las muestras tratadas con HP presentaron un incremento del potencial de membrana mitocondrial (50.61 ± 5.44 %) con respecto a su control (24.75 ± 8.88 %) ($p < 0,05$). El porcentaje de capacitación fue 26.50 ± 7.42 % y 5.25 ± 1.50 % ($p < 0,05$), respectivamente. La heparina induce la capacitación provocando un incremento en el potencial de membrana mitocondrial vinculado con el incremento de vías metabólicas oxidativas y con el aumento del burst mitocondrial observados en los espermatozoides criopreservados centrando a la mitocondria como una organela proveedora de energía a la gameta.

¹Cátedra de Química Biológica, Facultad Ciencias Veterinarias-UBA. ²Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal.

³Unidad ejecutora UBA-CONICET de Investigaciones en Producción Animal.

Efecto de la vitrificación de ovocitos bovinos sobre la competencia de desarrollo embrionario

GADZE, T.¹; CETICA, P.^{1,2} & GUTNISKY C.^{1,2}

La vitrificación de embriones bovinos por el método de mínimo volumen Cryotech® da resultados similares a los embriones frescos en cuanto a su viabilidad, calidad y tasa de preñez. Sin embargo se desconoce su efecto sobre los ovocitos bovinos. El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto del proceso de vitrificación-aterperado por el método de Cryotech® de ovocitos bovinos sobre la competencia de desarrollo embrionario. Los complejos ovocito-cumulus (COCs) se obtuvieron por punción aspiración de ovarios provenientes de vacas de faena y se seleccionaron bajo lupa estereoscópica aquellos COCs con cumulus denso y compacto. Los mismos fueron madurados *in vitro* en medio 199 suplementado con suero fetal bovino (SFB), FSH + LH y gentamicina a 38°C y 5 % CO₂ en aire humidificado. Finalizada la maduración un grupo de ovocitos fue denudado mecánicamente mientras que otro se mantuvo con el cumulus intacto. Los ovocitos fueron divididos en tres grupos: un grupo denudado vitrificado-aterperado (V), un grupo control denudado sin vitrificar (C) y un grupo control positivo sin denudar y sin vitrificar (C+).

La fecundación *in vitro* (FIV) se realizó en medio mSOF, suplementado con heparina y albúmina bovina. El desarrollo embrionario se realizó en IVC-mSOF suplementado con SFB en atmósfera humidificada con 5% O₂; 5% CO₂ : 90% N₂. El porcentaje de clivaje fue determinado mediante la evaluación del número de embriones que presentaron 2 o más blastómeras a las 48 horas luego de la FIV. La tasa de desarrollo embrionario fue determinada al día 7 posterior a la FIV estableciendo el porcentaje de blastocistos obtenidos. Los grupos mostraron diferencias significativas en las tasas de clivaje entre si (C+=78,60%; C=56,98%; V=27,40) (p<0,05). El desarrollo embrionario también mostró diferencias significativas entre los tres grupos (C+= 26,4%; C=9,8%; V=0%) (p<0,05). A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que la vitrificación de ovocitos bovinos madurados *in vitro* por el método de Cryotech® afecta su calidad, disminuyendo la competencia de desarrollo embrionario. En el futuro se deberán ajustar los protocolos para poder adaptarlos a la gameta femenina de esta especie.

¹Cátedra de Química Biológica, INITRA (UBA), ²INPA (UBA-CONICET), Facultad de Cs. Veterinarias, UBA. Buenos Aires, Argentina.

Evaluación de la movilidad, la vitalidad, la concentración espermática y la integridad acrosomal en espermatozoides de vizcacha (*Lagostomus maximus*)

GIACCHINO, M.¹; RODRÍGUEZ P.C.^{2,3}; MUSCARSEL ISLA, M.L.¹; INSERRA PIF¹; LANGE F.D.⁴; FERRARIS, S.R.⁴,
BREININGER, E.^{2,3} & VITULLO, A.D.¹

L. maximus es un roedor caviomorfo autóctono de la región pampeana Argentina. Su tasa de fecundación y posterior desarrollo embrionario han sido vinculadas con diversos parámetros microscópicos de los espermatozoides. El objetivo de este trabajo fue analizar en los espermatozoides de vizcacha algunos de esos parámetros: la vitalidad, la concentración espermática, la integridad acrosomal y la movilidad de manera subjetiva y de un modo objetivo utilizando un sistema de análisis seminal computarizado. Se utilizaron 14 machos adultos capturados en período de máxima actividad gonadal (verano y otoño) con pesos superiores a 4,5 kg, a los que se les extrajeron testículos y epidídimos. Los órganos se mantuvieron en solución fisiológica a 38°C y luego se tomaron muestras de testículo, cabeza, cuerpo y cola de epidídimo que fueron disgregadas en 2 mL de PBS. A espermatozoides de cada grupo se les evaluó la vitalidad por la técnica de eosina/nigrosina, la concentración en cámara de Neubauer y la movilidad por microscopía óptica en platina termostatzada y, en 4 muestras obtenidas de cola de epidídimo (pre y post-centrifugación), con un sistema de análisis computarizado. A los espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo también se les evaluó la integridad acrosomal (pre y post-centrifugación) por la técnica de azul tripán combinada con microscopía de

contraste interferencial diferencial (DIC). Los animales capturados en época reproductiva presentaron alta concentración espermática (entre 1.9×10^7 y 3.47×10^8 espermatozoides/mL), pero se diferenciaron dos grupos: machos con alta vitalidad y movilidad (n=6) y machos con baja vitalidad y movilidad (n=8). La vitalidad en espermatozoides obtenidos de cola del epidídimo de machos del primer grupo varió entre 43% y 67% y la mayoría presentaron integridad acrosomal (vivos intactos). En los dos casos más representativos del análisis de movilidad por un sistema de análisis computarizado se encontró un 47% de espermatozoides móviles progresivos previo a la centrifugación. Postcentrifugación disminuyeron todos los parámetros de velocidad y se observó un notable descenso del porcentaje de espermatozoides clasificados como progresivos rápidos. En conclusión, se pudieron analizar los parámetros elegidos en los espermatozoides de vizcacha extrapolando técnicas utilizadas en otras especies. Se demostró correlación entre la movilidad subjetiva y el análisis sistemático computarizado. En época reproductiva encontramos todos los machos con alta concentración espermática pero se diferenciaron dos grupos (“alta vitalidad y movilidad” y “baja vitalidad y movilidad”) en base a los parámetros de vitalidad y movilidad de los espermatozoides.

¹CEBBAD. Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico Universidad Maimónides, CONICET. ²INPA, CONICET. ³Universidad de Buenos Aires, INITRA, Química Biológica. ⁴CIDME. Universidad Maimónides.

Rol de la autofagia en la eliminación/sobrevida de la célula germinal en el ovario adulto de *Lagostomus maximus*

LEOPARDO, N.P.^{1,2}; VELÁZQUEZ, M.E.¹& VITULLO, A.D.^{1,2}

En los mamíferos, la reserva de folículos primordiales presente al nacimiento, representa el total de células germinales disponible para la hembra durante toda su vida reproductiva. Esta reserva se establece por medio de: (1) la colonización de la célula germinal primordial en la gónada indiferenciada, (2) proliferación y formación de oogonias, (3) entrada en meiosis y detención en profase I, (4) formación de folículos primordiales, (5) maduración folicular y (6) ovulación. Durante estos procesos ocurre una extensa degeneración de la célula germinal cuyo significado puede ser atribuido a un proceso de control de selección extrema para preservar los oocitos de buena calidad y maximizar el éxito reproductivo. Esta pérdida masiva ha sido mayormente atribuida a la apoptosis pero está en discusión si la autofagia también estaría involucrada como mecanismo alternativo o concurrente de muerte. *Lagostomus maximus* (*L.m*), vizcacha de las llanuras, es el único mamífero hasta ahora descripto con una baja tasa de atresia folicular mediada por apoptosis tanto en el ovario fetal como en el adulto. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue analizar si la autofagia está involucrada como mecanismo de muerte o sobrevida y su correlación con la apoptosis en el ovario. Un total de 14 ovarios de hembras adultas no preñadas fueron analizados para BECLINA1, LC3BI-II, LAMP1, CASPASA-3 CLIVADA y BCL2 por Inmunohistoquímica (IHQ), Inmunofluorescencia (IF), Western Blot (WB) y Microscopia Electrónica (ME). Se observó una intensa expresión de BECLINA1, LC3B,

LAMP1 (proteínas autofágicas) principalmente en folículos atrésicos (escasos) y cuerpos lúteos (CL) en degeneración, acompañados de una expresión nuclear de CASPASA 3 CLIVADA. En el resto de los estadios foliculares sanos se observó leve expresión de las proteínas autofágicas junto a una intensa expresión de BCL2 (anti-apoptótica) asociados a una autofagia basal. El análisis de WB mostró una diferencia significativa en los niveles de BCL2 y LAMP1 comparado al resto de las proteínas, demostrando escasa muerte celular. Si bien las proteínas analizadas juegan un rol en la autofagia, LC3B-II (observada solo por WB) es la que determina el paso final de autofagia. En este estudio su expresión fue muy tenue/nula en todas las muestras analizadas. La ME reveló la formación de un gran número de autofagosomas y autofagolisosomas en folículos atrésicos y CL. Estos resultados demuestran que el ovario de *L.m* presenta escasa autofagia asociada a apoptosis en aquellas estructuras destinadas a degenerar, mientras que los altos niveles de BCL2 en las estructuras sanas y la baja detección de LC3-II demuestran que se promueve la sobrevida de la célula germinal y que aquellas estructuras que degeneran porque han perdido su función dejarían espacio en el tejido para nuevos folículos en crecimiento y así mantener la alta reserva folicular. Estos resultados sustentan la hipótesis de que el ovario de *L. m* no presenta mecanismos de muerte que agoten la masa germinal, permitiéndole al ovario tener un elevado número de oocitos que sostengan la ovulación masiva característica de esta especie.

¹ Universidad Maimónides- CEBBAD. ² CONICET.

Ultraestructura de la cáscara de huevo durante el desarrollo embrionario en *Mimus saturninus* (Aves: Mimidae)

LEZCANO, D.M.¹; OLEA, G.B.²; CUZZIOL BOCCIONI, A.P.¹; CESPEDez, J.A.¹ & LOMBARDO, D.M.³

La cáscara es la cubierta externa del huevo y tiene como principal función mantener la integridad física del embrión y es una barrera bacteriológica. Está constituida, en gran parte, por una matriz calcárea con un entramado orgánico, en el que el calcio es el elemento más abundante y de mayor importancia. Se encuentran en menores concentraciones en su composición sodio, magnesio, cinc, manganeso, hierro, cobre, aluminio y boro. La misma está atravesada por numerosos poros que permiten el intercambio gaseoso entre el interior y el exterior. Las membranas que recubren el interior de la cáscara son tres: membrana fibrosa interna, la membrana fibrosa intermedia y la membrana de depósito externa. La membrana interna tiene una fina estructura de fibras de queratina entrelazadas fuertemente, esto último es lo que la diferencia de la membrana intermedia que es de fibras menos compactas. La membrana externa es de depósito calcáreo, el cual se deposita sin seguir un patrón particular y es mucho más porosa que las otras dos membranas. El conocimiento sobre la ultraestructura de la cáscara de los huevos de las aves contribuye a una visión exhaustiva de su fisiología y sobre los procesos que se dan entre el huevo y el ambiente. Si bien abundan los estudios sobre la ultraestructura de la cáscara en aves, en su gran mayoría los mismos se han realizado en especies con patrón de desarrollo precoz, siendo para las de patrón altricial escasa dicha información. El objetivo del presente trabajo es describir durante el desarrollo embrionario la variación

de la ultraestructura de la cáscara de los huevos de *Mimus saturninus*, especie con patrón de desarrollo altricial, perteneciente al orden Passeriformes, familia Mimidae. Se realizó un análisis morfológico de la cáscara de huevos de *Mimus saturninus* a través de microscopia electrónica de barrido (MEB) de un total de 45 secciones transversales, dorsales y ventrales correspondientes a una serie ontogénica de 15 huevos en distintos estadios del desarrollo incluyendo cáscaras correspondientes a la eclosión de los neonatos. El análisis de MEB permitió evidenciar que estructuralmente, las cáscaras se componen de una capa externa calcárea, una capa interna orgánica fibrosa y una capa limitante interna que está en contacto con el vitelo. Las mismas durante el desarrollo embrionario disminuyen en su grosor y exhiben mayor grado de compactación. A su vez, están vinculadas estrechamente a las membranas extraembrionarias. También pudo observarse un grado de porosidad en aumento en la membrana externa, debido al incremento exponencial de los procesos metabólicos del ave en formación y que requieren de un intercambio gaseoso y de vapor de agua cada vez más activo. La información obtenida servirá de base para realizar un análisis de la absorción de calcio y establecer una relación entre el nivel de calcio que consume la especie y el grado de diferenciación del esqueleto en especies con patrón de desarrollo altricial y compararlos con los descriptos por otros autores en especies precoces.

¹UNNE, Facultad de Cs. Exactas y Naturales y Agrimensura. Laboratorio de Herpetología. ²CONICET – UNNE - Facultad de Medicina. Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas (LIBIM). ³UBA, Facultad de Cs Veterinarias. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA).

Las células del *Cumulus* como predictoras de la competencia para el desarrollo de ovocitos porcinos tratados con dimetiltiourea

LORENZO, M.S.¹; CRUZANS, P.R.¹; TEPLITZ, G.M.¹; MARURI, A.¹; TELLO, M.F.¹ & LOMBARDO, D.M.¹

Las condiciones isquémicas a las que están expuestos los ovarios de faena y la producción de especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO) durante la reoxigenación al momento de la aspiración folicular, inducirían apoptosis y podrían dañar la calidad ovocitaria. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la dimetiltiourea (DMTU) como suplemento en el medio de recolección y búsqueda de los complejos *cumulus* ovocito porcinos (COC) sobre la apoptosis en las células del *cumulus* y la competencia para el desarrollo ovocitario *in vitro*. Los COC se obtuvieron por aspiración folicular; el medio de aspiración y lavado en el control fue TCM 199 suplementado y en los tratamientos se agregó al medio 2 mM de DMTU (tto 2mM) o 20 mM de DMTU (tto 20mM). Luego de la maduración *in vitro* (MIV) se determinó el porcentaje de maduración nuclear por tinción de los ovocitos desnudos con Hoechst 33442 (n= 357). Luego de la fecundación *in vitro* (FIV) con semen fresco de fertilidad probada, los presuntos cigotos se tiñeron con Hoechst 33342 para evaluar los porcentajes de penetración espermática, monospermia, formación de pronúcleo masculino (PNM) y eficiencia de la FIV (n= 260). En las células del *cumulus* post MIV se realizó citometría de flujo luego de la tinción con anexina V-IP para evaluar apoptosis y viabilidad (n= 90000).

Se determinaron diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$. No se observaron efectos sobre los porcentajes de maduración nuclear. El tratamiento con DMTU aumentó significativamente la penetración espermática (de 35,06% en el control a 72,91% en el tto 2 mM y 67,81% en el tto 20 mM) sin modificar la monospermia. Si bien en los dos tratamientos la cantidad de PNM fue siempre mayor al control, los porcentajes de formación de PNM no mostraron diferencias significativas. El tto 20 mM aumentó significativamente la eficiencia de la FIV, de 22,23% en el control y 31,92% en el tto 2mM a 45,69%. En las células del *cumulus* de los grupos tratados, se observó un aumento significativo de la viabilidad y una disminución de la apoptosis temprana. La apoptosis tardía disminuyó en el tto 20 mM en comparación con los otros grupos experimentales. Las células del *cumulus* constituyeron una población útil para predecir el efecto de la DMTU sobre los ovocitos. La evaluación de la competencia ovocitaria de forma indirecta, a través de la viabilidad, apoptosis y/o calidad de las células del *cumulus* constituye un método no invasivo interesante. El agregado de DMTU durante la recolección y búsqueda de COC resulta útil para disminuir el daño provocado por la apoptosis mediada por especies reactivas del oxígeno en las células del *cumulus* y optimizar el desarrollo *in vitro* de ovocitos porcinos.

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Cátedra de Histología y Embriología.

Parámetros morfométricos durante el desarrollo postnatal de dos hembras de peludo (*Chaetophractus villosus*) en condiciones de bioterio

LUACES J.P.^{1,2}, BARROSO CLEMENTE ROCHA I.², ROSSETI PICININ ARRUDA VIEIRA B.², LOPES DE SOUZA E.R.²,
SAIZ M.Y.², CASTELO BRANCO F.S.²& IODICE O.H.³

Debido a los hábitos nocturnos, esquivos y fosoriales de las poblaciones de *Chaetophractus villosus* el estudio de ciertos parámetros biológicos es difícil de realizar en la naturaleza. El conocimiento de la ontogenia es esencial para la comprensión de la biología de una especie y su estudio en condiciones de bioterio permite una obtención precisa y sistemática de datos y parámetros asociados al desarrollo ya que se realiza en ambientes controlados. Se realizó un apareamiento programado de parejas de la especie *C. villosus* alojados en el Bioterio de la Universidad de Morón. Los animales utilizados fueron capturados en la localidad Lucas Monteverde, Pcia de Buenos Aires. Los ejemplares capturados fueron mantenidos en cuarentena (por un período no menor a 10 días). Durante el periodo de aislamiento les fue administrado en forma preventiva antibiótico vitaminado (Clorhidrato de oxitetraciclina 2,5 g/l en el agua de bebida), y también un antiparasitario inyectable (levamisol 5,7 mg/kg y praziquantel 5,5 mg/kg) con repetición a los 15 días, luego fueron incorporarlos al resto de la colonia. El protocolo sanitario fue repetido cada 6 meses. Fueron mantenidos en recintos circulares de plástico de 90 cm de diámetro por 80 cm de altura con piso desmontable para facilitar su higienización. Las condiciones macroambientales fueron controladas con un fotoperiodo coincidente con la luz exterior vigente y una temperatura de entre 20 y 25 °C. Se utilizó viruta irradiada como material absorbente que fue cambiada

dos veces por semana. Tuvieron acceso a agua y comida *ad-libitum*, se utilizó alimento para caninos cachorros de calidad premium (con una composición mínima de 31% de proteína, 20% de grasa y 5% de fibra) suministrado diariamente a las 12:00 pm. Una vez iniciada la estación reproductiva para esta especie, en el mes de Agosto, se controlaron diariamente los recintos verificando eventos de copula y registrando el nacimiento de dos ejemplares hembra en uno de ellos al cabo de 140 días de iniciada la estación reproductiva. Se registraron desde el nacimiento sus pesos dos veces por semana y se tomaron medidas morfométricas una vez por semana. Fueron destetadas artificialmente al día 40 ya que al día 33 comenzaron a comer alimento sólido. Luego se les suministró el mismo alimento *ad-libitum*, pero para razas pequeñas. Al nacimiento el registro del peso fue de 135,45±13,93 g, el largo de cabeza de 4,18±0,09 cm, el ancho de cabeza de 2,79±0,01 cm, el largo de cuerpo de 13,46±0,22 cm, el largo de cola de 5,73±0,01 cm, el diámetro de cola de 1,40±0,04 cm, el largo de oreja de 1,03±0,08 cm y el largo de uña de 0,90±0,03 cm, estos parámetros registraron una ganancia de aproximadamente 1891%, 239%, 303%, 190%, 217%, 213%, 257% y 289% respectivamente durante el los 120 días del periodo de estudio. Los datos obtenidos en cautiverio permitirán establecer y correlacionar parámetros de edad de animales crecidos en condiciones de bioterio que permita extrapolar a estudios de esta especie en la naturaleza.

¹Laboratorio de Biología Cromosómica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. ²Cátedra de Genética Humana, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Morón. ³Instituto de Neurociencia, Facultad de Medicina, CONICET-Universidad de Morón.

Eventos tempranos del proceso apoptótico en espermatozoides porcinos expuestos a diferentes concentraciones de glicerol

MALCERVELLI, D.¹; TORRES, P.¹; SUHEVIC, J.¹; CISALE, H.¹ & FISCHMAN, M.L.¹

Los agentes crioprotectores minimizan los daños que sufren los espermatozoides (Z) durante la criopreservación. El glicerol (GLY) es un crioprotector penetrante que difunde a través de la membrana plasmática, reemplazando el agua intracelular y evitando la deshidratación celular. Si bien en porcinos es el crioprotector más empleado, el GLY puede generar daños si se adiciona a temperaturas superiores a los 5°C y presenta efectos tóxicos dosis-dependiente. El objetivo de este trabajo fue determinar si el GLY presente en el diluyente de congelación modifica el índice apoptótico respecto al obtenido en espermatozoides refrigerados a 5°C. Se recolectaron eyaculados de 3 verracos híbridos estabulados en la FCV-UBA, por la técnica de mano enguantada. Los eyaculados fueron transportados al laboratorio atemperados a 37°C, fueron estabilizados durante 15 min en baño termostático y diluidos con diluyente de refrigeración (relación 1/2). Luego de su estabilización a 20°C durante 20 min, se confeccionó un pool seminal que se mantuvo a 17°C durante 18 h. Pasado este tiempo, el pool se centrifugó a 800 g por 15 min y el pellet se resuspendió en el diluyente de precongelado (lactosa 11%, yema de huevo 20% y Equex 1,13% vol total), hasta alcanzar una concentración de 2×10^9 Z/ml. Se estabilizó a 17°C durante 1 h. Luego se disminuyó la temperatura hasta 5°C a una velocidad de 1°C/3 min. Alcanzada dicha temperatura, se estabilizó durante 1 h. Se tomaron 3 alícuotas y se diluyeron (relación 1/2) con los diferentes diluyentes de congelación (Control

(C) 0% GLY, A 2% GLY y B 3% GLY). Las alícuotas se incubaron durante 10 min. Se evaluaron los siguientes parámetros: movilidad espermática (contraste de fase), integridad de la membrana plasmática (CFDA/PI) y acrosomal (contraste de fase), funcionalidad de membrana (HOS) y apoptosis temprana: translocación de fosfatidilserina (Anexina V-FITC/PI) y potencial de membrana mitocondrial Ψ_m (JC-10) por citometría de flujo. Para determinar diferencias entre los tratamientos se aplicó el test de Friedman ($\alpha \leq 0,05$). Se observó un aumento significativo en el porcentaje de Z con membrana íntegra (C: $69,76 \pm 2,99\%$; A: $71,98 \pm 3,15\%$; B: $73,70 \pm 2,87\%$) y una disminución significativa del porcentaje de Z con bajo Ψ_m (C: $58,09 \pm 7,24\%$; A: $50,70 \pm 5,27\%$; B: $40,19 \pm 3,96\%$) cuando los mismos fueron sometidos al diluyente B. Se evidenció una disminución significativa en el porcentaje de Z en necrosis temprana (A+/PI+), y un aumento significativo de Z viables (A-/PI-) en el diluyente A (A+/PI+: C: $19,48 \pm 3,89\%$; A: $15,16 \pm 2,87\%$; B: $16,84 \pm 2,94\%$. A-/PI-: C: $31,13 \pm 6,39\%$; A: $39,2 \pm 5,58\%$; B: $36,98 \pm 5,16\%$). No se observaron diferencias significativas en la subpoblación de Z en apoptosis (A+/PI-: C: $10,84 \pm 2,62\%$; A: $9,725 \pm 1,99\%$; B: $10,06 \pm 2,32\%$) ni en necrosis (A-/PI+: C: $38,54 \pm 5,68\%$; A: $35,7 \pm 4,89\%$; B: $34,63 \pm 5,71\%$) frente a las diferentes concentraciones de GLY. En conclusión, la suplementación con 3% de GLY sería la más indicada para conservar la función mitocondrial y la integridad de la membrana plasmática y no modificaría el índice de apoptosis temprana.

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. INITRA. Cátedra de Física Biológica.

Detección del antígeno de proliferación celular KI-67 como predictor del desarrollo *in vitro* de embriones bovinos

MARURI, A.¹; LORENZO, M.S.¹; TELLO, M.F.¹; CRUZANS, P.R.¹; TEPLITZ, G.M.¹ Y LOMBARDO, D.M.¹

El desarrollo embrionario es consecuencia de procesos de proliferación y diferenciación celular que se reflejan en los cambios morfológicos y funcionales de los sucesivos estadios. Las metodologías tradicionales de evaluación de la cinética del desarrollo se basan en la observación embrionaria bajo lupa estereoscópica a tiempos definidos. Alteraciones en la proliferación celular pueden bloquear o reducir la velocidad de desarrollo y observarse una asincronía entre los diferentes estadios. La detección del antígeno de proliferación celular Ki-67 se utiliza ampliamente en histopatología tumoral por su valor pronóstico. La marcación del antígeno Ki-67 en embriones bovinos de estadios tempranos podría utilizarse como un parámetro de calidad embrionaria. El objetivo de este trabajo fue detectar la expresión del antígeno Ki-67 en embriones bovinos de día 2 y 7 de desarrollo, producidos en dos sistemas de cultivo con diferente rendimiento, con el fin de determinar su posible utilidad como predictor temprano del desarrollo *in vitro*. Para la producción de embriones, se obtuvieron complejos *cumulus* ovocitos a partir de ovarios de faena, se maduraron *in vitro* durante 22 h e incubaron con espermatozoides durante 5 h. Los presuntos embriones se cultivaron las primeras 48 h en dos sistemas diferentes: en cocultivo con células luteales bovinas (CLB-1) y en medio SOF sin células (control). Luego, en ambos casos se cultivaron en medio SOF hasta el día 8. El desarrollo embrionario se evaluó por observación bajo lupa estereoscópica los días 2 y

8. Se realizó inmunofluorescencia indirecta en embriones segmentados de día 2 y en blastocistos de día 7 de ambos grupos experimentales. Se determinó el índice de proliferación celular (IPC: células Ki-67+/ blastómeras totales) en cada uno de los embriones evaluados. Se utilizó la tinción con Hoechst 33342 para determinar el número total de blastómeras por embrión (NTC). Los embriones se observaron con un microscopio de fluorescencia. Los datos se analizaron estadísticamente considerando diferencias significativas con $p < 0,05$. No existieron diferencias significativas en el porcentaje de segmentación a día 2 (control: 84%, $n = 141$ vs. cocultivo: 83%, $n = 133$), sin embargo, el IPC fue significativamente mayor en el cocultivo (control: $0,13 \pm 0,023$, $n = 54$ vs. cocultivo: $0,48 \pm 0,044$, $n = 65$). Asimismo, el NTC no difirió entre los grupos (control: $8,3 \pm 0,58$ vs. cocultivo: $8,2 \pm 0,55$). El IPC en blastocistos de día 7 no mostró diferencias entre los grupos (control: $0,88 \pm 0,023$, $n = 17$ vs. cocultivo $0,9 \pm 0,014$, $n = 15$), así como tampoco el NTC (control: $76,7 \pm 5,33$ vs. cocultivo: $83,5 \pm 6,77$) a pesar de existir diferencias significativas en el rendimiento de blastocistos entre los grupos (control: 29,8%, $n = 141$ vs. cocultivo: 50,4%, $n = 133$). Se concluye que la detección del antígeno Ki-67 en embriones bovinos de estadios tempranos (día 2) podría utilizarse como predictor temprano de la competencia para el desarrollo *in vitro*. Por otro lado, la determinación del IPC en blastocistos no tendría el mismo valor, al menos en los sistemas de cultivo *in vitro* que fueron utilizados.

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Cátedra de Histología y Embriología.

El uso de moduladores de AMPc aumenta la producción y calidad de embriones bovinos

NAVARRO, M.; WAREMKRAUT, M.; MUTTO, A.A. & BLUGUERMANN, C.

Uno de los puntos centrales de las técnicas de producción *in vitro* de embriones (PIV) es obtener oocitos competentes que logren dirigir el desarrollo inicial de un embrión. Las gametas femeninas obtenidas tanto de ovarios de animales cadavéricos como de aspiración folicular *in vivo*, poseen diferentes grados de competencia. Este es uno de los motivos por los que la PIV es un proceso ineficiente en comparación a la producción de embriones *in vivo*. La maduración prematura del oocito cuando éste es apartado del ambiente folicular, resulta en una pérdida de la capacidad funcional de la maquinaria citoplasmática, la cual es necesaria para dirigir las posteriores etapas del desarrollo embrionario.

Trabajos previos han propuesto un sistema de maduración *in vitro* (MIV) en dos fases que involucra el uso de moduladores de *Adenosin Monofosfato Cíclico* (AMPc). Esta maduración consiste en una primera etapa donde se utiliza un activador de la Adenilato Ciclasa junto a un inhibidor inespecífico de fosfodiesterasas con el fin de retrasar el comienzo de la metafase II (MII); y en una segunda etapa donde se utiliza un inhibidor específico de la fosfodiesterasa 3A y rhFSH con el objetivo de promover la maduración oocitaria en forma sincronizada. De esta forma, al retrasar la reasunción meiótica del oocito, se emulan las vías fisiológicas de la maduración que ocurren *in vivo*, lo cual resultaría en un aumento de la producción y calidad embrionaria.

En este trabajo evaluamos el grado de estrés de oocitos en MII provenientes del tratamiento, analizando transcritos (ARNm) involucrados en vías de plegado de proteínas y apoptosis por PCR en tiempo real. Adicionalmente, analizamos parámetros usuales en un sistema de PIV tales como porcentajes de maduración, clivaje, producción y calidad embrionaria. Por último, se evaluó la calidad citoplasmática de los oocitos tratados mediante el análisis de la actividad mitocondrial a distintos tiempos madurativos.

Se observó que el tratamiento bifásico no produjo cambios significativos en genes marcadores de estrés celular ni en los porcentajes promedio de maduración y clivaje embrionario. Sin embargo, observamos que el tratamiento aumentó significativamente la tasa de producción embrionaria y la calidad de los embriones producidos incrementando los niveles de eclosión, cinética de desarrollo, número de células por embrión, y resistencia a la criopreservación. Además, comprobamos que los embriones derivados del tratamiento fueron capaces de establecer preñeces. Por último, se observó que los oocitos tratados presentaron mayor actividad mitocondrial a las 7 y 15 horas de iniciada la MIV.

En base a estos resultados, podemos concluir que el uso de moduladores de AMPc durante la MIV aumenta la competencia oocitaria, mejorando la calidad citoplasmática y obteniéndose una mayor producción y calidad embrionaria.

Expresión de caspasa 3 activa durante la meiosis en *Columba livia* (Aves: Columbiformes)

OLEA, G.B.¹; AGUIRRE, M.V.¹; TODARO, S.¹; STOYANOFF, T.R.¹ & LOMBARDO, D.M.²

Las caspasas 3, 6 y 7 constituyen el grupo de caspasas efectoras y son las responsables de la fase de ejecución de la apoptosis, sin embargo algunos autores asocian a la caspasa 3 activa con eventos de proliferación y diferenciación celular. En el presente trabajo a fin de establecer el rol de dicha proteína durante los eventos de diferenciación ovárica y meiosis en *Columba livia* (Aves: Columbiformes) se procedió a la detección por inmunohistoquímica (IHQ) de la proteína caspasa 3 activa. Para ello se reveló en preparados histológicos de *C. livia* correspondientes a los estadios (E) 40 a 14 días post-eclosión (dpe) la expresión de caspasa 3 activa, utilizando un anticuerpo anti caspasa 3 activa de Sigma (C8487) producido en conejo en una concentración de 1:600 a 4°C ON y revelados según el protocolo indirecto de “L-streptoavidina biotina”. La expresión de dicha proteína se examinó a nivel cuantitativo a través de Western Blot (WB), para ello se sembró en gel de poliacrilamida al 12% en una cantidad de 40 µg de proteínas por calle. Se corrieron las muestras por 2 hs a 40 mA. La transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm de poro (162-0147 Bio-Rad), se realizó a 40V ON a 4 °C. Se controló la transferencia por tinción con Rojo Ponceau y se conservaron las membranas a -20 °C hasta su incubación con los anticuerpos anticaspasa 3 (Cell Signal Co). Luego del revelado, las membranas se lavaron con PBS y se conservaron a - 20 °C hasta su incubación con

el anticuerpo anti β-actina (control de masa). Las membranas fueron tratadas con NaOH 2N durante 5 minutos para levantar los anticuerpos antes de bloquear e incubar las mismas con anti β-actina, utilizada como referencia de expresión basal de proteínas. Por IHQ dicha molécula se expresó en el ovario izquierdo a partir del E41. Se detectaron células de la línea germinal en la corteza y médula de la gónada izquierda y dispersas en la médula de la gónada derecha. En contraste, las ovogonias dispersas en la gónada derecha, no expresan caspasa 3 activa, lo que indica que estas, en la gónada derecha, no entran en meiosis. La expresión de caspasa 3 activa en las ovogonias en división permite inferir que dicha molécula estaría involucrada durante la ontogenia gonadal en los procesos de división celular. Mediante el WB se detectó un incremento en la expresión de la caspasa 3 a partir del E41, indicando el inicio de la meiosis en este momento. Tomados en conjunto con los resultados de IHQ, estos datos indican que caspasa 3 activa se expresa en los ovarios embrionarios a partir del E41 y su expresión se incrementa gradualmente, y de forma concomitante al incremento de células de la línea germinal que entran en meiosis. Por lo que, caspasa 3 activa no es reguladora clave de la apoptosis en las gónadas de *C. livia* dado que la inmunodetección positiva está asociada a células de la línea germinal en diferenciación.

¹Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Medicina. Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas (LIBIM). ²Universidad de Buenos Aires. Facultad de Cs Veterinarias. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA).

Estudio preliminar de la histología ovárica de *Eumops patagonicus* (Chiroptera: Molossidae)

RODRÍGUEZ, F.E.¹; OLEA, G.B.²; ARGOITIA, M.A.³; AGUIRRE, M.V.² y LOMBARDO, D.M.⁴

Dentro del orden Chiroptera las especies del suborden Microchiroptera son de pequeño tamaño y por ello fueron objeto de numerosos estudios de biología reproductiva. Sin embargo, poco se ha realizado en especies sudamericanas, la especie más estudiada es *Molossus rufus* al cual se lo postula como animal modelo para estudios ováricos. Otra especie es *M. molossus* del cual se describió la morfología de los órganos reproductores. En ambas se observó una particular asimetría morfológica y funcional en los ovarios. *Eumops patagonicus*, es una especie sudamericana que abunda en zonas urbanizadas pero es escasa la información que se cuenta sobre su biología reproductiva. En el presente trabajo se describe la morfología ovárica a nivel histológico de *E. patagonicus* en diferentes estaciones del año. Se realizaron 2 capturas al mes con intervalos de 15 días, desde abril hasta noviembre. En el sitio de muestreo se extendieron redes de niebla próximas a los refugios. Los animales fueron capturados manualmente, fueron anestesiados y eutanasiados, respetando los lineamientos del American Veterinary Medical Association y de la American Society of Mammalogy, para muestrear el tracto reproductor. El material fue procesado siguiendo la técnica histológica convencional y coloración con hematoxilina - eosina. Se analizaron el ovario derecho (OD) e izquierdo (OI), en ambos se distinguió la zona cortical con folículos y la región medular con tejido intersticial glandular (TIG). Se observó que la morfología ovárica es diferente entre OI

y OD siendo el OD de mayor tamaño que el OI. En cuanto a la composición del córtex, en el OI solo se encontraron ovocitos desnudos formando nidos, folículos primordiales y primarios. La región medular resultó escasa. En el OD, tanto en otoño como en invierno se pudo observar toda la secuencia de estructuras de la foliculogénesis. Con respecto al TIG, se encontró en mayor cantidad que el OI pero en menor proporción a lo que se describe para *M. rufus*, en el que forma la mayor parte del ovario. En el OD de una hembra no preñada en invierno pudo encontrarse un folículo biovular. En primavera se analizó una hembra preñada, se observó en el OD un cuerpo lúteo ocupando la mitad del ovario, mientras que el TIG fue escaso. Asimismo, se constató que un único embrión se desarrollaba en el cuerno derecho. Estos resultados preliminares concuerdan con la asimetría ovárica y funcional ya que los folículos del OI no completan su maduración y se vuelven atrésicos en estadios tempranos. Por el contrario, en el OD se pueden observar todos los estadios de la foliculogénesis, comprobándose su funcionalidad al examinar una hembra preñada en la cual el embrión se gesta en el cuerno derecho, encontrándose el cuerpo lúteo en el ovario de este mismo lado. Concluimos de forma preliminar que *E. patagonicus* presenta asimetría ovárica morfológica y funcional al igual que *M. rufus*, pero a diferencia de este posee escaso TIG, aunque para determinar la razón de esta asimetría serán necesarios mayores estudios.

¹CONICET. UNNE, Facultad de Ciencia Exactas y Naturales y Agrimensura. ²CONICET. UNNE, Facultad de Medicina. Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas (LIBIM). ³UNNE, Facultad de Ciencia Exactas y Naturales y Agrimensura. ⁴UBA, Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA).

Folículos poliovulares en hembras adultas del peludo (*Chaetophractus villosus*)

ROSSI, L.F.¹; LUACES, J.P.¹; ALDANA MARCOS, H.J.² & MERANI, M.S.¹

En la mayoría de los vertebrados los ovarios en desarrollo durante la etapa embrionaria se caracterizan por presentar folículos con varios ovocitos. Estos folículos poliovulares (FP), o nidos, se observan, antes del inicio de la meiosis y la disolución de los mismos ocurre en etapas perinatales. En algunos casos se asocia su presencia a alteraciones de la ovogénesis. Por otro lado, la dinámica de la maduración de los folículos es uno de los mecanismos más complejos y desconocidos en vertebrados. En el peludo estos llamativos FP se mantienen durante toda la vida. A fin de clasificar, numerar y verificar la presencia de estos FP y su relación con la dinámica folicular en los adultos se obtuvieron ovarios de *C. villosus* (n=50), representativos de distintas estaciones del año (verano n=8; otoño=15; invierno n=9 primavera n=12). Los ovarios fueron fijados en Formol 10% o en Bouin realizándose cortes seriados de 5 µm en al menos tres ovarios por mes, los que fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina. El análisis de las secciones demostró la mayor cantidad de FP ($505,4 \pm 153,5$) en otoño, siendo esta diferencia

significativa respecto al invierno ($250,0 \pm 75,5$); mientras que, entre la primavera ($116,8 \pm 35,9$) y el verano ($163,0 \pm 34,5$) no se encontraron diferencias significativas. De febrero a agosto primó la presencia de folículos inmaduros en cambio desde agosto a principios de enero fue representativa la presencia de folículos con un único antro muy desarrollado (Antrales) (20/23; tipo 6-8). De agosto a enero 14/23 individuos presentaron cuerpos lúteos, claros indicios histológicos de una fase post-ovulatoria. Los FP se encontraron en todos los ejemplares y en todas las épocas del año. Sin embargo, se observa una relación mayor de FP vs folículos uniovulares en las primeras etapas de desarrollo. El análisis de cortes seriados demostró que en ningún caso un folículo de maduración avanzada se encontraba asociado a un FP. Nuestros resultados muestran que *C. villosus*, se presta como un excelente modelo biológico para entender la biología folicular en los distintos períodos de desarrollo embrionario y en el adulto y como esta puede ser afectada por agentes externos u hormonas naturales.

¹Laboratorio de Biología Cromosómica, Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. C.A.B.A., Argentina. ²Facultad de Cs. de la salud, Universidad de Morón, Buenos Aires, Argentina.

Factor de crecimiento nervioso beta (β -NGF) y su receptor trka en el sistema reproductor del macho de llama. Localización en espermatozoides

SARI, L.M.¹; CARRETERO, M.I.²; ZAMPINI, R.¹; FUMUSO, F.²; BARRAZA, D.¹; ARGANARAZ, M.E.¹; RATTO, M.³
& APICHELA, S.A.¹

Nuestra hipótesis es que el β -NGF del plasma seminal de llama se adhiere a los espermatozoides durante la eyaculación. Nos propusimos: 1- Localizar β -NGF y su receptor TrkA en espermatozoides: I. epididimales (EE), II. eyaculados (EY) y III con reacción acrosomal (RA); y 2- Conocer el origen del β -NGF seminal analizando su expresión en el aparato reproductor masculino. Espermatozoides: El semen se obtuvo por electroeyaculación, bajo anestesia general, de machos de llama adultos de la FCV-UBA. Luego se lavó dos veces en solución fisiológica a 37° C (1:10) (800 x g 10 min). Parte del pellet de espermatozoides fue fijado sobre portaobjetos positivados. El resto fue tratado para inducir RA: los espermatozoides se incubaron 3 hs a 38° C, 100% de humedad y 5% de CO₂ en TALP-BSA 6 mg/ml. Luego, se agregó ionóforo de calcio 5 μ M (A23187) y se incubó 1 h. Se evaluó viabilidad y estado acrosomal con FITC-PNA/PI. Se realizaron frotis que se fijaron en Carnoy para inmunomarcación. Los EE se obtuvieron *post mortem* en Tucumán. Se realizó disección de la cola del epidídimo, lavado de los espermatozoides y frotis. Inmunofluorescencia: Los frotis de EE, EY y espermatozoides con RA se incubaron con Proteinasa K 2% (20 min a 37° C) y luego Tritón X-100 0,3%. Se bloqueó con BSA 1% (30 min a TA). Se incubó con anti- β NGF 1:200 o anti-TrkA 1:100, 3 hs a 37° C

y luego con anticuerpo secundario biotinilado, 1:200 (20 min a TA) y con extravidina-FITC (1:2000). Se observó en microscopio de fluorescencia. RT-PCR: testículo, glándulas bulbouretrales, próstata y cabeza, cuerpo y cola del epidídimo se obtuvieron *post mortem* y se procesaron para extracción de ARN total. El ADNc se obtuvo por transcripción reversa de 1 μ g de ARN con M-MLV y oligodT. Se diseñaron cebadores específicos para β -NGF y TrkA y se realizó PCR con 0,5 μ l de ADNc. Como gen de referencia se empleó β -actina. Los productos se visualizaron en gel de agarosa al 1,5% y se calculó su expresión relativa por ImageJ. Para el análisis estadístico se aplicó ANOVA y test LSD de Fisher mediante InfoStat. Ambas proteínas se localizaron en la pieza media del espermatozoide. Sólo los EE y los espermatozoides RA poseen marca de β -NGF, mientras para TrkA se observó marca en los 3 casos. Se observó expresión génica de β -NGF y TrkA en todo el aparato reproductor siendo mayor en próstata y cabeza del epidídimo para β -NGF. Se concluye que el plasma seminal aportaría el β -NGF al espermatozoide durante la eyaculación. La co-localización de β -NGF y de su receptor indicaría que β -NGF ejerce alguna acción sobre el espermatozoide. La co-expresión de factor y receptor en el aparato reproductor podría indicar que, además de ser secretado, el β -NGF cumple también funciones en el órgano de producción.

¹Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnica-Universidad Nacional de Tucumán) ²Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal. Cátedra de Teriogenología-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina. ³Universidad Austral de Chile

Efecto del cocultivo de células luteales porcinas y del medio de cultivo condicionado sobre la maduración nuclear *in vitro*

TEPLITZ, G.M.¹; LORENZO, M.S.¹; CRUZANS, P.R.¹; MARURI, A.¹ & LOMBARDO, D.M.¹

La producción *in vitro* de embriones porcinos es una biotecnología poco eficiente. La maduración nuclear y citoplasmática no han sido bien descritas en esta especie, y esto se ve reflejado en inconvenientes para la formación de los pronúcleos y la existencia de altos porcentajes de polispermia. La utilización de un cocultivo estandarizado recrearía de mejor forma el ambiente en el cual se desarrollan estos procesos *in vivo*. La elección de células luteales porcinas (CLP) en monocapa para el cocultivo de complejos *cumulus* ovocito (COC) se fundamenta en la producción basal de progesterona (P4), hormona que posee un efecto antiapoptótico y es un mediador en la cascada de la reanudación meiótica. La utilización del medio de cultivo condicionado (MC) por células luteales porcinas se fundamenta en su constitución de componentes biológicamente activos y sintetizados por las células cultivadas. El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto del cocultivo con CLP y MC sobre la maduración nuclear de ovocitos porcinos. Para la obtención del cultivo de CLP y de COC se utilizaron ovarios provenientes de faena. Los COC se obtuvieron por punción-aspiración folicular y luego se maduraron *in vitro* durante 44 h. La maduración *in vitro* (MIV) se realizó en gotas de 100 µL usando en todos los casos como medio base el TCM 199 suplementado con fluido folicular porcino y antibióticos. Los grupos

experimentales fueron: control sin hormonas (C-hMG), control con hormonas (C+hMG), cocultivo con CLP pasaje 1 (CLP-1) y MC. Las CLP-1 se sembraron en una concentración de 2×10^4 cél/mL 24 h previas a la MIV y el MC empleado correspondió a este cultivo. Se evaluaron los porcentajes de maduración nuclear mediante la tinción con Hoechst 33342 (visualizando la placa metafásica) y se consideró significativo un $p < 0,05$. Se observó una diferencia significativa entre el cocultivo y el MC (cocultivo: 72%, $n = 104$ y MC: 59%, $n = 95$). No se observaron diferencias significativas entre el cocultivo y C+hMG (79,5%, $n = 75$) y entre MC y C-hMG (47%, $n = 95$). En base a lo observado, se concluye que la maduración nuclear en cocultivo con CLP-1 es similar a la maduración nuclear con el agregado de hormonas. Y que, la maduración nuclear con MC es similar a la maduración nuclear sin el agregado de hormonas. El uso de MC no ejerce el mismo efecto que el cocultivo, pudiendo suponer (sin descartar la existencia de factores solubles que pueden estar inactivados en el caso del MC), que el contacto directo entre CLP-1 con los COC o la señalización parácrina que se genera podría estar relacionada con el efecto observado. La utilización de este sistema de cocultivo, y no de su MC, permitiría reemplazar el agregado de hormonas a los medios de MIV manteniendo los porcentajes de maduración nuclear.

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

Respuesta a la capacitación de espermatozoides porcinos durante el proceso de enfriamiento

TORRES, P.¹; MALCERVELLI, D.¹; SUHEVIC, J.¹; FISCHMAN, M.L.¹ & CISALE, H.¹

Los espermatozoides (Z) porcinos son muy sensibles al shock por frío. Temperaturas menores o iguales a 5°C desestabilizan la membrana plasmática y provocan eventos similares a los evidenciados durante la capacitación espermática. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta a la capacitación espermática de espermatozoides porcinos durante el enfriamiento hasta 5°C, utilizando el protocolo que se aplica en nuestro laboratorio. Se recolectaron eyaculados de 3 verracos híbridos por medio de la técnica de mano enguantada. Los eyaculados fueron transportados atemperados a 37°C, se estabilizaron durante 15 min en baño termostático, y se diluyeron con diluyente comercial de refrigeración (relación 1/2). Sólo se utilizaron eyaculados con movilidad progresiva superior al 70%. Se mantuvieron a 20°C durante 20 min y posteriormente se confeccionó un pool seminal que se estabilizó a 17°C durante 18 h. Luego el pool se centrifugó a 800 g por 15 min y el pellet se resuspendió en el diluyente de precongelado (lactosa 11%, yema de huevo 20% y Equex 1,13% vol. total), hasta alcanzar una concentración de 2×10^9 Z/ml. Se estabilizó nuevamente a 17°C durante 1 h antes de disminuir la temperatura hasta 5°C a una velocidad de 1°C/3 min y se mantuvo a esta temperatura durante 1 h. Para inducir capacitación, las muestras se incubaron a 39°C y 5% CO₂ durante una hora y media en medio Tyrode (T) y, medio de control (C), (T sin NaHCO₃ ni CaCl₂). La capacitación espermática se evaluó utilizando el fluorocromo Clortetraciclina (CTC). Las evaluaciones se

realizaron a 37°C, 17°C (previo a centrifugar) y 5°C. Se evaluó la respuesta a la capacitación para cada una de las temperaturas. A 37°C, aumentó significativamente el patrón capacitado en el medio T (C: 4,02%±2,03%; T: 12,02%±2,02%). A 17°C y a 5°C no hubo respuesta significativa a la capacitación (Test de Wilcoxon; p<0,05). También se analizó el efecto del descenso de temperatura sobre la capacitación. Aumentó el número de espermatozoides capacitados al llegar a los 5°C encontrándose diferencias significativas (C: 44,1%±7,46%; T: 46,68%±2,99%) con respecto a los 37°C (C: 4,02%±2,03%; T: 12,02%±2,02%) y 17°C (C: 10,71%±6,60%; T: 15,21%±2,89%) en ambos medios (Prueba de Kruskal Wallis; p<0,05). Los espermatozoides capacitados aumentaron en ambos medios al descender la temperatura. En conclusión, en la curva de enfriamiento hasta 5°C de nuestro protocolo de criopreservación, la respuesta al estímulo capacitante dejó de evidenciarse a partir de los 17°C, por el aumento de Z capacitados en el medio control. Los valores más altos de capacitación se observaron a 5°C. El aumento de patrón capacitado en el medio C sería indicador de criocapitación, comenzando a los 17°C e intensificándose al llegar a los 5°C donde los valores superaron el 40%. Los mayores porcentajes podrían deberse a la baja temperatura y a la remoción de factores decapacitantes presentes en el plasma seminal producto de la centrifugación. La capacitación temprana compromete la estructura de la membrana pudiendo provocar un efecto negativo sobre la capacidad fecundante del eyaculado.

¹ Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. INITRA. Cátedra de Física Biológica.

Variaciones estacionales del peso corporal, circunferencia escrotal y niveles séricos de testosterona en machos caprinos criollos jóvenes en condiciones extensivas de pastoreo en La Rioja, Argentina

VERA, T.A.¹; VANINETTI, M. E.²; CHAGRA DIB, E.P.³; LEGUIZA, H.D.³; BRIZUELA, E.R.⁴ & MATELLÓN, G.F.²

La región del Chaco Árido (ChA) cubre aproximadamente 10 millones de hectáreas en la región central oeste de nuestro país. En esta región, la ganadería caprina se alimenta de especies vegetales forrajeras del monte nativo. El manejo reproductivo se caracteriza por la permanencia de los machos caprinos (chivos) de diferentes edades con la majada durante todo el año. La circunferencia escrotal (CE) de chivos de diferentes edades, sufre fuertes variaciones entre las estaciones del año. En tanto que en adultos las variaciones estacionales de la CE y de la concentración plasmática de testosterona (To) acompañando al fotoperiodo, reflejan las variaciones anuales de la fertilidad para la especie. Las pariciones en nuestra región, ocurren hacia fines del otoño e invierno (60 a 65%) y hasta finales de la primavera (35 a 40%). El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la estación del año sobre el peso corporal (PC), la CE y la To en machos caprinos criollos jóvenes criados bajo condiciones extensivas de pastoreo (CEP). El estudio se realizó en el campo experimental “Las Vizcacheras” de la EEA La Rioja del INTA (30°30'28,4''S, 66°07'12,75''W) ubicado en el distrito ecológico del ChA. El PC, la CE y la To se tomaron mensualmente en 9 chivos

Criollo, contando con una edad de 7 meses al inicio y 19 meses al finalizar el ensayo. El PC (kg media-X $\pm$ Error Estándar-EE-) se tomó con balanza electrónica (sensibilidad de 100 gr), la CE (cm X $\pm$ EE) se tomó con cinta métrica graduada en la región de mayor diámetro testicular y la sangre, se colectó individualmente en tubos de hemólisis por venopunción yugular, se separó el plasma y en laboratorio se realizó el dosaje de To (ng/dl X $\pm$ EE), utilizando método inmunoenzimático por competición con detección final en fluorescencia (ELFA) utilizando un kit comercial de bioMérieux. Los datos se procesaron a través de ANOVA, para un modelo lineal, tomando las estaciones como tratamientos y como repeticiones los animales. Las X se compararon utilizando el test de Fisher ($p \leq 0,05$). Se observan variaciones estacionales de PC (invierno-I-: 39,0 $\pm$ 1,53b; primavera-P-: 31,3 $\pm$ 1,53a; verano-V-: 37,2 $\pm$ 1,53b y otoño-O-: 46,9 $\pm$ 1,53c kg), CE (I: 20,8 $\pm$ 0,41a; P: 20,1 $\pm$ 0,41a; V: 24,1 $\pm$ 0,41b y O: 23,7 $\pm$ 0,41b cm) y To (I: 2,0 $\pm$ 0,33b; P: 0,3 $\pm$ 0,33a; V: 5,3 $\pm$ 0,33c y O: 5,9 $\pm$ 0,33c ng/dl). Se concluye que bajo CEP y conforme progresa la edad, las épocas del año influyen sobre los valores de PC, CE y To, siendo la P donde se presentan los menores valores de cada una de las variables.

¹INTA EEA La Rioja. ²U.N.LaR. Sede Chemical. ³INTA EEA Salta. ⁴Actividad Privada.

Viernes 19 de mayo de 2017

Reproducción Aplicada

Estrategias para mejorar la técnica de aspiración folicular transvaginal ecoguiada en yeguas, con folículos de 10 a 20 mm

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

La capacidad de recuperar ovocitos mediante la aspiración folicular transvaginal ecoguiada en yeguas y su posterior maduración *in-vitro*, ha permitido utilizar a los mismos en biotecnologías como la transferencia *in vivo* de ovocitos, ICSI (*Intracytoplasmatic Sperm Injection*) y la clonación. Si bien esta técnica se ha puesto a punto para la obtención de ovocitos de folículos preovulatorios (diámetro ≥ 35 mm), quedan aspectos por mejorar, en lo que respecta al número de lavajes intrafoliculares en la aspiración de folículos $\leq$ a 20 mm. El objetivo del trabajo fue obtener el mayor número de ovocitos realizando hasta 7 lavajes por folículo de 10 a 20 mm. Materiales y métodos: se utilizó un total de 20 yeguas mestizas de entre 5-12 años, que presentaban al menos tres folículos de entre 10- 20 mm al momento de la aspiración. Las yeguas se sedaron con una combinación de detomidina (2,2 μ g/kg) y xilacina (0,3 mg/kg) vía EV, seguida de una anestesia epidural con lidocaína 2% (5-6 ml totales). Además se aplicó butilbromuro de hioscina EV (35-40 mg totales) para una mejor relajación del recto. Se utilizó un

dispositivo de Aspiración Folicular (Watanabe, Tecnología Aplicada Ltda, Cravinhos, Brasil) con transductor microconvexo de 6,5 - 7,5 MHz y aguja de doble vía 12G (V-EOAD-1260L, Cook, Australia) conectada a una bomba de vacío y a una jeringa de 20 ml desde la que se inyecta el medio de aspiración. Los folículos aspirados, independientemente de la yegua, fueron asignados aleatoriamente en dos grupos: folículos a los que se les realizaron de 4 a 7 lavajes (n=52) y folículos a los que se les realizaron de 8 a 9 lavajes (n=46). Los resultados se analizaron mediante una prueba de proporciones. Resultados: no se observaron diferencias significativas ($p= 0,317$) entre el porcentaje de ovocitos recuperados de folículos que fueron lavados de 4 a 7 veces ($25/52= 48\%$) respecto de los folículos que se lavaron 8 a 9 veces ($27/46= 55\%$). En los folículos de entre 10 y 20 mm de diámetro se pueden reducir el número de lavajes sin afectar el porcentaje de recuperación de ovocitos, permitiendo reducir el tiempo de la maniobra.

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

Determinación del estado redox en ovocitos porcinos vitrificados

APARICIO, F.¹; PINCHETTI, D.¹; CETICA, P.^{1,2} & MORADO, S.¹.

Los resultados subóptimos obtenidos en la vitrificación de ovocitos porcinos madurados *in vitro* podrían tener relación con cambios en el estado redox de la célula. En nuestros estudios previos hemos demostrado que la vitrificación causa un aumento en la actividad mitocondrial de los ovocitos porcinos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el estado redox en ovocitos porcinos madurados *in vitro* luego de ser vitrificados y atemperados a través del nivel de reducción u oxidación de las coenzimas NADH y FAD, respectivamente. Los complejos ovocito-cumulus (COCs) inmaduros se obtuvieron por aspiración de folículos ováricos antrales y fueron seleccionados bajo lupa estereoscópica. Se utilizaron ovocitos completamente rodeados por un cumulus íntegro y denso. Los COCs fueron madurados en medio 199 con sulfato de gentamicina, fluido folicular porcino, FSH y LH, bajo aceite mineral a 39°C, 5% CO₂ en aire y 100% de humedad durante 48 hs. Luego fueron denudados de forma mecánica con pipeta Pasteur fina previa incubación con hialuronidasa. Los ovocitos fueron vitrificados (n=100) utilizando crioprotectores permeables (etilenglicol, dimetilsulfóxido), componentes osmóticamente activos (trealosa) y una lámina

fina como soporte para ingresar directamente al nitrógeno líquido (método Cryotech®). Para su atemperado se utilizaron soluciones de trealosa en concentraciones decrecientes en sucesivos pasajes hasta llegar a soluciones isotónicas. La autofluorescencia de las coenzimas NADH y FAD de los ovocitos fue evaluada a las 0, 3 y 21 hs post-atemperado a partir de microfotografías digitales obtenidas con un microscopio de epifluorescencia y las imágenes fueron analizadas con el software IMAGE J. Como control se utilizaron ovocitos que no fueron sometidos al proceso de vitrificación-atemperado. En los diferentes tiempos analizados los niveles de FAD se mantuvieron constantes tanto en el grupo de ovocitos vitrificados como en el control. A su vez, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en los niveles de esta coenzima. Los niveles de NADH no presentaron diferencias significativas dentro de cada uno de los grupos a lo largo del tiempo, sin embargo el grupo vitrificado-atemperado presentó un valor más bajo con respecto al control (p<0,05). Por lo tanto, los ovocitos porcinos vitrificados y luego atemperados parecen tener un mayor estado oxidativo durante el proceso de recuperación respecto a los ovocitos frescos.

¹Cátedra de Química Biológica, INITRA (UBA), ²INPA (UBA-CONICET), Facultad Cs. Veterinarias, UBA. Buenos Aires, Argentina.

Análisis del colágeno endometrial durante el periodo preimplantacional de la preñez en alpacas (*Vicugna pacos*)

BARRAZA, D.E.¹; APICHELA, S.A.^{1,2}; PACHECO, J.I.⁴; LOMBARDO, D.⁵ & ARGANARAZ, M.E.^{1,3}

La receptividad uterina se define como una secuencia temporal única de factores que permiten la implantación embrionaria, la cual se extiende en alpacas durante los primeros 20 días de la preñez. Una particularidad de esta especie es que en el 98% de los casos la implantación del embrión y la preñez se desarrollan con éxito en el cuerno uterino izquierdo (CUI). Se ha descrito que la remodelación y reorganización de las fibras de colágeno uterino es un proceso importante para la implantación del embrión.

Nuestro objetivo fue determinar el contenido de colágeno total (CT), colágeno tipo I (COLI) y tipo III (COLIII) en el endometrio de CUI y cuerno uterino derecho (CUD) de alpacas no preñadas (n= 3) y alpacas con 15 días de preñez (n= 7).

Los CUs se obtuvieron a partir de necropsias de hembras de 2 años. La preñez se confirmó por la presencia del embrión (100% de los casos en CUI), del cuerpo lúteo (42,8% en ovario derecho y 57,2% en ovario izquierdo) y por el dosaje de progesterona. Las fibras de colágeno se identificaron mediante tinción específica con Picrosirius Red (0,1%) en cortes histológicos de CUD y CUI (5µm), previamente fijados en formol-PBS al 10% e incluidos en paraplást. Las muestras se observaron a campo claro para determinar CT (rojo), y bajo luz polarizada para determinar COLI (amarillo a rojo) y COLIII (verde). Se tomaron fotografías teniendo en cuenta los diferentes estratos del endometrio: zona densa (ZD) y zona laxa (ZL). Para la

semicuantificación se utilizó el programa ImageJ 1.51, con el cual se determinó el porcentaje de área relativa coloreada con colágeno (número de píxeles por área) para la ZD del endometrio (5 campos de captura) y para la ZL del endometrio (3 campos de captura). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido del Test LSD Fisher.

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de CT, COLI y COLIII a nivel del endometrio entre CUs de hembras no preñadas, ni entre CUs de hembras preñadas. En general se observa que COLI es más abundante que COLIII.

Se observaron diferencias significativas en el endometrio del CUD entre hembras no preñadas y las hembras preñadas. La ZD presentó 2,8 veces menos COLIII ($p<0,05$) en alpacas preñadas de 15 días. Mientras que en la ZL los niveles de COLIII decrecen 1,87 veces en los animales preñados ($p<0,05$), también se observó una disminución de 1,42 veces en los niveles de COLI ($p<0,05$).

Los datos presentados indican que existen cambios en la proporción y composición de las fibras de colágeno en los diferentes estratos del endometrio durante la preñez temprana. Esto indicaría que los CUs presentan un metabolismo de colágeno diferente durante el periodo preimplantacional de la preñez. Sería interesante conocer si estas diferencias se deben a una mayor síntesis o degradación del colágeno durante la preñez temprana.

¹INSIBIO (CONICET-UNT). ²FAZ-UNT. ³FBQF-UNT. ⁴Estación Experimental IVITA Marangani (UNMSM-Perú). ⁵INITRA (FCV-UBA).

Efecto de un protocolo con GnRH y prostaglandina $F_{2\alpha}$ sobre la actividad folicular en llamas

BIANCHI, C.P.^{1,2}; SIMONETTI, M.¹; BENAVENTE, M.^{1,2} & ABA, M.A.^{1,2}

Las llamas son animales de ovulación inducida que no presentan ciclos estrales, pudiendo permanecer receptivas al macho por hasta 40 días si no son servidas. Así, la estrecha asociación entre estro y ovulación, existente en otras especies, no se observa en llamas. Por tanto, establecer un protocolo de sincronización de la actividad ovárica que permita conocer el momento exacto en que un folículo ovulatorio joven se encuentra presente, resulta importante para evitar servicios infértiles. Además, una característica de las hembras es que una vez montadas generalmente no son vueltas a servir por el mismo macho, aunque no hayan quedado preñadas. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de un protocolo basado en el uso de GnRH y $PGF_{2\alpha}$ sobre las concentraciones plasmáticas de progesterona (P_4) y su efectividad para sincronizar la actividad folicular en llamas. Once animales fueron ecografiados diariamente desde dos días antes de comenzar el estudio (día -2) y hasta el día 10 post inicio del tratamiento. En el día 0, todos los animales recibieron una inyección de Buserelina (análogo de la GnRH; 8,4 µg; Receptal®, Intervet) con el objetivo de inducir la ovulación de todos aquellos folículos con capacidad de responder. Siete días después se inyectó una dosis de D-Cloprostenol (análogo de la $PGF_{2\alpha}$; 112,5 µg; Baker, Tecnofarm®) y 5 días más tarde se administró una nueva dosis

de Buserelina. Esta última inyección tuvo como objetivo inducir la ovulación de aquellos folículos ≥ 7 mm, considerados ovulatorios en la especie, que se originaron a partir de una nueva onda folicular surgida después de iniciado el tratamiento. Desde el día 0 al día 8, se recolectaron muestras de sangre para la posterior determinación de las concentraciones plasmáticas de P_4 por RIA. El porcentaje de llamas que ovularon en respuesta a la primera inyección de Buserelina fue 82% (9/11). En estos animales, las concentraciones plasmáticas de P_4 comenzaron a elevarse a partir del día 4 post inducción y, en todos los animales, disminuyeron por debajo de 1 ng ml⁻¹ al día 8, 24 h luego de la inyección de $PGF_{2\alpha}$. En 7 de estos animales (63% del total) se observó la emergencia de una nueva onda folicular al día 3 y la presencia de un folículo ovulatorio, originado a partir de esta onda, al día 10 post inicio del tratamiento.

Se concluyó que la primera inyección de Buserelina logra inducir la ovulación en un alto porcentaje de animales, y la inyección de $PGF_{2\alpha}$ al día 7 es efectiva para inducir luteólisis en estos animales. Con el protocolo planteado, se logró sincronizar la emergencia de una nueva onda folicular y la presencia de un folículo ovulatorio joven al día 10 post tratamiento en el 65% de las llamas.

¹Lab. de Endocrinología, Fac de Cs Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Buenos Aires, Argentina. ²CIVETAN, CONICET.

El trolox disminuye el porcentaje de espermatozoides precapacitados del semen porcino refrigerado

CAMPORINO, A.^{1,2,3} & CÓRDOBA, M.^{1,2,3}

La conservación de gametas es una estrategia biotecnológica fundamental en el ámbito productivo. La evaluación del espermatozoide a través de sus aspectos funcionales aporta parámetros espermáticos que predicen la habilidad fertilizante. En los espermatozoides de porcos la elevada concentración de ácidos grasos insaturados los hace más susceptibles a la peroxidación producida por las especies reactivas del oxígeno generadas durante el almacenamiento a bajas temperaturas que otras especies. El compuesto sintético derivado del alfa-tocoferol (vitamina E) denominado Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) tiene un efecto antioxidante que radica en su capacidad de secuestrar y romper enlaces de especies reactivas de oxígeno. El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto que tiene el Trolox sobre espermatozoides refrigerados de porcino. Se trabajó con un pool de muestras de semen que, tras ser incubado durante 20 minutos a 37°C, fue separado en dos alícuotas iguales diluidas en medio Modena modificado, siendo una de ellas tratada con Trolox. La temperatura de ambas alícuotas se mantuvo a 25°C durante 2 horas, para posteriormente ser almacenadas a 17°C. Al día 0 (semen fresco), 1, 2 y 5 de refrigeración se evaluó: viabilidad e integridad acrosomal con la tinción de azul tripán y microscopía óptica de Contraste Diferencial Interferencial (DIC), integridad funcional de la membrana plasmática con el Test Hipoosmótico (Hos Test), potencial de membrana mitocondrial con el fluorocromo JC-1 y estado de pre-capacitación con la tinción de Clorotetraciclina (CTC). El porcentaje de espermatozoides vivos en semen fresco fue de 76,33±5,85%. Las muestras

refrigeradas sin Trolox presentaron un porcentaje de vitalidad de 57,00±11,02%, 44,8±6,87% y 38,5±8,06% al día 1, 2 y 5 post refrigeración respectivamente con diferencias significativas ($p<0,05$). En las muestras tratadas con Trolox los cambios de viabilidad también fueron significativos, siendo de 63,25±13,89%, 47,00±8,48% y 43,33±18,58% al día 1, 2 y 5 respectivamente ($p<0,05$). Se encontró una mejora en la viabilidad espermática en los días 1 y 5 post refrigeración con trolox ($p<0,05$). La diferencia entre el porcentaje de integridad acrosomal y de membrana de muestras tratadas y no tratadas con trolox no fue significativa ($p>0,05$). El potencial de membrana mitocondrial fue de 80,00±4,69% previo a la conservación. Las muestras tratadas con Trolox (69,00±7,75%, 58,75±6,80% y 46,33±12,66% al día 1, 2 y 5 respectivamente) presentaron un potencial de membrana mitocondrial mayor comparadas con las no tratadas (con un porcentaje de 61,50±6,60%, 53,67±2,08% y 34,67±19,22% al día 1, 2 y 5 respectivamente), siendo las diferencias significativas ($p<0,05$). El porcentaje de espermatozoides precapacitados fue menor en muestras tratadas con Trolox al día 5 post-refrigeración ($p<0,05$). El efecto del antioxidante no produce cambios en el mantenimiento de un bajo potencial de membrana mitocondrial por lo cual relacionamos que la mejora de la viabilidad es ejercida por la disminución del estado redox intracelular. De esta manera el agregado de Trolox al diluyente mejora la calidad espermática obteniéndose un incremento en la viabilidad con menor porcentaje de espermatozoides pre-capacitados.

¹ Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA, UBA).

² Unidad Ejecutora de Investigaciones en Producción Animal (INPA, UBA-CONICET).

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

Factores relacionados con las yeguas receptoras que afectan la eficiencia en la transferencia embrionaria

CANTATORE, S.E.^{1,2}; BRUNO, S.³; BRUST, A.³ & FUMUSO, E.A.²

La declinación de la fertilidad de la yegua ocurre a partir de los 12 a 15 años. La Argentina, junto a Brasil y Estados Unidos, es uno de los 3 países que más embriones produce por transferencia embrionaria (TE). La selección y el manejo de la yegua receptora es un factor importante que afecta el éxito de los programas de TE. La utilización de yeguas jóvenes como receptoras “aseguraría” la fertilidad necesaria para recibir el embrión y llevar adelante la gestación. El Laboratorio de Clínica y Reproducción equina de la Facultad de Cs. Veterinarias de la UNICEN fue consultado a finales de la temporada reproductiva por un establecimiento en el cual 23 de las 32 yeguas receptoras (YR), entre 3 y 8 años de edad, permanecieron vacías luego de las TEs. El objetivo de este trabajo fue poner en evidencia los factores más frecuentes que impactaron sobre la fertilidad de YR jóvenes en un programa de TE. Para esto, se realizó un análisis retrospectivo, en el cual se recabaron datos de reseña y anamnesis, datos particulares de cada animal y se evaluaron las planillas utilizadas en el establecimiento durante la temporada de servicios. Se llevó a cabo un análisis general, en el cual se realizó un examen físico, evaluación de la condición corporal (CC) de 1 a 4, y presencia de lesiones o patologías. Luego, se realizó un análisis particular, en el cual se evaluó la conformación vulvar (inclinación, ubicación del piso de la pelvis y cierre), seguido de palpación transrectal y transvaginal, y ecografía. Se registraron los datos del estado del útero y los ovarios, así como también cualquier hallazgo considerado de relevancia. También se tomaron muestras

de biopsia endometrial (clasificadas según la escala predictiva de Kenney & Doig), citología y cultivo bacteriano. La condición corporal fue óptima (CC=3) en el 60,9%, mientras que 26,1% se encontraban delgadas (CC=2) y 13% obesas (CC=4). Siete yeguas (30,4%) presentaban lesiones de distinta gravedad, afectando al sistema músculo esquelético, y probablemente provocando dolor. Entre las alteraciones más frecuentemente halladas, se encontraron artritis y artrosis involucrando diversas articulaciones, deformaciones angulares y subluxación sacroilíaca. Las planillas permitieron determinar que los ciclos habían sido regulares. La conformación vulvar varió, entre mala (4 YR; 17,4%), regular (4 YR; 17,4%), buena (10 YR; 43,5%) y muy buena (5 YR; 21,7%). En la palpación transrectal, 2 yeguas presentaron cervix tortuoso y 1 hipoplasia uterina, mientras que a la ecografía 10 de ellas presentaron cierto grado de pneumoútero. En 4 de las yeguas (17,4%) se obtuvo crecimiento bacteriano tras el cultivo de las muestras tomadas, compatibles con *Salmonella spp.*, *Staphylococcus* y *Streptococcus zooepidemicus*. A la histopatología, el 40% las biopsias endometriales fueron clasificadas como grado I y el 60% presentaba alteraciones compatibles con la categoría IIA. Dos yeguas de 3 años de edad presentaron baja densidad glandular. Del total de las yeguas, 6 (26,1 %) mostraron una citología positiva de distinta intensidad, desde leve a severa. Tres de ellas presentaron concomitantemente infección bacteriana, mientras que en las 3 restantes la presencia de PMN se debió probablemente a

¹CONICET. ²CIVETAN, Facultad de Cs. Veterinarias, UNCPBA. ³Haras Grl. Lavalle, Tandil, Bs. As., Argentina.

la irritación, conformación vulvar regular y/o presencia de pneumóútero. La sincronización donante-receptora varió notablemente entre las distintas yeguas y, dentro de una misma yegua, en las sucesivas transferencias. La misma fue desde -4 (la receptora ovuló 4 días antes que la donante) a +1 (la receptora ovuló 1 día después que la donante). En cuanto al estado de los

embriones, todos aquellos recuperados fueron transferidos, independientemente de su calidad. Este estudio permitió confirmar que varios de los requisitos que una yegua receptora debe cumplir no estaban presentes en los animales involucrados, situación que de algún modo podría corregirse, y así probablemente obtener mejores resultados reproductivos.

Comparison of two freeze-thawing protocols for llama semen: with and without collagenase and seminal plasma in the medium. Preliminary results

CARRETERO, M.I.^{1,4}; FUMUSO, F.G.^{1,4}; CHAVES, M.G.¹; MIRAGAYA, M.H.¹; NEILD, D.M.¹; CETICA, P.^{3,4} & GIULIANO, S.M.²

Owing to the rheological characteristics of South American Camelids semen, various authors have suggested that it is necessary to enzymatically treat samples to decrease viscosity and thread formation, both of which interfere with the interaction of sperm with semen extenders and hinder sample homogeneity. Our objective was to compare two freeze-thawing protocols for llama semen with and without collagenase and Seminal Plasma (SP) in the medium. Twelve ejaculates from four males (n= 4, r=3) were incubated in 0.1% collagenase and were then divided into two aliquots. One was extended in lactose and egg yolk with 7% dimethylformamide (Protocol A: collagenase and SP present). The other aliquot was centrifuged, and the pellet was resuspended in the same extender (Protocol B: collagenase and SP absent). Both samples were equilibrated at room temperature for 20 min and were then placed in 0.5 ml straws (adjusted to 40×10^6 sperm/mL) and frozen. Samples were thawed in a 37 °C water bath for 60 s. The following seminal characteristics were evaluated: motility (phase contrast microscope and a warm stage), viability and acrosomal status (FITC-PNA/PI stain) and DNA fragmentation (TUNEL). Samples were evaluated immediately after

thawing and again after 3 h of incubation at 37 °C. A Friedman test was used to compare the percentages of motility between raw semen, extended semen prior to freezing and post-thawed semen in both protocols at the different times of incubation (post-thawed and 3 h). To evaluate viability and acrosomal status and DNA integrity a split plot factorial design was used with time as the splitting factor (levels: post-thawed and 3 h) and treatment as the fixed factor (levels: absence or presence of collagenase and SP). The males were considered as a blocking factor. Both freezing protocols preserved DNA integrity, but sperm motility (total and progressive) and the percentage of live sperm with an intact acrosome was significantly lower compared to raw semen ($P<0.05$). In both protocols, the percentage of live sperm with an intact acrosome did not significantly change after 3 h, but a decrease of total and progressive motility was observed at 3 h of incubation. Protocol A avoids centrifugation, reducing processing times and making the application of this biotechnology in the field easier. However, as neither protocol showed a significant superiority over the other, studies should be continued to improve semen characteristics in llama frozen-thawed sperm.

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal.
¹Cátedra de Teriogenología, ²Cátedra de Física Biológica, ³Cátedra de Química Biológica INPA, ⁴Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

Impacto de la endometritis subclínica sobre el intervalo parto-parto en vacas lecheras en pastoreo

CIESLOWSKI, B.^{1,6}; VEGA, M.^{2,6}; FRANA, E.^{3,6}; BERNARDI, S.^{4,6}; MARINI P.R.^{2,5,6}

La eficiencia reproductiva en las vacas lecheras puede ser afectada por múltiples factores. Una de las afecciones reproductivas más comunes en el posparto son las inflamaciones del endometrio sin evidencia clínica. El objetivo del trabajo fue evaluar la endometritis subclínica y su relación con el intervalo parto-parto de vacas lecheras Holando Argentino en sistemas a pastoreo. Durante los meses de mayo a octubre de 2016 se muestrearon un total de 108 vacas Holando Argentino multíparas entre los 21 y 56 días en leche, de un establecimiento lechero bajo sistema a pastoreo con suplementación, en el sur de la provincia de Santa Fe - Argentina. Se tomaron muestras citológicas del endometrio por la técnica de cytobrush, (Medibrush XL, Medical Engineering Co, SA). Posteriormente, se realizaron frotis rotando cada cepillo con la muestra sobre un portaobjetos limpio, y se determinó el porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos para constatar la existencia de endometritis subclínica (ES). Las preparaciones citológicas se observaron con un microscopio binocular Olympus BH-2 a un aumento de 400 X. Para cada frotis se contaron un mínimo de 200 (doscientas) células totales (células epiteliales y células inflamatorias), a partir de las cuales se determinó un porcentaje de células inflamatorias (macrófagos, linfocitos, neutrófilos) de las cuales los neutrófilos fueron

los utilizados para determinar el grado de inflamación de la mucosa uterina, obteniendo por tanto un porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos (% PMN N). Las vacas cuyos frotis endometriales obtuvieron % de PMN N ≥ 5 , fueron diagnosticadas como positivas a ES. La variable reproductiva evaluada fue el Intervalo parto-parto (IPP) en días. Para el análisis de la progresión del Intervalo parto-parto en relación a los días por grupo (sanas o enfermas), se aplicó la curva de supervivencia de Kaplan-Meier y se compararon entre sí con la prueba estadística de U de Mann Whitney. Del total de vacas revisadas 75 (69,4%) resultaron sanas y 33 (30,6%) con ES. El % de vacas sanas fue 69,4%. En el intervalo parto-parto, existieron diferencias estadísticamente significativas al comparar vacas sanas y vacas enfermas con ES. Las vacas sanas necesitaron 434 ± 9 días para volver a parir, mientras que las vacas con ES 469 ± 15 días para tener un nuevo parto, la diferencia numérica de 35 días entre ambos grupos muestra diferencia estadística significativa ($p \leq 0,05$; $p = 4,5437$, test Wilcoxon, $p = 4,9480$, test Long-rank), observándose un detrimento en la eficiencia reproductiva del grupo de vacas enfermas. Se concluye que las vacas con endometritis subclínicas ven afectada su eficiencia reproductiva, en este caso evaluada a través del intervalo parto-parto.

¹Actividad Privada. Cátedras de Producción de ²Bovinos Lecheros, ³Zootecnia e ⁴Histología y Embriología I. Facultad de Ciencias Veterinarias - UNR ⁵CIC-UNR. ⁶Centro Latinoamericano de Estudios de la Problemática Lechera

Optimización de curvas de enfriamiento y congelado para mejorar la preservación del semen ovino

CONFALONIERI, J.^{1,3,4}; SUHEVIC, J.^{1,2}; MALCERVELLI, D.^{1,2}; FASOLO, P.⁴; SABRINA, R.⁴; DODDS, S.⁴; CARBALLO, E.⁴
& CAPDEVIELLE, E.^{1,3}

Durante el proceso de criopreservación los espermatozoides (Z) son sometidos a bajas temperaturas y a cambios osmóticos que inducen la formación de cristales de hielo. Estos factores dañan la membrana plasmática deteriorando la calidad espermática al descongelado. A su vez, los Z de carnero son muy susceptibles a las bajas temperaturas por la alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados que presenta su membrana plasmática. Varios protocolos de criopreservación y diferentes diluyentes de congelación han sido desarrollados, pero sólo un bajo porcentaje de células espermáticas mantienen su capacidad fertilizante. El objetivo de este trabajo fue evaluar una nueva curva de enfriamiento del proceso de criopreservación, a fin de mejorar la calidad espermática ovina al descongelado. Se recolectaron 40 eyaculados provenientes de 4 carneros. Los eyaculados fueron transportados atemperados a 37°C. A dicha temperatura se evaluó: movilidad masal microscópica (M; escala de 0-1), vigor (V; escala de 0-5), movilidad rectilínea individual progresiva (MP; escala de 0-5) con microscopía de campo claro con luz invertida y platina térmica, y % de Z vivos y muertos (V/M) con la tinción de Eosina/Nigrosina. Se congelaron los eyaculados que a las evaluaciones iniciales presentaron: M=1, MP≥4, V≥4, V/M≥70%. Se realizó la 1ª dilución (relación 1:1) con diluyente de refrigeración (Triladyl® 80% + yema de huevo 20%). Se disminuyó la temperatura hasta 22°C, y se realizó la 2ª dilución 1:1 del volumen total. Se continuó el enfriamiento hasta 5°C (velocidad

de enfriamiento: 1°C/3 min). Se diluyó hasta alcanzar la concentración de 240 millones de Z/ml, y se estabilizó durante 2 horas. Se realizó el llenado de las pajuelas mini, y se congeló en vapores de N₂ a 6 cm del nivel del mismo por 5 min, y se sumergió en el N₂ líquido (curva de enfriamiento control (C); n=20). La nueva curva de enfriamiento (NC) repitió todos los pasos del equilibramiento hasta la estabilización de 2 horas a 5°C, y luego se sometió a los vapores de N₂ a 13 cm y a 4 cm de altura, durante 2 min y 3 min respectivamente (n=20). Las pajuelas fueron descongeladas a 37°C por 30 seg, y se realizaron las evaluaciones antes mencionadas. Para determinar diferencias de calidad espermática al descongelado se aplicó el test de Kruskal Wallis ($\alpha \leq 0,05$). Se observó un aumento significativo en el porcentaje de Z con M (C: 0±0; NC: 0,80±0,41), V (C: 0,65±0,67; NC: 3,05±0,51), MP (C=0,75±0,79; NC=3,00±0,65) y V/M (C=8,00%±3,77%; NC=45,50%±11,80%) cuando los mismos fueron sometido a la NC durante el proceso de criopreservación. Estas diferencias podrían deberse a que al disminuir las velocidades de enfriamiento se favorecería la adaptación de las membranas espermáticas a las bajas temperaturas. En conclusión, la nueva curva, que incluye dos fases de estabilización durante la congelación, mostró ser más adecuada que la empleada con anterioridad para criopreservar Z de carnero, ya que mejora en los parámetros de calidad espermática al descongelado.

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. ²INITRA. ³Cátedra de Teriogenología; ⁴INTECH, Laboratorio de Biotecnologías Ovinas.

The administration of hCG or GnRH induce the formation of accessory corpora lutea

FERNÁNDEZ, J.¹; BRUNO GALARRAGA, M.¹; LACAU, I.²; SOTO, A.³; DE LA SOTA, R.³; CUETO, M.¹ & GIBBONS, A.¹

The aim of this study was to evaluate the effect of the administration of hCG or GnRH at day 4 post fixed-time artificial insemination (FTAI) on the formation of accessory corpora lutea (acc-CL) and the concentration of serum progesterone (P_4) in sheep. Multiparous adult Merino ewes ($n=36$) were treated for estrus synchronization using two intramuscular (i.m.) injections of prostaglandins (PG, 125 μ g Cloprostenol, Cycloset, Syntex, Argentina) with an interval of 14 days. At 53-56 h after the second PG application, FTAI was performed vaginally with a dose of 100 million spermatozoa of fresh semen. The ewes were assigned randomly to three groups on day 4 post FTAI: GnRH group ($n=12$) received 4 μ g i.m. of GnRH analogue (Buserelin, Receptal, Intervet, Argentina), hCG group ($n=12$) received 300 IU i.m. of hCG (Gonacor, Ferring, Argentina) and Control group ($n=12$) received 1 ml i.m. of saline solution. Two laparoscopic examinations were performed at day 4 and 10 post-FTAI. In the first observation, we determined the number and distribution of post ovulation corpora lutea (po-CL) and the number and diameter of follicles present in both ovaries. In the second laparoscopy, we observed the number of po-CL and acc-CL. The sizes of the follicles that generated the acc-CL were determined according to the position of the follicles observed in the first laparoscopy. Blood samples were collected from the jugular vein at 4, 7, 10, 13, 17 and 21 days post FTAI. Serum concentration of P_4 was determined by chemiluminescence (Elecsys, P_4 ;

Roche, Germany). A similar follicular population in number and size was observed in the three experimental groups before the beginning of treatments (Follicles 2 mm: 6.4 ± 3.7 , 3 mm: 3.0 ± 2.3 , 4 mm: 1.1 ± 0.5 , 5 mm: 1.4 ± 0.8 ; $P>0.05$). The formation of one acc-CL was only observed in GnRH and hCG treated animals ($P<0.05$). The acc-CL induced by the hormonal treatments were generated from follicles of 3, 4 or 5 mm and did not differ between both treatments ($P>0.05$). The hCG group had higher mean concentrations of P_4 on days 7, 10, 13 and 17 post FTAI (4.1 ± 1.3 , 10.5 ± 2.0 , 9.4 ± 1.9 , 7.4 ± 2.1 ng/ml, $P<0.05$) compared with the GnRH group (2.3 ± 1.1 , 5.6 ± 2.5 , 5.6 ± 2.9 , 5.7 ± 1.8 ng/ml) and the Control group (2.5 ± 1.1 , 5.3 ± 4.5 , 2.0 ± 3.2 , 4.8 ± 2.5 ng/ml), while no differences were observed between these two latter groups. Mean P_4 concentrations showed no differences according to the size of the follicle which formed the acc-CL ($P>0.05$). Administration of hCG or GnRH at 4 days post FTAI induced the formation of acc-CL from follicles greater than or equal to 3 mm indistinctly. However, serum concentration of P_4 increased significantly only in the hCG group. Differences in the pharmacodynamics of these two hormones might induce corpora lutea with a different steroidogenic capacity to produce P_4 . Further research should be done to assess the effect of these hormones on the histological and functional characteristics of po-CL and acc-CL.

¹INTA EEA Bariloche. ²IBYME CONICET. ³FCV-UNLP.

Evaluación de niveles de β -Hidroxibutirato en vacas lecheras en transición y su relación con los anticuerpos naturales

DUNLEAVY, M.V.¹; MONGIARDINO, M.E.¹; SCÁDOLO, D.E.²; MACIEL, M.² FERNANDEZ, B.³ & MUNDO, S.L.³

Las vacas lecheras atraviesan un período de balance energético negativo durante la transición entre el final de la gestación y el inicio de la lactancia. La falta de adaptación a las enormes demandas metabólicas en este período, se manifiesta mediante aumentos excesivos en la concentración β -hidroxibutirato (BHB) en plasma, que se asocian con mayor incidencia de enfermedades metabólicas e infecciosas y se reportaron efectos directos de los cuerpos cetónicos sobre componentes del sistema inmune. Para probar la hipótesis de que la hipercetonemia podría explicar en parte la inmunosupresión que se evidencia en este periodo, en el presente trabajo se buscó establecer si existe asociación entre niveles de BHB compatibles con cetosis y la respuesta inmune humoral innata, representada por los niveles séricos de anticuerpos naturales (AcN). Se efectuó un estudio prospectivo, en un establecimiento comercial, sobre 40 vacas, divididas en dos grupos, según hayan o no presentado enfermedades relacionadas al parto (enfermas: n=21 y sanas: n=19). Se tomaron muestras en las semanas -1, 0, 1 y 2 respecto del parto. Se determinaron las concentraciones séricas de BHB y se compararon los niveles de anticuerpos naturales (AcN), mediante una técnica de ELISA adaptada y validada para ese fin, utilizando un antígeno con el cual los bovinos no podrían tener contacto previamente, asegurando que las inmunoglobulinas detectadas sean AcN. Se categorizó la variable BHB utilizando los valores de corte descriptos en la bibliografía para periodos pre y posparto ($\geq 0.80\text{mM}$ en la semana-1 o $\geq$

1.20mM en las semanas 0, 1, y/o 2). Se evaluó la diferencia de proporciones en los animales sanos y enfermos respecto de los valores de BHB pre y posparto. Se encontró que la ocurrencia de enfermedad en el periparto está relacionada con altos niveles de BHB posparto (p-valor <0.056), mientras que no se encontraron diferencias en los niveles de AcN entre grupos de animales sanos y enfermos. Se efectuó el análisis de medidas repetidas en el tiempo para AcN en función del nivel de BHB, para los grupos sanos y enfermos y no se encontraron diferencias significativas (p-valor >0.05). Por lo tanto, no se evidenciaron relaciones entre los valores plasmáticos de BHB y los niveles séricos de AcN. Es decir que no hubo influencia de los niveles de BHB, sobre la evolución de los niveles de AcN en el tiempo. Por otro lado, a partir de los resultados obtenidos en las muestras, se simuló datos para la variable AcN respetando la distribución y estructura de la matriz de covarianza para las medidas repetidas. Así se comprobó que, aumentando el número de animales, por simulación, altos niveles de BHB posparto modificaron significativamente la evolución de los niveles de AcN en el periparto. En conclusión, con mayor tamaño de muestra, podrían verificarse diferencias entre los niveles de AcN, en animales que tuvieron valores de BHB superiores al umbral en las primeras tres semanas de lactancia, lo que incentiva a efectuar nuevos ensayos con mayores tamaños de muestra y mayores posibilidades de controlar las condiciones experimentales para profundizar este estudio.

¹Laboratorio de Bioquímica - Instituto de Patobiología – CNIA – INTA; ²EEA INTA Rafaela. ³Cátedra de Inmunología – Fac. de Cs. Veterinarias – UBA.

Correlación entre características externas del estro, cristalización del moco cervical y ultrasonografía folicular, en vacas lecheras, para optimizar el tiempo de la inseminación artificial. Santa Rita de Siguan, Arequipa – 2016

FERNÁNDEZ, F.^{1,2,3,4,5}; REÁTEGUI, J.^{1,2,3,4,5}; CUADROS, S.^{1,2,4,5}; BERNARDI, S.⁵; PACHECO, V.^{1,2} & BEGAZO N.^{1,3,5}

En todo sistema de ganadería lechera la finalidad es lograr la máxima rentabilidad productiva, lo que se logra con una interacción correcta de diversos factores como: reproducción, genética, nutrición, sanidad y manejo; de los cuales la reproducción tiende a ser el más importante, ya que las vacas lecheras tienen que parir un ternero por año para ser productivamente rentables. Ante problemas reproductivos que limitan el principal propósito de los sistemas de ganadería lechera, que es la mala detección del estro, se planteó la siguiente investigación. Los objetivos fueron: el optimizar el momento para la inseminación artificial, correlacionando tres métodos, como son las características externas del estro, la formación de cristales del moco cervical, propiedad biofísica de mayor importancia por su formación de helechos (arborización), la cual permite detectar el celo y finalmente la medición del diámetro folicular de los ovarios mediante ultrasonografía. Determinar el momento óptimo para la inseminación artificial (IA) mediante la correlación entre las características externas del estro, formación de cristales del moco cervical y el diámetro folicular ultrasonográfico de los ovarios de vacas lecheras en producción, según el tiempo de muestreo. Seleccionar el método más adecuado para optimizar el momento de la IA en la etapa del estro. Observar y dar una puntuación a la presencia de características externas del estro de las vacas en producción, según el tiempo de muestreo. Evaluar la calificación de la formación de cristales del moco cervical durante la etapa del estro, según el tiempo de recolección de muestras. Este estudio se llevó a cabo en un sistema

intensivo lechero, en el distrito de Santa Rita de Siguan, provincia de Arequipa, departamento de Arequipa, cuya ubicación geográficamente está entre las coordenadas 16° 29' 34" S y 72° 05' 40" O. Se trabajó durante los meses de abril a octubre del 2016, con 18 vacas fisiológicamente sanas y en producción, realizando el muestreo a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas en la etapa del estro, y en busca del método más adecuado se correlacionó según el tiempo, cada método individualmente, iniciando con la observación de las características externas del estro, usando el patrón adaptado por Van Eedenburg, que de acuerdo a su presentación se les dio una puntuación acumulada dando como resultado $r=0,896$, posteriormente, para calificar la formación de cristales se recolectó moco cervical de las vacas de acuerdo al protocolo establecido por Prado, y para su análisis e interpretación, se utilizarán las tablas de calificación propuestas por Tsiligianni; resultando $r=0,907$, en cuanto a la medición del diámetro folicular de los ovarios se realizaron ultrasonografías endorectales y se interpretara según Gigli, siendo $r=0,996$. Para determinar el momento óptimo para la inseminación artificial se correlacionó los tres métodos estudiados, reflejando: hora 0: $r = 0,388$, hora 6: $r = 0,431$, hora 12: $r = 0,908$, hora 18: $r = 0,727$, y la hora 24: $r = 0,645$. Se concluye, que la mejor metodología de optimizar el mejor momento para la IA entre los tres métodos, es la determinación del diámetro folicular mediante ultrasonografía. Existe una correlación positiva muy fuerte a la hora 12, entre las características externas del estro, la formación de cristales y el diámetro folicular.

¹Escuela de Posgrado, ²Laboratorio de Biotecnología Animal. Vicerrectorado de Investigación. ³Maestría en Producción y Salud animal,

⁴Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Católica de Santa María. Arequipa. Perú. , ⁵CLEPL – Argentina.

Evaluación de algunos parámetros reproductivos en alpacas (Lama pacos) de la raza huacaya a través de la inseminación artificial con 2-3 siembras y usando un dilutor, en el distrito de Palca, Lampa, Perú

FERNÁNDEZ, F.^{1,2,4}; FERNÁN-ZEGARRA, J.⁴; PACHECO, V.^{1,2}; SALAS, J.^{1,3}; BORJA, J.^{1,3}; ALEMÁN, C.^{1,3} & TORRES, R.^{1,3}.

La producción pecuaria alto andina del Perú está basada en la crianza de alpacas, y el departamento de Puno tiene 54% del total nacional. El aspecto reproductivo de la alpaca es la base de su crecimiento poblacional, siendo el problema de mayor relevancia con bajos índices de natalidad (50%). El macho juega un rol preponderante en la fertilidad general del rebaño, ya que un reproductor puede ser usado en el empadre para muchas hembras y, por lo tanto, su influencia en la calidad del rebaño llegando a una fertilidad de 25-32%, convirtiendo a la inseminación artificial (IA) en alpacas en una técnica para mejorar las características y así contribuir al mejoramiento genético para la producción de fibra de calidad y el desarrollo de su crianza. Los objetivos fueron: Incrementar el porcentaje de fertilidad en alpacas raza Huacaya a través de IA, a través de IA con 1, 2 y 3 siembras y evaluar características macroscópicas y microscópicas del semen colectado. La investigación se desarrolló en la Comunidad de Umpuco Central, Distrito de Palca, Provincia de Lampa, Departamento de Puno, ubicado 15°13'51"S y 70°35'51"O y a una altitud de 4020 msnm. Se seleccionó 104 animales, de la raza Huacaya. Se seleccionaron machos con características fenotípicas adecuadas y aptos para reproductivamente, que acepten el maniquí con un tiempo de acostumbramiento de 3 semanas y cuya vagina artificial estará a 38-41°C y presión adecuada, se aplicó vitaminas y minerales IM. Se evaluó macroscópica (volumen y color) y microscópicamente (motilidad y concentración)

el semen, se agrega el dilutor (BSA 3.0%, Glucosa 6.0%, estreptomycin 1.0%, diluidos en agua destilada). Las hembras se seleccionaron según sus características fenotípicas y aptas para la reproducción. Se evaluó ecográficamente y la prueba de receptibilidad, seleccionando aquellas alpacas que sean receptivas al macho, una vez que adopta la posición de cópula se registra y aplica (GnRh) Conceptal® 1.0 ml IM, luego de 26 horas se procedió a la IA, vía recto vaginal, en el cuerno uterino ipsilateral al folículo pre ovulatorio. Se realizaron 1, 2 y 3 siembras. El diagnóstico gestacional se realizó a los 20 días con un ecógrafo con transductor transrectal de 7.5 MHz. y mediante la prueba de rechazo por el macho. Se logró incrementar la fertilidad a 58.65% entre uno a tres siembras, con una siembra 42 preñadas (40.38%); con dos siembras, 16 preñadas (40.00%); con tres siembras, 3 preñadas (27.27%). El mayor número de dosis corresponde a la de 1 ml con 61.9 % de un total de 42 dosis en la primera siembra, 87.9 % de un total de 16 dosis en la segunda siembra y 66.7 % de un total de 3 dosis en la tercera. La eficiencia del uso de 1 ml de semen muestra un 68.85% de preñez en las 3 siembras. Al aplicar la prueba estadística de X^2 , se encuentra que el número de diferentes dosis (ml) ha sido similar en las 3 siembras. Con el semen de machos más jóvenes (2D y 4D) se lograron preñez (62.3 %) lo que se manifiesta en forma similar en la primera y segunda siembra. En la tercera siembra se utilizaron machos jóvenes. Al aplicar

¹Escuela de Posgrado, ²Laboratorio de Biotecnología Animal. Vicerrectorado de Investigación. ³Maestría en Producción y Salud animal,

⁴Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Católica de Santa María. Arequipa. Perú.

la prueba estadística de X^2 , el comportamiento de los machos es similar en las 3 siembras. Los valores promedios son: volumen $2,26 \pm 1,40$ ml; motilidad $60,73 \pm 15,85\%$ y concentración 72,2 millones de espermatozoides/ml, siendo los machos jóvenes los que presentan mayor motilidad; (68,66 y 72,0 respectivamente) y alta concentración de espermatozoides

(88 y 100 millones de espermatozoides/ml respectivamente). Concluimos que si bien no existe significancia entre dosis seminales y los machos en las tres siembras este estudio, se aporta información sobre la calidad seminal de reproductores jóvenes y que la técnica de IA en alpacas debe mejorarse para obtener mejores índices.

Efectividad del protocolo Ovsynch 56 horas en ganado vacuno (*Bos taurus*) mestizo en el distrito de Puyca, La Unión, Arequipa

FERNÁNDEZ, F.^{1,2,4}; REÁTEGUI, J.^{1,2,4}; CUADROS, S.^{1,2,4}; PACHECO, V.^{1,2}; SALAS, J.^{1,3}; ALEMÁN C.^{1,3}; TORRES R.^{1,3}.

BORJA J.^{1,3,4}

La ganadería bovina en el Perú, es un sector importante en la producción agropecuaria, de un total de 1'764,660 hogares rurales, 486,829 crían vacunos e involucra a una población de 4'500,000 habitantes. El 80% del ganado bovino se encuentra mayormente en propiedad de pequeños ganaderos y comunidades campesinas donde predomina el vacuno criollo y sus cruces. La ganadería en las zonas alto andinas, enfrenta un problema, el cual es la detección de celo, siendo un proceso limitante, por tener un sistema de pastoreo extensivo aunado a una deficiencia de manejo reproductivo y productivo. Por ello se hace imprescindible optimizar protocolos que demuestren efectividad, si bien es cierto el Ovsynch existe hace más de diez años, recientemente se han probado diferentes variaciones en los tiempos de administración de las hormonas y la inseminación artificial (IA) en un intento por obtener mejores tasas de preñez. Los objetivos del presente trabajo de investigación fueron: Evaluar la efectividad del protocolo hormonal Ovsynch 56 horas con inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en ganado vacuno mestizo, obtener porcentajes aceptables de tasa de preñez, y mejorar el sistema de reproducción en las zonas alto andinas. El estudio se realizó en el distrito de Puyca ubicado a 15° 05'30'' S, y 72° 47'14'' O, y a una altitud de 3,674 msnm, durante enero a diciembre del 2016. Se trabajó con 200 vacas mestizas como población, teniendo como criterios de inclusión las aptas reproductivamente; aquellas cuya condición corporal (CC) era adecuada y las que el diámetro

de punta de caderas e isquiones favorezcan el parto. Dando como resultado la selección de una muestra de 40 vacas, las que se dividieron en un grupo experimental y otro control, de 20 vacas cada uno. El primer grupo fueron tratadas con el protocolo Ovsynch 56 horas y las otras sirvieron como grupo control. Ambos grupos se desparasitaron y vitaminizaron. En el grupo experimental se aplicó el protocolo Ovsynch 56 horas, que consistió en la administración de primera dosis de un análogo de la GnRH (Acetato de Gonadotropina, Gonasyl® el día 0 a dosis de 3 ml vía IM, seguido de una inyección de Cloprostenol Sódico (Luteosyl®) a dosis de 2ml vía IM el día 7, después de 56 horas, una segunda dosis de GnRH (3 ml vía IM) y se realizó IATF a las 16 horas de la segunda dosis de GnRH, empleando para ello pajillas de semen de Holstein Neozelandés. La detección de preñez se realizó por la técnica de palpación rectal, el día 90 post IATF, obteniéndose los siguientes resultados: en el grupo experimental, de las 20 vacas con tratamiento hormonal, 13 vacas quedaron preñadas y 7 vacías, obteniendo un 65% de tasa de concepción, mientras que el grupo control 10 preñaron y 10 quedaron vacías, obteniéndose un 50% de tasa de concepción, no existiendo diferencia significativa entre ambos grupos. Se concluye que el protocolo Ovsynch es más efectivo reproductivamente frente al grupo control, ya que en este se obtuvo mejores tasas de preñez 65%, Finalmente se mejoró el sistema de reproducción en las zonas alto-andinas por el aumento de índices reproductivos.

¹Escuela de Posgrado, ²Laboratorio de Biotecnología Animal. Vicerrectorado de Investigación. ³Maestría en Producción y Salud animal,

⁴Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Católica de Santa María. Arequipa. Perú.

Caracterización biométrica e histológica de los ovarios en alpacas (*Vicugna pacos*) de Puno, Perú

FERNÁNDEZ, F.^{1,2,4}; REÁTEGUI, J.^{1,2,4}; PACHECO, V.^{1,2}; SALAS, J.^{1,3}; BORJA J.^{1,3}; ALEMÁN C.^{1,3}; TORRES, R.^{1,3} & DEL CARPIO, M.⁴

El Perú es uno de los países con mayor población de alpacas a nivel mundial, pero a la vez es el país que posee menos información histológica respecto a los órganos de esta especie en altura. Debido a esto es necesario investigaciones que ayuden a aumentar nuestros conocimientos en ciencias básicas sobre la alpaca. Los objetivos del presente trabajo de investigación son el estudiar y describir biométricamente los ovarios derecho (OD) e izquierdo (OI) de alpacas (*Vicugna pacos*), sus estructuras (folículos primordiales (FPRIM), primarios, (FP) secundarios (FS), de Graff (FG), cuerpo lúteo (CL), cuerpo lúteo hipertrófico (CLH), cuerpo albicans (CA), y caracterizarlos histológicamente. El presente trabajo de investigación se desarrolló en 73 alpacas (*Vicugna pacos*) adultas hembras de las razas Huacaya y Suri con una edad de 7 años a más. Las muestras se recolectaron de animales pertenecientes al camal municipal de Nuñoa, distrito de Nuñoa, provincia de Melgar, departamento de Puno, ubicado a 14°28'48"S 70°38'28"O y a una altitud de 4023 m.s.n.m. Ambos ovarios de cada hembra se transportaron en frascos con solución de formol al 10% por 24 horas como mínimo hasta el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la UNSA. Cada ovario fue medido y tratado en el procesador automático de tejidos STP20 Thermo Scientific¹. Posteriormente se realizaron cortes histológicos de 5 μ , se colorearon con hematoxilina-eosina, para finalmente montar las láminas en Bálsamo de

Canadá² Valkanick; obteniendo los siguientes resultados de la biometría macroscópica expresados en promedios: OD Huacaya: Largo 2.07 cm (σ = 0,26), ancho 1.29 cm (σ = 0,27) y grosor 0.78 (σ = 0,19) cm; OD Suri: Largo 1.93 (σ = 0,30) cm, ancho 1.25 (σ = 0,22) cm y grosor 0.78 (σ = 0,23) cm; OI Huacaya: Largo 1.40 (σ = 0,30) cm, ancho 1.11 (σ = 0,18) cm y grosor 0.55 (σ = 0,20) cm; OI Suri: Largo 1.27 (σ = 0,43), ancho 1.26 (σ = 0,05) cm y grosor del ovario 0.47 (σ = 0,26) cm. Los valores obtenidos para la biometría microscópica también expresados en promedios por número de estructuras encontradas, fueron: para la raza Huacaya en OD: 3,77 (σ = 4,82) FG, 2,58 (σ = 2,74) CL, 0,76 (σ = 1,34) CLH y 5,92 (σ = 0,48) CA; en OI: 4,35 (σ = 3,95) FG; 2,88 (σ = 1,89) CL; 0,12 (σ = 0,32) CLH y 5,79 (σ = 8,58) CA. Para la raza Suri en OD: 2,50 (σ = 1,46) FG, 2,38 (σ = 1,49) CL, 0,75 (σ = 0,37) CLH y 4,00 (σ = 6,47) CA, mientras que en OI: 8 (σ = 2,82) FG, 4 (σ = 3,21) CL; 0,14 (σ = 0,37) CLH y 9,71 (σ = 8,61) CA respectivamente. Los resultados de las medidas promedio fueron analizados con la prueba de t de Student. En cuanto a la relación de altura del ovario derecho e izquierdo entre alpacas Huacaya y Suri no hay diferencias significativas. La relación del largo del ovario derecho y del izquierdo entre ambas razas no es significativo. Es decir la raza no influiría en la altura y el largo del ovario derecho ni izquierdo. En relación con el ancho de los ovarios entre la raza Huacaya y Suri, no existe significancia para el ovario

¹Escuela de Posgrado, ²Laboratorio de Biotecnología Animal. Vicerrectorado de Investigación. ³Maestría en Producción y Salud animal,

⁴Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Católica de Santa María. Arequipa. Perú.

derecho, pero sí para el ovario izquierdo. Es decir, la raza influiría en el ancho del ovario izquierdo. Podemos concluir desde la evaluación biométrica macroscópica de ambos ovarios de alpacas de ambas razas Huacaya y Suri tienen las siguientes medidas promedio: Largo: 1.73 cm ($\sigma = 0.44$) / Ancho: 1.21 cm ($\sigma = 0.24$) / Grosor: 0.67 cm. ($\sigma = 0.23$). Y desde la evaluación

biométrica microscópica, la presencia promedio de las siguientes estructuras: Folículo primordial: 49.15 u ($\sigma = 33.56$); Folículo primario: 17.88 u ($\sigma = 9.79$); Folículo secundario: 5.68 u ($\sigma = 1.88$); Folículo de Graff: 4.19 u ($\sigma = 3.49$); Cuerpo lúteo: 2.79 u ($\sigma = 1.65$); Cuerpo lúteo hipertrófico: 0.4 u ($\sigma = 0.52$); Cuerpo Albicans: 5.9 ($\sigma = 8.83$).

Combinación de la tinción azul de coomassie con la prueba hipoosmótica para evaluar espermatozoides equinos y porcinos.

FERRANTE, A.¹; CALDEVILLA, M.¹ & MIRAGAYA, M.¹

La integridad del acrosoma es uno de los parámetros de importancia para determinar la capacidad fertilizante del espermatozoide. Si bien la tinción con azul de Coomassie (AC) es una técnica efectiva y económica para evaluar el acrosoma espermático sin necesidad de utilizar microscopía de fluorescencia, no es posible evaluar simultáneamente el estado del acrosoma y la viabilidad espermática. El objetivo de este trabajo fue evaluar espermatozoides equinos y porcinos mediante la tinción con AC en muestras sometidas previamente a una prueba hipoosmótica (HOS/AC) con la finalidad de evaluar simultáneamente estado acrosomal y funcionalidad de la membrana espermática. Materiales y métodos: se obtuvieron 12 eyaculados de padrillos equinos mediante vagina artificial (n=4, r=3) y 12 eyaculados porcinos por la técnica de mano enguantada (n=6, r=2). Las muestras se evaluaron mediante a) la prueba hipoosmótica (HOS), b) la tinción con AC y c) una combinación de HOS seguida de la tinción AC (HOS/AC). Para la prueba de HOS/AC, los espermatozoides se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 2 %, se extendieron en portaobjetos, se secaron al aire y se tiñeron con AC durante 15 minutos. Se observaron 200 espermatozoides por muestra con microscopio óptico a 1000x. El análisis

estadístico se realizó mediante un test de Pearson y una t de Student apareada. No se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre la prueba de HOS (HOS positivo equino: $48 \pm 7\%$ y HOS positivo porcino: $54 \pm 13\%$) y HOS/AC (HOS positivo/AC en equinos: $48 \pm 6,7\%$ y HOS positivo/AC en porcinos: $53 \pm 15\%$); tampoco hubo diferencias significativas ($p>0,05$) entre AC (AC positivo equino: $80 \pm 6,6\%$ y AC positivo en porcinos: $86 \pm 10\%$) y HOS/AC (HOS/AC positivo en equinos: $79 \pm 7\%$ y HOS/AC positivo en porcinos: $87 \pm 10\%$). Se observó una correlación positiva entre los espermatozoides con funcionalidad de membrana evaluados con HOS y HOS/AC (equinos: $r= 0,93$ y cerdos: $r= 0,89$). Se observó una correlación positiva entre los espermatozoides con acrosoma intacto evaluados con AC y HOS/AC (equinos: $r= 0,85$ y cerdos: $r= 0,89$). En conclusión: la combinación de las dos técnicas, HOS y AC, es un método sencillo y económico que permite evaluar simultáneamente dos parámetros espermáticos, estado del acrosoma y funcionalidad de la membrana, indispensables para estimar la calidad seminal. Su incorporación en un espermograma de rutina realizado a campo en las especies estudiadas permitiría independizarse del uso de fluorocromos.

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

El enfrentamiento físico entre machos de llama previo a la extracción de semen no modifica la calidad del eyaculado

FUMUSO, F.G.^{1,3}; GIULIANO, S.M.²; CHAVES, M.G.¹; NEILD, D.M.¹; MIRAGAYA, M.H.¹ & CARRETERO, M.I.^{1,3}

En algunas especies se ha observado que la aplicación de un estímulo sexual antes de la recolección de semen puede mejorar la calidad del eyaculado obtenido. Los machos adultos de CSA expresan patrones de conducta muy agresivos cuando compiten entre sí. Teniendo en cuenta esta característica, el objetivo del presente trabajo fue determinar si el enfrentamiento físico entre machos de llama previo a la extracción de semen modifica la calidad del eyaculado recolectado. Se trabajó con cuatro machos adultos de llama y todos los eyaculados fueron obtenidos mediante electroeyaculación bajo anestesia general. Se evaluaron un total de 40 eyaculados de los cuales 20 fueron recolectados luego de haber enfrentado a los machos con otro macho durante un periodo de 2 a 3 minutos. Desde su llegada a la facultad los machos han permanecido en corrales individuales aislados entre sí, sin tener contacto visual ni físico entre ellos previo al estudio. Las características evaluadas en el semen fresco fueron: volumen, filancia, concentración, número total de espermatozoides, movilidad espermática, viabilidad espermática (Tinción fluorescente CFDA/PI) y funcionalidad de membrana (HOS test), estado acrosomal (Coomassie Blue) y condensación de la cromatina espermática (Azul de Toluidina). El volumen, concentración, número total de espermatozoides, movilidad, viabilidad y funcionalidad de membrana espermática se

analizaron con un t de Student, la presencia o ausencia de filancia con un Chi cuadrado, el estado acrosomal y condensación de la cromatina espermática se analizaron mediante el test de Mann Whitney. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el volumen, filancia, concentración espermática, número total de espermatozoides, integridad y funcionalidad de membrana, estado acrosomal y grado de condensación de la cromatina espermática entre eyaculados provenientes de machos con y sin estímulo previo a la extracción. Se observaron diferencias significativas ($p = 0,01$) en el porcentaje de espermatozoides móviles (con estímulo: $55,4 \pm 19,3$ %, sin estímulo: $40,2 \pm 16,5$ % [media $\pm$ DS]). Al analizar esta variable para cada individuo, sólo se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en las muestras provenientes de uno de los machos. Estos hallazgos sugieren que podría haber respuestas individuales de cada macho, con lo cual habría que ampliar la población de estudio para determinar si el efecto sobre la movilidad espermática difiere según el individuo. Los resultados indicarían que no habría un efecto de la competencia ni del comportamiento de dominancia característico entre machos sobre la calidad seminal de los eyaculados obtenidos luego del estímulo. En estudios posteriores se evaluarán otros efectos conductuales sobre la calidad seminal de los eyaculados de llama obtenidos mediante electroeyaculación.

Efecto de diferentes sistemas de soporte en la vitrificación de folículos preantrales porcinos contenidos en láminas de corteza ovárica

GABRIEL, P.¹; FRATTO, M.C.¹; CISALE, H.¹; LOMBARDO, D.² & FISCHMAN, M.L.¹

La técnica de vitrificación de folículos preantrales (FPA) contenidos en láminas de tejido ovárico permite preservar el potencial genético de individuos de interés. El soporte utilizado para vitrificar modificaría la eficacia del proceso. El objetivo del presente trabajo fue determinar el soporte más adecuado para realizar la vitrificación de láminas de tejido ovárico porcino. Se tomaron ocho muestras de la corteza ovárica (5 mm x 2 mm x 1 mm) de ovarios de hembras porcinas provenientes de faena (n=10). Los controles se fijaron en solución de Bouin. Las muestras restantes fueron divididas aleatoriamente entre los distintos soportes: criotubos (A) con 200 µl de solución de vitrificación (SV), cápsulas BEEM® (B) y agujas de acupuntura (C). Las mismas fueron expuestas a la SV: TCM-199, HEPES 25Mm, 30% etilenglicol, 20% de suero fetal bovino y sacarosa 0,25M y almacenadas en nitrógeno líquido durante una semana. Luego del atemperado se realizó la evaluación morfológica sobre cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina, con microscopía de campo claro (x400). Los FPA se clasificaron como normales (sin alteraciones en el ovocito o en las células de la granulosa) o anormales (con cambios degenerativos en el ovocito y/o células de la granulosa con alta picnosis o alteración del epitelio). A su vez se realizó un análisis morfométrico sobre fotos digitales de los FPA obtenidas con la cámara LEICA DC-180 y el programa de captura IM_50 LEICA Inc. Mediante el software Qwin PlusR se obtuvieron

los valores de área citoplasmática (AC); área nuclear (AN), área total (AT), relación núcleo/citoplasma (AN/AC). El análisis estadístico se realizó mediante el test de Friedman ($p < 0,05$). De un total de 607 FPA analizados, se observó un porcentaje significativamente mayor de folículos morfológicamente normales al utilizar criotubos o agujas de acupuntura, tanto en primordiales (Control: 84,89%, A: 65,13%, B: 25,03%, C: 49,97%) como en primarios (Control: 77,13%, A: 40,50%, B: 18,23%, C: 44,02%). En cuanto a la localización de las lesiones, en ambos tipos de folículos, el mayor porcentaje del daño se observó sólo en el ovocito o en el ovocito y las células de granulosa juntos. A nivel del ovocito, la utilización de cápsulas BEEM® aumentó el porcentaje de lesiones en el núcleo y en el citoplasma simultáneamente con respecto a los otros soportes. El proceso de vitrificación produjo una disminución significativa en el AN, AC y AT de los folículos primordiales con respecto al control. El uso de cápsulas BEEM® en este tipo de folículos, redujo significativamente el AN. En los folículos primarios, no se observaron diferencias significativas en el AC del control y los criotubos, ni en la relación AN/AC entre el control y las agujas. Los criotubos y las agujas de acupuntura serían los soportes de elección para la criopreservación de láminas de corteza ovárica en nuestro sistema de vitrificación, ya que preservarían un mayor porcentaje de FPA morfológicamente normales al permitir el adecuado intercambio de energía térmica entre las muestras y el soporte.

¹ Cátedra Física Biológica, ² Catedra de Histología y Embriología. INITRA. Facultad de Cs. Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

Importancia de la incorporación de pruebas nucleares en el control de la calidad espermática en el bovino

GONZÁLEZ, L.O.^{1,2}; GHIRARDOSI, M.S.^{1,2}; LÓPEZ, M.S.¹; FERRARI, M.R.^{1,2}; FISCHMAN, M.L.^{1,2} & CISALE, H.^{1,2}

Uno de los factores determinantes del éxito de la inseminación artificial bovina es la calidad seminal. La evaluación *in vitro* de la misma se emplea en la práctica para predecir la capacidad fecundante del semen. Los espermogramas estándar permiten detectar, en general, aquellas muestras que presentan espermatozoides con anomalías compensables. La incorporación de pruebas nucleares permitiría la detección temprana de dosis comerciales portadoras de defectos no compensables. La evaluación de la calidad del núcleo espermático permite encontrar anomalías que podrían estar asociadas a fallas en el comportamiento a campo de las muestras evaluadas. Pajuelas comerciales de 17 toros que presentaron baja fertilidad a campo se procesaron para controlar calidad espermática y nuclear. La suma de núcleos crestados, vacuolados y diploides (Reacción de Feulgen) superó el 1% en 13 de las muestras evaluadas. Más de la mitad de las muestras presentaron valores de macro y micronúcleos y núcleos globosos, superiores al 1%. Ocho de las muestras resultaron Azul de Anilina (+), lo cual indicaría fallas en el reemplazo de histonas.

Solamente en 3 muestras se observaron núcleos Azul de Toluidina (+), revelando una incorrecta maduración/compactación de la cromatina nuclear. En 11 muestras se observaron valores superiores al 50% de núcleos con respuesta exacerbada a agentes decondensantes (Nuclear Chromatin Decondensation Test). Las alteraciones morfológicas comprometerían el proceso de fertilización o producirían pérdidas embrionarias tempranas. La presencia de histonas en espermatozoides maduros y alteraciones en las protaminas o en los puentes disulfuro impedirían una correcta compactación del material nuclear, complicando el rol de la cromatina nuclear en la protección del genoma paterno contra el ataque oxidativo y generando pérdidas embrionarias tempranas. Esto establece la importancia de realizar análisis que permitan detectar anomalías no compensables. La incorporación de estas evaluaciones en programas de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo y otros programas de valoración de toros posibilitaría la selección de los individuos más aptos para estas prácticas reproductivas.

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

Transferencia embrionaria quirúrgica y no quirúrgica en porcinos: experiencia inicial

LUCHETTI, C.G.^{1,3}; RENOULIN, E.G.; SALAMONE, D.F.^{2,3} & LOMBARDO, D.M.¹

La transferencia embrionaria es una herramienta muy útil para el progreso zootécnico. Los embriones producidos *in vitro* pueden ser transferidos a cerdas receptoras mediante dos técnicas: una quirúrgica (TEQ) y una no quirúrgica (TENQ), novedosa en nuestro país y aún no utilizada a nivel productivo. La transferencia embrionaria en porcinos ha sido tradicionalmente quirúrgica, con los gastos en insumos y materiales que implica, los requerimientos en infraestructura y personal calificado y también el hecho de la imposibilidad de ser realizado a campo en los establecimientos de producción porcina. La TENQ presenta numerosas ventajas frente a la TEQ. Entre ellas, que es no invasiva, que disturba mínimamente al animal que puede estar comiendo mientras se realiza el procedimiento, los relativamente bajos costos y que se puede realizar a campo. Además la cerda puede ser transferida muchas veces. Aplicando la combinación de FIV + TENQ se puede mejorar la genética de un rodeo en un 100 % en una generación, sin necesidad de cirugías. Dicha combinación de técnicas es totalmente novedosa. En particular en nuestro país, donde la producción y el consumo de carne porcina se encuentran en crecimiento, este sistema de producción de embriones en el laboratorio y transferencia embrionaria a campo es prometedor. El objetivo del presente trabajo fue obtener preñez mediante TEQ y TENQ

de embriones porcinos a cerdas receptoras. Se generaron embriones porcinos producidos *in vitro* a partir de ovarios de cerdas de frigorífico, mediante partenogénesis y FIV. Los mismos fueron transferidos, mediante TEQ y TENQ, a cerdas receptoras sincronizadas con 1 día de diferencia con los embriones. TEQ: entre 35 y 55 embriones de día 4 a cerdas receptoras en día 5. TENQ: entre 45 y 60 embriones de día 6 o 7 a cerdas receptoras en día 7, utilizando el catéter DeepBlue para transferencia embrionaria (minitube) en instalaciones cerradas y a campo. Se observó el no retorno a celo a día 21 como indicador de presunta preñez. Luego la preñez fue confirmada por ecografía abdominal lateral en día 25. Se realizaron 6 TEQ y 4 TENQ en instalaciones cerradas y 2 TENQ a campo. Se obtuvo una preñez por TEQ de embriones de FIV, la misma fue confirmada por ecografía en el día 25 de preñez y se perdió alrededor del día 30. Se obtuvo una preñez por TENQ de embriones partenogénicos, como era de esperar para estos embriones esta preñez continuó sólo entre 28 y 30 días. Las dos TENQ de embriones de FIV a campo resultaron en no retorno a celo pero no se pudo confirmar preñez y luego las mismas no continuaron. Si bien los resultados son prometedores, se presenta la necesidad de mejorar la calidad embrionaria para aumentar el éxito de las transferencias, además de ampliar el número de ensayos realizados.

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, INITRA, Cátedra de Histología y Embriología. ²Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Laboratorio de Biotecnología Animal. ³CONICET.

La condensación de la cromatina espermática no correlaciona con los parámetros seminales de rutina del eyaculado canino

MONACHESI, N.¹ & CARRETERO, M.I.^{1,2}

Debido a que la cabeza del espermatozoide está compuesta casi completamente por la cromatina, se ha propuesto que alteraciones morfológicas de la cabeza están relacionadas con alteraciones de la cromatina. La coloración de Azul de Toluidina (AT) es una técnica sencilla que pone de manifiesto problemas en la compactación de la cromatina del núcleo espermático, interactuando iónicamente con el ADN a través de la unión a los grupos fosfatos negativos. El objetivo del presente estudio fue correlacionar el grado de condensación de la cromatina de espermatozoides caninos teñidos con AT con los parámetros seminales evaluados en los espermogramas convencionales. Se procesaron 21 eyaculados provenientes de 7 machos (n=7, r=3), clínicamente saludables, de entre 2 a 5 años de edad, de diferentes razas. Las muestras fueron obtenidas mediante la técnica de masaje manual sobre la porción caudal del bulbo del glande, recolectándose la primera y la segunda porciones del eyaculado. Las características seminales evaluadas fueron: volumen (V), movilidad (MP), concentración (C), funcionalidad de membranas (HOS) y morfología espermática. Se realizaron frotis que se fijaron y tiñeron con AT (0,25%) durante 15 minutos. Se evaluaron 3 patrones de espermatozoides de acuerdo al grado de condensación de la cromatina: i) AT negativos: cromatina condensada; ii) AT intermedios: cromatina moderadamente descondensada

y iii) AT positivos: cromatina altamente descondensada. Como control positivo de la tinción, se incubó una alícuota de la muestra con un agente reductor de los puentes disulfuros de las protaminas (ditiotreitól al 1%, DDT). El 100% de los espermatozoides incubados con DTT fueron AT positivos. Los valores para las características seminales de rutina fueron (media $\pm$ DS): V: $1,6 \pm 0,5$ ml; MP: $82,4 \pm 6,3\%$; C: $461,3 \pm 201,5 \times 10^6$ esp/ml; HOS: $94,9 \pm 2,0\%$, espermatozoides con morfología normal: $84,5 \pm 7,6\%$, anormalidades primarias: $6,8 \pm 5,5\%$, anormalidades secundarias: $8,7 \pm 4,0\%$. También se contabilizaron las anormalidades de cabeza ($0,4 \pm 0,9\%$) y las cabezas sueltas ($3,3 \pm 2,7\%$). Los valores de AT fueron (media $\pm$ DS): AT negativos: $95,1 \pm 3,5\%$; AT intermedios: $4,1 \pm 2,8\%$ y AT positivos: $0,8 \pm 1,1\%$. No se observó correlación entre los diferentes patrones de AT y las diferentes variables seminales estudiadas ($r < 0,4$; $p > 0,05$). Estos resultados indican que al no observar asociación entre las anormalidades de cabeza (contabilizadas en los espermogramas de rutina) y las alteraciones en la compactación de la cromatina (observadas con AT), podrían existir espermatozoides caninos con cabezas morfológicamente normales, pero con algún grado de descondensación de la cromatina. Por lo tanto, el análisis de la morfología de la cabeza espermática podría no ser un parámetro adecuado para predecir el estado de la cromatina en la especie canina.

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

Viabilidad de embriones bovinos producidos *in vitro* vitrificados en diferentes estadios de desarrollo

GÓMEZ OQUENDO, J.¹; MATURA MENA, D.¹; VARELA GIRALDO, E.¹ & RESTREPO BETANCUR, G.²

La vitrificación es una técnica de congelación ultrarrápida, basada en el contacto directo entre los embriones y la solución de vitrificación que contiene agentes crioprotectores. En este proceso, el embrión al ser enfriado no se cristaliza, sino que experimenta solidificación por las altas tasas de enfriamiento, permaneciendo en este estado durante todo el proceso, al pasar del estado líquido a un estado sólido no estructurado, similar al vidrio. Esto permite conservar embriones de buena calidad durante un período de tiempo prolongado. El objetivo de esta investigación fue evaluar la viabilidad de embriones bovinos producidos *in vitro* y sometidos a procesos de vitrificación en diferentes estadios de desarrollo. Se realizó la producción *in vitro* de un total de 80 embriones bovinos, a partir de oocitos obtenidos por aspiración folicular de ovarios provenientes de una planta de faenado. Se realizó la selección y clasificación de los embriones de acuerdo a su estadio de desarrollo como blastocisto (BL) o blastocisto expandido (BX). Grupos de cinco embriones de cada estadio, se sometieron durante 10 minutos a una solución de vitrificación (V1), compuesta por M199 Hepes (Gibco) suplementado con 7.5% de etilenglicol (EG), 7.5% de dimetilsulfóxido (DMSO) y 20% de suero fetal bovino (SBF). Luego se sometieron por un minuto a una segunda solución de vitrificación (V2), compuesta por M199 Hepes, 16.5% EG, 16.5 % DMSO, 20% SFB y 0.5M de sacarosa, los embriones

fueron depositados en el soporte de vitrificación (WTA[®]) y almacenados en nitrógeno líquido durante una semana, el calentamiento se realizó en 3 pasos, un minuto en la solución de calentamiento (W1) compuesta de M199 Hepes, 20% SFB y 0.5M de sacarosa a 37°C, luego pasaron durante 3 minutos a la solución (W2) compuesta de M199 Hepes, 20% SFB y 0.25M de sacarosa a 25°C. Finalmente pasaron a medio de lavado compuesta de M199 Hepes y 20% SFB a 25°C durante 5 minutos y fueron incubados en medio SOF. Se evaluaron las tasas de reexpansión y eclosión a las 48 horas, se determinó la viabilidad de los embriones mediante microscopía de fluorescencia (Live/Dead viability/cytotoxicity - Invitrogen[®]). Para la evaluación estadística se ajustaron modelos lineales generalizados (GLM) y se compararon las medias con la prueba de Tukey. No se encontraron diferencias estadísticas entre BL y BX para las tasas de reexpansión ($63.8 \pm 23.4\%$ vs. $72.3 \pm 22.4\%$) y eclosión ($33.6 \pm 28.5\%$ vs. $48.4 \pm 19.1\%$), respectivamente ($p \geq 0.05$). Sin embargo, se observó una tendencia en la obtención de tasas de reexpansión mayores para BX. De otro lado, se encontró diferencia en la viabilidad embrionaria para BL y BX, con resultados de $76.6 \pm 11.5\%$ y $81.4 \pm 9.4\%$, respectivamente ($p \leq 0.05$). Se concluye que el estadio embrionario BL o BX, influye en la tolerancia a la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*.

¹Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA), Facultad de Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín, Colombia. ²Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

Evaluación de especies reactivas del oxígeno en ovocitos porcinos sometidos al proceso de vitrificación-aterperado

PINCHETTI, D.¹; APARICIO, A.¹; CÉTICA, P.^{1,2}; ÁLVAREZ, G.^{1,2} & MORADO, S.¹

Con el objetivo de evaluar la calidad de ovocitos porcinos madurados *in vitro* vitrificados por el método de mínimo volumen Cryotech[®], se cuantificó luego del proceso de aterperado la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Los ovarios se obtuvieron de hembras porcinas faenadas y transportados en termos hasta el laboratorio. Los complejos ovocito-cúmulus (COCs) inmaduros se obtuvieron por aspiración de folículos ováricos antrales y seleccionados bajo lupa estereoscópica. Se utilizaron ovocitos completamente rodeados por un cúmulus íntegro y denso. Los COCs fueron madurados en medio 199 con sulfato de gentamicina, fluido folicular porcino, FSH y LH, bajo aceite mineral a 39°C, 5% CO₂ en aire y 100% de humedad durante 48 hs. Luego fueron denudados de forma mecánica con pipeta Pasteur fina previa incubación con hialuronidasa. Los ovocitos se vitrificaron (n=95) utilizando crioprotectores permeables (etilenglicol, dimetilsulfóxido), componentes osmóticamente activos (trealosa) y como soporte una lámina fina para ingresar directamente al Nitrógeno líquido. Para su aterperado se utilizaron soluciones de trealosa en concentraciones decrecientes en sucesivos pasajes hasta llegar a soluciones isotónicas. Los ovocitos se evaluaron a 3 tiempos (0, 3 y 21 hs)

siendo sus respectivos controles los ovocitos que no han sido sometidos al proceso de vitrificación-aterperado. Para medir las ROS se incubaron en PBS adicionado con polivinilalcohol (PVA) y 2',7'-diclorodihidrodiacetato de fluoresceína (DCHF-DA). Para evaluar la actividad de esterases un grupo de ovocitos fue incubado en PBS adicionado con PVA y diacetato de fluoresceína (FDA). Se obtuvieron microfotografías digitales con un microscopio de epifluorescencia, las imágenes se analizaron utilizando el software IMAGE J. Al ser los niveles de fluorescencia de DCHF-DA dependientes de la actividad de esterases intracelulares, el cociente entre la luminosidad obtenida por DCHF-DA para cada ovocito y el promedio de luminosidad por FDA de cada tratamiento fue considerado como medida relativa del nivel de ROS producido por cada ovocito. La producción de ROS fue significativamente mayor a tiempo cero, decreciendo tanto a tiempo 3 como 21 hs en frescos y en vitrificados-aterperados (P<0.05). Además, la producción de ROS fue significativamente mayor para los vitrificados-aterperados en cada uno de los tiempos (P<0,05). El proceso de vitrificación-aterperado aumentaría la producción de ROS de los ovocitos porcinos y dicho aumento no se compensa en el tiempo de recuperación.

¹ Cátedra de Química Biológica, INITRA (UBA), ² INPA (UBA-CONICET), Facultad Cs. Veterinarias, UBA. Buenos Aires, Argentina.

Efecto de la adición de gelatina sobre las características del semen de conejo refrigerado a 15°C durante 24 y 48 h

PUENTE, M.¹ & TARTAGLIONE, M.¹

La inseminación artificial con semen refrigerado es un procedimiento rutinario en las granjas cunícolas. El uso de diluyentes de semen con el agregado de gelatina mejora la crioconservación de espermatozoides por su estabilidad, capacidad de gelificación y fácil manejo, ha sido utilizada en la conservación del semen de diferentes especies de interés zootécnico, obteniéndose una mejor calidad seminal debido a que el almacenamiento en una solución viscosa reduce las demandas metabólicas del espermatozoide, así como también, evita la sedimentación de las gametas distribuidas más uniformemente en el contenedor, maximizando el rol de cada componente del diluyente, en el especial el amortiguador de pH. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la adición de gelatina al diluyente y su efecto sobre la viabilidad e integridad de membrana plasmática en espermatozoides de conejo refrigerados a 15°C durante 24 y 48 h. Para esta investigación se utilizaron 4 machos de la raza Neozelandesa, alojados en jaulas individuales con alimento y agua ad-libitum bajo fotoperíodo de 16 hs luz-8 hs. oscuridad. Se realizó una extracción por semana de cada macho con vagina artificial a 42°C, haciendo un pool el cual fue dividido en 4 alícuotas y diluidos con diluyente TCG + gelatina realizando los siguientes tratamientos: 0% de gelatina (grupo control), 0,5%, 1% y 2%. Las muestras fueron refrigeradas a 15°C. Se evaluó la viabilidad con la técnica de eosina-

nigrosina y la integridad de membrana con el test de HOS a las 24 y 48 h. Los resultados se analizaron estadísticamente con el Infostat 2016 realizando un análisis de varianza con el método de comparación de LSD Fisher con un nivel de significancia de ($P>0,05$). Los resultados obtenidos de viabilidad a las 24 h. fueron de 67,4 $\pm$ 4,7; 65,9 $\pm$ 5,6; 70,5 $\pm$ 4,7 y 64,6 $\pm$ 4,3 para el control y los tratamientos (0; 0,5%; 1% y 2%) respectivamente, observándose una diferencia significativa en el tratamiento de 1%. Los resultados observados a las 48 hs. fueron los siguientes: 62,1 $\pm$ 7,3; 61,7 $\pm$ 5,9; 64,9 $\pm$ 5,7 y 58,8 $\pm$ 5,9 para el control y los tratamientos (0%; 0,5%; 1% y 2%) respectivamente. Si bien el tratamiento con 1% también posee mejores resultados, no se ve reflejado estadísticamente. Los resultados obtenidos de integridad de membrana a las 24 hs. fueron 50,0 $\pm$ 6,4; 45,3 $\pm$ 8,5; 50,1 $\pm$ 7,3 y 45,2 $\pm$ 7 y los correspondientes a 48 h. 44,8 $\pm$ 11; 44,8 $\pm$ 9; 47,6 $\pm$ 9,2 y 41,3 $\pm$ 9,8 para el control y los tratamientos (0%; 0,5%; 1% y 2%) respectivamente. Si bien los resultados de integridad de membrana presentaron una mejoría con el agregado de 1% de gelatina, no fueron significativos. Se puede concluir que el agregado de 1% de gelatina al diluyente mejora la viabilidad en espermatozoides almacenados en forma refrigerada por 24 h. Tanto la viabilidad (48 h) como la integridad de membrana (24 h y 48 h) no presentan diferencias significativas.

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

Uso de cloprostenol para la interrupción de gestación canina

SÁNCHEZ RIQUELME, A.¹ & ARIAS RUIZ, F.¹

La interrupción de gestación en perras es uno de los motivos de consulta más frecuente en la clínica reproductiva de pequeños animales. En el presente reporte se describe el uso de un protocolo abreviado, consistente en la administración subcutánea de cloprostenol, en 4 dosis de 1 µg/kg cada 12 horas para continuar con 4 dosis de 2 µg/kg cada 12 horas a 10 perras de entre 2 y 4 años, con gestaciones de entre 25 y 30 días. El diagnóstico de gestación así como la confirmación de la interrupción de gestación

se realizó mediante exámenes ecográficos. La interrupción de gestación se observó como reabsorción, posterior a la sexta administración en 5 hembras con gestaciones entre 25 y 27 días y como aborto en las otras 5 hembras con gestaciones entre 28 y 30 días posterior a la 7 administración. En todos los casos se observó presencia de efectos colaterales como salivación, jadeo y vómito, los cuales fueron transitorios. Se concluyó que el tratamiento resultó eficaz y seguro.

¹Universidad de Las Américas, Facultad de Medicina Veterinaria y Agronomía, Escuela de Medicina Veterinaria, Viña del Mar, Chile.

Relación entre IL-1b, $\alpha\text{v}\beta 3$ y fibronectina durante la gestación porcina

VÉLEZ, C.^{1,2}; WILLIAMSON, D.¹; CLAUZURE, M.³ & KONCURAT, M.¹

La gestación es un fenómeno fisiológico que obedece a precisas interacciones entre el *conceptus* y su madre que se llevan a cabo a través de la placenta. Dado que la placenta porcina es de tipo epiteliocorial, no invasiva, adecidua, plegada y difusa, desempeña sus funciones si se produce la correcta adhesión y fijación de las células trofoblásticas con las células epiteliales endometriales y si se lleva a cabo el diálogo entre el *conceptus* y el endometrio que involucra al sistema inmunológico a fin de impedir el rechazo del embrión. El objetivo de este trabajo fue determinar la concentración de IL-1b y la expresión de la integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ y su ligando fibronectina en muestras de placentas porcinas provenientes de diferentes períodos de gestación. Se recolectó suero, úteros de cerdas no gestantes (n=5) y placentas (n=16) de 30, 60, 70 y 114 días de gestación (dg). La determinación de IL-1b se realizó en suero, homogenatos de útero vacío (HoU), homogenatos de placenta materna (HoPM) y homogenatos de placenta fetal (HoPF) por Elisa de captura mediante un kit comercial (Abcam, USA). La expresión de $\alpha\text{v}\beta 3$ y de fibronectina se realizó por inmunoperoxidasa sobre cortes histológicos de útero vacío y de placentas maternas y fetales porcinas, determinándose los valores de densidad óptica (DO). Los resultados fueron analizados mediante ANOVA y test de Tukey. Los valores placentarios maternos

de IL-1b aumentaron significativamente sólo a los 70 días de gestación (254,16 pg/ml) mientras que los valores placentarios fetales se incrementaron a los 60 dg (261,06 pg/ml); en ambos extractos descendieron a los 114 días (1 pg/ml). La concentración sérica se incrementó significativamente a los 114 dg (306,25 pg/ml). La expresión de $\alpha\text{v}\beta 3$ aumentó significativamente a los 60 dg en placentas maternas y fetales porcinas (DO: 0,6 y 0,49 respectivamente) disminuyendo su expresión a partir de los 70 días de preñez (DO: 0,24). La fibronectina acompaña el patrón de expresión de la integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ a los 60 dg en placentas maternas y fetales (DO: 0,26 y 0,54 respectivamente), a los 70 dg disminuye su expresión (DO: 0,18) para aumentar significativamente a los 114 días de preñez (DO: 0,35). En conclusión, la IL-1b se encuentra presente en la interfase feto-placentaria en los períodos de mayor remodelación placentaria. A los 60 dg su presencia se correlaciona con la expresión de la integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ y su ligando fibronectina, mientras que a los 70 dg participaría en los mecanismos moleculares que permiten la apoptosis y la secreción de otras ILs proinflamatorias para lograr el remodelaje placentario que permitirá el crecimiento exponencial de los fetos. En suero a término la presencia de IL-1b facilitaría la expulsión de la placenta al momento del parto.

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam. ² CONICET. ³ BIOMED.

