

Fecha de presentación:

**FORMULARIO PARA LA PRESENTACION DE PROYECTOS DE
INVESTIGACION**

1.) Campo de aplicación:

Ciencias Veterinarias. Fertilidad, mejoras genéticas y reproducción animal.

2.) Título del Proyecto:

Tecnología aplicada a la valoración y conservación de gametas y embriones en ovinos y caprinos.

3.) Entidades Participantes¹

Entidad:² Centro Genético La Aurora

Tipo de vinculación: Convenio de colaboración

Descripción de la vinculación:

4.) Responsables:

4.1.) Director del Proyecto:

Apellido y Nombre³: Suhevic, Jorge Federico

¹ Se refiere además de UCES:

² Nombre si es una entidad científica o Razón Social si se refiere a una empresa.

³ Anexar CV actualizado

Lugar Principal de Trabajo⁴: UCES, sede Cañuelas

Funciones⁵: Titular de Biofísica y Adjunto de Producción Animal

Dedicación⁶ Semiexclusiva

4.2.) Co-director del Proyecto:

Confalonieri, Antonio Javier

5.) Antecedentes del Equipo de Investigación

Participa de las actividades de fertilidad, investigación y conservación de gametas y embriones desde el año 2010, en INTECH, el INITRA, en Centros de reproducción privados, en los últimos años Centro genético La Aurora, entre otros.

Dictado de cursos en el área de incumbencia, participación en Congresos y Simposios. Presentación de trabajos en revistas científicas y posters en reuniones relacionadas con la temática.

6.) Problema y Justificación

La biotecnología de la reproducción ovina y caprina ha cobrado gran relevancia en la última década, brindando importantes ventajas en el mejoramiento genético, así como en la prevención y control de enfermedades de transmisión sexual. Las nuevas tecnologías y protocolos de congelación empleados todavía no han logrado maximizar la cantidad de dosis obtenidas a partir de un único eyaculado, no se han logrado protocolos de crío-conservación que garanticen una buena fertilidad. Esto implica mayor cantidad de inseminaciones y mayor número de espermatozoides por inseminación.

La misma problemática se encuentra con las tasas de preñez utilizando semen fresco o

⁴ En función de las horas semanales dedicadas.

⁵ Se refiere a las funciones que desarrollará para monitorear, dirigir y evaluar la marcha del Programa.

⁶ Expresado en Horas Semanales dedicadas a la labor de gestionar el Programa.

refrigerado por Inseminación vaginal.

Hoy en día se acepta que una sola prueba no alcanza para indicar la posible fertilidad de esas dosis inseminantes, por lo que es necesario contar con una batería de pruebas que analicen diversas características espermáticas. Los parámetros a analizar siempre deben incluir la capacidad del macho para producir espermatozoides, la viabilidad, funcionalidad, integridad de sus membranas plasmática y acrosómica y el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales. Todos estos parámetros están interrelacionados y esto debe ser tenido en cuenta para detectar posibles errores en la evaluación de las muestras seminales.

Uno de los mayores desafíos a nivel laboratorio está en el desarrollo y/o estandarización de pruebas que permitan predecir el comportamiento de ese material cuando es usado a campo.

En cuanto a la conservación de gametas femeninas, la posibilidad de la criopreservación permite conservar un gran número de ovocitos. Estos ovocitos, arrestados en profase I de la meiosis, tienen diámetro pequeño, baja tasa metabólica, carecen de zona pelúcida y gránulos corticales y escasos lípidos intracitoplasmáticos. Otra ventaja, los folículos preantrales presentan pocas células. Además, la obtención de la muestra es independiente de la edad del animal y del momento del ciclo estral y puede llevarse a cabo aún en hembras muertas. El desarrollo de protocolos adecuados permitirá almacenar información genética de interés.

Hay una amplia divergencia sin que se haya podido establecer un protocolo único que estandarice las Unidades Internacionales de FSH para las superovulaciones en estas especies.

7.) Marco conceptual

Entre las técnicas de Reproducción Asistida, la inseminación artificial (IA) como la

transferencia embrionaria (TE) son las más difundidas, ya que favorece la selección y el mejoramiento genético de las majadas a escala mundial, optimizando la producción al incorporar semen de calidad probada en las pruebas de progenie de los machos.

A pesar de que hoy se utilizan variantes de los protocolos de congelamiento originales, la fertilidad y prolificidad son significativamente inferiores a las alcanzadas con semen fresco o refrigerado. La introducción de envases con diseño basado en la termodinámica de la congelación inicia el desarrollo de nuevas metodologías de conservación que presuponen un avance en esta materia. Sin embargo, las variaciones de temperatura reducen la motilidad y causan daños en la ultraestructura, bioquímica y funcionalidad espermática, especialmente por la labilidad de la membrana (cantidad de colesterol y razón colesterol / fosfolípidos), lo que acota la inseminación con semen congelado a no más de cuatro horas previas la ovulación para obtener resultados aceptables introducido en el útero por la técnica laparoscópica.

Dentro de las cuestiones inherentes al congelamiento de semen, óvulos o embriones, la valoración de la calidad es de importancia fundamental. El control de proceso que se realizan para la producción debe complementarse con el control de producto, que se basa en la valoración en fresco, pos refrigerado y pos congelado-descongelado.

8.) Objetivos

8.1.) Objetivos generales

Aportar nuevos conocimientos tecnológicos para la valoración y conservación de gametas y embriones en las diferentes razas de las especies ovina y caprina, que permita su transferencia a la industria, así como el desarrollo del conocimiento relacionado a las gametas y transferencias embrionarias de especies silvestres, de interés productivo, o en riesgo.

8.2.) Objetivos específicos

Comparar diferentes técnicas de valoración de la viabilidad espermática e integridad estructural y funcional de la membrana empleadas en el protocolo estandarizado a los fines de establecer criterios de selección en la utilización rutinaria de las mismas en los centros de inseminación.

Analizar nuevas curvas de enfriamiento y congelación en la preservación de semen ovino y caprino, a fin de optimizar la producción de dosis para inseminar.

Desarrollar un protocolo de vitrificación de ovocitos y de embriones obtenidos in vivo.

Diseñar protocolos de superovulación y probarlos en las diferentes razas ovinas y caprinas.

Evaluar cuál podría ser el mejor protocolo de transferencia embrionaria para cada raza ovina y caprina de interés para la industria lechera y carnicera.

Que los estudiantes adquieran la habilidad para manipular ovocitos/ embriones y conozcan el trabajo en un laboratorio de biotecnología veterinaria.

9.) Hipótesis

Métodos eficientes de obtención, refrigeración y criopreservación de gametas y embriones permitirán el intercambio de alta genética, mejorando la calidad de las majadas ovinas y caprinas comerciales.

10.) Metodología

Se establecerá un protocolo de valoración general de las muestras de semen con pruebas de control de calidad espermática:

Determinación de la concentración espermática mediante recuento en cámara de Neubauer y sistemas computarizados (CASA).

Movilidad progresiva mediante la evaluación subjetiva en microscopio de contraste de fase con platina térmica y sistema computarizado (CASA).

Determinación del porcentaje de espermatozoides vivos mediante coloración vital con Eosina/Nigrosina y por fluorocromía.

Determinación de la funcionalidad de membrana utilizando el test de endósmosis (HOST).

Determinación de la integridad acrosómica empleando microscopía de contraste de fases y tinciones ópticas y fluorocrómicas.

Determinación de la morfología espermática: Se empleará la coloración de Rosa de Bengala.

En todos los casos se evaluará un total de 200 espermatozoides por muestra, se calculará el porcentaje de espermatozoides normales y anormales de cada muestra, clasificando las anomalías encontradas. Se determinarán aquellas de mayor prevalencia a través del análisis estadístico descriptivo de un número representativo de muestras ($n \geq 45$).

Análisis de nuevos diluyentes para semen ovino y caprinos: Se analizará su eficiencia entre productos similares.

Obtención de semen ovino y caprino: Se utilizarán machos seleccionados puros y cruza a los que se les extraerá semen por la técnica de vagina artificial o electro-eyaculación.

Valoración de la calidad seminal: Se valorarán las características físicas (color, aspecto, olor, pH y presencia de cuerpos extraños, en eyaculados frescos) y grado de aglutinación. Las pruebas rutinarias de control de calidad espermática a realizar, así como las técnicas para la valoración de la morfología del espermatozoide serán similares a las descritas para el bovino, adaptándose a estas especies.

Curvas de enfriamiento: Se utilizará una heladera programable. Se diseñarán diferentes sistemas de enfriamiento. Se estudiarán diversas curvas (exponencial simple o múltiple con distintas temperaturas y tiempos de equilibramiento).

Obtención del ovocitos ovinos y caprinos, pruebas de toxicidad y vitrificación: Se utilizarán ovarios de ovinos y caprinos sacrificados para consumo. Se tomarán muestras, que se emplearán para control y para las pruebas de toxicidad y vitrificación. Se comparará el efecto de etilenglicol y dimetilsulfóxido como agentes crioprotectores (ACPs) permeables utilizados solos a una concentración de 50 % o la combinación de ambos (50 % + 50% de la dosis total recomendada en pureza). En todos los casos se evaluará la toxicidad (se enfrentarán las muestras a las soluciones sin llevarlas a nitrógeno líquido) y la respuesta a la vitrificación en ausencia o en presencia de sacarosa (0,25 M). Una vez encontrada la mejor combinación de ACPs, se analizará dicha combinación en presencia de concentraciones crecientes de sacarosa (0,25M; 0,5M; 0,75M).

Evaluación de la integridad de los folículos: Los controles, las muestras sometidas a la prueba de toxicidad y las descongeladas serán fijadas en solución de Bouin para su posterior evaluación histológica. Dicha evaluación se realizará mediante microscopía óptica, luego de teñir las muestras con Hematoxilina-Eosina. Se considerarán anormales aquellos folículos que presenten ovocitos degenerados, con núcleo condensado o

picnótico, citoplasma vacuolado, sin membrana nuclear y/o células de la granulosa hinchadas o ausentes.

Comparación de los métodos de valoración y conservación de semen de animales de abasto con otras especies de interés: Se realizarán los análisis dimensionales necesarios para encontrar posibles correlaciones en los métodos de conservación y parámetros de valoración utilizados. Se tomará en cuenta también el efecto de la posible estacionalidad reproductiva de los animales en cuestión, la respuesta a los métodos de extracción pre y post mortem, etcétera.

Obtención del ovocitos ovinos y caprinos, a partir de ovarios de ovinos y caprinos sacrificados para consumo. Se seleccionarán según la morfología utilizando un microscopio estereoscópico. Se clasificarán en diferentes grupos y solo los de las mejores características serán vitrificados. Posteriormente serán desvitrificados y colocados en estufa a 38 °C y a 5 % de CO₂ hasta completar las 27 horas de maduración in vitro.

Luego de la superovulación e inseminación (IATF) se realizará la obtención de embriones. Para ello se inyectará un medio líquido (PBS-PVA filtrado estéril) para lavar y arrastrar los embriones a través de los cuernos uterinos (flushing). Se utilizará un medio base (TCM 1999 o PBS (Solución Buffer Fosfato), con un 2 % de suero fetal bovino, ovino o caprino inactivado. En ovejas, la colecta embrionaria se realiza en los días 5to o 6to postservicio. Debido a que el desarrollo embrionario inicial en caprinos presenta un retraso de 12 a 24 horas, la colecta de embriones se realiza en los días 5to o 6to postservicio. Posteriormente los embriones obtenidos serán mantenidos en un medio de cultivo con 2 % de suero fetal bovino, ovino o caprino inactivado en estufa a 38 °C y a 5 % de CO₂ hasta la vitrificación o congelado. Luego de la desvitrificación/descongelación se evaluarán parámetros morfológicos y morfométricos, de viabilidad y finalmente serán transferidos a hembras receptoras para evaluar la capacidad de desarrollo. Se realizarán diferentes protocolos de vitrificación y un control sin vitrificar para seleccionar el protocolo con mejores resultados.

Análisis estadístico: En general se utilizarán elementos de teoría estadística de pequeñas muestras ($N < 30$). Se utilizará estadística descriptiva en todos los casos. Se usará además estadística no paramétrica en los casos en que sea requerida. Se utilizará análisis de varianza (ANOVA), en orden de establecer si las varianzas de las muestras son homogéneas, y para determinar las posibles diferencias entre tratamientos. En los casos en que se obtenga diferencias significativas entre tratamientos y se puedan normalizar las variables, se utilizará el test de Tukey (HSD, $P < 0.05$) para comparaciones múltiples. Cuando corresponda se hará "verificación de hipótesis".

11.) Cronograma

	Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Relevamiento bibliográfico y sistematización.	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Reformulación de criterios analíticos en función del aporte bibliográfico y constitución del primer corpus de análisis. Redacción de trabajos a partir de ordenamientos temáticos Análisis del Corpus			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Lectura y discusión de los trabajos realizados. Elaboración del informe.							X	X	X	X	X	X

12.) Resultados Esperados

Lograr desarrollar un modelo de valoración para semen ovino y caprino fresco, refrigerado y congelado que incorpora diferentes pruebas de laboratorio, adaptando su uso de acuerdo a la durabilidad de las dosis.

Jerarquizar algunos de los diferentes diluyentes comerciales en la protección *in vitro* de muestras seminales, y su efecto en la durabilidad del semen refrigerado como en la congelación profunda que cumplan con pautas de practicidad, económicos y fáciles de conseguir.

Desarrollar diferentes curvas controladas para los procesos de enfriamiento, congelamiento, descongelamiento en equipos computarizados, permitiendo el diseño de nuevas curvas de descenso térmico adaptables a los diferentes reproductores.

Realizar aportar conocimiento de la morfología, comportamiento biológico de las gametas y embriones sometidos de distintos procesos de conservación en las diferentes razas ovinas y caprinas.

Lograr nuevos protocolos de valoración de la calidad de embriones para transferir en ovinos y caprinos.

Adaptar a las diferentes razas los protocolos de superovulación, los de sincronización y de transferencia embrionaria ya existentes.

12.1.) Aportes científicos

Libros:

Conferencias Científicas:

12.2.) Vinculación y Transferencia⁷

12.3.) Mediación del conocimiento

Cursos de Capacitación:

Conferencias:

13.) Investigadores:

13.1.) *Seniors*

Apellido y Nombre: Tello, Fernanda

Grado Académico: Profesor titular de UCES

Principal actividad laboral:

Dedicación al proyecto: simple

⁷ Indicar el nombre de la entidad destinataria de la transferencia y el tipo de relación formal que habría que tramitar para concretar el vínculo

Apellido y Nombre: Ferrante, Alejandro

Grado Académico: Profesor Adjunto de UCES

Principal actividad laboral:

Dedicación al proyecto:

Apellido y Nombre: Bernasconi, Gustavo

Grado Académico: Profesor Titular de UCES

Principal actividad laboral:

Dedicación al proyecto:

Apellido y Nombre: César Fernández Magán

Grado Académico: Profesor Titular de UCES

Principal actividad laboral:

Dedicación al proyecto:

Apellido y Nombre: Miralles, Mariana

Grado Académico: Profesor Adjunto de UCES

Principal actividad laboral:

Dedicación al proyecto:

13.2.) Juniors

—

13.3.) Alumnos asistentes de Investigación.

Apellido y Nombre: Agustín Tantucci

Breve descripción de las tareas que se asignarán: participar de las actividades de investigación que se realizan sobre gametas y embriones y su conservación y transferencia en el laboratorio de Veterinaria de la UCES, sede Cañuelas

Apellido y Nombre: Roció Ferrari

Breve descripción de las tareas que se asignarán: participar de las actividades de investigación que se realizan sobre gametas y embriones y su conservación y transferencia en el laboratorio de Veterinaria de la UCES, sede Cañuelas

14.) Bibliografía

Aisen E, Álvarez H, Venturino A, Garde J. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053-1061. doi: 10.1016/S0093-691X(00)00251-X

Aisen E, Medina V, Venturino A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram *Agropecuaria*. ISBN: 978-987-521-902-1

Bartlewski, P. M., Beard, A. P., Cook, S. J., Chandolia, R. K., Honaramooz, A., Rawlings, N. C. (1999). Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *Reproduction*, 115(1), 111-124.

Berlinguer, F., Gonzalez-Bulnes, A., Succu, S., Leoni, G., Mossa, F., Bebbere, D., Naitana, S. (2007). Effects of progestagens on follicular growth and oocyte developmental competence in FSH-treated ewes. *Domestic animal endocrinology*, 32(4), 303-314.

- Cuadro, F., dos Santos Neto, P. C., Barrera, N., Crispo, M., Menchaca, A. (2016). Progesterone levels during the first follicular wave affect oocyte viability and embryo quality in sheep. In 18th international Congress of animal reproduction (ICAR). Abstract Book (pp. 430-431).
- Driancourt, M. A., Philipon, P., Locatelli, A., Jacques, E., Webb, R. (1988). Are differences in FSH concentrations involved in the control of ovulation rate in Romanov and Ile-de-France ewes? *Reproduction*, 83(2), 509-516.
- Gibbons AE; Cueto MI, Bruno Galarraga MM, Fernandez J. (2016). Manual de obtención, Gundogan M, Yeni D, Avdatek F, Fidan AF. Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Anim Reprod Sci.* 2010;122(3-4):200-7.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.012>
- Leyva, V., Buckrell, B. C., Walton, J. S. (1998). Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology*, 50(3), 395-416.
- Menchaca, A., Miller, V., Salveraglio, V., Rubianes, E. (2007). Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the short-term protocol to synchronize ovulation in goats. *Animal Reproduction Science*, 102(1-2), 76-87.
- Menchaca, A., Rubianes, E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(4), 403-413
- Menchaca, A., Rubianes, E. (2007). Pregnancy rate obtained with short-term protocol for timed artificial insemination in goats. *Reproduction in domestic animals*, 42(6), 590-593.
- Menchaca, A., Rubianes, E. (2012). Avances en el control ovárico en la oveja. Reunión Bianual sobre Reproducción Animal. Temascaltepec de Gonzáles, México, del 4, 76-83. procesamiento y conservación del semen ovino. Editorial: Instituto Nacional de Tecnología
- Sandoval R, Santiani A, Ruiz L, Leyva V, Coronado L, Delgado A. 2007. Criopreservación de semen ovino empleando tres dilutores y cuatro combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. *Rev Inv Vet Perú* 18: 107-114
- Santos-Neto, P. C., García-Pintos, C., Pinczak, A., Menchaca, A. (2015). Fertility obtained with different progestogen intravaginal devices using short-term protocol for fixed-time artificial insemination (FTAI) in sheep. *Livestock Science*, 182, 125-128.
- semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57: 1801-1808
- Vera, TA. 2009. Evaluación de viabilidad y fertilidad de espermatozoides caprinos congelados con diluyente sin proteína animal y el agregado de plasma seminal pos

descongelado (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata).

https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/7795/INTA_CIPAF_IPAFNO_A_Vra_TA_Evaluacion_de_viabilidad_y_fertilidad_de_espermatozoides_caprinos.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Viñoles, C., Martín, G. B., Milton, M., Paganoni, B. (2007). El uso de esponjas y eCG en programas de inseminación a tiempo fijo promueve una mejor fertilidad que la prostaglandina. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría.

Watson P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Repro Sci 60-61: 481-492.