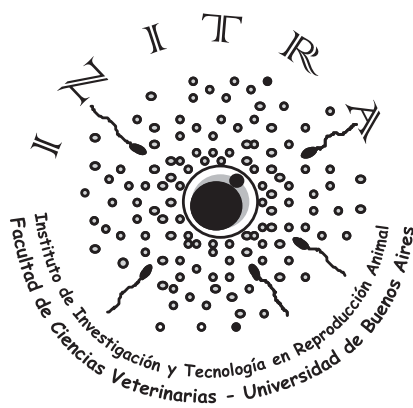


**Cuartas Jornadas Internacionales  
del Instituto de Investigación y  
Tecnología en Reproducción Animal**



**INITRA**

**Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA**

**16 y 17 de octubre de 2014**

**Buenos Aires, Argentina**



## Conferencias Plenarias

Señalización del calcio en el proceso de fertilización <i>Dr. Rafael Fissore</i> .....	91
Rol del cobre como suplemento mineral para el desarrollo de embriones bovinos: análisis de los factores metabólicos involucrados <i>Dra. Cecilia Furnus</i> .....	93
Clonación y transgénesis animal <i>Germán Kaiser, Vet, MSci</i> .....	95
Utilización de células madre para el tratamiento de endometriosis en yeguas <i>Dra. Élide Fumuso</i> .....	97
A análise computadorizada do semen (casa) e a integridade da membrana espermática na avaliação da qualidade do sêmen criopreservado de carneiro <i>Dr. Sony Dimas Bicudo</i> .....	99
Nuevas tendencias en la valoración de la calidad seminal <i>Dr. Humberto Cisale</i> .....	101
Experiencias en investigación y perspectivas futuras de las biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos <i>Dra. Susana María Giuliano</i> .....	104
Influencia del estrés en la fisiopatología ovárica bovina <i>Dr. Hugo H. Ortega</i> .....	106
El fotoperíodo y su aplicación al control de la reproducción en ovinos y caprinos <i>Dr. Philippe Chemineau</i> .....	109



# Señalización del calcio en el proceso de fertilización

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



# Clonación y transgénesis animal

Germán Kaiser<sup>1</sup>, Vet, MSci.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# Nuevas tendencias en la valoración de la calidad seminal

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

que tenga un folículo dominante con el tamaño adecuado.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# Influencia del estrés en la fisiopatología ovárica bovina

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



## Resúmenes de Posters

Identificación de proteínas en el espermatozoide de llama

*Sequeira, S.; Zampini, R.; Argañaraz, M.E.; Miceli, D.C.; Apichela, S.A.* .....117

Differences in expression and distribution of E-Cadherin and MMP2 in oviduct alpaca (*Vicugna pacos*) with mature ovarian follicle size, and the presence or absence of corpus luteum

*Angiono, G.M.; Boviez, J.D.; Blanco, C.J.; Apichela, S.A.; Lombardo, D.M.* .....118

Estudio diferencial de la expresión de metaloproteasas de matriz (MMPs) y sus inhibidores (TIMPs) en los cuernos uterinos de llama

*Barraza, D.E.; Zampini, R.; Apichela, S.A.; Miceli, D.C.; Argañaraz, M.E.* .....119

Influence of gonadotropins and insulin on glucose consumption by porcine cumulus oocyte- complex during in vitro maturation

*Barrios Expósito, M.J.; Cetica, P.; Alvarez, G.* .....120

Importance of glucose 6-phosphate dehydrogenase as regulator of the pentose phosphate pathway in porcine COCs

*Breininger, E.; Vecchi Galenda, B.; Alvarez, G.; Ferreti, E.L.;*

*Gutnisky, C.; Dalvit, G.; Cetica, P.* .....121

Crotamine, a Cell-penetrating peptide, is able to translocate into bovine embryos with no toxicity

*Campelo, I.S.; Melo, L.M.; Canel, N.G.; Freitas, V.J.F.; Salamone, D.F.* .....122

Spontaneous ovarian granulosa cell luteinization in cattle: experimental model *in vitro*.

*Carou, M.C.; Maruri, A.; Olea, G.; Lombardo, D.M.* .....123

Estudio inmunohistoquímico de receptores de andrógenos en el cuerpo epididimario de un roedor autóctono en relación con la edad

*Cruceño, A.; Chaves, M.; Aguilera- Merlo, C.; Mohamed, F.* .....124

Evaluation of nuclear maturation and apoptosis of bovine oocyte recovered by follicular aspiration with dimethylthiourea (DMTU)

*Cruzans, P.; Maruri, A.; Tello, M.F.; Lorenzo, M.S.; Lombardo, D.M.* .....125

Modelo de persistencia folicular a largo plazo: perfiles plasmáticos y en líquido folicular de progesterona y 17 $\beta$ estradiol <i>Díaz, P.; Gareis, N.; Matiller, V.; Belotti, E.; Stassi, A.; Rodriguez, F.; Amweg, A.; Salvetti, N.; Ortega, H.</i> .....	126
Effect of protein kinase c and tyrosine kinase inhibition on oxidative metabolism in cryopreserved bovine sperm <i>in vitro</i> capacitation <i>Fernández, S. and Córdoba, M.</i> .....	127
Evaluation of the acrosomal status in equine spermatozoa <i>Ferrante, A.; Baca Castex, C.; Caldevilla, M.; Carretero, M.I. Marin Briggiler, C; Vazquez Levin, M.; Miragaya, M.</i> .....	128
Redox state induced by hyaluronic acid in bovine cryopreserved spermatozoa <i>Filosa, A.; Pérez Marchetta, G.; Fernandez, S.; Córdoba, M.</i> .....	129
Efecto de la inmunomodulación sobre la expresión endometrial de la ciclooxigenasa 2 en yeguas resistentes a endometritis <i>Acuña, S.; Herrera, M.F; Peralta, V.; Dearmas, A.; Redolatti, C.; Cantatore, S.E.; Cadenazzi, G.; Rosatti, J.J.; Fumuso, E.</i> .....	130
Alteraciones en la expresión de intermediarios comunes a la respuesta de insulina E IGF1 en folículos de vacas con enfermedad quística ovárica <i>Gareis, N.C.; Huber, E.; Rodriguez, F.M.; Salvetti, N.R.; Ortega, H.H.; Hein, G.J.; Rey, F.</i> .....	131
Characterization of primary culture of bovine corpus luteum (CPCLB): an experimental model for the study of apoptosis and direct effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogues <i>Germano, P.E.; Mohamad, N.; Soñez, M.C.; Lombardo, D.M.</i> .....	132
Fluidez de membrana en espermatozoides de cerdo incubados en presencia de la fracción soluble de la yema de huevo <i>Huala, J.M.; Orrego, M.T.; Montenegro Brusotti, J.; Martínez Sarrasague, M.; Suhevic, J.; Piehl, L.L.</i> .....	133
Effect of dimethyl thiourea on nuclear maturation and apoptosis of porcine oocytes <i>Lorenzo, M.S.; Tello, M.F; Cruzans, P; Maruri, M.; Lombardo, D.M.</i> .....	134

Expression receptor GnRH (GnRH) on cells the germ line <i>Columba livia</i> (Birds: Columbiformes) <i>Olea, G.B.; Aguirre, M.V.; Lombardo, D.M.</i> .....	135
Uso de una sonda de espín para el estudio de la interacción de espermatozoides con lípidos <i>Orrego, M.T.; Huala, J.M.; Montenegro Brusotti, J.; Cimato, A.; Cisale, H.; Piehl, L.L.</i> .....	136
Participación del sistema fn/integrina en la interacción espermatozoide-oviducto bovino <i>Osycka-Salut, C.; Castellano, L.; Alonso, C.A.; Pérez-Martínez, S.</i> .....	137
Hialuronic acid and progesterone effect in bovine cryopreserved sperm <i>Pérez Marchetta, G.; Filosa, A.; Córdoba, M.</i> .....	138
Implementación de microscopía raman en el análisis de la zona pelúcida de ovocitos bovinos madurados <i>in vitro</i> <i>Rizo, G.; Alvarez, R.M.S.; García, E.V.; Barrera, A.D.; García, D.C.; Miceli, D.C.;</i> <i>Roldan Olarte, M.</i> .....	139
Efecto de melatonina sobre la expresión de receptores de andrógenos en hipófisis de vizcachas <i>Rosales, G.J.; Busolini, F.I.; Gallol, L.E.; Filippa, V.; Mohamed, F.</i> .....	140
Cordones testiculares fetales en el ovario de la mulita ( <i>D. Hybridus</i> , Xenarthra) <i>Rossi, L.F.; Luaces, J.P.; Merani, M.P.</i> .....	141
Mitochondrial activity in fresh and frozen with or without a-tocopherol boar semen <i>Satorre, M.M.; Beconi, M.T.; Breininger, E.; Córdoba, M.</i> .....	142
Alteración en la expresión de factores reguladores de la degradacion de la matriz extracelular como componentes de la enfermedad quística ovárica bovina <i>Velázquez, M.M.L.; Peralta, M.B.; Baravalle, M.E. Belloti, E.M.; Stassi, A.</i> <i>Salveti, N.R.; Ortega, H.H.</i> .....	143
Perfil de expresión y distribución espacial de MMP-2 en el oviducto de llama <i>Zampini, R.; Angiono, G.; Apichela, S.A.; Lombardo, D.M.; Miceli, D.C.; Argañaraz, M.E.</i> .....	144

Effects of leuprolide acetate, GnRH analogue, on the proliferation and apoptosis on primary cultures of bovine corpus luteum <i>Germano, P.E.; Soñez, M.C.; Hamer, C.S.; Gambarotta, M., Lombardo, D.M.</i> .....	145
Evaluación de patrones ecogénicos testiculares en carneros merino australiano de la patagonia norte <i>Ambrosi, C.P.; Aisen, E.G.; López Armengol, M.F.</i> .....	146
Equine Sperm Vitrification. Preliminary Results <i>Baca Castex, C.; Arraztoa, C.; Miragaya, M.</i> .....	147
Modelo de inducción de estrés en bovinos mediante la aplicación de adrenocorticotrofina previo al momento esperado de ovulación <i>Belotti, E.M.; Díaz, P.U.; Stassi, A.F.; Allasia, M.A.; Gareis, N.C.; Bertoli, J.; Quercia, E.; Salvetti, N.R.; Ortega, H.H.</i> .....	148
Efecto de un tratamiento prolongado con progesterona sobre la fertilidad de vacas lecheras en anestro posparto <i>Scandolo Lucini, D.G.; Satón, M.; Castro, V. Borrego, C.; Fernández, P.; Kamlofky, C.; Farcey, F.; Massara, N.; Psoa, J.; Zapata, L.; Bilbao, M.G.; Bartolomé, J.A.</i> .....	149
Causas de descarte de cerdas según el número de partos en una granja comercial <i>Borelli, V.S.; González, M.A.; Zanel, W.A.</i> .....	150
Effect of pyruvate and the antioxidant L-carnitine on equine semen motility preliminary results <i>Caldevilla, M.; Ferrante, A.; Carretero, M.I.; Miragaya, M.</i> .....	151
Morphology and morphometry of spermatic nuclei in frozen yak ( <i>Bos grunniens</i> ) semen. Preliminary data <i>Campi, S.; Jorge, A.; Blasi, C.; Fischman, M.I.; Lombardo, D.M.; Cisale, H.</i> .....	152
Luteotrophic effect of eCG to decrease gestational loss in bovines <i>Confalonieri, A.J.; Carretero, M.I.; Pendola, C.H.</i> .....	153
Uso de dimetilformamida al 4 y 7% como crioprotector para congelar semen de alpaca. Resultados preliminares <i>Flores, H.N.; Cucho, H.; Ciprian, R.; Calderón, N.; Ordóñez, C.; Carretero, M.; Miragaya, M.; Giuliano, S.</i> .....	154

Test de endósmosis en espermatozoides de alpaca <i>Flores, H.N.; Giuliano S.; Quispe A.; Ordóñez, C.; Carretero, M. Miragaya, M.; Cucho, H. ....</i>	155
Use of the integrated semen analysis system (ISAS®) for the evaluation of llama sperm motility <i>Fumuso, F.; Carretero, M.I.; Neild, D.; Gonzalez, L.; Miragaya, M.; Giuliano, S. ....</i>	156
Morphometric analysis of histological changes in vitrified porcine preantral follicles <i>Gabriel, P.; Torres, P.; Fratto, M.C.; Boviez, J.; Cisale, H.; Claver, J.A.; Lombardo, D.M.; Fischman, M.L. ....</i>	157
Histeroscopia exploratoria de vizcachas ( <i>Lagostomus maximus</i> ) no preñadas <i>Giacchino, M.; Lange, F.D.; Ferraris, S.R.; Vitullo, A.D. ....</i>	158
Detección de herpes virus bovino 4 (BoHV-4) en un sistema de producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos <i>González Altamiranda, E.; Ríos, G.; Kaiser, G.; Leunda, M.; Odeón, A.; Perez, S.; Verna, A. ....</i>	159
Objective prediction of fecundity in frozen bovine semen doses: Preliminary results <i>Gonzalez, L.; Ghirardosi, M.S.; Torres, P.; Malcervelli, D.; Fratto, M.C.; Bernardi, S.; Marini, P.; Fischman, M.L.; Cisale, H. ....</i>	160
Evaluación del número de lechones nacidos vivos comparando partos naturales e inducidos <i>González, M.A.; Borelli, V.; Zanel, W. ....</i>	161
Postthawing viability of immature vitrified oocytes and in vitro matured vitrified oocytes <i>Gutnisky, C.; Cetica, P. y Dalvit, G. ....</i>	162
Efecto del método de colecta seminal sobre la composición proteica del plasma seminal ovino <i>Ledesma, A.; Cesari, A.; Gil, J.; Hozbor, F. ....</i>	163
Determinación del estado reproductivo en <i>Xenarthra</i> por ultrasonografía testicular, citología espermática y dosaje hormonal <i>Luaces, J.P.; Rossi, L.F.; Gassmann, Y.R.; Perez Jimeno, G.; Ramos, E.; Demergassi, N.; Falzone, M.; Merani, M.S. ....</i>	164
Fecundación <i>in vitro</i> en porcinos: efectos de los tratamientos con roscovitina e ionomicina <i>Luchetti, C.G.; Tello, M.F.; Lorenzo, M.S.; Ynsaurralde, A.E.; Lombardo, D.M.; Salamone, D.F. ....</i>	165

DNA evaluation of raw dog semen using toluidine blue. Preliminary results. <i>Monachesi, N.; Carretero, M.I.</i> .....	166
Efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre la concentración de testosterona sérica en caninos <i>Risso, A.; Pellegrino, F.J.; Relling, A.E.; Pasquale, I. Spaini, E.; Corrada, Y.</i> .....	167
Use of altrenogest in replacement gilts <i>Confalonieri, J.; Carretero, M.I.; Chaves, G.; Pendola, C.H.</i> .....	168
Uso de la yema de huevo en polvo en la criopreservación del semen ovino <i>Ramírez, V.R.; Carro, M.; Ledesma, A.V.; Cano, A.; Hozbor, F.</i> .....	169
Changes in porcine semen freezing curves: Preliminary results <i>Suhevic, J.; Malcervelli, D.; Fratto, M.C.; Torres, P, Acerbo, M.; Miguez, M.; Fischman, M.I.; Cisale, H.</i> .....	170
Use of color doppler ultrasound for pregnancy control in llamas <i>Veiga, F.; Baca Castex, C.; Trasorras, V.L.; Miragaya, M.H.</i> .....	171
Comparación en época reproductiva y no reproductiva de diferentes protocolos de sincronización en cabras criollas <i>Vera, T.A.; Brunello, G.E.; Gonzalez, H.A.; Ricarte, R.A. Y Diaz, R.</i> .....	172
Quistes ováricos en cerdas: estudios anatomopatológicos y niveles séricos de progesterona <i>Barrales, H.; Cappuccio, J.; Machuca, M.; Paez, E.; De La Sota, R.; Williams, S.</i> .....	173
Effect of nadph oxidase inhibition on bovine oocyte in vitro maturation and fertilization <i>Morado, S.A., Cetica, P.D., Beconi, M.T., Dalvit, G.C.</i> .....	174

# Identificación de proteínas en el espermatozoide de llama

Sequeira, S.<sup>1</sup>; Zampini, R.<sup>1</sup>; Argañaraz, M.E.<sup>1</sup>; Miceli, D.C.<sup>1</sup>; Apichela, S.A.<sup>1</sup>

Las proteínas espermáticas participan en eventos claves relacionados a la función espermática, la interacción con el tracto reproductor femenino y la fertilización. A pesar de su importancia, el conocimiento de las proteínas espermáticas en camélidos sudamericanos es escaso. En estudios previos demostramos que el espermatozoide de llama, mediante una molécula aportada por el plasma seminal, reconoce Galactosa y N-Acetil galactosamina para adherirse al oviducto y formar reservorios espermáticos. Los objetivos son conocer el perfil de las proteínas asociadas a la membrana espermática, identificar las proteínas mayoritarias y las que tienen afinidad por N-Acetil galactosamina (NAG). Se trabajó con semen obtenido por vagina artificial de machos pertenecientes al INTA Abra Pampa (Jujuy). Los espermatozoides se obtuvieron por lavado/centrifugación con HBS. El *pellet* de espermatozoides se incubó con KCl 0,5 M en HBS (1 h a 4°C) y las proteínas asociadas a la membrana espermática se recuperaron por centrifugación. El sobrenadante conteniendo las proteínas fue desalado y concentrado por

centrifugación a través de filtros de acetato de celulosa 0,2  $\mu$ m. Luego se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida (15%) y colorearon con coomassie blue coloidal. Las bandas de mayor intensidad (39, 23, 13 kDa) se identificaron por MALDI-MS como el factor de crecimiento nervioso beta (NGF- $\beta$ ), siendo las formas de 13 kDa la proteína madura, y de 39 y 23k Da los precursores.

Para detectar las proteínas con capacidad de unión a NAG, las proteínas de un nuevo gel se inmovilizaron en membranas de nitrocelulosa y reconocieron por ligand blotting incubando con 2  $\mu$ g de NAG-PAA-FITC y anticuerpo anti-FITC- fosfatasa (1:10.000). Sólo una banda de 14 kDa unió NAG. Ésta sería la única proteína del espermatozoide de llama candidata a participar en la formación de reservorios espermáticos. Estudios adicionales son necesarios para determinar su identidad. Este trabajo describe por primera vez el NGF- $\beta$ , presente en plasma seminal, estaría adherido a la membrana del espermatozoide, al igual que una proteína de 14 kDa con actividad de lectina por su capacidad de unir el azúcar NAG.

<sup>1</sup>Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (CONICET-UNT). San Miguel de Tucumán.

# Differences in expression and distribution of E-Cadherin and MMP2 in oviduct alpaca (*Vicugna pacos*) with mature ovarian follicle size, and the presence or absence of corpus luteum

Angiono, G.M.<sup>1</sup>; Boviez, J.D.<sup>1</sup>; Blanco, C.J.<sup>2</sup>; Apichela, S.A.<sup>3,4</sup>; Lombardo, D.M.<sup>1</sup>

Cadherins and Metaloproteinases (MMPs) are related to multiple reproductive events. In recent studied the expression of E-cadherin and MMP2 in oviduct alpaca were determined. The aim of this study was to determine differences in the expression pattern of E-Cadherin and MMP2, in the oviduct of female alpaca at different times of ovarian activity. We worked with oviduct samples of adult, nonlactating, nonpregnant alpacas, obtained in Huancavelica-Perú, categorizing them according to the presence of mature follicle in size and the presence or absence of corpus luteum in the ovaries. The oviducts were fixed in formalin 10%, were separated in ampulla, isthmus and utero-tubal junction segments, and processed

to evaluate the expression of E-Cadherin and MMP2 by LSAB immunohistochemistry, using a mouse monoclonal antibody for E-Cadherin (1:100) and a rabbit polyclonal antibody (1:200). The expression pattern of E-cadherin and MMP2 was evaluated in the mucosal epithelium of the oviductal, using a subjective rating score of 4 levels. Statistical analysis using Chi square test was performed. Tendency to differences in the pattern of expression of E-cadherin and MMP2, comparing the isthmus and ampulla between animals with mature follicle size in the presence or absence of CL was observed. These findings suggest that the expression of E-cadherin and MMP2 in alpaca oviductal mucosa could be involved in reproductive histophysiology of that organ.

<sup>1</sup>Histología y Embriología, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. <sup>2</sup> Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. <sup>3</sup>Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (CONICET-UNT).-San Miguel de Tucumán. <sup>4</sup>Facultad de Agronomía y Zootecnia, UNT. Av. Chorroarín 280, (C1427CWO) Buenos Aires, Argentina.



# Estudio diferencial de la expresión de metaloproteasas de matriz (MMPs) y sus inhibidores (TIMPs) en los cuernos uterinos de llama

Barraza, D.E.<sup>1,3</sup>; Zampini, R.<sup>1,3</sup>; Apichela, S.A.<sup>1,2</sup>; Miceli, D.C.<sup>1,3</sup>; Argañaraz, M.E.<sup>1,3</sup>

En camélidos sudamericanos el 98% de las preñeces ocurren en el cuerno uterino (CU) izquierdo, independientemente del ovario en cual se haya producido la ovulación. Dado que la preñez se produce particularmente en el cuerno uterino izquierdo, podrían existir diferencias que determinen un reconocimiento específico de la preñez en dicho cuerno. En mamíferos las MMPs intervienen en la remodelación de la mucosa uterina durante la implantación. Hasta el momento no se ha descrito la presencia del sistema de MMPs en el útero de llama. Es por ello que el objetivo de este trabajo es conocer si los CUs de llama expresan los genes de las MMPs 2 y 9, y sus inhibidores (TIMPs 1 y 2). A tal fin, se trabajó con fluido y tejido de CUs de hembras de llama no lactantes, no preñadas pertenecientes al CEA-INTA Abra Pampa (Jujuy, Argentina). Se estudió la actividad de MMPs por zimografía en gelatina y la expresión de genes de MMPs/TIMPs por RT-qPCR, utilizando como genes control  $\beta$ -actina y HPRT.

En la zimografía de fluido se observaron bandas de actividad gelatinolítica de 88 kDa y 62 kDa, mientras que en tejido se detectaron bandas de 95 y 64 kDa. Las bandas de 62-64 kDa corresponderían a la MMP2, mientras que la de 95 y 88 kDa a la pro-MMP9 y a la MMP9 respectivamente; observándose mayor actividad de MMP2. No se detectaron diferencias a nivel de actividad gelatinolítica de MMPs entre ambos CUs tanto en endometrio como en fluido uterino. Los estudios de expresión cuantitativa de MMP2, MMP9, TIMP1 y TIMP2 tampoco mostraron diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de expresión en CU izquierdo y derecho.

Estos datos indicarían que el sistema proteolítico MMPs/TIMPs no presenta variaciones entre ambos CUs en hembras no preñadas a nivel de expresión génica lo cual se encuentra en correspondencia con lo observado a nivel proteico.

<sup>1</sup>Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (CONICET-UNT), San Miguel de Tucumán. <sup>2</sup>Facultad de Agronomía y Zootecnia, UNT. <sup>3</sup>Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT.

# Influence of gonadotropins and insulin on glucose consumption by porcine *cumulus* oocyte- complex during *in vitro* maturation.

Barrios Expósito, M.J.<sup>1</sup>; Cetica, P.<sup>1,2</sup>; Alvarez, G.<sup>1</sup>

Oocyte maturation and embryo development *in vitro* is inefficient in swine. The *cumulus* cells metabolize most glucose available and provide the oxidative substrates necessary for oocyte maturation. FSH and LH are needed for proper maturation *in vitro* by stimulating the glycolytic pathway. Insulin increases the developmental competence of oocytes. However its involvement in the regulation of carbohydrate metabolism has not been yet assessed. The objective was to evaluate the *in vitro* porcine oocyte maturation and glucose consumption of COCs, under the influence of gonadotropins and insulin. Immature COCs were obtained by aspiration of antral follicles (3-8 mm diameter) of slaughtered pigs. Maturation was conducted for 44 hours in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 39°C in medium 199 (control) supplemented with 0,4 μUml insulin, 10

IUml of FSH + 10 IUml LH or 0,4μUml insulin + 10 IU ml of FSH + 10 IUml of LH. Glucose concentration in the remaining culture medium was determined by spectrophotometry after maturation. Meiotic maturation was evaluated by Hoechst staining. We found that the gonadotropins and their combination with insulin increased glucose uptake (nmol / COC: Control 4.1, 2.7 insulin, gonadotropins 12, gonadotropins+insulin 13) and the percentage of meiotic maturation (control 54%, insulin 52%, 68% gonadotropins, gonadotropin+insulin 75%) (p<0.05), but insulin alone had no significant effect. Therefore, gonadotropins would stimulate meiotic maturation and glucose uptake without insulin participation. We will evaluate the effect of insulin on cytoplasmic maturation of oocytes, as this hormone is routinely supplemented in media of porcine oocyte maturation.

<sup>1</sup>Biochemistry, (INITRA). <sup>2</sup>INPA, Veterinary School, UBA.

# Importance of glucose 6-phosphate dehydrogenase as regulator of the pentose phosphate pathway in porcine COCs

Breininger, E.<sup>1,2</sup>; Vecchi Galenda, B.<sup>1</sup>; Alvarez, G.<sup>1</sup>; Ferreti, E.L.<sup>1</sup>; Gutnisky, C.<sup>1</sup>; Dalvit, G.<sup>1</sup>; Cetica, P.<sup>1,2</sup>

The suboptimal results in *in vitro* porcine oocyte maturation (IVM) are partly due to ignorance of the metabolic requirements of cumulus oocyte-complexes (COCs). The aim of this work was to study the activity of a key enzyme of the pentose phosphate pathway (glucose 6 phosphate dehydrogenase, G6PDH) and its participation in IVM. Immature and *in vitro* matured COCs were resuspended in distilled water, sonicated (4 min), centrifuged (17000xg, 20 min, 4°C) and the enzymatic activity was determined spectrophotometrically in the supernatant. Enzymatic units (U) were defined as the quantity of enzyme that catalyzes the reduction of 1 µmol of NADP/min. The enzymatic activity was expressed as U/COC and the specific activity as U/protein mg (mean±SD) and was compared by student t test. For IVM evaluation, immature COCs obtained by aspiration of antral follicles from gilt ovaries were matured for 48 h at 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, in 199 media supplemented with gonadotrophins (control) and with different

concentrations of 6-aminonicotinamide (6-AN; 0,01-0,1 mM), pharmacological inhibitor of G6PDH. Nuclear maturation was evaluated by the presence of the metaphase II chromosomal plate. Viability was assessed by the fluorescein diacetate probe. Percentages were compared by Chi-square analysis. The U were (1.44±0.52) 10<sup>-5</sup> and (1.54±0.51) 10<sup>-5</sup> for immature and *in vitro* matured COCs, respectively (p<0.05). The specific activity was (3.77±0.60) 10<sup>-3</sup> and (1.40±0.65) 10<sup>-3</sup> for immature and *in vitro* matured COCs, respectively. An inhibition of the IVM rate was observed with 6-AN (p<0.05) with no viability compromise of COCs. The lowest concentration of 6-AN evaluated also inhibited enzymatic activity (p<0.05, (81%). Since U remained unchanged during *in vitro* maturation, a significant decrease (p<0.05) in specific activity was observed, probably due to the increase of protein amount during maturation. These results demonstrate that the G6PDH is present in porcine COCs and participates in the oocyte maturation.

<sup>1</sup>Química Biológica - (INITRA). <sup>2</sup>INPA, FCV, UBA.

# Crotamine, a Cell-penetrating peptide, is able to translocate into bovine embryos with no toxicity

Campelo, I.S.<sup>1</sup>; Melo, L.M.<sup>1</sup>; Canel, N.G.<sup>2</sup>; Freitas, V.J.F.<sup>1</sup>; Salamone, D.F.<sup>2</sup>

Cell-penetrating peptides (CPPs) are a promising alternative to improve transgenesis technology in animals. Crotamine, a toxin from venom of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*), is a CPP capable of binding and delivering foreign DNA into somatic cells. There fore, we investigated both penetrating ability and toxicity (accessed by *in vitro* development and gene expression) of crotamine in intact bovine embryos. Thus, *cumulus*-oocyte complexes (COCs) were aspirated from follicles of cow ovaries and *in vitro* matured for 22-24 h under standard conditions. Matured COCs were fertilized with frozen-thawed semen at  $15 \times 10^6$  spermatozoa/ml for 5-6 h. Presumptive zygotes were denuded, subjected to crotamine exposure and *in vitro* culture in CR2aa medium. To visualize peptide penetration, rhodamine B-labelled crotamine was used at 10  $\mu$ M for up to 24 h. At 1, 6, 17, and 24 h, zygotes were washed, the zonapellucidae (ZP) was removed and embryos were fixed and mounted for confocal imaging. To evaluate *in vitro* development, zygotes were exposed (Cr10) or not (Cr0) to 10  $\mu$ M crotamine for 24 h. Development was measured at days 2 and 8 by cleavage and blastocyst production

ratios, respectively. Besides, expression of *ATP1A1*, *AQP3*, *GLUT1* and *GLUT3* of day 8 blastocysts were evaluated by qPCR using *GAPDH* and *H2A* as reference genes. Statistical analysis of cleavage and blastocyst rates was assessed by Fisher's exact test and gene expression was compared using the Kruskal-Wallis test followed by *post-hoc* Dunn's test. For all analysis, p-value < 0.05 was considered to be statistically significant. Intracellular localization of crotamine was confirmed at all exposure times. Concerning embryo development, no differences (p > 0.05) between Cr10 (n=309) and Cr0 (n=295) was observed for cleavage (57.93% vs 56.95%, respectively) neither for blastocyst production (24.92% vs 28.81%, respectively). In addition, expression of all evaluated genes were similar (p > 0.05) between Cr10 and Cr0. From these results, we can infer that crotamine is capable of rapidly translocating through ZP and cell membrane of IVF bovine zygotes remaining at least for 24 h into embryo cells. Crotamine used at 10  $\mu$ M concentration for 24 h does not induce toxic effects over preimplantation development of IVF bovine embryos, showing a great potential for transgenic animal production.

<sup>1</sup>Laboratory of Physiology and Control of Reproduction, Faculty of Veterinary, State University of Ceará. <sup>2</sup>Laboratory of Animal Biotechnology, University of Buenos Aires.

# Spontaneous ovarian granulosa cell luteinization in cattle: experimental model *in vitro*.

Carou, M.C.; Maruri, A.<sup>1</sup>; Olea, G.<sup>2</sup>; Lombardo, D.M.<sup>1</sup>

Luteinization is a cellular differentiation process essential for the success of early pregnancy involving the internal theca and granulosa cells that are induced by the ovulatory stimulus to become the corpus luteum (CL). The objective was to obtain a suitable and reliable experimental model for studying the process of spontaneous luteinization of primary culture cells of bovine ovarian granulosa (CPGB) *in vitro*. Cultures were classified according to if were obtained from ovaries with or without the presence of CL, assessing the production of P<sub>4</sub>, apoptosis and mitosis according to the seeding density (3125, 6250, 12500 and 25000 cells/ml) and time of culture (4, 6, 8 and 10 days). The CPGB were sown over 18X18 mm coverslips in 6-well plates. At 4, 6, 8 and 10 days of incubation, 1 ml culture medium aliquots were frozen for P<sub>4</sub> determination by RIA. The cells were fixed with methanol and stained with hematoxylin to assess apoptosis and mitosis morphologically.

All treatments were performed in triplicate. The results showed an increase in the P<sub>4</sub> production in function of time (from day 4 to 10) in cultures seeded with 6250 cells/ml, at 8 (59%) and 10 (49%; 3.13 ng P<sub>4</sub>/ml / density at day 4) days of culture for CPGB without CL and 8 (62%) and 10 (269%; 2.15 ng P<sub>4</sub>/ml / density at day 4) days to CPGB with CL. The increase in P<sub>4</sub> production was presented in conjunction with an increase in apoptosis since day 10 (86% with CL and 92% without CL) and the decrease in mitosis since day 8. It was demonstrated that cells undergoing apoptosis produce significant levels of P<sub>4</sub>. So, it is important to distinguish both, differentiation and apoptosis. Therefore, under the conditions imposed to achieve spontaneous luteinization of bovine granulosa cells from ovaries with and without CL, a seeding density of 6250 cells/ml and 8 days of culture is needed. Being this a simple *in vitro* model for studying the ability of granulosa cells to luteinize under different stimuli.

<sup>1</sup>Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste.

# Estudio inmunohistoquímico de receptores de andrógenos en el cuerpo epididimario de un roedor autóctono en relación con la edad

Cruceño, A.<sup>1</sup>; Chaves, M.<sup>1</sup>; Aguilera- Merlo, C.<sup>1</sup>; Mohamed, F.<sup>1</sup>

Los Receptores de Andrógenos (RA) han sido observados en las diferentes etapas del desarrollo en diferentes tejidos y están involucrados en los procesos de reproducción y desarrollo sexual. Nuestro modelo experimental; la vizcacha, es un roedor sudamericano de hábitos nocturnos y reproducción estacional. En esta especie el macho adulto presenta períodos de máxima actividad gonadal en verano y mínima en invierno. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de los RA en el cuerpo epididimario de vizcacha mediante inmunohistoquímica y relacionar los resultados hallados con la edad del animal. Vizcachas machos capturados en su hábitat fueron clasificados en impúberes (n=3), pre púberes (n=3) y adultos (n=3) de acuerdo al peso corporal e histología testicular. Desde animales anestesiados se extrajeron muestras de sangre y posteriormente fueron sacrificados. Muestras tisulares de epidídimo fueron extraídas y procesadas para microscopía óptica. Niveles de testosterona sérica fueron medidos por enzimoimmunoensayo quimioluminiscente y los RA se localizaron con el anticuerpo AR

(N=20): sc816. Niveles de testosterona (ng/dl) medidos en impúberes fueron menores a 20, en pre púberes  $139,74 \pm 30,77$  y en adultos  $490,66 \pm 40,76$ . El número de células inmunomarcadas para RA fue mayor en animales impúberes ( $72.74 \pm 0.75$ ) y prepúberes ( $80.36 \pm 2.73$ ) que en adultos ( $65.46 \pm 5.17$ ), sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa. En todos los casos la marcación inmunohistoquímica se observó sólo a nivel nuclear. La intensidad de marcación fue mayor en animales impúberes (+++) y pre púberes (+++) que en adultos (++) . En la lámina propia del cuerpo epididimario, las células conectivas no presentaron variaciones en la intensidad de marcación, en las tres edades estudiadas. Nuestros resultados sugieren que durante el proceso de maduración posnatal, el cuerpo epididimario necesita de testosterona en forma constante, no sólo para alcanzar la madurez sexual durante las primeras etapas del desarrollo posnatal, sino también para garantizar un microambiente luminal adecuado, en el cual los espermatozoides adquieren motilidad y capacidad fecundante cuando el animal es adulto.

<sup>1</sup>Proyecto 2-2614 CyT. Cátedra de Histología. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis.

# Evaluation of nuclear maturation and apoptosis of bovine oocyte recovered by follicular aspiration with dimethylthiourea (DMTU)

Cruzans, P.<sup>1</sup>; Maruri, A.<sup>1</sup>; Tello, M.F.<sup>1</sup>; Lorenzo, M.S.<sup>1</sup>; Lombardo, D.M.<sup>1</sup>

*In vitro* maturation (IVM) allows use ovaries as a source of immature oocytes. During transport to the laboratory, the ovaries become ischemic conditions by occlusion of blood flow and reduce the oxygen supply. The reoxygenation of ischemic tissues generates reactive oxygen species (ROS) that are toxic to the cells. The aim of this study was to evaluate the effect of adding an antioxidant, dimethylthiourea (DMTU), in the recovery medium of *cumulus*-oocyte complexes (COC) obtained from bovine ovaries by follicular aspiration on the nuclear maturation and oocyte apoptosis. COCs were obtained through puncture of ovarian follicles slaughter cattle with collection medium TCM-199 with or without the addition of 2 or 20 mM DMTU give 3 groups: Control (TCM-199 without antioxidant), DMTU 2 mM and DMTU 20 mM which were matured for 22 h. After IVM oocytes were denuded to determine the nuclear stage (Hoechst 33342 staining) and apoptosis. Annexin V staining - IP were used to determine early apoptosis and TUNEL assay

to determine late apoptosis. There were no significant differences in the percentage of meiotic maturation between control (79.9%, n=343) and addition of 2 or 20 mM DMTU in the collection medium (77.3%, n=291; 77.7%, n=220, respectively). Regarding apoptosis, there were no significant differences between the percentages of Annexin positive oocytes between the control (0%, n=205), 2 mM DMTU (1.6%, n=118) and 20 mM DMTU (0 %, n=109) or the percentage of TUNEL positive between the control group (1.1%, n=177), 2 mM DMTU (0.6%, n=164) and 20 mM DMTU (1,7%, n=117). Therefore, the addition of DMTU in the collection medium of bovine oocyte recovered by follicular aspiration at the two concentrations used not produces differences in the nuclear maturation or the percentage of early or late apoptosis *in vitro* matured oocytes from control. Future research will evaluate whether adding DMTU in the collection medium modulates ROS production and cytoplasmic oocyte maturation.

<sup>1</sup>Department of Histology and Embryology, (INITRA), FVET, UBA.

# Modelo de persistencia folicular a largo plazo: perfiles plasmáticos y en líquido folicular de progesterona y $17\beta$ estradiol

Díaz, P.<sup>1</sup>; Gareis, N.<sup>1</sup>; Matiller, V.<sup>1</sup>; Belotti, E.<sup>1</sup>; Stassi, A.<sup>1</sup>; Rodriguez, F.<sup>1</sup>; Amweg, A.<sup>1</sup>; Salvetti, N.<sup>1</sup>; Ortega, H.<sup>1</sup>

Los quistes foliculares en vacas lecheras se desarrollan a partir de folículos preovulatorios que fallan en su ovulación, persisten en el ovario e interfieren con la función ovárica. La persistencia es la etapa inicial en la patogenia de la Enfermedad Quística Ovárica (EQO). El proceso de síntesis de esteroides y los niveles plasmáticos e intrafoliculares de estas hormonas se encuentran alterados en la EQO, afectando los mecanismos de retroalimentación ováricos. Para conocer el comportamiento de progesterona (P4) y  $17\beta$  estradiol (E2) nos propusimos analizar sus perfiles durante un modelo de persistencia folicular a largo plazo. Los animales se sincronizaron con un protocolo G6G con modificaciones, y luego fueron divididos en cuatro grupos: Control (C; n=5) y 5, 10 y 15 días de persistencia (P5, P10 y P15; n=5/grupo). Los controles no recibieron tratamientos adicionales y se les realizó aspirado folicular dos días después de finalizada la sincronización. P5, P10 y P15 fueron mantenidos con niveles bajos de progesterona (dispositivo intravaginal de P4, 750 mg) y se realizó aspirado folicular

a los 5, 10 y 15 días de persistencia. Las concentraciones hormonales en plasma y líquido folicular fueron determinadas mediante electroquimioluminiscencia. En plasma E2 se incrementó gradualmente desde el proestro hasta el día 10 de persistencia, reduciéndose a valores similares a los del proestro al día 15 ( $p<0,05$ ). En P5 se evidenció una concentración significativamente mayor de P4 ( $p<0,05$ ) en relación a los demás grupos. En líquido folicular las concentraciones de E2 fueron similares en todos los grupos decreciendo significativamente en P15 ( $p<0,05$ ). Las concentraciones de P4 fueron significativamente mayores en el grupo C que en los demás grupos ( $p<0,05$ ). Los resultados aquí obtenidos muestran que los niveles alterados de P4 y E2 podrían afectar el patrón normal de pulsatilidad del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, induciendo persistencia folicular a largo plazo. Esta información, sumada a otros estudios hormonales y moleculares, permitirá una mayor comprensión de la dinámica de formación inicial de los folículos persistentes como base de la etiopatogenia de la EQO.

<sup>1</sup>Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral, UNL-CONICET). FCV-UNL



# Effect of protein kinase C and tyrosine kinase inhibition on oxidative metabolism in cryopreserved bovine sperm *in vitro* capacitation

Fernández, S.<sup>1</sup> and Córdoba, M.<sup>1</sup>

Glycosaminoglycan heparin is present in genital tract of female cattle and can also induce *in vitro* sperm capacitation. During capacitation, it has been identified signaling pathways mediated by protein kinase C (PKC), protein kinase and tyrosine kinase (TK). Malate dehydrogenase NAD<sup>+</sup> dependent (MDH-NAD<sup>+</sup>) is a Krebs cycle enzyme, an indicator of mitochondrial oxidative activity. The objective was to determine MDH-NAD<sup>+</sup> activity and capacitation of cryopreserved bovine sperm incubated with heparin and PKC and TK inhibitors. GF-109203X and genistein were used as inhibitors of PKC and TK, respectively. MDH-NAD<sup>+</sup> activity was determined at 340 nm spectrophotometrically, capacitation was evaluated by chlortetracycline epifluorescence technique (CTC) and acrosomal integrity and viability by trypan blue stain/DIC. Data were analyzed by ANOVA and Tukey test ( $p < 0.05$ ).

Activity of MDH-NAD<sup>+</sup> registered for heparin capacitated sperm ( $5.42 \pm 1.32 \text{ U}/10^8 \text{ sp} \times 10^{-2}$ ) was significantly higher compared to control. In samples incubated with heparin and inhibitors of PKC and TK, enzyme activity was lower than that obtained in heparin capacitated samples ( $p < 0.05$ ). Sperm capacitation induced by heparin ( $32.75 \pm 6.49 \%$ ) determined by CTC, was significantly higher than samples treated with heparin and GF ( $12.50 \pm 3.16 \%$ ), heparin and genistein ( $14.25 \pm 4.06 \%$ ) and for the control ( $8.50 \pm 2.56 \%$ ) ( $p < 0.05$ ). Percentage of live spermatozoa and with acrosome integrity showed no significant differences between treatments and control. Protein kinase C and tyrosine kinase are involved in the intracellular signal mechanism of heparin capacitation and modulate malate dehydrogenase NAD<sup>+</sup> dependent activity in cryopreserved bovine sperm *in vitro* capacitation.

# Evaluation of the acrosomal status in equine spermatozoa

Ferrante, A.<sup>1,2</sup>; Baca Castex, C.<sup>1</sup>; Caldevilla, M.<sup>1</sup>; Carretero, M.I.<sup>1</sup>;  
Marin Briggiler, C.<sup>2</sup>; Vazquez Levin, M.<sup>2\*</sup>; Miragaya, M.<sup>1\*</sup>

Acrosome status assessment is key for evaluating the functional potential of sperm. Among the techniques that assess acrosomal status (Intact / Reacted), a widespread technique for evaluating acrosomal status together with viability is the FITC-PNA / PI (PNA) stain.. The Coomassie Blue stain (CB) is simple and inexpensive and has not been widely described in the horse. In this study both techniques (PNA and CB), were performed on selected equine sperm capacitated *in vitro* and incubated with progesterone (P4) to induce the acrosome reaction to determine the correlation (r) between the techniques. Twelve ejaculates from 3 fertile stallions were analyzed. The fraction of motile sperm was obtained by centrifugation through Androcoll-E<sup>TM</sup>. The selected sperm were incubated 3 h at 38 °C in MW-BSA medium to promote sperm capacitation. They were then separated into 3 aliquots and incubated 1 h at 38 °C with 95 uM P4 and with and without the DMSO vehicle (controls). The percentage of reacted sperm (CB and PNA) at 0 h and 4 h post-Androcoll was determined. The results were analysed using Pearson's correlation.

Capacitation was monitored by evaluating the % of capacitated sperm (chlortetracycline, CTC, pattern B) at 0 h and 3 h post-Androcoll. Selected sperm responded to capacitating conditions, as the % of capacitated spermatozoa (CTC pattern B) was higher at 3 h ( $p < 0.05$ ) than 0 h. After incubation with P4, a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the % of "reacted" spermatozoa was observed when compared with the controls when using the CB technique (no acrosome staining) and the PNA / PI (presence of stained acrosomes) and these results also correlated ( $p < 0.05$ ;  $r = 0.46$ ). However, vital staining (PI) combined with PNA showed an increase ( $p < 0.05$ ) in the % of dead spermatozoa at 4 h of incubation (58%) compared to 0h (48%). The % of live reacted sperm detected with PNA/ PI was higher in samples incubated with P4 ( $p < 0.05$ ) than the controls but did not correlate with the "reacted" sperm observed with CB ( $p > 0.05$ ;  $r = 0.28$ ). To conclude, in sperm samples with high viability, either the CB or the PNA/ PI technique can be used, but CB should be combined with a vital stain in samples of low viability.

<sup>1</sup>Cátedra de Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). <sup>2</sup>Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET. (\*equal contribution).

# Redox state induced by hyaluronic acid in bovine cryopreserved spermatozoa

Filosa, A.<sup>1</sup>; Pérez Marchetta, G.<sup>1</sup>; Fernandez, S.<sup>1</sup>; Córdoba, M<sup>1</sup>.

Oxidative metabolism and variations in cellular redox state are important parameters to study the induction of spermatogenic processes. Heparin (HP) and hyaluronic acid (HA) are glycosaminoglycans found in the bovine female genital tract. The aim of this work was to study the cellular redox state variations, oxygen consumption and capacitation induction by HP and HA. Motility and vigor were observed by optical microscopy at 37°C. Oxygen consumption was evaluated by polarography. Results were analyzed by ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ). Cellular respiration of the samples incubated for 60 minutes with HA ( $7,29 \pm 1,86 \mu\text{L O}_2/\text{h}/10^8 \text{ esp}$ ) was significantly lower than results obtained by HP treatment ( $14,76 \pm 2,89 \mu\text{L O}_2/\text{h}/10^8 \text{ esp}$ ). Spectrofluorometric evaluation with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) after excitation at 488 nm and emission of green fluorescence at

525 nm was used for the measurement of reactive oxygen species (ROS). Furthermore, DCFH-DA fluorescence, attributed to  $\text{H}_2\text{O}_2$ , was determined by flow cytometry (BD FACS Canto II flow cytometer). Sperm viability was analyzed by Propidium Iodide (PI) treatment, a fluorescent stain which only penetrates dead cell membranes and binds to DNA. A ROS production decrease (10%), analyzed by spectrofluorometrically, was observed in samples treated with HA respect to controls and ( $p < 0.05$ ). Samples treated with HA and evaluated by flow cytometry produced less ROS ( $459,88 \pm 122,65$ ) than the controls ( $909,77 \pm 150,21$ ) ( $p < 0.05$ ). No significant differences in viability were found among treatments with HA, HP and the controls ( $p > 0.05$ ). HA causes a reduction in mitochondrial respiration and ROS production, which can lead to *in vitro* capacitation of cryopreserved spermatozoa.

<sup>1</sup>Cátedra de Química Biológica, Facultad Ciencias Veterinarias-UBA. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Unidad ejecutora UBA-Conicet de Investigaciones en Producción Animal.

# Efecto de la inmunomodulación sobre la expresión endometrial de la ciclooxigenasa 2 en yeguas resistentes a endometritis

Acuña, S.<sup>1</sup>; Herrera, M.F.<sup>2</sup>; Peralta, V.<sup>1</sup>; Dearmas, A.<sup>1</sup>; Redolatti, C.<sup>2,3</sup>; Cantatore, S.E.<sup>2,4</sup>; Cadenazzi, G.<sup>2</sup>; Rosatti, J.J.<sup>2</sup>; Fumuso, E.<sup>2\*</sup>

La endometritis equina es tratada con antibióticos, oxitocina y lavajes uterinos. Los antibióticos pueden provocar resistencia bacteriana, disminución de los mecanismos de defensa, dejan residuos y tienen elevado costo. El uso de inmunomoduladores representa una alternativa terapéutica para la prevención o resolución de endometritis. La síntesis endometrial de prostaglandinas es regulada por la actividad y expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2). Se estudió el efecto del tratamiento intrauterino con un inmunomodulador (extracto de pared celular de *Mycobacterium phlei*-MCC-V) sobre la expresión de COX-2 en endometrio de yeguas resistentes a endometritis. Catorce yeguas criollas ciclando, fueron asignadas a dos grupos: Grupo-1 (n = 7), tratado con MCC-V intrauterino diluido 50 ml de agua destilada estéril y Grupo-2 (n = 7), recibió el vehículo 50 ml sin MCC-V. Se tomaron cuatro biopsias endometriales: la primera al inicio de la fase folicular (Es), momento en que a las yeguas del Grupo 1 se les administró MCC-V, la segunda a las 24 horas de declarado el inicio

de la fase folicular (24hPEs), la tercera a las 24 horas de la ovulación (24hPOv) y la cuarta al día 7 de la ovulación (d7POv). Las biopsias se fijaron en paraformaldehído. La expresión de COX-2 se determinó por inmunohistoquímica. Los resultados fueron analizados por ANOVA. En ambos grupos, la expresión de COX-2 fue mayor en el epitelio luminal que en los epitelios glandulares. En 24hPEs, la expresión de COX-2 fue mayor en el Grupo 1 que en el Grupo 2 y permaneció similar entre ambos grupos desde 24hPOv hasta d7POv. La liberación de mediadores inflamatorios podría ser beneficiosa frente a un desafío inmunológico. En esta investigación, el tratamiento con el MCC-V provocó una respuesta inflamatoria endometrial (en términos de COX-2), rápida y breve en el tiempo. Estos resultados sugieren que el MCC-V podría ser utilizado como tratamiento profiláctico en yeguas durante el estro, con el objetivo de preparar al endometrio frente al desafío inmunológico que implica la monta natural o la inseminación artificial.

<sup>1</sup>Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo-Uruguay; <sup>2</sup>CIVETAN Tandil, Fac. Cs. Veterinarias, U.N.C.P.B.A., Argentina, <sup>3</sup>Beca PICT-2012 -0290; <sup>4</sup>Beca CICPBA\*

# Alteraciones en la expresión de intermediarios comunes a la respuesta de insulina e IGF1 en folículos de vacas con enfermedad quística ovárica

Gareis, N.C.<sup>1</sup>; Huber, E.<sup>1</sup>; Rodriguez, F.M.<sup>1</sup>; Salvetti, N.R.<sup>1</sup>; Ortega, H.H.<sup>1</sup>; Hein, G.J.<sup>1</sup>; Rey, F.<sup>1</sup>

La enfermedad quística ovárica (COD) bovina se asocia con alteraciones en mecanismos intraováricos que involucran las vías de señalización en respuesta a señales extracelulares. Entre ellas, se destacan la insulina y el factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF1). Es por ello que nos propusimos evaluar la expresión génica y proteica de algunos intermediarios comunes a las señales mencionadas involucrados en la vía de la fosfatidilinositol 3'-OH quinasa (PI3K y AKT). Además, evaluamos la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR), limitante en la síntesis de esteroides, en células de la granulosa y teca. Se evaluaron muestras ováricas provenientes de animales con COD espontánea obtenidas de castraciones a campo (n=8) y de animales en proestro (controles; n=7). Se utilizaron folículos antrales pequeños, medianos, grandes y quistes espontáneos de los cuales se obtuvieron células de la granulosa y de la teca para evaluar las moléculas de interés por PCR en tiempo real. La expresión proteica se

evaluó mediante inmunohistoquímica indirecta sobre secciones de ovarios embebidas en parafina de los dos grupos y se evaluaron folículos antrales del grupo control y quistes. Se obtuvieron niveles de expresión similares en células de la granulosa para PI3K, AKT y StAR en todas las categorías foliculares evaluadas. Sin embargo, se obtuvieron menores expresiones de PI3K y AKT en células de la teca de quistes con respecto a folículos antrales controles ( $p < 0,05$ ), aunque con niveles de expresión proteica similares para StAR. Dicha expresión podría justificarse dado que StAR se encuentra modulada por intermediarios de otras vías como ERK. Los resultados obtenidos muestran que existen alteraciones en la expresión de intermediarios comunes a insulina e IGF1 en ovarios de vacas con COD. De esta manera, los mecanismos de respuesta a señales claves para el crecimiento, maduración y funcionalidad ovárica podrían verse afectados y favorecer el desarrollo de la enfermedad.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Facultad de Ciencias Veterinarias (ICIVET Litoral UNL-CONICET).

# Characterization of primary culture of bovine corpus luteum (CPCLB): an experimental model for the study of apoptosis and direct effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogues.

Germano, P.E.<sup>1</sup>; Mohamad, N.<sup>2</sup>; Soñez, M.C.<sup>1</sup>; Lombardo, D.M.<sup>1</sup>

The CPCLB is an experimental model representative of bovine corpus luteum behavior without influence of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. The objectives of this study were to characterize CPCLB regarding its heterogeneous cellular composition and to evaluate its sensitivity to apoptosis inducing factors for studying the modulation by GnRH analogues.

Primary cultures of cells obtained from bovine corpus luteum of slaughtered animals were performed and cell growth curves were obtained. Staining with haematoxylin/eosin and oil red O were made to determine morphological and histochemical features. The expression of a)  $3\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase ( $3\beta$  HSD), marker of steroidogenic cells, b) Von Willebrand Factor (VWF), marker of endothelial cells, c) active caspase 3 and d) GnRH-I receptor were

immunocytochemically evaluated. Prevailing cell populations were quantified by flow cytometry analysis with  $3\beta$  HSD and VWF and the response to apoptosis induction by serum deprivation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was assessed by TUNEL.

Steroidogenic cells were the main cell type present in CPCLB (65-85%) and showed the presence of lipid vacuoles and expression of  $3\beta$  HSD and GnRH-I receptor. The culture also presented smaller endothelial cells (25-35%), positively marked for VWF. Images of cells in interphase, mitosis and apoptosis were observed.

Rate of apoptosis increased in response to apoptotic inducers in respect of control, indicating sensitivity of CPCLB to apoptosis. The positive expression of GnRH-I receptor, would permit evaluation of the direct effect of GnRH analogues on luteal cells via this receptor.

<sup>1</sup>Chair of Histology and Embryology, INITRA, School of Veterinary Sciences, University of Buenos Aires. <sup>2</sup>Laboratory of Radioisotopes, School of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires.

# Fluidez de membrana en espermatozoides de cerdo incubados en presencia de la fracción soluble de la yema de huevo

Huala, J.M.<sup>1</sup>; Orrego, M.T.<sup>1</sup>; Montenegro Brusotti, J.<sup>1</sup>; Martínez Sarrasague, M.<sup>1</sup>; Suhevic, J.<sup>2</sup>; Piehl, L.L.<sup>1</sup>

Durante el proceso de criopreservación de espermatozoides ocurren cambios semejantes a la capacitación espermática, proceso conocido como criocapacitación. La yema de huevo, aditivo usado en criopreservación, presenta una importante fracción proteica insoluble aún en presencia del detergente Equex-Paste® (EQ). Esta fracción mostró un efecto deletéreo sobre los espermatozoides y además dificultó las evaluaciones de proteínas fosforiladas en tirosina por *Western blot* y de fluidez de membrana mediante Resonancia de Espín Electrónico (ESR). Por estas razones y dado que la mayor parte de los lípidos se encuentra en la fracción soluble de la yema, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de esta fracción sobre los espermatozoides de cerdo, en ausencia y presencia de glicerol (G) y EQ. La yema de huevo fue preparada al 20% (Y) en diluyente Androstar® Plus (D) y sus fracciones soluble (FSY) e insoluble (FIY) obtenidas por centrifugación (10000 g, 30 min). Las muestras de semen, diluídas en D, fueron estabilizadas 2 h a 17°C, centrifugadas y los espermatozoides resuspendidos a  $cc = 1,5 \times 10^9$  células/ml en: 1) D, 2) FSY, 3) FSY- G 3%, 4) FSY-G 3% - EQ

0,5-1,5%. La temperatura fue disminuida de 17 °C a 5°C en un intervalo de 2 h. Las células fueron lavadas 3 veces con D por centrifugación (2000 g, 5 min) y la fluidez de su membrana determinada por ESR utilizando dos marcadores de espín. En aquellas muestras de buena calidad seminal, los espermatozoides sometidos a los distintos tratamientos mantuvieron la fluidez de su membrana, motilidad, vitalidad y test hipoosmótico (HOS), mientras que en las muestras de mala calidad seminal se observó un significativo aumento de la fluidez ( $p < 0,05$ ) y disminución de la motilidad ( $p < 0,01$ ). La vitalidad no fue afectada en ninguno de los casos y el HOS test sólo a altas concentraciones de EQ. La FSY podría cumplir una función equivalente a la yema completa en muestras de buena calidad seminal, con la ventaja de permitir una mejor evaluación de los espermatozoides, dado que la fluidez de membrana mostró diferencias que no fueron evidenciadas con las técnicas de eosina y HOS. La evaluación de mayor cantidad de muestras de buena calidad seminal y de muestras pos-congelación es fundamental para definir los posibles beneficios de la utilización de la fracción soluble de la yema en criopreservación.

<sup>1</sup>Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. <sup>2</sup>Cátedra de Física Biológica e (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

# Effect of dimethyl thiourea on nuclear maturation and apoptosis of porcine oocytes

Lorenzo, M.S.<sup>1</sup>; Tello, M.F.<sup>1</sup>; Cruzans, P.<sup>1</sup>; Maruri, M.<sup>1</sup>; Lombardo, D.M.<sup>1</sup>

A balanced redox environment is significant for oocyte quality. An increase in the production of oxygen reactive species affects oocyte viability. The use of antioxidant during the collection of *cumulus* oocyte complexes (COCs) it is not reported in porcine. The aim of this study was evaluate the effect of dimethylthiourea (DMTU) on *in vitro* maturation (IVM) and early and late apoptosis of porcine oocytes. COCs were collected by follicular aspiration from slaughterhouse ovaries. In the control group the collection medium used was TCM-199 and the washing medium was TCM -199 supplemented with 10% porcine follicular fluid and penicillin streptomycin. In treatments 2 mM and 20 mM of DMTU was added to both media. Oocyte completely surrounded by *cumulus* cells were selected to mature *in vitro*. The determinations were performed after 44-48 h of IVM. Oocytes were denuded, fixed and stained with Hoechst 33342 for the evaluation of IVM rate; oocytes with metaphase II nuclear configuration were

considered mature. Early apoptosis was evaluated in fresh and denuded oocytes by Annexin V-propidium iodide (Invitrogen<sup>®</sup>). Late apoptosis was measured in fixed and denuded oocytes by TUNEL assay (In Situ Cell Death Detection Kit Roche<sup>®</sup>). Statistical analysis was performed with Infostat software ( $p < 0.05$ ). There were no statistically significant differences in nuclear maturation rates (57,4%, n=97 control; 53,65%, n=123 treatment 2 mM y 49,63% n= 137 treatment 20 mM) neither in the percentage of early (2,52%, n=119 control; 0,58%, n= 173 treatment 2 mM y 0%, n=122 treatment 20 mM) and late oocyte apoptosis (2,9%, n=103 control; 2,4%, n=85 treatment 2 mM y 0,83%, n=120 treatment 20 mM). We concluded that the addition of DMTU to collection medium (at the concentrations used) did not modify the rates of nuclear maturation and apoptosis in porcine oocytes. In future, the effects of DMTU supplementation in ROS production and oocyte cytoplasmic maturation will be evaluated.

<sup>1</sup>Cátedra de Histología y Embriología, (INITRA), FCV, UBA.



# Expression receptor GnRH (GnRH) on cells the germ line *Columba livia* (Birds: Columbiformes)

Olea, G.B.<sup>1</sup>; Aguirre, M.V.<sup>1</sup>; Lombardo, D.M.<sup>2</sup>

There is strong evidence of the presence of gonadotropin releasing hormone (GnRH) and its receptor (GnRHR) in the gonads of various vertebrate species. The expression of GnRH and its receptor in the sexual organs has been demonstrated in fish, amphibians, birds and mammals. From these autocrine and paracrine neuropeptide signaling regulate development and gonadal function, including steroidogenesis, spermatogenesis and folliculogenesis. Knowledge of these events gonadal endocrine regulation during development of birds is rare and has only been described embryonic processes steroidogenesis in *Gallus gallus domesticus* and *Coturnix coturnix*. Therefore the aim of this work is to characterize the GnRH receptor expression in embryonic testes and ovaries and post-natal *Columba livia* to provide information about the process of steroidogenesis in birds. For

this revealed in histological preparations testis and ovary expression GnRH in corresponding to embryos stages 41, 43 and neonates 2, 5, 7 and 75 days post-hatch, using an anti GnRHR PABX (1 mg ml) at a working dilution of 1: 800 incubated for 60 min. at 37; and revealed using the indirect protocol "L-streptavidin biotin". Samples of blood corresponding to these stages were obtained prior to euthanasia and immediately centrifuged at 1500 RPM for 5 minutes to isolate the serum, which was kept in freezer -4°C until use. From the results it was observed that in stadiums analyzed, GnRH receptor revealed immunodetection the presence of specific labeling in the plasma membrane and in the peri nuclear area of the the germline cells of ovary in stages pre -eclosión and testicles juveniles. Future analysis will focus on correlating these results with the hormone levels in plasma from techniques Radioimmunoassay (RIA).

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste. Av. Libertad 3400. Corrientes (Argentina). <sup>2</sup>Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Chorroarín 280. Buenos Aires. (CABA). C.P. 1428.

# Uso de una sonda de espín para el estudio de la interacción de espermatozoides con lípidos

Orrego, M.T.<sup>1</sup>; Huala, J.M.<sup>1</sup>; Montenegro Brusotti, J.<sup>1</sup>; Cimato, A.<sup>1</sup>; Cisale, H.<sup>2</sup>; Piehl, L.L.<sup>1</sup>

El colesterol es una molécula clave tanto en la capacitación espermática como en la criocapitación. Entre las distintas especies de mamíferos, los espermatozoides de cerdo son los que presentan la más baja relación colesterol/fosfolípidos (0,26) en su membrana, siendo los más susceptibles a la criocapitación. Los protocolos de criopreservación incluyen entre sus aditivos la incorporación de yema de huevo como fuente de lípidos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la posible incorporación de colesterol a los espermatozoides desde la yema de huevo o desde liposomas con distinto contenido de colesterol. La sonda de espín  $3\beta$ -doxil- $5\alpha$ -colestano, un análogo de colesterol, fue incorporada a: 1) yema de huevo al 20% (Y20) en lactosa 11% con y sin el agregado de glicerol 3% Equex-Paste 0,5 % (GEQ), 2) fracción soluble de Y20 obtenida por centrifugación (10000 g, 30 min) con y sin el agregado de GEQ, 3) liposomas de lípidos extraídos de Y20, 4) liposomas de lípidos comerciales con alto contenido de colesterol. Las muestras de espermatozoides, diluidas en diluyente Androstar® Plus, fueron estabilizadas

a 17°C durante 2 h, y el *pellet*, obtenido por centrifugación (2000 g, 5 min) fue resuspendido a  $cc=1,5 \times 10^9$  Z/ml en las preparaciones anteriores. La temperatura de las muestras fue disminuida de 17°C a 5°C en un intervalo de 2 h, y la presencia la sonda en los espermatozoides fue evaluada mediante espectroscopía de Resonancia de Espín Electrónico (ESR). Además, la fluidez de membrana de los espermatozoides sometidos a los distintos tratamientos fue determinada mediante ESR. En los espermatozoides co-incubados con ambos tipos de liposomas, se detectó la presencia de la sonda  $3\beta$ -doxil- $5\alpha$ -colestano y cambios en la fluidez de membrana, mientras que en los espermatozoides incubados con yema de huevo completa o su fracción soluble, tanto en ausencia como en presencia de GEQ, no se observó la incorporación de la sonda ni modificación de la fluidez de membrana de los espermatozoides. Estos resultados indicarían que los espermatozoides de cerdo no incorporan colesterol desde la yema de huevo, y que, estas células interaccionan con los lípidos cuando se encuentran en forma de liposomas.

<sup>1</sup>Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. <sup>2</sup>Cátedra de Física Biológica e (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

# Participación del sistema fn/integrina en la interacción espermatozoide-oviducto bovino

Osycka-Salut, C.<sup>1</sup>; Castellano, L.<sup>1</sup>; Alonso, C.A.<sup>1</sup>; Pérez-Martínez, S.<sup>1</sup>

La fibronectina (Fn) es una glicoproteína dimérica que presenta alrededor de 20 isoformas originadas a partir de un único gen que actúan uniéndose a integrinas, específicamente a  $\alpha 5\beta 1$ . Las variantes de Fn pueden encontrarse en plasma (soluble: Fn-s) o formando parte de la matriz extracelular (celular: Fn-c). Se sabe que el oviducto de mamíferos expresa Fn-c.

La unión de los espermatozoides (ESP) al epitelio oviductal retrasa la capacitación de los mismos, hasta que señales asociadas a la ovulación inducen su liberación permitiendo que ocurra la fecundación. Por otro lado, durante el proceso de capacitación se producen cambios en la exposición de  $\alpha 5\beta 1$  en los ESP. El objetivo fue caracterizar las variantes de Fn en el oviducto y evaluar la participación de la Fn en la regulación de la interacción ESP-oviducto en bovinos. Mediante la técnica de PCR para los 3 sitios de *splicing* alternativo, se detectaron todas las variantes de Fn en células epiteliales del oviducto (CEO). Posteriormente a través de inmunocitoquímicas se detectó la Fn-c en cultivos de CEO y al receptor  $\alpha 5\beta 1$  en ESP bovinos. Se utilizaron cocultivos de

ESP-CEO para evaluar la unión o la liberación de los ESP a las CEO. La preincubación de los ESP con un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  inhibió la unión de los mismos a las CEO ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, la incubación de los cocultivos con Fn-s indujo la liberación de los ESP de las CEO y la presencia del anti-  $\alpha 5\beta 1$  revirtió el efecto de Fn-s ( $p < 0,05$ ). Los ESP liberados con Fn-s presentaron un mayor porcentaje de ESP con motilidad progresiva y patrón capacitado respecto al control ( $p < 0,05$ ). Finalmente, se realizaron experimentos de capacitación *in vitro* de ESP bovinos criopreservados en presencia de Fn-s. La evaluación de la capacitación se realizó mediante las técnicas de CTC y de inducción de la reacción acrosomal por LPC. En ambos casos, la incubación de los ESP con la glicoproteína incrementó el porcentaje de ESP con patrón capacitado ( $p < 0,05$ ). Los resultados obtenidos sugieren la participación del sistema Fn-c/integrina  $\alpha 5\beta 1$  en la unión de los ESP al epitelio oviductal. Por otro lado, la Fn-s induce eventos asociados a la capacitación espermática promoviendo la liberación de los ESP del epitelio oviductal en bovinos.

<sup>1</sup>Lab. de Biología de la Reproducción en Mamíferos. Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-CONICET).

# Hyaluronic acid and progesterone effect in bovine cryopreserved sperm

Pérez Marchetta, G.<sup>1</sup>; Filosa, A.<sup>1</sup>; Córdoba, M.<sup>1</sup>

Heparin (HP) and hyaluronic acid (HA) are glycosaminoglycans present in the female bovine genital tract. HP participates in sperm capacitation, important event for acrosomal reaction, which is physiologically induced by zona pellucida and progesterone. These events are necessary for oocyte fertilization. HP increases intracellular calcium in bovine cells. In mammals, HA is produced by the female genital tract and *cumulus oophorus* cells. Progesterone also increases intracellular calcium and provides fertilizing potential to human and bovine sperm. The aim of this work was to study HA and progesterone effect as physiological inductors of bovine cryopreserved sperm Motility and vigor were observed at 37°C. Sperm concentration was determined by hematocymetry. Viability

and acrosome integrity were analyzed by trypan blue stain and interferential differential (DIC) optic microscopy. Capacitation and acrosome reaction was evaluated by chlortetracycline (CTC) epifluorescent stain. Results were analyzed by ANOVA and Tukey test ( $p < 0.05$ ). Sperm capacitation (CTC) increased with HA treatment ( $32.33 \pm 4.12\%$ ) respect to control ( $14.33 \pm 5.839\%$ ) ( $p < 0.05$ ). The addition of progesterone to capacitated spermatozoa with HA caused an increase in spermatozoa with true acrosome reaction ( $18.64 \pm 7.00\%$ ) respect to control ( $p < 0.05$ ). Viability did not change due to treatments ( $p > 0.05$ ). The present study introduces HA as a glycosaminoglycan that may cause *in vitro* intracellular changes and capacitation of cryopreserved bovine sperm.

<sup>1</sup>Cátedra de Química Biológica, Facultad Ciencias Veterinarias-UBA. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Unidad ejecutora UBA-Conicet de Investigaciones en Producción Animal.

# Implementación de microscopía raman en el análisis de la zona pelúcida de ovocitos bovinos madurados *in vitro*

Rizo, G.<sup>1</sup>; Alvarez, R.M.S.<sup>1</sup>; García, E.V.<sup>1</sup>; Barrera, A.D.<sup>1</sup>; García, D.C.<sup>1</sup>; Miceli, D.C.<sup>1</sup>; Roldan Olarte, M.<sup>1</sup>

Los componentes del sistema proteolítico extracelular Plasminógeno (Plg)/Plasmina (Plm) están presentes en los gametos y el oviducto de mamíferos. En nuestro laboratorio, se localizó el Plg en la zona pelúcida (ZP) y membrana plasmática de ovocitos bovinos madurados *in vitro* (MIV) y se demostró que componentes de este sistema se expresan en los complejos cúmulo-ovocito (COCs). El Plg es enzimáticamente inactivo y al interactuar con sus activadores se convierte en Plm, involucrada en la proteólisis de la ZP. El objetivo de este trabajo fue estudiar si la generación de Plm durante la MIV de ovocitos bovinos produce modificaciones sobre las glicoproteínas de la ZP. Para ello, los COCs obtenidos mediante punción/aspiración de folículos, se seleccionaron y se maduraron *in vitro* en condiciones estándares, suplementado con estreptoquinasa (SK) 3,5 UI/ml (activador exógeno y específico del Plg) o con ácido  $\epsilon$  amino caproico (EACA) 10 mM (inhibidor exógeno de Plm) durante 22 h en estufa gaseada con 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad a 38,5 °C. Luego de disgregar las células del cúmulo empleando hialuronidasa al 1%, los ovocitos se fijaron en formaldehído 4%. La ZP de los

ovocitos de cada grupo experimental se analizó mediante microscopía Raman, empleando un microscopio Raman confocal con laser de 780 nm. Se realizaron 60 exposiciones de 5 segundos cada una en tres regiones al azar de la ZP y se registraron los espectros Raman generados. Para estudiar los cambios en la ZP inducidos por la generación o inhibición de Plm, se analizaron comparativamente los espectros obtenidos. Se observaron variaciones en la región espectral 1610-1670 cm<sup>-1</sup>, correspondiente a la banda Amida I. Según la bibliografía, la banda entre 1610 cm<sup>-1</sup> y 1640 cm<sup>-1</sup> caracteriza a la estructura secundaria hoja  $\beta$  plegada, mientras que aquella encontrada entre 1650 cm<sup>-1</sup> y 1660 cm<sup>-1</sup>, a la estructura  $\alpha$  hélice. Los ovocitos que fueron MIV en presencia de SK, mostraron una banda  $\alpha$  hélice más intensa con respecto al control. La SK, al activar el Plg de la ZP y generar Plm *in situ*, modificaría la estructura secundaria de las glicoproteínas que la forman alterando la relación  $\alpha$  hélice/hoja  $\beta$ . Esta modificación bioquímica durante la MIV, podría afectar positivamente la posterior fecundación *in vitro* de los ovocitos MIV en presencia de SK y el cultivo *in vitro* de los embriones obtenidos.

<sup>1</sup>INSIBIO (CONICET-UNT), Fac. de Bioq., Qca. y Fcia. Chacabuco 461. S. M. de Tucumán (4000), Argentina.

# Efecto de melatonina sobre la expresión de receptores de andrógenos en hipófisis de vizcachas

Rosales, G.J.<sup>1</sup>; Busolini, F.I.<sup>1</sup>; Gallol, L.E.<sup>1</sup>; Filippa, V.<sup>1</sup>; Mohamed, F.<sup>1</sup>

La glándula pineal permite al organismo conocer la longitud del fotoperíodo ambiental a través de la síntesis y liberación de melatonina. En animales que se reproducen estacionalmente este indol interactúa con los esteroides sexuales y produce una interferencia en el funcionamiento gonadal. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la expresión inmunohistoquímica de los receptores de andrógeno (RA) en pars distalis (PD) hipofisaria de vizcachas machos adultos administradas con melatonina. Los animales se dividieron en 2 grupos: experimental (Exp., n=4) que recibió dos inyecciones subcutáneas diarias de melatonina en vehículo oleoso durante 9 semanas; y control (Co, n=4) inyectadas con el vehículo oleoso. Las hipófisis fueron procesadas para microscopía óptica. Los RA se inmunomarcaron con el anti-AR(N-20). Niveles de testosterona sérica fueron medidos por ensayo inmunoenzimático quimioluminiscente. Se contaron las células que presentaron inmunorreacción (ir) nuclear (RAn-ir) y citoplasmática (RAC-ir) y se expresaron como porcentaje respecto de la cantidad total de

células por campo microscópico. El patrón de inmunomarcación predominante fue nuclear en ambos grupos. Las células RAn-ir se localizaron principalmente en el extremo caudal, la región ventro-medial, y próximas a los bordes ventral y dorsal. El % de células RAn-ir no presentó variaciones significativas ( $p < 0,05$ ), sin embargo se observó una tendencia a valores mayores en animales administrados con melatonina (Co:  $8,05 \pm 0,82\%$  y Exp.  $9,05 \pm 1,02\%$ ). La marcación citoplasmática fue más notoria en la región central. Luego del tratamiento con melatonina se observó una disminución significativa del % de células RAC-ir ( $p < 0,05$ ; Co:  $0,33 \pm 0,05\%$  y Exp.:  $0,22 \pm 0,05\%$ ) y en los niveles séricos de testosterona ( $p < 0,01$ ; Co:  $424,20 \pm 47,35$  ng/dl y Exp.:  $156,53 \pm 40,59$  ng/dl). Estos resultados demuestran que la administración de melatonina modifica la expresión de los RA en hipófisis y los niveles de andrógenos circulantes. Estas variaciones no presentan una relación directa entre ellas, por lo tanto sugerimos que el indol a nivel hipofisario podría actuar a través de un mecanismo específico.

<sup>1</sup>Proyecto 2-2614 CyT, Cátedra de Histología, Fac. de Qca., Bioqca. y Fcia., Universidad Nacional de San Luis; CONICET.

# Cordones testiculares fetales en el ovario de la mulita

## (*D. Hybridus*, *Xenarthra*)

Rossi, L.F.<sup>1</sup>; Luaces, J.P.<sup>1</sup>; Merani, M.P.<sup>1</sup>

La mulita, *Dasyurus hybridus*, es un armadillo con uno de los sistemas reproductivos más peculiares conocidos entre los mamíferos, con retraso de implantación y poliembrionía monocigótica. En otros armadillos se describieron estructuras que sugieren un ovario indiferenciado, y en *D. hybridus* la morfología del parénquima ovárico indica una situación similar. A fin de clarificar estas estructuras en *D. hybridus*, se realizaron en material de colecciones, cortes histológicos longitudinales y transversales de ovarios fijados en formol 10%, que fueron teñidos con hematoxilina eosina. El ovario de forma discoidal posee una corteza externa que ocupa casi todo el órgano. En todos los individuos adultos y en la mitad de los juveniles se observaron estructuras aisladas con forma de cordones o túbulos que se ubican en la zona más externa del ovario. Este tejido similar a cordones testiculares fetales se encuentra formado por:

1) una membrana basal, rodeada de células aplanadas peritubulares; 2) de dos tipos de células internas: las sustentaculares de núcleo elongado perpendicular a la basal, y las germinales poliédricas de núcleo redondeado con cromatina homogénea y citoplasma claro; 3) cromatina en cordones en algunas células germinales, propias de señales diferenciación nuclear 4) células picnóticas en proceso de degeneración. Entre los mamíferos, los ovarios de este tipo han sido clasificados como ovotestis; sin embargo la gónada femenina de *D. hybridus*, compuesta de un tejido ovárico dentro del cual se encuentran cordones aislados de tejido testicular disgenésico, representaría un caso excepcional. Es por lo tanto necesario profundizar con otros estudios la función y presencia de estos cordones testiculares fetales en *D. hybridus* descritos, a fin de declarar los mecanismos de organogénesis como la influencia de los mismos en el ciclo reproductivo de esta especie.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Cromosómica. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. Paraguay 2155 P10° LAB 6 (C1121ABG) C.A.B.A-Argentina.

# Mitochondrial activity in fresh and frozen with or without $\alpha$ -tocopherol boar semen

Satorre, M.M.<sup>1</sup>; Beconi, M.T.<sup>1</sup>; Breininger, E.<sup>1</sup>; Cordoba, M.<sup>1</sup>

Cryopreservation damage on sperm includes mitochondrial, flagellar and acrosomal alterations. The maintenance of the mitochondrial activity may be related to the resistance of sperm to the cryopreservation process. The plasma membrane disruption can lead to metabolic disorders. Sperm are relatively impermeable to di- and tricarboxylic acids. The alteration of the plasma membrane modified succinate permeability facilitating its mitochondrial oxidation. In order to evaluate the mitochondrial damage produced by the cryopreservation process we assessed in fresh (control) and cryopreserved with or without alpha tocopherol, boar spermatozoa, the mitochondrial functionality by the polarographic assay of oxygen uptake, as well as quality parameters: motility, by optical microscopy; viability by eosin-nigrosin; acrosomal integrity by DIC and Trypan blue staining patterns and cryocapacitation by

chlortetracycline (CTC). The results were analyzed by two-way ANOVA and posterior contrasts were used in the analysis of the mean values. A value of  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant. All quality parameters were affected by cryopreservation process, being this damage lower when alpha tocopherol was added to freezing extender. Basal respiration significantly decreased in cryopreserved samples respect to fresh ones, but was significantly higher in samples cryopreserved with alpha tocopherol, reaching values similar to control ( $p > 0.05$ ). An increase ( $p < 0.05$ ) in succinate permeability was observed in all cryopreserved samples, although it was lower in samples with alpha tocopherol. The addition of alpha tocopherol to the freezing extender protects the sperm membranes from the oxidative damage produced by the cryopreservation process preserving the quality parameters and the mitochondrial activity.

<sup>1</sup>Instituto de investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Química Biológica, Facultad de Cs. Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. Unidad ejecutora UBA-Conicet de Investigación en Producción Animal.



# Alteración en la expresión de factores reguladores de la degradación de la matriz extracelular como componentes de la enfermedad quística ovárica bovina

Velázquez, M.M.L.<sup>1</sup>; Peralta, M.B.<sup>1</sup>; Baravalle, M.E.<sup>1</sup>; Belloti, E.M.<sup>1</sup>; Stassi, A.<sup>1</sup>; Salvetti, N.R.<sup>1</sup>; Ortega, H.H.<sup>1</sup>

La hipótesis más aceptada acerca de la etiología de la enfermedad quística ovárica (EQO) bovina es la existencia de una disfunción del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. Sin embargo, existen componentes intraováricos capaces de responder a esa alteración hormonal sistémica y contribuir en la persistencia de las estructuras foliculares. La degradación de la matriz extracelular (MEC) por parte de las enzimas metaloproteasas de la matriz (MMPs) es regulada por la acción de factores antiinflamatorios como los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs). La intensidad de dicha degradación depende del balance entre la expresión y actividad de MMPs y TIMPs. Sin embargo no se ha estudiado aún si existe una alteración en su expresión y cuál es su rol en la falla ovulatoria y mantenimiento de estructuras quísticas durante la enfermedad. Para ello, en el presente trabajo nos propusimos estudiar los niveles de expresión de ARNm correspondientes a MMP2, TIMP1, TIMP2, TIMP3 y TIMP4, en quistes foliculares de animales con EQO y en folículos preovulatorios

de animales sanos. Trabajamos con muestras de células obtenidas por aspiración folicular, en animales de establecimientos lecheros de la zona. El análisis de la expresión relativa de cada gen se realizó mediante PCR en tiempo real. Los resultados demostraron que MMP2 tiende a disminuir su expresión en quistes foliculares con respecto a lo observado en folículos preovulatorios ( $p=0,06$ ), mientras que la expresión de ARNm correspondiente a TIMP1 estuvo significativamente disminuida en los quistes respecto de los folículos preovulatorios ( $p<0,05$ ). Por otro lado, TIMP2 y TIMP3 no mostraron diferencias significativas entre animales con EQO y sanos, siendo la expresión de ARNm de TIMP4 no detectable por este método. Esto nos permite inferir que el desbalance en la expresión de dichos factores es un indicio de la alteración existente a nivel de la MEC cuando las estructuras foliculares permanecen en el tiempo. Esto a su vez podría impedir que ocurra la cascada de eventos que desencadenan la reacción inflamatoria normal, necesaria para la ruptura del folículo y liberación del ovocito.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada. Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral. Universidad Nacional del Litoral-CONICET.

# Perfil de expresión y distribución espacial de MMP-2 en el oviducto de llama

Zampini, R.<sup>1</sup>; Angiono, G.<sup>2</sup>; Apichela, S.A.<sup>1,3</sup>; Lombardo, D.M.<sup>2</sup>; Miceli, D.C.<sup>1,4</sup>; Argañaraz, M.E.<sup>1,4</sup>

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) son un grupo de enzimas proteolíticas que podrían estar asociadas con la fluidificación del semen, expansión de las células del cúmulo del ovocito y la interacción ovocito-espermatozoide. En estudios preliminares detectamos y secuenciamos parcialmente el ARN mensajero de MMP-2 en el oviducto de llama. Los objetivos de este trabajo fueron determinar los niveles de expresión de MMP-2 en ampulla, istmo, unión útero tubal (UUT) y papila del oviducto de llama, localizar MMP-2 en estas regiones y determinar la actividad de MMP-2 del fluido oviductal (FO). Se trabajó con oviductos de hembras no lactantes, no preñadas pertenecientes al CEA-INTA Abra Pampa (Jujuy, Argentina). El FO se obtuvo mediante perfusión de los oviductos con Tris 10 mM pH 7,4. Posteriormente los oviductos fueron separados en las diferentes regiones y procesados para obtener ARN total, o fijados en formol 10% en PBS para ensayos de inmunohistoquímica. A partir de las muestras de

ARN se determinaron los niveles de expresión de MMP-2 en ampulla, istmo, UUT y papila mediante RT-qPCR. Para los estudios de inmunolocalización en el tejido se empleó un anticuerpo policlonal anti-MMP-2 producido en conejo (dilución 1:100). Finalmente la actividad proteolítica de MMP-2 se determinó mediante zimografía empleando gelatina como sustrato. Se observó expresión de MMP-2 en ampulla, istmo, UUT y papila del oviducto de llama, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión entre regiones. La inmunomarcación se ubicó principalmente a nivel del epitelio de las diferentes regiones oviductales, y el FO mostró una banda de 62 kDa con actividad gelatinolítica consistente con MMP-2. En conjunto, los resultados indicarían que el oviducto de la llama produce y secreta MMP-2. La presencia de esta enzima en el microambiente oviductal podría sugerir su participación en los eventos reproductivos tempranos que allí se desarrollan.

<sup>1</sup>Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (CONICET-UNT); <sup>2</sup>Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires; <sup>3</sup>Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán; <sup>4</sup>Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán.

# Effects of leuprolide acetate, GnRH analogue, on the proliferation and apoptosis on primary cultures of bovine corpus luteum

Germano, P.E.; Soñez, M.C.<sup>1</sup>; Hamer, C.S.; Gambarotta, M., Lombardo, D.M.

GnRH is an endogenous ovarian molecule which regulates the processes related to the dynamics of the corpus luteum. The object of this work was to determine the effects in vitro of leuprolide acetate (LA) on proliferation and apoptosis of primary cultured bovine luteal cells (CPCLB). Luteal cells from slaughter animals were cultured 7 days with supplemented DMEM + F12. Three experiments with the following treatments in triplicate were performed: FBS 5% (control), LA 10 and 100 nM.. The GnRH receptor and proliferating cells were identified using indirect immunocytochemistry LSAB (Dako) applying antibodies anti-GnRHR 1:50 and anti-hKi-67 Clone MIB-1 (Dako) 1:100 respectively. The apoptotic index was obtained by light microscopy analysis and H/E stain. The data

were statistically analyzed by ANOVA. Most of the cells expressed the GnRH receptor. There were no statistically significant differences in the levels of proliferation among cultures treated for 24 h ( $p = 0.46$ ) while the ones stimulated for 48 h were similar for both doses of LA but showed significant decrease related the controls ( $p = 0.002$ ). The apoptotic index determined by light microscopy showed no significant differences between controls and treated cultures (ANOVA for two factors:  $p > 0.05$ ). We conclude that this analogue of GnRH did not alter rates of apoptosis in CPCLB cells treated with both doses during 24 and 48 h, while the proliferation index was independent of doses, significantly decreasing in number comparing cells treated for 48 h to controls, indicating that LA modulates CLB cell proliferation in vitro.

# Evaluación de patrones ecogénicos testiculares en carneros merino australiano de la patagonia norte

Ambrosi, C.P.<sup>1,2</sup>; Aisen, E.G.<sup>1</sup>; López Armengol, M.F.<sup>1,2</sup>

La ultrasonografía es un método seguro no invasivo de evaluación del parénquima testicular, generalmente utilizado con fines diagnósticos clínicos. Los tejidos altamente celulares se observan hipoeoicos por su gran contenido de agua. En ovinos, los testículos clínicamente sanos presentan un patrón ecogénico homogéneo, observándose como única estructura hiperecoica el mediastino testicular. Los objetivos de este trabajo fueron: evaluar si existen cambios en la ecogenicidad del parénquima a lo largo de los meses estudiados, y si existe relación con otras variables del testículo, epidídimo y calidad espermática. Ocho carneros Merino Australiano de 4 dientes de edad fueron examinados desde marzo hasta septiembre de 2014. Las imágenes se obtuvieron mensualmente utilizando un ecógrafo equipado con transductor sectorial de 7,5 MHz, aplicado perpendicularmente al eje longitudinal testicular en la superficie escrotal craneal. La ecogenicidad fue evaluada mediante el software ImageJ v1.49h y expresada como el promedio de intensidad de pixeles (escala: 0 = anecoico, 255

= hiperecoico) en un sector rectangular de 500 pixeles situado a una profundidad de 0,5 a 2,5 cm dentro del parénquima testicular. Mensualmente se promediaron los valores de ambos testículos. Las otras variables consideradas fueron: largo testicular y perímetro escrotal, consistencia testicular y de la cola del epidídimo (escala de 1 a 4), volumen del eyaculado, concentración espermática y espermatozoides totales de los eyaculados. La ecogenicidad del parénquima testicular se correlacionó significativamente ( $p < 0,05$ ) y de forma negativa ( $r = -0,50$ ) con los meses considerados como estación reproductiva (marzo a julio), el volumen del eyaculado ( $r = -0,34$ ) y total de espermatozoides ( $r = -0,44$ ). Sin embargo, no hubo correlación significativa con largo y consistencia testiculares, perímetro escrotal, consistencia de la cola del epidídimo y concentración espermática. Concluimos que en estación reproductiva el patrón ecogénico testicular presenta menor ecogenicidad, y los eyaculados mayor volumen y número total de espermatozoides.

<sup>1</sup>Laboratorio de Teriogenología "Dr. Héctor H. Morello", IBAC, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue; <sup>2</sup>CONICET.

# Equine Sperm Vitrification

## Preliminary Results

Baca Castex, C.<sup>1</sup>; Arraztoa, C.<sup>1</sup>; Miragaya, M.<sup>1</sup>

Vitrification is a technology that has recently surged in the reproductive criobyology field. The major problem of vitrification is the media toxicity given by the high concentracions of crioprotectors used. Sperm vitrification without crioprotectors is a new method succesfully used in humans and canines. This technique requires semen improvement and very high rates of cooling and thawing. The aim of this study was to evaluate equine sperm vitrification without permeable crioprotectors. Semen was recolected using an artificial vagina Missouri model and a mare on heat (n=2, r=2). Samples were improved by colloidal centrifugation with Androcoll-E<sup>TM</sup>. Selected sperm were split and diluted to  $5 \times 10^6$  sperm/ml in different vitrification media: Control (Modified Whittens Medium: MW) (a), MW + 1% BSA (b), MW + 1% BSA + 0.25 M sucrose (c) y MW + 1% BSA + 0.4 M sucrose (d). Vitrification was performed in spheres by discharging 20 to 30  $\mu$ l of the sperm suspension directly over liquid nitrogen. Samples remained

stored a minimum of 24 hs before evaluation. Spheres were warmed in a rapid way by plunging them directly in MW medium + 1 % BSA at 37°C, accompanied by a smooth agitation with vortex. Afterwards, centrifugation was performed at 400 x g during 5 minutes and the pellet was resuspended in 100  $\mu$ l of MW medium. The following parametres were evaluated: motility, membrane functionality (HOS test), sperm viability (CFDA-PI stain) and sperm chromatin fragmentation (SCD- Sperm Chromatin Dispertion assay). The vitrified-warmed sperm did not show motility, HOS nor viability. In reference to DNA fragmentation, values of intact DNA (media $\pm$ standard deviation) were:  $95.44 \pm 2.18$ ;  $93.56 \pm 2.28$ ;  $94.23 \pm 3.91$  y  $93.63 \pm 5.59$  for treatments a, b, c y d respectively. The vitrification process would alter sperm viability parameters studied without altering DNA, indicating the posibilidad of using vitrified-warmed equine sperm in assisted reproductive techniques as the intracitoplasmic sperm injection (ICSI).

<sup>1</sup>Cátedra de Teriogenología, Instituto de Investigación en Tecnología y Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

# Modelo de inducción de estrés en bovinos mediante la aplicación de adrenocorticotrofina previo al momento esperado de ovulación

Belotti, E.M.<sup>1,2,4</sup>; Díaz, P.U.<sup>1,2,3</sup>; Stassi, A.F.<sup>1,2,3</sup>; Allassia, M.A.<sup>5</sup>; Gareis, N.C.<sup>1,2,4</sup>; Bertoli, J.<sup>5</sup>; Quercia, E.<sup>6</sup>; Salvetti, N.R.<sup>1,2,3</sup>; Ortega, H.H.<sup>1,2,3</sup>

La enfermedad quística ovárica (EQO) es una de las causas principales de infertilidad en vacas lecheras. En esta y otras enfermedades reproductivas se ha postulado que existe una falla en la ovulación debido a una alteración en el mecanismo inflamatorio local que la desencadena, hipótesis que propone al estrés como uno de los principales factores etiopatogénicos. Mediante ensayos *in vitro*, se ha comprobado una liberación de cortisol folicular en respuesta a adrenocorticotrofina (ACTH), que afectaría negativamente el proceso inflamatorio mencionado. En base a estos datos es que planteamos un modelo de inducción de estrés a través de la administración de ACTH previo a la ovulación en bovinos. Se realizó el protocolo de sincronización de celos G6G-OvSynch en 6 vacas Holando Argentino y se realizó el seguimiento de la dinámica folicular ovárica mediante ecografía transrectal. Se aplicaron 100 de ACTH, intramuscular, cada 12 horas a partir del día 15 del protocolo y

durante todo el proestro hasta el momento esperado de ovulación (día 18 en este protocolo), momento en el cual se realizó ovariectomía bilateral por flanco izquierdo. Además, se extrajeron muestras de sangre para mediciones de cortisol sérico cada 2 h desde la primera aplicación de ACTH durante 12 h totales. Los valores de cortisol sérico (medido por el método ECLIA) fueron: 0h=18,21nmol/l; 1h=253,92nmol/l; 2hs=253,64nmol/l; 3hs=159,8nmol/l; 4hs=95,49nmol/l; 5hs=58,78nmol/l; 6hs=38,91nmol/l, los cuales muestran una cinética con una concentración máxima a las 4 horas posteriores a cada administración de ACTH. La dinámica folicular demostró que la sincronización hormonal se adapta al modelo de inducción de estrés con ACTH, observándose niveles de cortisol compatibles con situaciones estresantes de la rutina de ordeño de las vacas. Por esto, este modelo permitirá evaluar la relación entre el proceso inflamatorio y el de anovulación como base de la etiopatogenia de la EQO.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada. <sup>2</sup>ICiVet-Litoral, UNL-CONICET. <sup>3</sup>CONICET. <sup>4</sup>ANPCyT. <sup>5</sup>FCV-UNL. <sup>6</sup>Profesional de actividad privada.

# Efecto de un tratamiento prolongado con progesterona sobre la fertilidad de vacas lecheras en anestro posparto

Scandolo Lucini, D.G.<sup>1</sup>; Satón, M.<sup>2</sup>; Castro, V.<sup>2</sup>; Borrego, C.<sup>2</sup>; Fernández, P.<sup>2</sup>; Kamlofky, C.<sup>2</sup>; Farcey, F.<sup>2</sup>; Massara, N.<sup>3</sup>; Pesoa, J.<sup>4</sup>; Zapata, L.<sup>2</sup>; Bilbao, M.G.<sup>2</sup>; Bartolomé, J.A.<sup>2</sup>

La eficiencia reproductiva en rodeos lecheros es reducida por el anestro posparto. En esas condiciones, los tratamientos con progesterona (P4) aseguran que, de producirse la ovulación, sea acompañada de expresión de celo y una fase lútea normal. Objetivos: evaluar la ovulación en respuesta a la administración de GnRH durante un protocolo extendido de P4. Para ello, vacas primíparas Holstein (n=23) de 50,86 ± 7,28 días postparto, condición corporal de 2,54 ± 0,19 y producción láctea de 37,54 ± 4,05 l/día en anestro, se asignaron por condición corporal y producción de leche al grupo T con dispositivo intravaginal Test de P4 (3 g) por 9 días (n=12) o al grupo C sin dispositivo (n=11). Al retiro del dispositivo (día -3), se aplicó doble dosis de PGF2 $\alpha$ . El día 0 las vacas se reasignaron a un protocolo Ovsynch (n=12, control) u Ovsynch + P4 con un nuevo dispositivo intravaginal por 7 días (n=11) seguido de IATF. Se observó la manifestación de celo por remoción absoluta

de pintura en la base de la cola. La actividad ovárica se monitoreó diariamente por ecografías transrectales y el diagnóstico de preñez se realizó 30 días post IA. Se evaluaron los niveles de P4, IGF-1 cuerpos cetónicos y glucosa en sangre. El tratamiento con P4 no modificó el tamaño folicular (días -12 y -3: 14,45 ± 4,9 mm y 14,18 ± 3,09 mm para C y 14,84 ± 3,5 mm y 14,23 ± 3,53 mm para T). No se observaron diferencias significativas en la ovulación en respuesta a la 1° GnRH (C: 7/11 y T: 7/12), ni a la 2° dosis (CC: 6/6; CT: 5/5; TC: 4/6 y TT: 5/6). A su vez, la ovulación dentro de las 37 h ocurrió en 4/6, 3/5, 3/4 y 5/5 de los grupos mencionados (P=0,3). La proporción de vacas preñadas fue de 1/6, 2/5, 1/7 y 4/6, respectivamente (P=0,14). No se observaron diferencias significativas en los niveles de cuerpos cetónicos ni glucosa. Conclusión: El tratamiento, previo al IATF, no habría afectado el tamaño del folículo dominante ni la respuesta ovulatoria.

<sup>1</sup>Facultad de Veterinaria, Univ. Nac. del Litoral; <sup>2</sup>Facultad de Veterinaria, Univ. Nac. de La Pampa; <sup>3</sup>Elastec SRL; <sup>4</sup>Biogenesis Bago SA.

# Causas de descarte de cerdas según el número de partos en una granja comercial

Borelli, V.S.<sup>1</sup>; González, M.A.<sup>1</sup>; Zanel, W.A.<sup>1</sup>

La vida reproductiva de las cerdas en granjas a través de los años ha sufrido modificaciones debido principalmente a la intensificación e incremento del tamaño de los rebaños, para lo cual se requiere una alta inversión que debe retornar en una alta productividad. El número de lechones destetados por cerda por año determina la productividad porcina y la vida reproductiva de la cerda se estima por el número de partos que tiene al momento de ser descartada. El objetivo de este trabajo fue analizar las causas de descarte en una granja porcina según el número de partos. El estudio se realizó en una granja comercial localizada en la ciudad de Las Breñas, Chaco. Se tomaron registros de 162 madres descartadas entre los años 2006 y 2013. Se establecieron 7 causas de descarte (repetición de celo, aborto, baja productividad, edad avanzada, trastorno de locomoción, muertes, ventas y otros) y estas se agruparon en 7 categorías. Los datos se analizaron mediante estadística descriptiva de las variables, distribuidas según el número de partos. La mayor frecuencia de descartes (19.1%) se debió a muerte seguida por reproducción (17.3%) y edad avanzada (16%). La principal causa de

descarte fue Muerte observándose que la suma de los valores entre 0 y 4 partos fue de 60.9% dentro de esta categoría. Del total de cerdas descartadas por problemas reproductivos, la suma de los valores de los animales de 0,1 y 2 partos correspondió al 46.3%. A medida que aumentó el número de partos, disminuyó el número de hembras eliminadas por esta razón. La categoría edad se situó en el tercer lugar con un 17,9%. Esta causa se comienza a evidenciar en las cerdas a partir del cuarto parto y el grupo de más de 6 partos tiene el mayor peso (96.1%) dentro de esta razón. La cuarta razón de eliminación fue locomoción (14%), dentro de la cual las hembras de 4 partos en adelante, sumados sus valores, constituyeron los grupos de menor valor. De los resultados obtenidos se desprende que hay causas de alto impacto en la baja de producción entre ellas, muerte y fallas reproductivas. A modo de conclusión el mejoramiento de las instalaciones puede ser uno de los cambios a implementar en el establecimiento para disminuir el efecto de los mismos, de esta manera proponer nuevos ensayos para profundizar el estudio de las causas de descarte de cerdas.

<sup>1</sup>Sector Porcinos -INTA EEA Las Breñas, Ruta Nacional 89, km 51 (CP 3722) Las Breñas, Chaco



# Effect of pyruvate and the antioxidant L-carnitine on equine semen motility preliminary results

Caldevilla, M.<sup>1</sup>; Ferrante, A.<sup>1</sup>; Carretero, M.I.<sup>1</sup>; Miragaya, M.<sup>1</sup>

L-carnitine modulates the oxidation of fatty acids, the acetyl-CoA / free CoA relation and the use of lactate and pyruvate as energy substrates in spermatozoa. It also has a powerful antioxidant effect because it reduces the availability of lipids for peroxidation and increases the activity of antioxidant enzymes. The aim of this study was to determine whether the addition of L-carnitine and pyruvate to the Kenney extender improves equine sperm motility. Eight ejaculates from four fertile stallions were collected using an artificial vagina and were analyzed. The samples were divided into three aliquots: 1- raw semen, 2-semen diluted in Kenney extender and 3-semen diluted in Kenney extender supplemented with L-carnitine and pyruvate. Aliquots were then: a) incubated at 22 °C for 6 hours, and b) refrigerated at 5 °C for 24 hours. Evaluation of the kinematic parameters of sperm motility was carried out using a computerized system

(Computer Assisted Semen Analysis CASA): the ISAS v1 (Proiser, Valencia, Spain). The percentage of motile and progressively motile sperm, curvilinear velocity (microns/sec), straight-line velocity (microns/sec), average path velocity (microns/sec), amplitude of lateral head displacement (microns), spermatic batting frequency (Hz), oscillation (%), straightness (%) and linearity (%) were evaluated. Results: At both temperatures there was a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the parameters of straight line speed, curvilinear velocity and average path velocity in samples diluted in Kenney extender with L-carnitine and pyruvate. However, the percentages of total and progressive motility showed no significant differences ( $p > 0.05$ ). It would be of interest to see if this increase in velocity has an impact on pregnancy rates using cooled semen supplemented with L-carnitine and pyruvate.

<sup>1</sup>Cátedra de Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA)

# Morphology and morphometry of spermatic nuclei in frozen yak (*Bos grunniens*) semen. Preliminary data

Campi, S.<sup>1,3</sup>; Jorge, A.<sup>1,3</sup>; Blasi, C.<sup>1,3</sup>; Fischman, M.I.<sup>1,3</sup>; Lombardo, D.M.<sup>2,3</sup>; Cisale, H.<sup>1,3</sup>

To our knowledge, there are no studies concerning the sperm nuclear morphology and morphometry of the yak (*Bos grunniens*). The aim of this study was to perform a digital analysis the sperm nuclear morphologic and morphometric of this species. Frozen semen samples of one male were thawed at 37°C for 30 seconds. The morphology and morphometry of the spermatic nucleus were assessed on 1000 spermatozoa stained with Feulgen reaction. Nuclear morphometry was determined using a Leica DC180 (Leica Microsystems Co, Wetzlar, Germany) camera and the QWin Plus (Leica Microsystems Co) software, obtaining direct (area, length, width and perimeter) and indirect characters (roundness, elongation, and equivalent diameter). The majority population of nuclei in this individual was 98,3%. The percentage of different shapes was: pyriform (1,2%), round (0,2%), microcephalic (0,2%) and elongated (0,1%). This abnormalities and their prevalence

were similar to those found in bull spermatic nuclei in our laboratory. Morphometric measures (mean  $\pm$  standard deviation) were: area:  $21,98 \pm 2,60 \mu\text{m}^2$ , length  $7,34 \pm 0,33 \mu\text{m}$ , width  $3,78 \pm 0,27 \mu\text{m}$ , perimeter:  $19,26 \pm 0,88 \mu\text{m}$ , roundness:  $1,27 \pm 0,04$ , elongation:  $1,95 \pm 0,11$ , equivalent diameter:  $5,28 \pm 0,27 \mu\text{m}$ . This values are lower in comparison to the ones found in bulls using the same technique (area:  $34,10 \pm 1,79 \mu\text{m}^2$ , length:  $9,00 \pm 0,30 \mu\text{m}$ , width:  $4,81 \pm 0,16 \mu\text{m}$ , perimeter  $24,07 \pm 0,69 \mu\text{m}$ ). New determinations are needed to confirm this tendency. This methodology showed to be adequate for the yak spermatic nuclei analysis. Even though this are preliminary results, they contribute to a better understanding of this bovid sperm nuclear morphology, which could allow, in the future, a normality pattern for this species spermatic characteristics, that could be of use in future spermatologic analysis for clinical and reproductive application.

<sup>1</sup>Cátedra de Física Biológica, <sup>2</sup>Cátedra de Histología y Embriología. <sup>3</sup>(INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

# Luteotrophic effect of eCG to decrease gestational loss in bovines

Confalonieri, A.J.<sup>1</sup>; Carretero, M.I.<sup>1,2,3</sup>; Pendola, C.H.<sup>1,2</sup>

Late embryo and early fetal loss affects the reproductive performance of the herd. With the objective of evaluating the luteotrophic effect of equine Chorionic Gonadotrophin (eCG) for reducing gestational losses, two estrus synchronization protocols using progestagens (BID: bovine intravaginal device), estradiol benzoate (Be) and estradiol cypionate (Ci), together with eCG. One hundred Hereford cows were used, all 35 to 50 days post partum, with calves and an average body condition of 2.5 (scale of 1 to 5). The females were randomly divided into two groups: **Group I (n=50)**: a 4 movement protocol was used (day 0: Be (2 ml) + BID; day 7.5: BID removal + PGF2 $\alpha$  (2 ml) + Ci (1 ml) + eCG (2 ml); day 9.5: fixed-time Artificial Insemination (FTAI) and day 21.5:

eCG (2 ml) and **Group II (n=50)**: a 3 movement protocol was used (day 0: Be (2 ml) + BID; day 7.5: removal of BID + PGF2 $\alpha$  (2 ml) + eCG (2 ml) + Ci (1 ml); day 9.5: FTAI). Gestation diagnosis was carried out using ultrasonography at 30 and 43 days after the FTAI. Cows not pregnant at the first ultrasound control were synchronized with the 3 movement protocol and re-inseminated. A Chi Square test was used to compare pregnancy rates. No significant differences were observed between both groups 30 days after the first AI, although a tendency to a higher pregnancy rate in Group I was noted ( $P=0,09$ ). Group I showed a significantly higher pregnancy rate at 43 days after the first AI ( $P=0,02$ ) and in the total pregnancy rate ( $P=0,03$ ) compared to Group II.

	% Pregnancy 30 days post 1st FTAI	% Pregnancy 43 days post 1st FTAI	% Pregnancy 30 days post 2nd FTAI	% Pregnancy 43 days post 2nd FTAI	%Total pregnancy
<b>Lote I</b>	46 (23/50) <sup>a</sup>	44 (22/50) <sup>a</sup>	66.7 (18/27) <sup>a</sup>	66.7 (18/27) <sup>a</sup>	80 (40/50) <sup>a</sup>
<b>Lote II</b>	30 (15/50) <sup>a</sup>	22 (11/50) <sup>b</sup>	57.1 (20/35) <sup>a</sup>	54.3 (19/35) <sup>a</sup>	60 (30/50) <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Different letters within the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ )

The higher pregnancy rates obtained with the second dose of eCG would seem to indicate that its use in estrus synchronization protocols could have a

luteotrophic effect, thus contributing to the endogenous production of progesterone by the corpus luteum and in this way reducing possible gestational losses.

<sup>1</sup>Cátedra de Teriogenología, <sup>2</sup>(INITRA)- FCV- UBA. <sup>3</sup>CONICET

## Uso de dimetilformamida al 4 y 7% como crioprotector para congelar semen de alpaca. Resultados preliminares.

Flores, H.N.<sup>4</sup>; Cucho, H.<sup>4</sup>; Ciprian, R.<sup>4</sup>; Calderón, N.<sup>4</sup>; Ordóñez, C.<sup>4</sup>;  
Carretero, M.<sup>1,3,5</sup>; Miragaya, M.<sup>1,3</sup>; Giuliano, S.<sup>2,3</sup>

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del uso de dos concentraciones de Dimetilformamida (DMF) (4 y 7%) en la criopreservación de semen de alpaca. Se procesaron un total de 25 eyaculados provenientes de 5 alpacas (n=5; r= 5) del Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos La Raya a 4130 msnm. Cada eyaculado se incubó 4 minutos a 37 °C con una solución de colagenasa al 0,1%. Posteriormente, las muestras se diluyeron 1:1 en un diluyente a base TRIS; fructosa y yema de huevo (25%) y se las enfrió hasta alcanzar los 5°C. Luego, se dividieron en dos alícuotas y se les adicionó 4% o 7% de DMF. Se equilibraron a 5°C durante 1 h y posteriormente se realizó el congelamiento profundo. El descongelamiento se realizó en un baño a 37°C durante 1 minuto. Se evaluó: viabilidad espermática, funcionalidad de la membrana plasmática e integridad del acrosoma en el semen fresco y luego del descongelamiento de cada grupo. Se utilizó un

diseño factorial para comparar el semen fresco con el semen congelado/descongelado. Los resultados en el semen fresco y en las muestras criopreservadas con DMF al 4% y al 7% fueron los siguientes (media  $\pm$  DS): porcentaje de vivos: 87,1  $\pm$  1,7%; 53,6  $\pm$  2,7% y 54,2  $\pm$  1,4%; respectivamente. Porcentaje de espermatozoides con endósmosis: 39,4  $\pm$  11,7%. 19,6  $\pm$  4,8%; 20,5  $\pm$  4,5%. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto: 91,27  $\pm$  8,16%; 66,86  $\pm$  5,96% y 66,66  $\pm$  3,79%. Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el semen fresco y las muestras criopreservadas con DMF al 4% o al 7% en las tres variables espermáticas estudiadas. No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las muestras criopreservadas con DMF al 4% y con DMF al 7% en ninguna de las variables espermáticas estudiadas. Según estos resultados preliminares es posible criopreservar semen de alpaca con el crioprotector DMF al 4% o al 7%.

Cátedras de Teriogenología<sup>1</sup> y Física Biológica<sup>2</sup>, (INITRA)<sup>3</sup>, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina. CONICET<sup>5</sup>, Carrera Profesional de Zootecnia<sup>4</sup>, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

# Test de endósmosis en espermatozoides de alpaca

Flores, H.N.<sup>4</sup>; Giuliano S.<sup>2,3</sup>; Quispe A.<sup>4</sup>; Ordóñez, C.<sup>4</sup>; Carretero, M.<sup>1,3,5</sup>;  
Miragaya, M.<sup>1,3</sup>; Cucho, H.<sup>4</sup>

El objetivo de este estudio fue comparar el comportamiento osmótico de los espermatozoides de alpaca utilizando soluciones con dos osmolaridades diferentes (50 y 125 mOsm/l) en semen fresco y luego de la incubación con colagenasa al 0,1%. Se recolectaron y procesaron un total de 25 eyaculados provenientes de 5 alpacas (n=5; r= 5) del Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos La Raya de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, a 4130 msnm. El semen fue recolectado mediante electroeyaculación. El HOST se realizó en semen fresco y en el semen incubado con una solución de colagenasa 0,1%. Las muestras se incubaron en baño maría termostático a 37°C durante 20 minutos con una solución hipoosmótica de 50 mOsm o de 125 mOsm. Luego del tiempo de incubación, la reacción se detuvo agregando una solución hipoosmótica formolada. Se contaron no menos de 200 células espermáticas. Se utilizó

un diseño factorial de 2 factores con dos niveles cada uno (factor tratamiento: con los niveles: fresco y colagenasa; y factor Osmolaridad: con los niveles 50 y 125 mOsm/l). No hubo interacción ( $p > 0,05$ ) entre el tratamiento (fresco-colagenasa) y la osmolaridad (50 y 125 mOsm/l). No hubo diferencias significativas ( $p = 0,38$ ) en el porcentaje de espermatozoides con endósmosis entre el semen fresco y el tratado con solución de colagenasa al 0,1%. El porcentaje de espermatozoides con endósmosis en todas las muestras incubadas con 50 mOsm/l fue significativamente mayor ( $p = 0,004$ ) al obtenido con 125 mOsm/l. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos en la llama tanto en semen fresco, como en muestras incubadas con colagenasa al 0,1%. A su vez se determinó que una solución de 50 mOsm/l sería más adecuada que una solución de 125 mOsm/l para realizar el test de endósmosis en espermatozoides eyaculados de alpaca.

Cátedras de Teriogenología<sup>1</sup> y Física Biológica<sup>2</sup>, (INITRA)<sup>3</sup>, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina. CONICET<sup>5</sup>, Carrera Profesional de Zootecnia<sup>4</sup>, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

# Use of the integrated semen analysis system (ISAS®) for the evaluation of llama sperm motility

Fumuso, F.<sup>1,3,4</sup>; Carretero, M.I.<sup>1,3,4</sup>; Neild, D.<sup>1,3</sup>; Gonzalez, L.<sup>2,3</sup>; Miragaya, M.<sup>1,3</sup>; Giuliano, S.<sup>2,3</sup>

Raw semen of South American Camelids is not progressively motile, having only oscillatory motility. Seminal plasma is characterized by high viscosity, making evaluation and handling of the samples difficult. Previous studies had shown that the presence of immobile or a low percentage of motile spermatozoa is inherent to this species; therefore, this seminal parameter is not used to establish the quality of an ejaculate. Progressive motility can be induced treating the ejaculate with enzymes. The objective of this study was to evaluate two different methods of progressive motility evaluation in enzymatically treated llama spermatozoa. A total of seven ejaculates were collected from 5 llamas using electroejaculation. Each ejaculate was diluted 4:1 in 0.1% collagenase in HEPES-TALP (HT) medium and incubated 4 minutes at 37°C with the objective of separating spermatozoa from the seminal plasma (SP). Immediately after incubation, each ejaculate was divided in two and centrifuged for 8 min at 800 g. The pellets

were resuspended in either HT or SP and maintained at 37°C until evaluation. Progressive motility was evaluated with the Integrated Semen Analysis System ISAS Proisser® and using a phase contrast microscope and a warm stage (PCM). Propidium Iodide and Carboxyfluorescein Diacetate were used for assessing membrane integrity (viability). Acrosomal status was evaluated with the Coomassie Blue stain. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed between the percentages of progressively motile spermatozoa in HT samples evaluated with phase contrast microscope and the other samples (SP- PCM, HT-ISAS, SP-ISAS). Nevertheless, no significant differences ( $p > 0.05$ ) were found for viability and acrosomal status between samples with HT or SP, indicating that the treatments were not responsible for the difference observed. These preliminary results would indicate that more studies are needed to standardize and validate the ISAS system prior to its clinical application for llama sperm motility evaluation.

<sup>1</sup>Cátedra de Teriogenología, <sup>2</sup>Cátedra de Física Biológica, <sup>3</sup>Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. <sup>4</sup>CONICET, Argentina.

# Morphometric analysis of histological changes in vitrified porcine preantral follicles

Gabriel, P.<sup>1</sup>; Torres, P.<sup>1</sup>; Fratto, M.C.<sup>1</sup>; Boviez, J.<sup>2</sup>; Cisale, H.<sup>1</sup>; Claver, J.A.<sup>2</sup>;  
Lombardo, D.M.<sup>2</sup>; Fischman, M.L.<sup>1</sup>

Cryopreservation of preantral follicles (PAF) in ovarian cortex sheets is considered an alternative technique for preserving genetic material from endangered species or from individuals with remarkable genotype for its species. The aim of this work was to assess, by means of morphometric analysis, the response of porcine PAF to the effect of Ethyleneglycol (E), permeant crioprotective agent (CPA), combined with increasing concentrations of sucrose as non-permeant agent. Samples were taken, for control and vitrification (Vit) assays, from slaughterhouse ovaries (n=10). Control samples were fixed in Bouin solution. Vit assay samples were previously exposed to an equilibrium solution (base solution (SB), 15% E, 20% Bovine fetal serum (BFS) and sucrose (0; 0.25 y 0.75M)), then exposed to a vitrification solution (SB, 30% E, 20% BFS, sucrose (0; 0.25 y 0.75M)) and finally taken into liquid nitrogen for a week, and then fixed the same way as the control. Morphometric analysis was

performed using digital photographs of PAF in ovarian cortex sheets dyed using hematoxylin-eosin, taken with a LEICA DC-180 camera and the capture program IM\_50 LEICA Inc. Using Qwin Plus<sup>®</sup> software for digital morphometry, the following parameters were measured: cytoplasm area (CA); nucleus area (NA), total area (TA=CA+NA), NA/CA relationship, oocyte roundness (OR) y nucleus roundness (NR). Exposure of PAF to vitrification solutions containing sucrose concentrations equal or higher than 0.25 M may produce significant modifications in CA and TA values compared to control and solution without sucrose. No significant differences were found between NA of primordial follicles treated with sucrose 0 or 0.25 M, but there were differences between control and the other treatments (Friedman test, p<0.05). Quantitative analysis may be of use for estimating cryogenic damage of PAF, as it assesses morphometric parameters changes, CA and TA in different vitrification treatments.

# Histeroscopia exploratoria de vizcachas (*Lagostomus maximus*) no preñadas

Giacchino, M.<sup>1,2</sup>; Lange, F.D.<sup>3</sup>; Ferraris, S.R.<sup>3</sup>; Vitullo, A.D.<sup>1,2</sup>

*Lagostomus maximus*, un roedor caviomorfo autóctono de la región pampeana argentina, manifiesta características reproductivas únicas entre los mamíferos. Tiene un prolongado período gestacional (153–157 días) y una alta mortalidad embrionaria; implanta 10 a 12 blastocitos y produce la reabsorción embrionaria selectiva (entre el día 26-70 de gestación); eliminando desde los más cercanos al ovario hacia los más alejados dejando únicamente en desarrollo el más cercano al cérvix en cada cuerno uterino. El objetivo de este trabajo fue explorar *in situ* el aparato reproductivo de hembras no preñadas de vizcachas con la finalidad de evaluar vagina, útero y oviducto y ver si existen diferencias anatómicas entre la zona más cercana al cérvix con las más alejadas de cada cuerno uterino que pueda tener implicancia en la reabsorción embrionaria. Se anestesiaron 4 animales con ketamina y xilacina (IM). Se realizaron ecografías transabdominales con transductor lineal a 10 MHz no hallándose vesículas gestacionales; confirmando la no preñez. Posteriormente se les realizó videoendoscopia del

tracto genital ingresando vía vaginal. Para lograr la visualización, se insufló el aparato reproductivo con medio gaseoso (CO<sub>2</sub>). Se utilizó fibra óptica de 4 mm, cámara, fuente de luz y digitalizadora de imagen. Se visualizó el tracto reproductivo desde vagina hasta la unión útero-tubárica. En vagina se observó gran cantidad de flujo y sus dos regiones anatómicas, una craneal que presenta un rafe medial manifiesto y otra caudal carente de esta estructura. Se observó la bifurcación de los cuernos, cada uno con su respectivo cérvix; ya que tiene un útero doble. La mucosa cornual presentó pliegues transversales hiperémicos que obstaculizaban la luz. La mucosa oviductual presentó disposición tortuosa con pliegues longitudinales. En conclusión no se visualizaron diferencias entre cuernos uterinos ni entre las zonas más proximales al cérvix y las más distales al mismo de las hembras no preñadas. Estos estudios por imágenes permiten la visualización en tiempo real e *in situ* del aparato reproductivo, aportando información valiosa por lo cual son técnicas a tener en cuenta en medicina veterinaria para ser aplicadas en diferentes especies.

<sup>1</sup>CEBBAD. Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico Universidad Maimónides. Buenos Aires, Argentina; <sup>2</sup>CONICET. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas; <sup>3</sup>CIDME. Centro de Investigación y Desarrollo en Medicina Experimental Universidad Maimónides, Buenos Aires, Argentina.



# Detección de herpes virus bovino 4 (BoHV-4) en un sistema de producción *in vitro* de embriones bovinos

González Altamiranda, E.<sup>1</sup>; Ríos, G.<sup>1</sup>; Kaiser, G.<sup>1</sup>; Leunda, M.<sup>1</sup>; Odeón, A.<sup>1</sup>;  
Perez, S.<sup>2</sup>; Verna, A.<sup>1</sup>

El estudio de los alfa herpes virus bovinos en los sistemas de producción *in vitro* (PIV) de embriones se ha focalizado principalmente en el herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) y más recientemente, en el herpesvirus bovino 5 (BoHV-5). Sin embargo, hay escasa información disponible sobre las infecciones por BoHV-4 en estos sistemas. Este trabajo constituye el primer reporte, en nuestro país, de dos aislamientos de BoHV-4 a partir de material biológico como fuente primaria para sistemas de PIV de embriones bovinos. Las cepas de BoHV-4 fueron aisladas en los años 2011 y 2013 a partir de células del *cumulus* y ovocitos, respectivamente. Los complejos *cumulus*-ovocito (COCs) se obtuvieron a partir de ovarios provenientes de un frigorífico local mediante la técnica de aspiración por medio de la punción de folículos de 3-8 mm. Se los clasificó morfológicamente y aquellos que poseían al menos una capa de células del *cumulus* rodeando al ovocito fueron seleccionados para su maduración *in vitro*. Posteriormente, las células del *cumulus* fueron removidas por tratamiento con hialuronidasa (1%), lavadas con medio TCM-199, al igual que los ovocitos, y ambos sembrados en monocapa preformada de células

MDBK para aislamiento viral (AV). Luego de tres pasajes en cultivo celular, se observó efecto citopático (ECP) característico de BoHV-4 a partir de células del *cumulus* y ovocitos en co-cultivo con células MDBK. Para confirmar los resultados del AV, se extrajo ADN de los cultivos celulares que presentaban ECP y se realizó una *nested* PCR para el gen de la *thymidine kinase* (TK). La especificidad de las reacciones se evaluó mediante el uso de ADN proveniente de cepas de referencia para BoHV-1 y BoHV-5. Se obtuvo una banda específica de 216 pb a partir del ADN de los ovocitos y células del *cumulus* en co-cultivo con células MDBK, la cual fue visualizada en gel de agarosa al 2% por tinción con SYBR® Safe (*Invitrogen*). El rol del BoHV-4 en trastornos reproductivos es objeto de estudio. Reportes previos han demostrado su asociación con casos de endometritis post-parto en hembras bovinas. Sin embargo, aún resta por determinar su rol como patógeno primario en problemas reproductivos y su posible impacto en los sistemas de PIV. Cabe destacar que estos resultados demuestran un indicio de riesgo potencial de transmisión de BoHV-4 mediante transferencia embrionaria.

<sup>1</sup>Área Producción Animal, INTA EEA Balcarce; <sup>2</sup>CIVETAN, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA.

# Objective prediction of fecundity in frozen bovine semen doses: Preliminary results

Gonzalez, L.<sup>1,2</sup>; Ghirardosi, M.S.<sup>1</sup>; Torres, P.<sup>1</sup>; Malcervelli, D.<sup>1</sup>; Fratto, M.C.<sup>1</sup>; Bernardi, S.<sup>2,3</sup>; Marini, P.<sup>2,3</sup>;  
Fischman, M.L.<sup>1,2</sup>; Cisale, H.<sup>1,2</sup>

One of the most important factors for the success of bovine artificial insemination (AI) is semen quality, used in the field as a tool to predict the *in vivo* fecundity capacity of semen doses. Therefore, its assessment using *in vitro* objective techniques should include as many spermatid parameters as possible. Routine sperm analysis include parameters that could be affected by compensable abnormalities. However, it doesn't include the quality of the sperm nucleus, which may be associated with non-compensable abnormalities. In some samples, sperm concentration is higher than it should be, and this could mask the presence of compensable defects. The aim of this work was to determine the existence of parameters, in a full evaluation of seminal quality, that allows the elimination of doses with abnormalities that could affect potential fecundity. Bull semen doses from different AI centers were assessed (n=15; r=2), they were classified by those centers in three fertility categories (High, Medium and Low) based on field results. The tests performed were: concentration, motility variables: total and progressive, % of high velocity spermatozoa

(%R), medium and low velocity, among others (CASA: ISAS Proiser v.02<sup>®</sup>); hypoosmotic swelling test; acrosomal integrity, vitality (% V; CFDA/PI); morphology (Bengal Rose) and nuclear tests: nuclear morphology (Feulgen reaction); maturation (aniline blue), response to decondensation (% NCD+, nuclear chromatin decondensation technique) and nuclear fragmentation (% NF, using our laboratory protocol). Results were statistically analyzed for the different variables in study and bull fertility, regrouped in two categories (Low and Medium/High). Only % NCD+, % NF and % R showed significant differences between fertility categories (Wilcoxon test;  $p < 0.05$ ). There was significant association (Spearman;  $p < 0.05$ ) between fertility category and % NCD+ ( $r = -0.62$ ), % R ( $r = 0.77$ ) and % V: ( $r = 0.56$ ). Including both nuclear tests (which could detect samples carrying non-compensable defects) and CASA (for %R determination) in routine sperm analysis, could allow discarding of low fertility samples. The standardization of dose concentration would result in better information when comparing lab results with field results.

<sup>1</sup>Cátedra de Física Biológica, (INITRA), FCV, UBA; <sup>2</sup>Centro Latinoamericano de Estudios de la Problemática Lechera, <sup>3</sup>UNR.

# Evaluación del número de lechones nacidos vivos comparando partos naturales e inducidos

González, M.A.<sup>1</sup>; Borelli, V.<sup>1</sup>; Zanel, W.<sup>1</sup>

En la producción porcina, la necesidad de organizar adecuadamente el trabajo y la de reducir el número de bajas durante el parto, ha impulsado a utilizar diferentes técnicas de sincronización de partos, agrupando los mismos en los momentos de mayor presencia laboral, lo cual permite brindar un mayor control sobre el proceso de parto. El incremento de lechones nacidos muertos, son debidas a falta de atención durante el parto, ya que la mayoría de ellos ocurren de noche, la presencia de “maternistas” nocturnos, podrían minimizar este efecto. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la inducción de partos sobre los parámetros productivos en cerdas. El trabajo se llevó a cabo, en una granja comercial de ciclo completo, localizada en la E.E.A INTA Las Breñas (Las Breñas, Chaco). El estudio abarcó las 4 estaciones del año, utilizando un total de 63 hembras de diferentes pariciones con programas de pariciones mensuales. La duración promedio de la gestación en la granja analizada fue de 115 días. La inducción se realizó utilizando Prostaglandina sintética (D-Cloprostenol 0.075 mg), vía IM, 2 ml, el día 114 de gestación. Las hembras

fueron alojadas en jaulas de maternidad. Se realizaron 2 tratamientos: TRT1: (n=32) hembras con parto normal (PN) y TRT2: (n=31) hembras con partos inducidos (PI). Las variables estudiadas fueron: duración del parto (DP), N° de lechones nacidos vivos (LNV), N° de lechones nacidos muertos (LNM) y época del año. Se realizó estadística descriptiva, y se ajustó un modelo lineal mixto usando como efectos fijos época del año y efectos aleatorios DP, LNV y LNM. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.002$ ) en el número de LNV: TRT1= 9.14 vs. TRT2 = 11.56. El número de LNM fue estadísticamente menor ( $p < 0,0071$ ) en aquellas hembras en las cuales el parto fue inducido LNM TRT2: 0,37 vs LNM TRT1: 1,29 no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en la época de parto y duración del mismo. Conclusión: esta tecnología (PI) permite mejorar los índices productivos, lográndose un aumento en el NLV y una reducción en LNM lo que redundará en una reducción en los gastos fijos del establecimiento.

<sup>1</sup>Sector Porcino, Área de Producción Animal E.E.A INTA Las Breñas –Ruta Nacional 89 km 51 CP 3722, Las Breñas, Chaco

# Postthawing viability of immature vitrified oocytes and *in vitro* matured vitrified oocytes

Gutnisky, C.<sup>1</sup>; Cetica, P.<sup>1</sup> y Dalvit, G.<sup>1</sup>

The aim of this work was to study the post warming viability on immature vitrified oocytes and vitrified *in vitro* matured oocytes to evaluate the use of this cryopreservation method in the bovine production. *Cumulus*-oocyte complexes (COCs) were obtained by aspiration of ovaries from slaughter cows. Only COCs with dense and compact cumulus were selected. COCs were semidenuded mechanically and divided in three groups: 1) immature vitrified oocytes, warmed and matured *in vitro* (V+M); 2) *in vitro* matured oocytes, vitrified and warmed (M+V) and 3) Control group of maturation that was not vitrified (C). The V+M group was vitrified immature and warmed, after it was cultured in order to complete de maturation. The other two groups were *in vitro* matured for 22 h. Maturation was evaluated by the presence of the 1st polar body. Matured oocytes of the M+V

group were vitrified and warmed. The three groups were cultured for an extra 20 h period to evaluate the survival rates after vitification by the diacetate fluorescein. In this work the Cryotech® vitrification technique was used. No significant difference between the maturation rates of the three groups V + M, M + V and C were found (55.5; 53.3 y 54.2 %, respectively). Nor were any significant differences between the survival rates of the three groups V + M, M + V and C (100; 93.7 and 100% respectively) were found. The obtained results suggest that vitrification using Cryotech® technique not affect the viability of bovine oocytes. This cryopreservation method is a valid resource better than other slow freezing and vitrification methods described in the literature and can be used both in immature oocytes and *in vitro* matured oocytes.

<sup>1</sup>INITRA), Química Biológica, Facultad de Cs. Veterinarias, UBA.

# Efecto del método de colecta seminal sobre la composición proteica del plasma seminal ovino

Ledesma, A.<sup>1</sup>; Cesari, A.<sup>2</sup>; Gil, J.<sup>3</sup>; Hozbor, F.<sup>4</sup>

La criopreservación de semen ovino afecta la calidad espermática ocasionando en un elevado número de células capacitación prematura y muerte celular. Se ha descrito que el plasma seminal (PS) evita y/o revierte el daño causado por la criopreservación. El PS contiene proteínas de bajo peso molecular que se adhieren a la membrana espermática. Entre estas proteínas RSVP14 y RSVP20 (*Ram seminal vesicles proteins*) son responsables del efecto crioprotector del PS. Hemos desarrollado un protocolo para separar la fracción de proteínas del PS que interactúa con las proteínas de la membrana plasmática de los espermatozoides (fracción retenida, FR) y observamos que el agregado del conjunto de proteínas contenidas en la FR a espermatozoides criopreservados mejoró su ultraestructura y mantuvo su movilidad pos descongelación. Por otro lado, reportamos que el método de colecta seminal vagina artificial (VA) o electroeyaculador (EE) afecta tanto la calidad del eyaculado como la composición del PS. El uso de EE permite obtener eyaculados con una mayor concentración de proteínas de bajo peso molecular (crioprotectoras) que los colectados con VA. El objetivo de este trabajo fue determinar si existen diferencias

en la concentración y composición de las FR obtenidas de eyaculados colectados con VA y EE. Los eyaculados fueron obtenidos de 4 carneros mediante el uso de VA y EE en otoño. Se formaron pooles por método y semana de colecta y se obtuvo la FR correspondiente a cada método. Los pooles de eyaculados fueron lavados y centrifugados para eliminar el PS, el pellet de espermatozoides fue incubado con buffer glicina-HCl 1M (pH 3) y nuevamente centrifugado para recuperar el sobrenadante (FR). Posteriormente se determinó la concentración de proteínas y se analizó su composición y posterior inmunodetección de RSVP14 y RSVP20. La concentración de proteínas contenidas en las FR no fue afectada por el método de colecta. Dos proteínas de bajo peso molecular (12; 29 kDa) estuvieron aumentadas en la FR obtenida con EE. Tanto RSVP14 como RSVP20 estuvieron presentes en ambas FR. El método de colecta seminal modifica la composición proteica de la FR del PS ovino. La electroestimulación permite obtener eyaculados con mayor concentración de proteínas de bajo peso molecular lo cual podría ser beneficioso para conservar la calidad del semen ovino criopreservado.

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agrarias UNMdP; <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biológicas CONICET, UNMdP; <sup>3</sup>Facultad de Veterinarias UdelaR, Uruguay; <sup>4</sup>Biotecnología de la Reproducción INTA Balcarce.

# Determinación del estado reproductivo en *Xenarthra* por ultrasonografía testicular, citología espermática y dosaje hormonal

Luaces, J.P.<sup>1</sup>; Rossi, L.F.<sup>1</sup>; Gassmann, Y.R.<sup>1</sup>; Perez Jimeno, G.; Ramos, E.; Demergassi, N.<sup>2</sup>; Falzone, M.<sup>2</sup>; Merani, M.S.<sup>1</sup>

La presencia de testículos internos es distintiva entre los *Xenarthra* actuales y constituye una dificultad para evaluar el estado reproductivo (ER) en los machos. En la actualidad no existen técnicas de lectura instantánea para evaluar el ER en estos mamíferos, y los métodos no invasivos resultan de preferencia debido a su delicado estado de conservación. Se analizaron por ultrasonografía (con escáner Mindray M5) ejemplares de *Chaetophractus villosus* (Cv o peludo, n=7 adultos y n=3 juveniles), *Tamandua tetradactyla* (Tt u oso melero, n=3 adultos) y *Myrmecophaga tridactyla* (Mt u oso hormiguero, n= 6 adultos y n=1 juvenil). Estas lecturas fueron acompañadas por citología espermática en n=11Cv y n= 2Tt, evaluando presencia/ausencia de espermatozoides obtenidos de la punta del pene directamente con un portaobjetos. En n= 3 adultos de Cv, se realizaron, junto con la ultrasonografía, determinaciones de testosterona sérica (por inmunoquimioluminiscencia). Externamente,

los testículos se localizaron en posición craneolateral al pene en las 3 especies, utilizando en Cv un transductor de 7 MHz en adultos y de 3,5 MHz en juveniles, uno de 5 MHz en adultos de Tt y Mt y uno de 7,5 MHz en juveniles de Mt. En adultos las dimensiones testiculares fueron desde 26,1x15,0 mm a 42,7 x 27,6 mm en Cv, desde 28,2 x 17,5 mm a 36,0 x 24,0 mm en Tt y desde 41,6 x 26,4 mm a 63,2 x32,1 mm en Mt. En juveniles las dimensiones testiculares fueron desde 20,2 x10,7 mm a 25,7 x 14,8 mm en Cv y de 12,3 x 6,9 a 12,8 x 7,8 mm en Mt. Los valores hormonales se asociaron positivamente con las dimensiones testiculares. Se observaron, en individuos adultos, espermatozoides en 80% de los ecografiados en Cv y en 1 de 2 individuos de Tt mediante citología espermática. Fue instrumentada así, una metodología de fácil realización para determinar el ER que permita aplicar a prácticas destinadas a favorecer o inhibir la reproducción de estas especies.

1. Laboratorio de Biología Cromosómica. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. Paraguay 2155 P10° LAB 6 (C1121ABG) Ciudad de Buenos Aires, Argentina. 2. Fundación Temaikén. Ruta Provincial 25 Km, 0.700 (1625) Escobar, Buenos Aires, Argentina.

# Fecundación *in vitro* en porcinos: efectos de los tratamientos con roscovitina e ionomicina

Luchetti, C.G.<sup>1</sup>; Tello, M.F.<sup>2</sup>; Lorenzo, M.S.<sup>2</sup>; Ynsaurralde, A.E.<sup>1</sup>; Lombardo, D.M.<sup>2</sup>; Salamone, D.F.<sup>1</sup>

Uno de los avances biotecnológicos que más rápidamente se han desarrollado en las últimas décadas ha sido la producción *in vitro* de embriones (PIV). Sin embargo todavía es necesario mejorar la capacidad de desarrollo y calidad embrionaria sumado al problema de polispermia en la especie porcina. Con el objetivo de optimizar la fecundación *in vitro* (FIV) en porcinos se realizaron dos experimentos. En el experimento 1, un grupo de COCs porcinos fue incubado con roscovitina (R+) 50  $\mu$ M en TCM-199 por 24 h y luego madurados *in vitro* 44-48 h en TCM-199 + fluido folicular porcino (10%), FGF (3,6 ng/mL) y FSH (30  $\mu$ g/mL). El grupo control (C) fue madurado *in vitro* en condiciones similares. A continuación los ovocitos fueron denudados y sometidos a FIV (coincubados 30 min con semen fresco porcino,  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml en medio BO modificado). En el experimento 2, ovocitos porcinos madurados *in vitro* y denudados fueron tratados con ionomicina (Io+) 5  $\mu$ M 4 min, o

sin la misma control (C) y sometidos ambos a FIV. Los presuntos cigotos fueron cultivados *in vitro* a 39°C con 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 100% humedad. Se registró el porcentaje de clivados (% cl) y de blastocistos (% bl). Los datos fueron analizados por el test de Fisher (P<0.05). En el Exp. 1 se observó un mayor % cl en R+ (47%, n=272) respecto al C (35%, n=368). El % bl no mostró diferencias significativas: 18% bl/cl en R+ y 12% en C. En el Exp. 2 se observó un mayor % cl en Io+ (52%, n=145) respecto al C (33%, n=261). El % bl no mostró diferencias significativas: 16% bl/cl en Io+ y 14% en C. Concluimos que el tratamiento de COCs con roscovitina y el de ovocitos maduros con ionomicina previo a la FIV aumentan la activación y esto podría beneficiar el desarrollo embrionario *in vitro*. A los fines de dar mayor sustento a las conclusiones, quedaría por determinar si este aumento en el clivaje se debe a una disminución en la polispermia o a un aumento en la activación partenogénica.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, UBA; <sup>2</sup>Cátedra de Histología y Embriología, (INITRA), FCV, UBA.

# DNA evaluation of raw dog semen using toluidine blue.

## Preliminary results.

Monachesi, N.<sup>1,2</sup>; Carretero, M.I.<sup>1,2,3</sup>

Currently, semen parameters used in the evaluation of the canine ejaculate include: motility, concentration, morphology and membrane function. In recent years, there is a growing interest to include sperm DNA assessment to routine semen evaluation. Toluidine Blue (TB) stain is a simple technique that has been used in different species to assess the degree of sperm chromatin condensation. The objectives of this study were: to set up a technique to evaluate chromatin condensation in canine sperm, define the TB patterns in canine spermatozoa stained with TB and determine if it is possible to use dithiothreitol (DTT) as a positive control of the stain. A total of 8 ejaculates from 4 canine males between 2 to 5 years old, were obtained by applying manual massage to the caudal portion of the *bulbus glandis*, collecting the first and second portions of the ejaculate. The following routine semen characteristics were evaluated: volume (V), motility (PM), concentration (C), membrane function (HOS) and sperm morphology. The TB stain was used to assess the degree of chromatin condensation. Two staining times for the samples (15 and 30 minutes) and three staining times for the incubation with 1% DTT (2, 5 and 30 minutes) were tested. Two smears were made of each ejaculate: one of the sample and the

other of the sample incubated with DTT. Once dried, the smears were fixed with ethanol 96° for 2 minutes and finally stained with a working solution of 0.25% TB for both 15 and 30 minutes. A paired T test was used to compare the two staining times and descriptive statistics were performed on the samples incubated with DTT. Values for the routine semen characteristics were (mean ± SD): V: 1.5 ± 0.7 ml; MP: 85.7 ± 5.3%; C: 517.1 ± 163.5 ×10<sup>6</sup> sperm/ml; HOS: 95.6 ± 1.8% and morphologically normal sperm: 86.1 ± 4.9%. The TB patterns observed were: light blue (negative, normal chromatin condensation), light violet (intermediate, some degree of decondensation) and dark blue-violet (positive, high degree of decondensation). No significant differences ( $p > 0.05$ ) were observed between the two staining times, nor among the males, for any of the TB patterns (negative: 95.3% vs. 94.3%; intermediate: 4.1% vs. 4.7% and positive 0.6% vs. 0.9% for 15 and 30 minutes of staining, respectively). At all times of incubation with DTT (2, 5 and 30 minutes) 100% TB positive sperm were observed. This is the first report of the use of TB to evaluate canine sperm chromatin condensation. The different patterns observed with the technique were determined and it was verified that the incubation with DTT can be used as a positive control of the TB stain.

<sup>1</sup>Cátedra de Teriogenología, <sup>2</sup>(INITRA), FCV-UBA. <sup>3</sup>CONICET



# Efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre la concentración de testosterona sérica en caninos

Risso, A.<sup>1,2,3\*</sup>; Pellegrino, F.J.<sup>1,2</sup>; Relling, A.E.<sup>1,2,3</sup>; Pasquale, I.<sup>1</sup>;  
Spaini, E.<sup>1</sup>; Corrada, Y.<sup>1,2</sup>

Las propiedades nutraceuticas de los ácidos grasos han incrementado su uso como suplementos en el hombre y en las especies domésticas. El efecto de los ácidos grasos omega 3 sobre la concentración de testosterona (T) se ha descrito en varias especies. En el perro no ha sido estudiado aún. Por lo expuesto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la suplementación con aceite de pescado, como fuente de omega 3, sobre la concentración de T en perros. En un diseño experimental cruzado se incluyeron 10 perros mestizos, de 2 a 5 años de edad y peso de 7 a 27 kg. Se asignaron aleatoriamente en los grupos control (C) y omega 3 (O3). En el grupo C los perros recibieron alimento balanceado por 120 días. En el grupo O3 recibieron la misma dieta suplementada

oralmente con una cápsula de digestión gástrica conteniendo 54 mg de aceite de pescado por kg de peso metabólico. Las muestras de sangre en cada periodo, se recolectaron los días 0, 30, 60, 90 y 120, a los 0, 20 40, 60, 80 100 y 120 minutos. Los datos se analizaron con un modelo mixto lineal generalizado, S.A.S (0.9). En ambos grupos la concentración de testosterona fue similar al día 0 ( $4,8 \pm 0,3$  ng/ml). El grupo C no mostró variaciones durante el estudio, mientras que el grupo O3 disminuyó al día 30 ( $1,31 \pm 0,3$  ng/ml) permaneciendo hasta el día 120 ( $1,84 \pm 0,5$  ng/ml,  $1,20 \pm 0,3$ , y  $0,89 \pm 0,3$  los días 60, 90 y 120 respectivamente) ( $p < 0,01$ ). Se concluye que la suplementación con aceite de pescado disminuye la concentración de testosterona dentro del rango fisiológico descrito para la especie.

<sup>1</sup>Laboratorio de Nutrición, Facultad de Cs Veterinarias, UNLP, <sup>2</sup>CONICET, <sup>3</sup>IGEVET.

# Use of altrenogest in replacement gilts

Confalonieri, J.<sup>1</sup>; Carretero, M.I.<sup>1,2,3</sup>; Chaves, G.<sup>1,2</sup>; Pendola, C.H.<sup>1,2</sup>

The orderly planning of production controls current pig farms, requiring strict management of the lots or bands that will form part of the mating quota. In this management, replacement gilts should be incorporated into these lots or bands synchronously with the sows that are still in production. The use of progestagens, for example Altrenogest (REGUMATE®), in cyclic females allows estrus synchronization and induction of ovulation. The objective of this study was to compare the use of Altrenogest in F1 replacement gilts with regard to estrus dispersion, parturition percentages and live-born piglets. Group 1 (G1, n=20) received 5 ml (20 mg) of Altrenogest with their ration during 18 days and Group 2 (G2, n=20) did not receive treatment (control group).

Estrus detection (ED) was carried out twice daily (am and pm) in both groups and the females expressing estrus were inseminated three times using the following protocol: 1) ED: am; Artificial Insemination (AI) pm; am; pm and 2) ED: pm; AI: am; pm; am. Pregnancy diagnosis was performed using ultrasonography. A Chi square test was used to compare pregnancy rates and the number of live-born piglets. Estrus emergence after treatment was observed between 5 to 7 days in 90% of the gilts of G1 (18/20). In G2, estrus was observed with a dispersion of 21 days in the 85% of the gilts (17/20). No significant differences ( $P>0.05$ ) in pregnancy rates or in the number of live-born piglets were observed between groups (Table 1).

	% Prenancy	Total nº piglets/female	Live piglets/female
<b>G I (treatment)</b>	90 (18/20) <sup>a</sup>	11.9 (215/18) <sup>a</sup>	11.1 (199/18) <sup>a</sup>
<b>G II (control)</b>	85 (17/20) <sup>a</sup>	11.5 (195/17) <sup>a</sup>	10.6 (181/17) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> ( $p > 0.05$ ).

These results indicate that the use of Altrenogest in replacement gilts is a useful tool for concentrating heats, thus enabling the incorporation of the gilt to the weekly mating

band and achieving a lower dispersion of estruses. In turn, this implies a concentration of births, facilitating better parturition assistance.

<sup>1</sup>Cátedra de Teriogenología, <sup>2</sup>(INITRA)- FCV- UBA. <sup>3</sup>CONICET

# Uso de la yema de huevo en polvo en la criopreservación del semen ovino

Ramírez, V.R.<sup>1,2</sup>; Carro, M.<sup>1,2</sup>; Ledesma, A.V.<sup>1,2</sup>; Cano, A.<sup>1</sup>; Hozbor, F.<sup>1</sup>

El objetivo del trabajo fue valorar el uso de la yema de huevo en polvo en la criopreservación de espermatozoides ovinos. Se empleó semen de 10 carneros adultos, colectado 2 veces/semana con vagina artificial, en invierno. Con las muestras con motilidad masal microscópica  $\geq 4$ , se conformaron pooles por sesión de colecta, donde cada animal aportó  $1500 \times 10^6$  gametas. Éstos se dividieron en seis alícuotas que fueron diluidas en medio TRIS (360 m), glucosa (33,3 m), ác. cítrico (113,7 m), penicilina G sódica ( $1 \times 10^6$  UI/L), sulfato de estreptomycin (1g/L), y glicerol (7% v/v) con yema de huevo fresca (TYHF) o en polvo (TYHP) en diferentes concentraciones (10, 15 y 20%). Las muestras se envasaron en pajuelas de 0,25 ml, a una concentración de  $100 \times 10^6$  espermatozoides, enfriadas y congeladas en vapores de nitrógeno líquido. Se realizaron

5 sesiones de congelación. Se descongelaron (37°C, 30 segundos) 3 pajuelas por tratamiento y sesión. Se evaluó la motilidad espermática total (MET), motilidad rectilínea progresiva (MRP), integridad de membrana (Eosina/Nigrosina), funcionalidad de membrana (HOS test), integridad acrosomal (Coomassie blue) y decondensación de la cromatina nuclear (azul de toluidina y DTT). Los resultados se analizaron con el PROCGLIMMIX de SAS® (Tabla 1, Medias mínimas cuadráticas y errores estándar). Las muestras diluidas en medio TYHF 15% presentaron los parámetros cualitativos posdescongelación más elevados ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, desde el punto de vista biológico los valores observados en las muestras diluidas en TYHP 10 y 15% podrían ser una alternativa para la criopreservación de semen ovino.

CALIDAD SEMINAL (%)	TRIS YEMA DE HUEVO FRESCA			TRIS YEMA DE HUEVO EN POLVO		
	TYHF10%	TYHF15%	TYHF20%	TYHP10%	TYHP15%	TYHP20%
MET	46,0 $\pm$ 3,36 <sup>abc</sup>	55,3 $\pm$ 3,36 <sup>a</sup>	50,0 $\pm$ 3,36 <sup>ab</sup>	45,3 $\pm$ 3,36 <sup>bc</sup>	43,3 $\pm$ 3,36 <sup>bc</sup>	38 $\pm$ 3,36 <sup>c</sup>
MRP	48,6 $\pm$ 3,06 <sup>ab</sup>	54,0 $\pm$ 3,06 <sup>a</sup>	44,6 $\pm$ 3,06 <sup>b</sup>	43,3 $\pm$ 3,06 <sup>bc</sup>	41,3 $\pm$ 3,06 <sup>bc</sup>	35,3 $\pm$ 3,06 <sup>c</sup>
Membranas íntegras	39,3 $\pm$ 0,89 <sup>d</sup>	44,9 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>	43,4 $\pm$ 0,90 <sup>ab</sup>	40,6 $\pm$ 0,90 <sup>cd</sup>	43,0 $\pm$ 0,90 <sup>abc</sup>	41,9 $\pm$ 0,90 <sup>bc</sup>
Membranas funcionales	43,4 $\pm$ 0,90 <sup>b</sup>	48,5 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>	49,9 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>	45,5 $\pm$ 0,91 <sup>b</sup>	44,1 $\pm$ 0,90 <sup>b</sup>	43,2 $\pm$ 0,90 <sup>b</sup>
Acrosomas íntegros	54,0 $\pm$ 0,91 <sup>bc</sup>	57,4 $\pm$ 0,90 <sup>a</sup>	56,4 $\pm$ 0,90 <sup>ab</sup>	50,7 $\pm$ 0,91 <sup>d</sup>	56,8 $\pm$ 0,90 <sup>a</sup>	52,8 $\pm$ 0,91 <sup>cd</sup>
Cromatina nuclear madura	45,0 $\pm$ 0,92 <sup>d</sup>	52,9 $\pm$ 0,92 <sup>c</sup>	63,1 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>	58,0 $\pm$ 0,93 <sup>b</sup>	52,3 $\pm$ 0,92 <sup>c</sup>	52,4 $\pm$ 0,96 <sup>c</sup>

\*Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup>Lab. Biotecnología de la Reproducción, INTA-Balcarce, Argentina; <sup>2</sup>CONICET, CCT-Mar del Plata, Argentina.

# Changes in porcine semen freezing curves: Preliminary results

Suhevic, J.<sup>1,3</sup>; Malcervelli, D.<sup>1,3</sup>; Fratto, M.C.<sup>1,3</sup>; Torres, P.<sup>1,3</sup>;  
Acerbo, M.<sup>2,3</sup>; Miguez, M.<sup>2</sup>; Fischman, M.I.<sup>1,3</sup>; Cisale, H.<sup>1,3</sup>

Changes in the porcine sperm freezing process may result in better possibilities for cryopreservation. For example, increasing semen refrigeration time could allow better stabilization of its plasmatic and acrosomal membranes, making them more resistant to the physic and chemical changes they are exposed to; the first part of the rich seminal fraction seems to be the most resistant to cryopreservation; using 20% egg yolk and 3% glycerol could improve thawing results; the temperature drop from 17°C to 5°C, at rates between 0.1°C/min and 1.5°C/min, does not seem to show significant improvement. The aim of this work was to analyze modifications made to our laboratory freezing curve, to improve results after thawing.

The holding time at 17°C was increased from 2 h to 18 h, after centrifugation, resuspension was made in a solution of lactose 11%, egg yolk 20% and Equex®, and then left 1 hour at 17°C to stabilize, finally, it was cooled to 5°C at a 0.2°C/min rate. The sample was left for 30 min at 5°C, and then it was diluted using lactose 11%, egg yolk 20% and glycerol 3%, and stored in 0.5 ml. straws. For this procedure, the first third of the rich fraction of 12 samples (3 boars) was used. The parameters analyzed were: progressive motility, integrity and functionality of the sperm plasmatic membrane and acrosomal integrity. They were assessed in the fresh sample, at 17°C cooled semen for 18 h, at 5°C prior to storage and after thawing. The results are summarized in Table 1.

	Progressive Motility		Viability		HOS test		Acrosomal Integrity	
	historical	modified	historical	modified	historical	modified	historical	modified
fresh	71.7±12.8	78.3±8.9	67.9±10.2	76.7±6.5	65.2±14.5	72.0±8.4	98.7±5.8	93.6±2.6
17°C	44.7±12.3	71.1±10.7	60.8±8.4	71.0±8.1	50.2±13.9	68.3±6.0	60.6±17.2	87.7±2.0
5°C	32.3±13.4	52.5±8.4	54.2±18.5	59.7±9.8	47.4±12.6	55.2±7.1	44.0±22.8	66.5±9.4
thawed	15.8±7.4	27.7±9.7	24.4±8.8	55.9±5.8	32.2±7.5	32.3±8.2	16.6±7.3	55.4±12.5

Table 1: Percentage values with their standard error.

There was an improvement in spermatic parameters after thawing when using the new freezing curve compared to our laboratory historical data. We estimate that this new

curve may improve adaptation of the sperm membranes to low temperatures. However, we need further analysis to confirm these conclusions.

# Use of color doppler ultrasound for pregnancy control in llamas

Veiga, F.<sup>1</sup>; Baca Castex, C.<sup>1</sup>; Trasorras, V.L.<sup>1</sup>; Miragaya, M.H.<sup>1</sup>

In veterinary sciences, diagnostic imaging using Colour Doppler Ultrasonography is still in its infancy. This technology not only allows bi-dimensional evaluation of the structure of different organs, but also permits observation of their vascularisation. The instrument superimposes colour signals of blood flow on a B-mode image, thus blood flow velocities and perfusion can be assessed on a flat image. In the llama, pregnancies vary from 335 to 360 days and only one offspring is born per year. In addition, they exhibit high embryonic loss, and it has been reported that 50% of alpaca embryos die in the first 30 days of pregnancy. The use of colour Doppler ultrasonography would enable us to estimate embryo and fetal viability through the blood perfusion. The aim of this study was to evaluate llama gestational state using colour Doppler ultrasonography. A 6 year old female llama (*Lama glama*), which received natural mating with a fertile male, was used. Ultrasonographic monitoring was

performed on days 45, 60 and 270 of gestation by colour Doppler (Esaote, MyLab™) with a 5.0 MHz linear-array transducer. The manoeuvre was conducted with the female standing in a stock. Prior to inserting the transducer, faeces were manually removed from the rectum with a lubricated and gloved hand. The transducer was located over the dorsal uterine wall, parallel to the organ, in order to achieve a longitudinal image of it. Foetus, placental and umbilical cord blood flow were observed, showing the movement towards the transducer in red and the movement away from the transducer in blue. These results demonstrate the feasibility of using colour Doppler ultrasonography in pregnant llamas during any stage of gestation. Using this tool, as from the first moment of embryo visualization, its vascularisation, the corpus luteum and the development of the placental vasculature could be evaluated, being able not only to predict but also to treat any imminent embryonic-foetal loss.

<sup>1</sup>Cátedra de Teriogenología, (INITRA), Facultad de Cs. Veterinarias, UBA.

# Comparación en época reproductiva y no reproductiva de diferentes protocolos de sincronización en cabras criollas

Vera, T.A.<sup>1</sup>; Brunello, G.E.<sup>1</sup>; Gonzalez, H.A.<sup>2</sup>; Ricarte, R.A.<sup>1</sup> Y Diaz, R.<sup>1</sup>

Las cabras son poliéstricas estacionales, actividad regulada principalmente por el fotoperiodo. El objetivo fue comparar, en época reproductiva (ER: junio) y no reproductiva (ENoR: noviembre), la eficiencia de protocolos de sincronización de celos (PSC) en porcentaje de preñez (%P) y detección (PC) y duración de celo (DC). El trabajo se realizó en el campo "Las Vizcacheras" del INTA La Rioja. Las cabras se alimentaron a monte natural sin suplementación con una carga de 1cabra/3 has. Durante la ER, 3 grupos de 21 hembras elegidas al azar, recibieron diferente PSC de 6 días de duración: esponjas (ESP), progesterona L.A. (MAD-4) y progesterona (PROG). En la ENoR, los mismos PSC se aplicaron a 3 grupos de 28 cabras durante 11 días. En ambas épocas y en todos los tratamientos, a la extracción de las ESP se administró eCG y cloprostenol. La PC se realizó 2 veces por día con chivos marcadores desde las 24 h de finalizados los PSC. La cabra que aceptaba la monta se considero en celo. En cada época, la DC se calculo tomando la diferencia en horas entre PC (ej.: 2 PC: 12 h y 7 PC: 96 hs, máximo PC registrado). En ambas

épocas se realizo IA con semen fresco (0,10 ml) a celo detectado. Para DC se realizó un ANAVA (DCA) considerando como fuentes de variación: época, PSC y su interacción; las medias se compararon mediante test LSD ( $p < 0,05$ ). Para PC y %P según PSC, se analizaron con chi-cuadrado, considerando la época como criterio de estratificación. No hubo interacción época\*PSC ( $p = 0,7250$ ) para DC; ni diferencias entre PSC y en época se observaron diferencias marginales. La PC no fue diferente entre PSC en ENoR ( $p > 0,999$ ), detectándose el 100% de cabras en celo. En ER ( $p = 0,0252$ ) el PSC MAD-4 presentó la menor PC (76% < 95% < 100% para MAD-4, PROG y ESP, respectivamente). En %P no hubo diferencias entre PSC en ambas épocas (ER: 53%, 50% y 62%  $p = 0,7212$  y ENoR: 68%, 54% y 61%  $p = 0,5494$  para ESP, MAD-4 y PROG, respectivamente). En cada época (ER y ENoR) los PSC no mostraron diferencias en %P y DC y sí fueron diferentes en la PC. En sistemas extensivos de cría caprina con pastoreo controlado, la eficiencia reproductiva de estos PSC permitiría en cada época definir su uso por otros parámetros.

<sup>1</sup>INTA - EEA La Rioja. <sup>2</sup>Actividad privada.

# Quistes ováricos en cerdas: estudios anatomopatológicos y niveles séricos de progesterona

Barrales, H.<sup>1,2,3</sup>; Cappuccio, J.<sup>3</sup>; Machuca, M.<sup>4</sup>; Paez, E.<sup>2</sup>; De La Sota, R.<sup>2</sup>; Williams, S.<sup>2</sup>

El objetivo del trabajo fue estudiar los niveles séricos de progesterona ( $P_4$ ) en cerdas, y relacionarlo con la presencia y tipo de quiste ovárico (Q) y la causa de descarte. Se evaluaron 184 cerdas de granjas comerciales enviadas a descarte. Se obtuvo una muestra de sangre, y se recogieron los aparatos genitales, identificados individualmente. Se consideró Q a toda estructura mayor a 10 mm de diámetro de apariencia quística (Martinat-Botté *et al.* 1998). Se clasificó a los Q por la histología en

foliculares (QF) y luteinizados (QL). Se midió la concentración de  $P_4$  por un RIA validado (Coat-A-Count® Progesterone). De acuerdo a estos criterios, las cerdas se clasificaron en con o sin Q, y con Q simple o múltiples. El análisis estadístico se realizó utilizando el procedimiento un GLM de SAS (SAS® 2004). Los resultados se muestran en la tabla 1. Se hallaron diferencias significativas entre los niveles de  $P_4$  de cerdas con y sin Q ( $p < 0.0001$ ). De las cerdas con Q sólo 5 (23%) fueron descartadas por falla reproductiva.

	Quistes	$P_4$ (ng/ml)	Simples	Múltiples	Luteal	folicular
Sin	162 (88%)	$39.36 \pm 5.94^b$				
Con	22 (12%)	$24.78 \pm 2.18^a$	12 (54.5%)	10 (45.5%)	21 (95.5%)	1 (4.5%)
Total	184 (100%)	$32.07 \pm 4.06$				

La prevalencia de Q fue del 12% lo que concuerda con lo expuesto por otros autores (Ebbert *et al.* 1993, Heinonen *et al.* 1998, Knauer *et al.* 2007, Rodríguez *et al.* 2008, Tummaruk *et al.* 2009). El tipo predominante fue el luteal lo que podría indicar que el diestro es el periodo de mayor riesgo para la formación de Q. Si bien los niveles de  $P_4$  fueron mayores en las cerdas con Q,

lo niveles encontrados no serían suficientes para causar falla reproductiva clínica (retorno o falta de celo). Esto sumado a que solo el 23% de las cerdas con Q fueron descartadas por falla reproductiva, indicaría que los Q no tuvieron efecto hormonal sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada que haya podido motivar una falla reproductiva y en última instancia el descarte.

<sup>1</sup>Becario tipo A, SC y T, UNLP. <sup>2</sup>Lab. de Reproducción Animal. <sup>3</sup>Cat. de Clínica de Grandes Animales. <sup>4</sup>Cat. de Patología Especial. FCV, UNLP. Calle 60 y 118 B1900AVW, La Plata.

# Effect of nadph oxidase inhibition on bovine oocyte in vitro maturation and fertilization

Morado, S.A.<sup>1</sup>, Cetica, P.D.<sup>1,2</sup>, Beconi, M.T.<sup>1</sup>, Dalvit, G.C.<sup>1</sup>

Redox state describes the interaction between oxidized and reduced forms of various molecules, including NADP: NADPH. In several types of cells, redox state participates in the regulation of enzymes involved in intracellular signalling. At physiological concentrations, superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) are considered the most important reactive oxygen species (ROS) that participate in redox reactions in different biological processes. NADPH oxidase catalyses the reduction of oxygen to  $O_2^{\bullet-}$  using NADPH. It has been proposed that an adequate level of  $O_2^{\bullet-}$  would be beneficial for in vitro maturation (IVM) of bovine oocytes, increasing their developmental competence, and that physiological concentrations of  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$  would be necessary to optimize sperm-oocyte interaction. The aim of this work was to determine the effect of NADPH oxidase inhibition on ROS production during bovine oocyte IVM and its after-effect on in vitro fertilization (IVF). Cumulus-oocyte complexes (COCs) were collected from ovaries obtained from slaughtered cows and they were matured in medium 199 (control) or with the addition of  $2\mu M$  difenylidonium (IDP, NADPH oxidase inhibitor) in humidified air at  $39^\circ C$  and 5%  $CO_2$  for 22h. ROS production was determined in denuded oocytes at 0, 6, 12, 18 and 22h of IVM using the 2',7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate. No significant differences were detected in ROS levels between the control group and COCs matured in presence of IDP in any of the studied time points. Meiotic maturation percentage was not affected either (IDP: 75% vs Control: 80%). However, cleavage rates presented a significant decrease when IVM medium was added with IDP (IDP: 18% vs Control: 85%;  $p < 0.05$ ). In conclusion, NADPH oxidase inhibition would not alter ROS production nor meiotic maturation in the oocyte, but its inhibition would affect IVF probably by the alteration of the redox state in the COC.

<sup>1</sup>Cátedra de Química Biológica, INITRA, <sup>2</sup>INPA, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.