



# ENCUENTRO CIENTIFICO INTERNACIONAL



## *“TECNOLOGIAS REPRODUCTIVAS EN ESPECIES DOMESTICAS Y NO DOMESTICAS”*



**15 al 18 de Julio**

**LIMA - 2014**



**ENCUENTRO CIENTIFICO  
INTERNACIONAL**

***“TECNOLOGIAS REPRODUCTIVAS  
EN ESPECIES DOMESTICAS Y NO  
DOMESTICAS”***

**15 al 18 de Julio**

**LIMA - 2014**



## PRESENTACION

Las tecnologías reproductivas representan una de las alternativas que pueden contribuir al progreso genético de las especies domésticas y a la conservación de las especies no domésticas. La sección de Biotecnología Reproductiva del Laboratorio de Reproducción Animal desarrolla investigaciones para la implementación de tecnologías reproductivas como Inseminación Artificial, Transferencia de Embriones y Fecundación *In Vitro*.

La Asociación Peruana de Producción Animal (APPA) tiene como uno de sus objetivos contribuir a la capacitación, actualización y divulgación de conocimientos en los diferentes campos de la Producción Animal.

Para cumplir con los objetivos, la APPA, gracias al aporte económico del **CONCYTEC** y contando con la colaboración de la sección de Biotecnología Reproductiva del Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria – Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha programado el ENCUENTRO CIENTÍFICO INTERNACIONAL: ***“TECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS EN ESPECIES DOMESTICAS Y NO DOMESTICAS”***, con la participación de destacados profesionales de Argentina, Canadá, Uruguay y Perú.

Atentamente,

**La Comisión Organizadora**

## COMISION ORGANIZADORA



Presidente:	José Atto Mendives
Vicepresidente:	Aída Cordero Ramírez
Secretario:	Antonio Ampuero Bustillo
Coordinación General:	Wilfredo Huanca López
Coordinación Internacional:	J. Manuel Palomino Cano
Colaboradores:	Willian F. Huanca Mori Tito Limache Coaquera Marco Machaca Pérez Patricia V. Godo Soto Jesús E. Turín Vilca Martha Hanco Gamarra Camilo Mamani Mondragon Rodolfo Zurita Burmester Josías N. Ascencio Santiago



**CONCYTEC**

## APOYO FINANCIERO Y ESTRUCTURAL

- Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica
- Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM)



## CONTENIDO

- 1.- Tecnologías Reproductivas en especies exóticas: presente y futuro.  
***Dra. Gabriela Mastromonaco*** **7**
- 2.- Biotecnologías de la reproducción en cérvidos.  
***Dr. Eduardo Aisen*** **9**
- 3.- Aplicación de técnicas no invasivas en la Evaluación Reproductiva.  
***Dr. Marco Enciso*** **14**
- 4.- Biobancos de especies exóticas: Asegurando los recursos genéticos para el mañana.  
***Dra. Gabriela Mastromonaco*** **22**
- 5.- Programación Fetal en Ovejas: Efecto de la Nutrición.  
***Dra. Raquel Pérez Clariget*** **24**
- 6.- Aplicación de las Tecnologías Reproductivas en Vacas Infértiles.  
***Dr. Claudio Centeno Gabancho*** **35**
- 7.- Experiencias sobre Inseminación en Ovinos.  
***Dr. Eduardo Aisen*** **38**
- 8.- Experiencias con Sincronización de Celo con Progesterona Oleosa.  
***Dra. Raquel Pérez Clariget*** **45**

9.-	Transferencia de Embriones Interespecífica en Camélidos.	
	<b><i>Dr. Teodosio Huanca Mamani</i></b>	<b>56</b>
10.-	Remoción de microorganismos del semen y embriones.	
	<b><i>Dr. Jesús Manuel Palomino Cano</i></b>	<b>63</b>
11.-	Consideraciones para la producción de embriones In Vitro.	
	<b><i>Dr. Wilfredo Huanca López</i></b>	<b>65</b>
12.-	Principios Físico-Químicos aplicados a la Criopreservación de los Espermatozoides.	
	<b><i>Dr. Eduardo Aisen</i></b>	<b>71</b>
13.-	Clonación y Células Madre – Posibilidades para la Conservación de Especies.	
	<b><i>Dra. Gabriela Mastromonaco</i></b>	<b>77</b>

# Reproductive Technologies in Exotic Species: Present and future

Gabriela F. Mastromonaco

Reproductive Physiology, Toronto Zoo, Toronto, Ontario, Canadá

On-going declines in wildlife populations present major challenges to biologists and animal managers working with free-ranging and captive populations. The sustainability of genetically and demographically stable populations is problematic due to constant environmental pressures, reduced or fragmented populations, disease concerns, and other anthropogenic factors. Although habitat protection and management is the most practical and successful solution, prevention of further declines requires the maintenance of reproductively viable and genetically diverse natural and captive populations<sup>1</sup>. In order to achieve this objective, knowledge of the basic reproductive biology of wildlife species and the impact of environmental stimuli on reproductive outcomes is critical. Specifically for conservation breeding programs, obstacles, such as reduced genetic variability and low population sizes, need to be overcome using assisted reproductive technologies (ARTs)<sup>2</sup>. ARTs can provide numerous benefits, such as enhanced breeding outcomes, improved distribution of genetic material, and reduced disease transmission. However, a more comprehensive understanding of basic reproductive parameters is needed prior to the development and application of successful techniques.

Reproductive hormone levels are important indicators of population health and growth, and the necessary foundation for implementing techniques that manipulate reproductive outcomes, including both ovulation induction and contraception. Non-invasive hormone analysis is the state-of-the-art technique due to the difficulties in repeated animal handling required for sample collections. Reproductive hormone profiles have been established for diverse species using a variety of sample types, including blood, saliva, urine, and feces, as well as novel substrates currently being developed (hair/fur, feathers, skin sheds and claws). These data have been instrumental for the management of both natural and captive populations by enhancing timed breeding introductions, detecting pregnancy, identifying seasonality and sexual maturity, and evaluating reproductive dysfunction. In addition to assisting natural breeding attempts, reproductive hormone levels provide valuable insight on the effects of exogenous hormones administered to up-regulate (e.g. superovulation) or down-regulate (e.g. contraception) gonadal activity.

ARTs, specifically artificial insemination (AI), in vitro fertilization (IVF) and embryo transfer (ET), have made a significant impact in livestock species in the past 30 years. Similarly, these tools can provide wildlife managers with methods to maintain or rapidly improve the genetic diversity of endangered populations. However, in non-domestic species, which are typically non-tractable, the degree of manipulation and invasiveness of the technique is related to its potential for success. Minimally invasive techniques (i.e. AI) result in greater live offspring production than ones that require extensive animal handling and gamete manipulation. To date, AI has been effectively implemented in diverse taxa using fresh, chilled, frozen and sex sorted sperm<sup>3</sup>. Several successes include the black footed ferret (*Mustela nigripes*) with more than 139

offspring from fresh and frozen AI, and the dolphin (*Tursiops truncatus*) with 10 females born from sex sorted sperm AI<sup>4,5</sup>. In contrast, numerous attempts with in vitro embryo production and transfer have resulted in a small number of live births, primarily in mammalian species. In exotic bovines, use of well-developed domestic cattle protocols has resulted in only a several live calves born (e.g. *Bos gaurus*, *Bos javanicus*, *Bison bison*). The challenge of transferring embryos into exotic females has led researchers to investigate the use of interspecies ET, whereby the exotic embryo is transferred into a related domestic recipient. With population sizes rapidly dwindling, the dependence on ARTs will only grow to include more novel techniques, such as somatic cell nuclear transfer and derivation of induced pluripotent stem cells, in the efforts to produce genetically valuable individuals.

It is well known that ARTs have the potential to provide the necessary tools for the reproductive management and long-term preservation of threatened species in captivity, and ultimately, the wild. Despite the use of domestic animal models for the development and optimization of protocols, various challenges remain, including differences in reproductive anatomy, repeated animal handling and anesthesia, and species-specific requirements for gametes and embryos. Efforts to date have shown that successful and widespread application of ARTs requires not only an understanding of reproductive biology of diverse species, but also increased collaborative relationships with wildlife, regulatory and funding agencies. Access to larger sample sizes and exchange of material and techniques on a global level are essential in order for progress to continue rapidly and effectively.

## REFERENCES

- 1 Holt WV, Pickard AR. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Rev Reprod* 1999; 4:143-150.
- 2 Comizzoli P, Mermillod P, Mauget R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reprod Nutr Dev* 2000; 40:493-504.
- 3 Durrant BS. The importance and potential of artificial insemination in CANDES (companion animals, non-domestic, endangered species). *Theriogenology* 2009; 71:113-122.
- 4 Howard JF, Wildt DE. Approaches and efficacy of artificial insemination in felids and mustelids. *Theriogenology* 2009; 71:130-148.
- 5 O'Brien JK, Robeck TR. Development of sperm sexing and associated assisted reproductive technology for sex preselection of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Reprod Fertil Dev* 2006; 18:319-329.



# BIOTECNOLOGÍAS DE LA REPRODUCCIÓN EN CÉRVIDOS Y SU APLICACIÓN EN ESPECIES AMENAZADAS.

Dr. Eduardo G. Aisen

*Laboratorio de Teriogenología "Dr. Héctor H. Morello" Facultad de Ciencias Agrarias.  
Universidad Nacional del Comahue. Cinco Saltos, Río Negro. ARGENTINA.  
teriogenologia@hotmail.com*

**Palabras clave:** técnicas de reproducción asistida - especies de cérvidos amenazadas - bancos de germoplasma.

## INTRODUCCION

La reproducción de los ciervos está marcada fuertemente por la estacionalidad reproductiva dependiente del fotoperiodo. La época de apareamiento o brama en la mayoría de las especies ocurre en el otoño (marzo-mayo en el hemisferio sur). El promedio de ciclo estral del ciervo colorado (*Cervus elaphus*) es de 18 días, con aproximadamente 4 ciclos durante la estación reproductiva. En los machos, la producción de testosterona y semen se reduce en el invierno, se modifican los testículos y la actividad sexual disminuye. A fines de primavera esta producción aumenta, llegando a su máxima expresión en el otoño.

Algunas especies de cérvidos, como el ciervo colorado, ofrecen una oportunidad para estudios reproductivos, los que pueden ser aplicados en diferentes circunstancias tales como producción en criaderos, caza o conservación de especies o poblaciones amenazadas. Actualmente, esta especie es utilizada como modelo experimental de estudios de biotecnologías reproductivas modernas o de técnicas de reproducción asistida (TRA). Esas técnicas, desarrolladas en ciervos de criadero, son una potente herramienta dentro de los programas de conservación de especies en peligro de extinción.

Las TRA incluyen: recuperación de espermatozoides del epidídimo, criopreservación de espermatozoides, sexado de semen, inseminación artificial, transferencia y sexado de embriones, fertilización in vitro, micromanipulación de gametos y embriones, clonación, bancos de recursos genéticos, y otros. El desarrollo de TRA para especies silvestres es lento, debido a la limitación de recursos y oportunidades, y a la complicación biológica y legal que representa el manejo de animales amenazados. En muchos casos, la aplicación de biotecnologías reproductivas resulta especie-específica, o bien no apropiada para todas las especies amenazadas. Los estudios básicos de la reproducción tales como ciclo estral, estacionalidad, espermatogénesis, fisiología de las gametas y supervivencia embrionaria no están completamente estudiados para especies silvestres.

Desde el punto de vista de la criopreservación, existen diferencias especie-dependientes que determinan la capacidad de las células y tejidos para sobrevivir los procesos de congelación-descongelación. Sin embargo, hay puntos en común entre los

diferentes *taxa* que permiten que un protocolo desarrollado para una especie pueda ser útil para otra. Por esta razón, es interesante realizar estudios comparativos de criopreservación entre diversas especies (Comizzoli et al., 2012). Cuando un individuo perteneciente a una especie en peligro de extinción muere, no hay tiempo para desarrollar un estudio de los fundamentos de la criobiología para ella. En estas situaciones de emergencia, es necesario tener la experiencia adquirida en otras especies relacionadas taxonómicamente y aplicarla.

En los últimos años se ha evidenciado un fuerte incremento de los trabajos de TRA aplicadas a especies silvestres. El desafío, pues, será utilizar correctamente estas técnicas en las especies de cérvidos amenazadas, a fin de mejorar la situación vulnerable de las mismas, sin poner en riesgo a los individuos ni introducir variaciones indeseables en el germoplasma. La diversidad genética alcanzada naturalmente es uno de los valores más importantes a preservar. Las crías obtenidas de ciertos progenitores permiten asegurar la diversidad genética. Ciertas tecnologías también pueden reducir el intervalo generacional. Sin embargo, la aplicación de biotecnologías reproductivas en animales en silvestría no es tan fácil como en ciervos de criadero o en especies amenazadas pero criadas en cautiverio (como en los zoológicos).

## **TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

Existe un importante número de TRA desarrolladas para su uso en los cérvidos (Garde et al., 2006). Entre ellas se destacan las que involucran a los espermatozoides, a los óvulos y al producto de la interacción de las dos gametas.

### **ESPERMATOZOIDES**

La colecta de las células espermáticas puede realizarse por medio de recuperación post coital, electroeyaculación, vagina artificial, recuperación *post mortem* (epidídimo), entre otros. La obtención de espermatozoides epididimarios de ciervos muertos (Soler et al., 2005, Malcotti et al., 2012) permite la criopreservación del material genético y la creación de bancos de germoplasma (Locatelli. 2008). Esta técnica, desarrollada en cérvidos en cautiverio, puede aplicarse a especies en peligro de extinción (Long et al., 2003).

Las técnicas desarrolladas para estas gametas comprenden la conservación de epidídimos, el sexado de espermatozoides, la congelación de espermatozoides y la inseminación artificial. El semen del ciervo se adapta bien a la congelación en pajuelas, utilizándose para ello diluyentes comerciales (Triladyl, Andromed, Bioxcell) o formulados en base a Tris-cítrico, TES y otros (Pintus et al., 2014).

La pre-selección del sexo de la descendencia a través de la utilización de espermatozoides sexados tiene un gran potencial como estrategia de gestión de la población de la vida silvestre en peligro de extinción, en particular en las especies con un solo sexo dominando estructuras sociales (O'Brien et al., 2002). También aporta beneficios al orientar el nacimiento a una mayor proporción de vientres.

## INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

En países como Nueva Zelandia y algunos europeos, la inseminación artificial de cérvidos es una práctica común. La misma se realiza por medio de siembra en el cuello uterino (vaginoscópica) o en la luz del útero (por palpación rectal o bien con el uso de laparoscopia) La incorporación de nueva genética (desde el exterior, o bien desde otras zonas productivas dentro de un país) es muy importante para el mejoramiento productivo, siendo la inseminación artificial con semen congelado una de las prácticas más recomendables (Holt et al., 2009).

## ÓVULOS

Los ovarios son fuente de ovocitos. Para su utilización pueden congelarse como ovario completo, tejido cortical ovárico o bien como folículos aislados. Para la criopreservación se usa la congelación lenta o métodos de vitrificación (Santo et al., 2010). Después de la criopreservación, el material conservado puede ser trasplantado o cultivado, con el objetivo de producir ovocitos maduros fertilizables; la maduración de óvulos *in vitro* (complejos cumulus-ovocito) es una técnica aplicable en estos casos (Locatelli et al., 2005).

## TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

Esta técnica está ampliamente difundida, especialmente en ciervo colorado. Tanto la recuperación como la transferencia de los embriones se realizan, por lo general, a través de métodos quirúrgicos, con o sin la ayuda de laparoscopia. Los embriones suelen congelarse (vitrificación), lo que permite su utilización entre diferentes países. En algunos casos, esta técnica da lugar a transferencias embrionarias interespecíficas, siendo ésta una herramienta importante en la recuperación de especies silvestres en peligro.

La fertilización *in vitro*, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, la micromanipulación, la clonación y el sexado de embriones son prácticas que se utilizan en diferente grado en los cérvidos, dependiendo de su uso (producción animal o recuperación de especies amenazadas).

La clonación que se realiza en el mundo utiliza, en general, material genético de especies idénticas, como la de *Pudu pudu* a través de la técnica de trasplante nuclear de células somáticas (Venegas et al., 2006), o el uso de *stem cells* de las astas de ciervo colorado (Berg et al., 2007). Sin embargo, también existe la clonación interespecífica, es decir, de una especie a través de otra similar o de la misma familia (Andrabi & Maxwell, 2007).

## BANCOS DE GERMOPLASMA

La congelación de espermatozoides, embriones, tejido ovárico y otras fuentes de germoplasma permite la creación de Bancos de Germoplasma. En el caso de especies de cérvidos amenazados, estos repositorios de genes ayudan a mantener la

diversidad de las poblaciones, aún cuando las mismas se hallen disminuidas. La mayoría de estos criobancos se encuentran en los zoológicos de distintos países del mundo (Andrabi & Maxwell, 2007).

Los estudios sistemáticos de gametos congelados y tejidos reproductivos deben considerar, para la recuperación después de la descongelación, los siguientes aspectos: 1) la permeabilidad de la membrana al agua y crioprotector, 2) la toxicidad del crioprotector, 3) la tolerancia a los cambios osmóticos, y 4) la resistencia a temperaturas de refrigeración y congelación (Comizzoli et al., 2012).

El acompañamiento con estudios de parentesco y diversidad genética mediante el análisis de ADN posibilitan la programación estratégica de la combinación de gametas para reducir la consanguinidad. A modo de ejemplo, los últimos estudios de genética molecular en poblaciones aisladas de huemul (*Hippocamelus bisulcus*) recomiendan preservar fuertemente la diversidad de genes en esta especie (Corti et al., 2011).

## REFERENCIAS

- 1 Andrabi SMH, Maxwell WMC. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science* 99, 223–243, 2007.
- 2 Berg, DK, Li, C, Asher, G, Wells, DN, Oback, B. Red Deer Cloned from Antler Stem Cells and Their Differentiated Progeny. *Biology of Reproduction* 77 (3), 384-394, 2007.
- 3 Comizzoli P, Songsasen N, Hagedorn M, Wildt DE. Comparative cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from wildlife species *Theriogenology* 78, 1666–1681, 2012.
- 4 Corti, P., Shafer, A.B.A., Coltman, D.W. Past bottlenecks and current population fragmentation of endangered huemul (*Hippocamelus bisulcus*): implications for preservation of genetic diversity. *Conserv. Genet.*, 12, 119-128, 2011.
- 5 Garde, JJ, Martínez-Pastor, F, Gomendio, M, Malo, AF, Soler, AJ, Fernández-Santos, MR, Esteso, MC, García, AJ, Anel, L, Roldán, ERS. The Application of Reproductive Technologies to Natural Populations of Red Deer. *Reproduction Domestic Animals* 41 (Suppl. 2), 93–102, 2006.
- 6 Holt, WV, Lloyd, RE. Artificial insemination for the propagation of CANDES: the reality! *Theriogenology* 71; 228–235, 2009.
- 7 Locatelli Y, Cognie Y, Vallet JC, Baril G, Verdier M, Poulin N, Legendre X, Mermillod P. Successful use of oviduct epithelial cell coculture for in vitro production of viable red deer (*Cervus elaphus*) embryos. *Theriogenology* 64, 1729–1739, 2005.

- 8 Locatelli, Y. In Vitro production of Cervid embryos: results, limits and future perspectives regarding endangered species conservation. *Reproduction in Domestic Animals* 43 (3), 14, 2008.
- 9 Long CR, Walker SC, Tang, RT, Westhusin ME. New commercial opportunities for advanced reproductive technologies in horses, wildlife, and companion animals. *Theriogenology*, 59, 139–149, 2003.
- 10 Malcotti V, Pelufo V, Bergamo N, Aisen E. Recovery of epididymal spermatozoa from bull and red deer, stored at different times and temperatures before freezing-thawing. *Animal Production Science*, 52 (8), 741-745, 2012.
- 11 O'Brien, J.K., Crichton, E.G., Evans, K.M., Schenk, J.L., Stojanov, T., Evans, G., Maxwell, W.M.C., Loskutoff, N.M. Sex ratio modification using sperm sorting and assisted reproductive technology - a population management strategy. *2nd Int. Symp. Assisted Reprod. Tech. (ART) Conservation Genetic Management Wildlife*, Omaha, Nebraska, 28-29 September 2002, pp 224-231.
- 12 Pintus, E, Ros-Santaella, JL. Assisted reproductive technologies in deer (Artiodactyla, Cervidae): a review. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 45 (2): 136–146, 2014.
- 13 Santo, RR, Amorim, C, Cecconi, S, Fassbender, M, Imhof, M, Lornage, J, Paris, M, Schoenfeldt, V, Martinez-Madrid, B. Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Animal Reproduction Science* , Volume 122 , Issue 3 , 151 – 163, 2010.
- 14 Soler, AJ, Estes, MC, Fernández-Santos, MR, Garde, JJ. Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5 degrees C in the epididymis for several days. *Theriogenology* 64(7):1503-17, 2005.
- 15 Venegas, F.; Guillomot, M.; Vignon, X.; Servely, J-L.; Audouard, C.; Montiel, E.; Le Bourhis, D.; Perón, S.; Soto, P. & Rojas, M. Obtainment of *Pudu pudu* deer embryos by the somatic nuclear transfer technique. *International Journal Morphology*, 24(2):285-292, 2006.

# Aplicación de técnicas no invasivas en la evaluación reproductiva

Dr. Marco Enciso Hoyos  
[marco.enciso@gmail.com](mailto:marco.enciso@gmail.com)

## Introducción

El manejo reproductivo y el uso de las biotecnologías reproductivas en especies silvestres son dependientes del conocimiento de la biología reproductiva de dichas especies, lo cual generalmente no se asemeja a las especies domésticas con las cuales son comparadas. Las dificultades inherentes del manejo de las especies silvestres, así como el grado variable de estrés desencadenado por éste, además del escaso desarrollo de infraestructuras adecuadas, han generado el desarrollo de técnicas de estudio principalmente no invasivas, tales como caracterizaciones etológicas y determinación de hormonas y metabolitos hormonales en excretas y pelo.

## Técnicas no invasivas disponibles

A continuación se detallan las técnicas no invasivas más usadas para el desarrollo de evaluaciones reproductivas e inclusive para el conocimiento básico de la biología reproductiva de las especies.

### *Estudios etológicos*

Las especies silvestres presentan características y comportamiento reproductivo asociados a la Familia de especies específicas, así por ejemplo, los ungulados silvestres se caracterizan, en general, por una marcada disgregación sexual durante el periodo de anestro estacional, siendo la formación de grupos mixtos la principal característica conductual que define el comienzo del periodo reproductivo en estado silvestre. Durante el periodo reproductivo, se han descrito distintas fases graduales y definidas, correspondientes a los periodos: pre-estral, donde los machos se integran a los grupos matriarcales, observándose los primeros comportamientos de lucha entre machos; estral, donde se registra la máxima frecuencia de cópulas y post estral, correspondiente al término del período reproductivo y caracterizado por cópulas esporádicas. Para la determinación de cada una de estas fases se han determinado los siguientes patrones de comportamiento: a) Cortejo de los machos: olfateo del periné, persecución de la hembra y reflejo de Flehmen, b) Comportamiento agonístico de machos: grado variable de agresión entre ellos, que genera jerarquización de acceso a las cópulas y c) Respuesta de las hembras al cortejo caracterizada por inmovilidad ante el macho, consecuencia del estado estral.

La caracterización de la época de parición es otro dato importante en los estudios de campo, que permite estimar de forma indirecta el periodo de actividad reproductiva de una población. Conociendo la fecha media del periodo estral (frecuencia de cópulas), es posible estimar la longitud de la gestación a través de la determinación de la fecha media de partos. Una serie de métodos han sido propuestos para la

estimación de la fecha media de partos, siendo el método del porcentaje de partos acumulados, el más utilizado. Este método consiste en estimar el número de partos ocurridos previos a la fecha del estudio y se expresa como porcentaje del número total de partos de toda la temporada. De este modo, la proporción de partos acontecidos previo a la fecha de observación es equivalente al número de hembras lactantes observadas, mientras que la proporción de partos ocurridos posterior a esta fecha, corresponde al número de hembras gestantes detectadas. Esta metodología ofrece como ventaja principal, el permitir periodos de muestreo discontinuos y con intervalos variables. Adicionalmente, es posible comenzar el estudio ya iniciada la estación de partos y dar término al mismo, antes de la finalización de la misma. Lo anterior se fundamenta en la característica de la metodología, que permite trabajar con datos acumulados, entregando de este modo el grado de avance de la temporada en estudio.

### ***Medición de hormonas sexuales en sangre***

#### *Hormonas glicoproteicas*

La aplicación de las diferentes técnicas utilizadas con éxito en animales domésticos, con el objetivo de caracterizar fisiológicamente las conductas reproductivas observadas en condiciones silvestres, ha presentado serias limitaciones en animales silvestres. La determinación de hormonas glicoproteicas, como la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), son de gran interés en la explicación de fenómenos asociados con la estación sexual y la pubertad. Sin embargo su aplicación en especies silvestres, es más limitada en comparación con las hormonas esteroidales, debido principalmente a la característica pulsátil de su secreción, lo cual hace necesario una alta frecuencia de muestreo sanguíneo, convirtiéndolo en inviable en muchas condiciones experimentales o en especies de difícil manipulación.

#### *Hormonas esteroidales*

La determinación de las concentraciones sanguíneas de estrógenos y progestágenos, se basa en la similitud del patrón de secreción y estructura de los esteroides entre las distintas especies, lo cual ha permitido el desarrollo y aplicación de las técnicas de radioinmunoanálisis (RIA) o enzimoimmunoanálisis (EIA). Es así como, el análisis de las variaciones en sus concentraciones plasmáticas ha permitido, principalmente en especies domésticas y en algunas silvestres, relacionarlas con el comienzo y término de la estación reproductiva, el inicio de la pubertad, el estro, anestro, gestación y puerperio. De este modo se ha caracterizado: el ciclo estral y la gestación en el ciervo rojo (*Cervus elaphus*); la estacionalidad y la gestación en el corzo (*Capreolus capreolus*); el ciclo estral, la estacionalidad y la gestación en el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*); el ciclo estral y la estacionalidad en el ciervo dama (*Dama dama*); y el ciclo estral y la estacionalidad en el muflón (*Ovis musimon*). Sin embargo, en muchas especies silvestres este método ha presentado limitaciones en su aplicación, relacionadas con la contención del animal durante la obtención de la muestra. Este hecho cobra mayor relevancia en cérvidos y pequeños primates, donde se ha descrito que como consecuencia del estrés, se desencadena un alza significativa

en las concentraciones de progesterona plasmática de origen adrenal, lo cual puede generar no sólo distorsión en los resultados, sino también detrimento en el bienestar del animal, que en algunos casos podría llevar hasta la muerte.

### ***Medición de hormonas sexuales en otras matrices***

La dificultad que representa el manejo con periodicidad, necesario en evaluaciones hormonales sanguíneas, ha generado el desarrollo de técnicas para la determinación de esteroides urinarios y fecales como métodos no invasivos. A pesar que péptidos, proteínas y hormonas glicoproteicas son componentes elementales en los diferentes procesos reproductivos, y son excretadas como metabolitos reconocibles, la especificidad en cada estructura proteica (secuencias de aminoácidos) entre las distintas especies, ha limitado su aplicación con los métodos analíticos existentes. No obstante, en algunos ensayos se han determinado restos bioactivos de hormonas glicoproteicas, tales como la LH y la FSH, sin embargo, la complejidad del método, ha limitado su aplicación en evaluaciones de rutina. De este modo, la mayoría de los trabajos han focalizado sus objetivos en el análisis de los metabolitos de hormonas esteroidales.

### ***Esteroides sexuales en orina***

Los primeros métodos no invasivos, fueron desarrollados para la determinación de estrógenos en muestras urinarias. Estas concentraciones presentan un retraso en relación a su expresión circulatoria, lo cual quedó demostrado en ensayos realizados en équidos, óvidos y suidos domésticos, donde se describe que la presencia de esteroides en circulación y su aparición en orina es menor a 5 horas.

Las primeras técnicas para el análisis de muestras de orina utilizaron anticuerpos contra estradiol y estrona, determinándose “estrógenos totales”. En consecuencia, fue necesaria la hidrolización de la muestra previo al análisis, ya que la mayoría de los estrógenos presentes en la orina se encuentran en la forma conjugada. Posteriormente, la disponibilidad de anticuerpos específicos para las formas conjugadas de los esteroides urinarios, representa el mayor avance en la analítica de sus metabolitos. Esto permite una simplificación metodológica, así como un incremento de la sensibilidad del análisis. Adicionalmente, la hidrosolubilidad característica de estos metabolitos, sumado a sus altas concentraciones urinarias, hace posible una gran dilución de la muestra inicial para su análisis, facilitando la aplicación de diversas técnicas, como EIA, Inmunofluorescencia y RIA. En la mayoría de las especies silvestres, el sulfato y/o glucuronato de estrona es el metabolito de estradiol más frecuente en orina y el pregnandiol-3 $\alpha$ -glucuronido en el caso de progesterona.

El análisis de los metabolitos urinarios ha hecho posible el monitoreo de la actividad ovárica en relación al desarrollo folicular, ovulación y función luteal, pudiéndose utilizar para evaluar el normal desarrollo de la función ovárica. Particularmente, el ciclo ovárico se caracteriza por un incremento gradual de los conjugados de estrona, alcanzando la máxima concentración justo antes de la ovulación. Las principales dificultades de la determinación de metabolitos esteroidales en orina, radican en que



la entrega de la muestra por parte del animal requiere entrenamiento, y que tanto los volúmenes, como horarios de obtención de la muestra, son difíciles de reproducir en largos períodos de estudio.

### *Esteroides sexuales en heces*

Los primeros estudios, a través de la administración endovenosa de hormonas esteroidales marcadas radio-activamente, demostraron que la excreción a través de las heces era tan importante como por la orina. Esta caracterización, permitió determinar que la eliminación de esteroides, es principalmente de origen biliar, y secundariamente y en una pequeña proporción desde el intestino grueso. Estos estudios indicaron que los estrógenos fecales están conformados principalmente de  $17\alpha$  estradiol,  $17\beta$  estradiol y estrona. En contraste, la progesterona es extensamente metabolizada previa a su excreción fecal, siendo eliminada en una serie de metabolitos fecales de  $5\alpha$  y  $5\beta$  pregnanos (pregnanedionas y pregnanos mono y dihidroxilados).

Entre los inconvenientes que supone la detección de metabolitos de esteroides en heces, están los cambios en la dieta y las fluctuaciones del contenido hídrico de las heces, lo cual puede incidir en la concentración de los esteroides fecales. Surge entonces la necesidad de contar con algún referente de excreción como lo es la creatinina en orina. En base a lo anterior se llevan a cabo estudios, los cuales concluyen que en la mayoría de las especies, esta variación es mínima no siendo necesario un parámetro referencial en heces.

La ruta de excreción hormonal varía considerablemente entre especies, al igual que entre los distintos esteroides en la misma especie. La aparición de metabolitos fecales demanda un lapso mayor que la excreción vía urinaria, que se relaciona con el tiempo necesario de tránsito de la bilis entre el intestino delgado y el recto. Este período varía entre 12 a 24 horas en rumiantes y alrededor de 24 a 48 horas en animales fermentadores cecales, como elefantes, équidos, rinocerontes y suidos.

Los estudios sobre determinación de estrógenos fecales, se han llevado a cabo utilizando anticuerpos específicos para: estrona no conjugada,  $17\alpha$  estradiol no conjugado y  $17\beta$  estradiol no conjugado, o con anticuerpos contra estrógenos totales no conjugados. A pesar que algunos estudios, han reportado el alza *pre* ovulatoria de estrógenos a través de la medición de metabolitos en heces de yeguas, esta aplicación ha sido menos exitosa que el diagnóstico de gestación. La prueba ha sido ineficaz tanto en Alce, como en bóvidos domésticos, debido principalmente, a que el alza en la concentración de conjugados de estrona fecal durante el desarrollo folicular es muy baja (inferiores a 2,0 ng/g), sumado a la baja concentración sanguínea de estrógenos característica en ungulados, y a que su vía de excreción es principalmente urinaria.

Estudios llevados a cabo con cromatografía de gases en combinación con inmunoensayos, indican que la progesterona se metaboliza previo a ser excretadas por las heces en una serie pregnanos reducidos (pregnanedionas y pregnanos mono y dihidroxilados). La progesterona no metabolizada, se encuentra escasamente en heces y los pregnanos fecales se encuentran tanto en su forma 20-oxo,  $20\alpha$ -OH o como

grupo 20 $\beta$ -OH. El número de metabolitos y series de 5 $\alpha$  o 5 $\beta$  pregnanos presentes en heces, varía entre las especies, por ejemplo los pregnanos fecales en équidos y rinocerontes son principalmente del tipo 5 $\alpha$  pregnanos, mientras en okapis pertenecen al tipo 5 $\beta$  pregnanos y en bóvidos se presentan tanto 5 $\alpha$  pregnanos como 5 $\beta$  pregnanos. La gran diversidad de metabolitos de progesterona presentes en heces, explica la existencia de una gran cantidad de técnicas para su determinación. En general, los anticuerpos para el análisis de metabolitos fecales de progesterona, identifican el C<sup>20</sup> de la molécula de pregnona (20-oxo, 20 $\alpha$ -OH o 20 $\beta$ -OH), debido a lo cual se describe la reacción cruzada con 20-oxo-pregnanos. Como la progesterona casi no se encuentra presente en heces, los ensayos usados para medir concentraciones de progestágenos en heces, reportan valores de reacción cruzada con 5 $\alpha$ -pregnano y 5 $\beta$ -pregnano que contengan el grupo 20-oxo.

El análisis de metabolitos fecales de progesterona se ha utilizado exitosamente, para la evaluación de la funcionalidad del cuerpo lúteo y monitoreo de la gestación, diagnóstico de abortos, determinación del inicio de la pubertad y caracterización de estacionalidad reproductiva, en una gran cantidad de especies, como bóvidos, équidos, suidos; rinoceronte negro (*Diceros bicornis*), rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum*), okapi (*Okapia johnstoni*), vicuña (*Vicugna vicugna*), oryx (*Oryx dammah*), y jirafa (*Giraffa camelopardalis*).

Finalmente en el caso de estudios llevados a cabo en especies en peligro de extinción como el rinoceronte Indio (*Rhicerus unicornis*) y el oryx (*O. dammah*), se ha utilizado el análisis conjunto de metabolitos de estrógenos y progestágenos, tales como estrano, pregnano y androstano. De este modo en el rinoceronte indio (*R. unicornis*), se ha descrito el ciclo estral y la gestación, obteniéndose que las concentraciones fecales de derivados del pregnano producidos por el cuerpo lúteo y la unidad feto-placentaria, son semejantes a una serie de reportes en rinocerontes africanos y en rinoceronte de Sumatra (*Dicerus sumatrensis*), demostrando de este modo similitudes endocrinas a considerar en el manejo reproductivo de la especie. Por otro lado, en el caso del oryx (*O. dammah*) estudios realizados sobre la caracterización de la estación sexual, han demostrado que los metabolitos de progesterona reflejan la actividad luteal y los de estrógenos el desarrollo folicular, relacionados con la actividad ovárica, así como descienden a niveles basales durante el anestro estacional. De este modo, en ambos casos la evaluación conjunta de estrógenos y progestágenos, ha permitido caracterizar la fisiología reproductiva en ungulados silvestres, a través de un método no invasivo de estudio.

#### *Esteroides sexuales en leche*

A mediados de la década de 1980, salen al mercado una serie de pruebas de campo, para la medición de progesterona en leche. Este esteroide, constituye el principal esteroide sexual presente en leche y dada su gran afinidad por los lípidos de la leche, puede alcanzar concentraciones superiores a las sanguíneas. La concentración de progesterona en leche puede presentar variaciones, que se relacionan principalmente con cambios endocrinos del ciclo estral, más que con fluctuaciones en el contenido lipídico de la leche.

Para la medición de progesterona en leche, se han descrito una serie de pruebas diagnósticas tipo EIA. Estas pruebas sólo son capaces de determinar concentraciones relativas, por lo cual los resultados son clasificados como alta o baja concentración. Los resultados, se fundamentan en la alta correlación ( $r=0,97$ ) existente entre la concentración de progesterona láctea y sanguínea. La medición de progesterona en leche, ha sido usada casi exclusivamente en bovinos de leche, en el diagnóstico primario de hembras no gestantes post-servicio, en la prevención de errores de inseminación y en la detección de hembras en anestro prolongado.

La difusión en la aplicación de esta prueba como herramienta diagnóstica, aún en bovinos de leche, ha sido menor a la esperada, debido principalmente al alto costo relativo de la prueba, lo cual se ve incrementado en casos de desórdenes reproductivos, por la necesidad de realizar pruebas seriadas y/o recurrir a muestras sanguíneas orientadas a establecer un diagnóstico más certero.

#### *Esteroides sexuales en saliva*

Otra vía en la cual es factible evaluar esteroides, es la saliva, siendo las principales hormonas medibles glucocorticoides y en menor medida testosterona. En el caso del estradiol en saliva sólo se detecta en concentraciones equivalentes al 1 a 2 % de las séricas, pero con una alta correlación ( $r=0,78$ ). En consecuencia, se han realizado estudios con el objeto de encontrar otro indicador del estado ciclo reproductivo. En mujeres, se han realizado evaluaciones del estriol salival, demostrando que las concentraciones en saliva, reflejan las fluctuaciones del estradiol sérico características del ciclo menstrual. Más aún las concentraciones del estriol salival, presentan una alta correlación ( $r=0,98$ ) con las concentraciones de estradiol libre sérico, postulándose de este modo al estriol salival como un potencial indicador de la funcionalidad de la unidad feto placentaria.

En el caso de la progesterona salival, presenta concentraciones similares a las descritas en estrógenos. Sin embargo presenta menor correlación ( $r=0,53$ ) con sus concentraciones séricas, reflejo de la progesterona libre en circulación existente durante el ciclo menstrual. Estudios recientes, plantean al uso diagnóstico de la concentración de progesterona en saliva, como un indicador de ovulación y en conjunto con mediciones de estradiol salivar, como potenciales herramientas de evaluación de la funcionalidad ovárica.

#### *Esteroides sexuales en pelo*

El pelo actúa como un reservorio biológico de distintas sustancias, que son sintetizadas por el organismo o incorporadas mediante la alimentación o vía administración parenteral. La característica propia de la matriz del pelo, de mantener diferentes sustancias durante largos periodos, ha sido utilizada por la medicina forense para la detección de narcóticos y anabólicos<sup>1</sup>.

En medicina veterinaria, se han desarrollado metodologías para el análisis y detección de esteroides en bóvidos domésticos, sometidos a tratamientos con anabólicos,

adecuándose posteriormente los protocolos para la determinación de estradiol, progesterona y testosterona en el pelo.

El desarrollo de protocolos de determinación de esteroides en pelo, constituye una alternativa como herramienta de estudio no invasiva en poblaciones de animales silvestres. Sin embargo, sus aplicaciones potenciales, para la evaluación de la endocrinología reproductiva, presenta limitaciones debido a la alta complejidad que presenta la extracción de hormonas desde la muestra, así como la generación de anticuerpos específicos. Adicionalmente, la permanencia de los esteroides sexuales en el pelo, durante largos periodos de meses y años, limitan aún más sus posibles aplicaciones. Esta permanencia, haría factible encontrar altas concentraciones de esteroides durante el anestro estacional, como consecuencia de la secreción durante el periodo estral, generando una potencial distorsión en los resultados y dificultad en la interpretación de los mismos.

## **CONCLUSIONES**

Como característica general, la estrategia reproductiva de animales silvestres en general se encuentra condicionada por la estación sexual y la variación del período gestacional, las cuales han propiciado en las distintas especies, la sincronización de la temporada de partos con las mejores condiciones ambientales. El conocimiento de la biología reproductiva de las especies silvestres, se ha visto limitada por las dificultades de manejo y obtención de muestras, generando el desarrollo de técnicas principalmente no invasivas. De esta manera, los estudios etológicos han hecho posible una primera aproximación a las especies en su medio natural, sin perturbar el comportamiento de la especie en estudio. Sin embargo, esta metodología presenta limitaciones para explicar fenómenos fisiológicos.

Con este objetivo, se implementaron técnicas de análisis hormonal en sangre. El análisis de hormonas glicoproteicas presenta dificultades en su evaluación, generadas por el patrón de liberación pulsátil, junto a la gran diversidad de su estructura entre las distintas especies. Los esteroides, presentan similitud estructural entre las especies, junto a un patrón de secreción más homogéneo, lo cual ha promovido el desarrollo y aplicación de sus técnicas. En ambos casos el carácter invasivo de la técnica relacionada con la obtención de la muestra, constituye la principal limitante en su uso.

El desarrollo de métodos no invasivos, permiten la interpretación de fenómenos reproductivos, sin requerir la inmovilización del animal. La medición de hormonas sexuales y sus metabolitos en orina, se centran en el análisis de estrógenos y progestágenos, con un grado de efectividad variable según especie. Su limitación radica en la baja replicabilidad de la toma de muestra. La determinación de hormonas y metabolitos esteroidales en heces, provee un mayor grado de certeza en la obtención de la muestra y mayor diversidad de metabolitos utilizables para el diagnóstico, en comparación con orina. Los métodos usados en heces, presentan gran diversidad en el proceso de extracción y en el grado de reactividad cruzada, generando que los resultados obtenidos entre estudios sean difíciles de comparar. En el caso de esteroides en saliva, las ventajas de la prueba están dadas por la facilidad de

obtención de la muestra y la alta correlación existente entre estrógenos salivares y sanguíneos. Sin embargo, la poca cantidad de estudios en especies silvestres, debido a la baja concentración hormonal presente en saliva, hace necesario el desarrollo de sistemas de extracción más eficaces y pruebas más sensibles.

#### REFERENCIA DE CONSULTA

- 1 Asa, C.S., Bauman, J.E., Houston, E.W., Fischer, M.T., Read, B., Brownfield, C.M., Roser, J.F. Patterns of excretion of fecal estradiol and progesterone and urinary chorionic gonadotropin in Grevy's zebra (*Equus grevyi*): Ovulatory cycles and pregnancy. *Zoo Biology*, 2001, vol. 20, p.185-195.
- 2 Lasley, B., Shideler, S.L. Methods for assessing reproduction in non-domestic species. En Fowler, M.E. (dir.), *Zoo and Wild Animal Medicine. Current Therapy* 3. 3ª ed. W.B. Saunders Co. USA, 1993, pp. 79-86. ISBN 0-72-163667-5.
- 3 Loskutoff, N.M., Ott, J.E., Lasley, B.L. Urinary steroid evaluations to monitor ovarian function in exotic ungulates. I. Pregnandiol-3-glucuronide immunoreactivity in the okapi. *Zoo Biology*, 1982, vol. 1, p. 45-53.
- 4 Loskutoff, N.M., Ott, J.E., Lasley, B.L. Strategies for assessing ovarian function in exotic species. *The Journal of Zoo Animal Medicine*, 1983, vol. 14, p. 3-10.
- 5 Monfort, S.L., Schwartz, C.C., Wasser, S.K. Monitoring reproduction in captive moose using urinary and fecal steroid metabolites. *Journal of Wildlife Management*, 1993, vol. 57, n° 2, p. 400-407.
- 6 Palme, R., Fischer, P., Schildorfer, H., Ismail, M.N. Excretion of infused <sup>14</sup>C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Animal Reproduction Science*, 1996, vol. 43, n° 1, p. 43-63.
- 7 Schwarzenberger, F., Möstl, E., Palme, R., Bamberg, E. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Animal Reproduction Science*, 1996, vol. 42, n° 1, p. 515-526. *British Veterinary Journal*, 1984, vol. 140, p. 287-291.
- 8 Schwarzenberger, F., Francke, R., Göltenboth, R. Concentrations of faecal immunoreactive progestagen metabolites during the oestrous cycle and pregnancy in the black rhinoceros (*Diceros bicornis michaeli*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 1993, vol. 98, p. 285-291.
- 9 Schwarzenberger, F., Speckbacher, G., Bamberg, E. Plasma and fecal progestagen evaluations during and after the breeding season of the female vicuna (*Vicugna vicugna*). *Theriogenology*, 1995, vol. 43, n° 3, p. 625-634.

# **Biobanking Exotic Species: ensuring genetic resources for tomorrow**

**Gabriela F. Mastro Monaco**

**Reproductive Physiology, Toronto Zoo, Toronto, Ontario, Canada**

Species are declining faster than biologists can identify and characterize them. On-going human-based impacts on habitats along with the introduction of invasive species and disease play major roles in the disappearance of entire populations. Recently, preservation of genetic material (i.e. genome resource banking or biobanking) in the form of gametes, embryos and specifically somatic cells has been identified as a priority endeavor by the International Union for the Conservation of Nature (IUCN). A significant effort is being made to capture the genetic material of species before they become extinct. In particular, amphibians and fishes have been declared key taxa in which intensive efforts are required to bank material before entire species are lost. Future access to living genetic material will become invaluable as it can be used directly for offspring production or, of equal importance, as biological specimens for the study of cellular function, phylogenetics, heritability, disease and numerous other topics in veterinary medicine. In particular, the effectiveness of reproductive technologies as tools for long-term genetic management of populations will be greatly enhanced with the availability of cryopreserved material.

Numerous protocols have been developed using traditional techniques, such as slow-cooling and vitrification, to properly preserve cells from diverse taxa<sup>1,2</sup>. Sperm, oocytes, testicular tissue, ovarian tissue, and embryos have been successfully or experimentally frozen for many years. Optimization of post-thaw viability has been focused on cooling/thawing rates, cryoprotective agents and other physical parameters, such as storage container and volume. Recently, novel approaches, such as lyophilization with room temperature storage, have been investigated to simplify and potentially improve long-term storage requirements<sup>1</sup>. Eliminating the dependence on liquid nitrogen is important for environmental and financial reasons. Difficulties in freezing gametes and embryos from exotic species have led to an increased interest in the cryopreservation of somatic cells. Simplified collection and cryopreservation protocols have enabled thousands of animals and hundreds of species to be represented in biobanks as frozen somatic cell cultures<sup>3</sup>.

Establishment and use of biobanks present various challenges. Cryopreservation of specialized cells, such as gametes and embryos, requires species-specific protocols that need to be evaluated for each species or genus. Accessibility to semen compared to oocytes or embryos has resulted in a high percentage of male genetic material being stored. The post-thaw quality of cryopreserved cells is variable, and therefore, its applicability for reproductive technologies is not known. Most importantly, there is a need for standardized protocols and cell banking guidelines along with world-wide distribution of the stored samples. Future progress requires global collaboration among biobanks to ensure the safe storage of material and prevent accidental loss.

Successful cryopreservation of biological material and implementation into ARTs can provide one of the most powerful tools for long-term species management and potentially change standard breeding strategies. Conservation programs should include biobanking as a priority action in the species management plans and native biodiversity should be preserved in national biobanks. Currently, several biobanks already contain samples from species that are extinct in the wild and captivity and exist only in frozen storage. Those cryopreserved cells are the final link remaining to those species.

## REFERENCES

- 1 Saragusty J. Genome banking for vertebrates wildlife conservation. In: Current Frontiers in Cryobiology, Katkov I (ed.). Intechopen 2012; pp. 293-368.
- 2 Leibo SP, Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology* 2002; 57:303-326.
- 3 Mastromonaco GF, Gonzalez L, Filice M, Comizzoli P. Somatic cells, stem cells, and induced pluripotent stem cells: How do they now contribute to conservation? In: *Reproductive Sciences in Animal Conservation – Progress and Prospects*, Holt WV, Brown JL, Comizzoli P (eds.). Springer 2014, in press.

# ***Efecto de la nutrición de la oveja gestante sobre la programación fetal en el cordero***

**Raquel Pérez-Clariget<sup>1</sup>, María José Abud<sup>1</sup>, Javier Ithurralde<sup>2</sup>, Patricia Genovese<sup>2</sup>, Andrea Álvarez<sup>1</sup>, Victoria Riaño<sup>2</sup>, Maximiliano Torres<sup>2</sup>, Sebastián Montaldo<sup>2</sup>, Sergio Ramírez<sup>3</sup>; Álvaro López<sup>1</sup>, Alejandro Bielli<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Facultad de Agronomía, UdelaR, Montevideo, Uruguay. <sup>2</sup> Facultad de Medicina Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay. <sup>3</sup> Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

## ***I. Introducción***

Estudios epidemiológicos en humanos han sugerido que las condiciones intrauterinas que experimenta el feto pueden afectar la salud y el bienestar del adulto y ser transmitidas a su descendencia (Barker, 2001). Interferencias en el óptimo desarrollo embrionario y fetal producen alteraciones permanentes en la estructura de órganos o alteran enzimas metabólicas claves y sus mecanismos de acción. Debido a que la diferenciación y maduración de los distintos órganos se produce en momentos diferentes de la vida embrionaria-fetal, el efecto de la interferencia depende del momento de la gestación en que suceda y de la naturaleza de la misma (Burton y Fowden 2012).

La nutrición es un factor clave en el normal desarrollo embrionario-fetal. La llamada “hipótesis de Barker” plantea que la subnutrición intrauterina produce cambios permanentes en la estructura, función y metabolismo de algunos órganos, que pueden conducir a una cardiopatía coronaria en el ser humano adulto (Barker, 2007). Si bien, el concepto de programación fetal fue desarrollado para explicar diferencias en la susceptibilidad de humanos a algunas patologías ha sido ampliado. En la actualidad, abarca el efecto de la subnutrición o malnutrición durante etapas tempranas de la vida (embrionaria-fetal, de lactante) sobre etapas posteriores de la ontogenia (etapa pre y posnatal), incluyendo los órganos reproductivos (Rhind et al., 2001).

La oveja ha sido frecuentemente utilizada como modelo para el estudio de los efectos de la nutrición sobre la programación fetal (Gunn et al., 1995; Deligeorgis et al., 1996; Abecia et al., 1997; Edwards y McMillen, 2001; Rae et al., 2002a; Erhard et al., 2004; Gopalakrishnan et al., 2004; Gadner et al., 2005; Ford et al., 2007; Torrens et al. 2009; Hernández et al., 2010). El conocimiento de la anatomía y fisiología que se tiene sobre esta especie, facilita los diseños experimentales y la interpretación de los resultados (Rhind et al., 2001).

La subnutrición de la oveja durante la gestación afecta el desarrollo del feto y puede tener consecuencias en los animales adultos limitando el potencial productivo y reproductivo de los mismos. Recientemente, Kenyon y Blair (2014), han revisado los efectos de la nutrición materna sobre aspectos productivos del cordero.

## ***II. Efecto sobre el peso al nacimiento y tamaño del cordero***

Desde hace tiempo se conoce que la nutrición de la oveja gestante influye el peso al nacimiento de sus crías y a través de ello la sobrevivencia de las mismas (Mellor, 1983). Sin embargo, el efecto de la nutrición sobre el peso al nacer de los corderos parece ser



menos severo si la subnutrición sucede durante etapas tempranas de la gestación que en etapas tardías. Aún más, restricciones nutricionales durante la gestación temprana o media pueden compensarse, si la restricción no es severa, con una adecuada alimentación durante el último tercio de la gestación (Kenyon y Blair, 2014). Nuestro equipo, trabajando en Australia con ovejas Merino Australiano estabuladas, observó que los corderos nacidos de madres alimentadas con 70% (Grupo 70%) de los requerimientos de energía metabolizable desde la 10ma semana de gestación hasta el parto, parieron crías 12% más livianas que las que fueron alimentadas con 110% (Grupo 110%) de los requerimientos, sin que el peso de la placenta o el número de cotiledones estuviera afectado (Bielli et al, 2002). Recientemente, utilizamos ovejas Corriedale en pastoreo de campo nativo sometidas a dos planos nutricionales contrastantes desde 23 días antes de los servicios hasta 23 días antes del parto. A partir de ese momento y hasta el parto ambos grupos pastorearon pasturas mejoradas *ad libitum* y fueron suplementadas con 200 g de afrechillo de arroz y 50 mL de glicerina cruda que indujo un aumento de peso (corregido por peso del feto y del vellón) de aproximadamente 12% su peso vivo. Los tratamientos se basaron en ofertas de forrajes diferenciales Grupo OF 5%: a este grupo se le ofertó 5 kg de materia seca por 100 kg de peso vivo (oferta a una oveja de 50 kg: 2,5 kg de materia seca por día) y Grupo OF: 10%: a este grupo se le ofertó 10 kg de materia seca por 100kg de peso vivo (oferta a una oveja de 50 kg: 5 kg de materia seca por día). Los tratamientos se reflejaron en diferencias de peso a lo largo de la gestación: 3% en los primeros 30 días, 10% entre los 31 y 100 días; 5% entre los 101 al parto. Ambos grupos tuvieron periodos de restricción: las ovejas del Grupo OF 10%: sufrieron una reducción de aproximadamente 10% de su peso entre los 70 y 100 días de gestación, mientras que las del Grupo OF 5% sufrieron una reducción del peso de alrededor del 16% entre los 30 y 100 días de gestación. En los hijos de las ovejas del Grupo OF 5% comparado con los del Grupo OF 10%, se observó una reducción del 5% del peso de los fetos de 70 días (Bielli et al., 2013) y del 11% ( $P<0,05$ ) del peso de los corderos al nacimiento (12 horas después del parto). Además, tuvieron piernas 7% más cortas ( $P<0,05$ ) y con perímetros 5% menor ( $P=0,06$ ), también presentaron una reducción del 5% de su diámetro torácico ( $P=0,1$ ), pero la longitud cráneo-caudal no fue afectada (datos no publicados aún). Estos resultados concuerdan parcialmente con los publicados por Blair y colaboradores (2011) quienes trabajaron con ovejas con gestación doble en condiciones pastoriles con dietas de mantenimiento y *ad libitum*. La principal discrepancia es que el equipo neozelandés no encontró efecto de la nutrición sobre los fetos a los 65 días.

La reducción del peso al nacimiento puede representar un aumento de las pérdidas perinatales. El peso al nacimiento es reconocido desde hace tiempo como la principal causa de mortalidad de corderos en las primeras 72 horas (Dwyer, 2008). Los corderos más livianos y menos vigorosos tienen más probabilidad de morir de inanición porque tienen dificultades para establecer el amamantamiento y más probabilidades de sufrir hipotermia porque están más expuestos a las condiciones climáticas (Dwyer, 2008). Datos de 10 años obtenidos en la sierra central del Perú con rebaños Junín por Enrique Ameghino y colaboradores (1984) reportan que el 85% de la mortalidad de corderos se registró dentro de las 72 horas de nacidos, siendo los factores nutricionales responsables de la tercera parte de esas muertes. En condiciones climáticas adversas

(280 mm de lluvia en tres días consecutivos asociado a bajas temperaturas) durante la parición, nuestro equipo registró una diferencia a favor del Grupo OF 10% del 14% en la sobrevivencia de corderos nacidos de parto simple y 26% de los nacidos de parto doble. La diferencia en el promedio de peso entre los corderos de parto simple y doble que sobrevivieron o no fue 9% y 12%, respectivamente.

También se debe tomar en cuenta que ovejas sub alimentadas durante la gestación producen menos calostro que las adecuadamente alimentadas (Banchero et al, 2006). Nuestro equipo observó una reducción del tamaño de la ubre en las ovejas del Grupo OF 5% comparado con el Grupo OF 10%.

### **III. Efecto sobre la carcasa**

La nutrición de la oveja durante la gestación tiene impacto sobre el peso y calidad de la carcasa. Sin embargo, a la fecha pocos estudios se han hecho en ovinos estudiando el efecto de la nutrición materna sobre la composición de los músculos de sus crías (Kenyon y Blair, 2014).

Nuestros resultados preliminares del trabajo en pastoreo, sugieren que el efecto de la nutrición de la madre sobre el peso de la carcasa de la cría dependería del momento de la gestación en que los tratamientos nutricionales se aplican. En efecto, hemos observado que en los fetos de 70 días el plano nutricional no tuvo efecto sobre el peso de la carcasa (Bielli et al, 2013). Sin embargo, se observó una reducción del 16% ( $P < 0,05$ ) en el peso promedio de las carcasas de los corderos sacrificados a las 12 horas de nacidos en el Grupo OF 5%, comparado con el Grupo OF 10%. Aún más, la relación peso carcasa: peso del cordero fue mayor ( $P < 0,05$ ) en los hijos de madres del grupo OF 10% que en los del Grupo OF 5% (datos no publicados aún). Cuando se incluye como covariable el peso del cordero en el modelo, las diferencias se mantienen, lo que sugeriría que la prioridad relativamente baja en el reparto de nutrientes escasos determinó que el desarrollo muscular y/o de los huesos que conforman la carcasa fueran afectada por el tratamiento. La estrategia de adaptación a la subnutrición intrauterina que provoca retardo en el crecimiento parece estar asociada a una redistribución del gasto cardíaco y la priorización de los órganos centrales en detrimentos de órganos periféricos (Godfrey y Robinson (1998). Por lo que, no solo el peso absoluto de la carcasa estaría afectado, sino que, también, el rendimiento podría verse afectado por la restricción nutricional de la madre.

Sin embargo, cuando estudiamos el efecto de los tratamiento nutricionales sobre el desarrollo muscular, los resultados preliminares del estudio en los fetos de 70 días (Ithurralde et al, 2013) indican que el área y el perímetro de los principales músculos que componen el bife (*Longissimusdorsi* y *Multifidusdorsi*) y el lomo (*Psoas major* y *Psoas minor*) no fueron afectados por el plano nutricional de sus madres. Tampoco se observó efecto sobre el área o perímetro del cuerpo vertebral correspondiente al corte. El plano nutricional de las madres tendió a influir en el espesor de la piel y los tejidos subcutáneos, con los hijos de las madres del Grupo OF 10% presentando los valores más altos. Es posible que el periodo estudiado o los tratamientos utilizados nos sean suficientes para provocar diferencias. Resta analizar los datos de las muestras de

músculo extraídos en los corderos para mejorar la interpretación de los resultados en el feto.

#### **IV. Efectos sobre los órganos metabólicos y del SNC**

Osgerby et al. (2002), observaron que fetos de 135 días de ovejas alimentadas con 70% de sus requerimientos energéticos desde el día 22 de la gestación, presentaron una disminución en el peso del corazón, páncreas y timo comparados con fetos de madres alimentadas con el 100% de los requerimientos, sin que ello fuera explicado por la diferencia en el peso fetal. El tamaño del húmero y la escápula, así como el peso del músculo semitendinoso también fue menor.

Considerando la importancia que tiene el hígado como órgano metabólico, recientemente Gao et al. (2014) estudiaron en fetos ovinos el efecto de la subnutrición materna desde 90 días a 140 días de gestación sobre el desarrollo y la actividad enzimática del hígado. Reportaron que la subnutrición de la madre indujo un retardo en el desarrollo hepático, fibrosis y disfunción hepática. El feto parece adaptarse a la subnutrición de su madre priorizando el desarrollo del sistema nervioso central a expensas de otros órganos como el hígado y los riñones (Godfrey y Robinson, 1998).

En el experimento realizado en estabulación, nuestro equipo reportó (Pérez-Clariget et al., 2003, Bello e Ibañez, 2003) que corderos hijos de las madres del Grupo 70% tuvieron hígados 27% y riñones 18% más livianos que los corderos nacidos de madres del Grupo 110%. Coincidiendo con estas observaciones, en el experimento realizado a pastoreo, observamos una reducción del hígado del 20% y de los riñones del 17% en los corderos nacidos de las madres del grupo OF 5% comparado con el grupo OF 10% ( $P=0,07$ ). En ninguno de los dos trabajos hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en el peso del corazón. Tampoco observamos diferencias, en el trabajo a pastoreo, ni del peso del encéfalo completo, ni del cerebro o del cerebelo (datos no publicados aún). Estos resultados no son significativos cuando en el modelo se incluye el peso del cordero, a diferencia de lo reportado por Blair et al. (2011) quienes encuentran mayores pesos del hígado y riñones de los fetos cuyas madres estaban sometidas a un plano nutricional de mantenimiento y fueron 18% más livianas que ovejas *ad libitum*. Sin embargo, hemos observado que la relación peso del cerebro/peso del hígado fue mayor ( $P<0,05$ ) en los corderos hijos de las madres OF 10% que en los de las ovejas del grupo OF 5%. También observamos en los corderos hijos de las madres del Grupo OF 5% una reducción del peso de las adrenales del 18% ( $P<0,05$ ) comparado con los corderos de las ovejas del Grupo 10%. Esta diferencia se mantuvo cuando se incluyó como covariable el peso del cordero en el modelo.

La adaptación del feto frente a situaciones intrauterinas adversas involucra una redistribución del flujo sanguíneo en el que las catecolaminas parecen estar involucradas. El objetivo de esta redistribución es priorizar el aporte de oxígeno y nutrientes a órganos vitales especiales como el cerebro, el corazón y las glándulas adrenales, siendo el cerebro el más priorizado. Este fenómeno conocido como "sparingbrain" o fenómeno de protección cerebral (Hernández Guillama et al., 2009), junto con la disminución del metabolismo cerebral permiten al cerebro estar más protegido que otros órganos como el hígado, el tracto gastrointestinal, el músculo

esquelético o los riñones, órganos que si bien son vitales, se perciben como menos vitales para la supervivencia inmediata (Nathanielsz y Hason, 2003). Los tratamientos nutricionales aplicados a las ovejas en pastoreo, posiblemente hayan afectado la distribución de nutrientes a los órganos priorizando fundamentalmente el cerebro frente al hígado y riñones y afectando más severamente a los componentes de la carcasa a partir de los 70 días (músculo esquelético) y las glándulas adrenales.

#### **V. Efecto sobre la concentración de metabolitos y hormonas**

Es aceptado que las hormonas cumplen un rol fundamental en el crecimiento y desarrollo del feto afectando tanto el crecimiento como la diferenciación celular. Esta acción estaría mediada por cambios en la expresión génica en el feto, como a través de modificaciones en la placenta (Fowden y Forhead, 2005). La subnutrición disminuye la concentración de hormonas anabólicas e incrementa las catabólicas en la sangre fetal, por lo que se ha planteado que serían claves en los procesos por los cuales la nutrición influye la programación fetal (Fowden y Forhead, 2005). Las concentraciones de las hormonas tiroideas, insulina, IGF-I y sus proteínas de unión (IGFBP's) y la leptina, además de ser afectadas por la nutrición, tienen efectos directos o indirectos sobre la fisiología de las gónadas, al menos en animales adultos (Rhind et al. 2001; Rhind, 2004).

En la etapa fetal de los ovinos, la nutrición también tiene efectos sobre la concentración de las hormonas metabólicas. Gallaher et al. (1998) observaron que la subnutrición alrededor de la concepción disminuye la concentración de IGF-I e IGFBP3 en la sangre de los fetos ovinos de 105-115 días de gestación. Osgerby et al. (2002) observaron modificaciones de las concentraciones de glucosa, insulina, IGF-I e IGFBP2 y 3 en fetos sometidos a diferentes periodos de subnutrición y sugirieron que los efectos de la subnutrición sobre el desarrollo fetal podrían actuar interfiriendo el eje glucosa-insulina-IGF-I.

La nutrición durante la gestación afecta la concentración de hormonas y metabolitos tanto en las madres como en los corderos recién nacidos. En el trabajo estabulado, la alimentación de las madres tuvo impacto sobre la glucemia y la concentración plasmática de IGF-I en sangre materna, con las ovejas del Grupo 110% presentando los mayores valores. Sin embargo, no se observó efecto de los tratamientos nutricionales sobre las concentraciones plasmáticas maternas de insulina y leptina. Ambas hormonas fueron afectadas por la semana de gestación pero no por el tratamiento nutricional (Pérez-Clariget et al., 2003).

Se ha planteado que la concentración de glucosa difícilmente sería la responsable directa de los cambios en el desarrollo fetal (Rhind, 2004). Sin embargo, es claro que la subnutrición materna afecta la glucemia fetal (Osgerby et al., 2002) o de corderos recién nacidos (Pérez-Clariget et al., 2003). En efecto, los corderos nacidos de las madres del Grupo 70% mostraron una reducción en la concentración de glucosa al nacer del orden del 37%. A las 48 h la glucemia había aumentado en ambos grupos como consecuencia del amamantamiento y no era diferente entre los tratamientos nutricionales. La diferencia en la glucemia al momento de nacer no fue explicada por el peso al nacimiento. A las 48 h de nacidos la diferencia en la concentración de insulina e

IGFI entre los corderos de ambos grupos fue del 62% y 42%, respectivamente, con los corderos del Grupo 110% presentando los mayores valores (Pérez-Clariget et al., 2003). Nuestros resultados apoyan la hipótesis que el eje glucosa – insulina - IGFI participa del mecanismo de acción por el cual la nutrición influye el desarrollo fetal.

## **VI. Efectos sobre los órganos reproductivos**

La variabilidad en fertilidad observada en los animales adultos puede, al menos en parte, ser originada en etapas tan tempranas de la vida del individuo como la pre-natal o intrauterina. En efecto, la nutrición de las ovejas durante la gestación también interfiere con la función reproductiva de sus crías (Rhind et al., 2001 y Rhind, 2004). La capacidad reproductiva de la oveja adulta es afectada por la restricción nutricional durante la etapa fetal tardía o primer mes de vida pos natal (Gunn et al., 1995). También, se ha observado que ovejas que sufrieron subnutrición en los primeros 95 días de su vida fetal presentaron menor tasa ovulatoria (Rae et al., 2002b). Sin embargo, la actividad hipotalámica-hipofisaria no parece modificarse con los tratamientos aplicados (Borwick et al., 2003), lo que sugiere que la acción primaria de la nutrición sobre la función reproductiva sería en el ovario. Aún más, la subnutrición intrauterina retardaría el desarrollo de las estructuras ováricas en el ovario fetal (Borwick et al., 1997), postergando el inicio de la foliculogénesis y la meiosis de las ovogonias (Rae et al., 2001) y alterando la expresión de genes reguladores de la apoptosis en el ovario fetal (Lea et al., 2006).

La subnutrición parece afectar en forma diferente a las hembras y a los machos ovinos. Se ha planteado que la subnutrición durante la gestación no afectaría el tamaño testicular o la producción de semen en la etapa adulta de carneros (Rae et al., 2002b). Sin embargo, dicha subnutrición modificaría la respuesta hipofisaria a la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH; Rae et al., 2002a) y el patrón de esteroidogénesis testicular (Rae et al., 2002c). Los efectos de la nutrición sobre el desarrollo reproductivo del macho durante la etapa fetal parecen depender del momento en que la subnutrición se produce (Rae et al., 2002c). Debe tenerse en cuenta que estos estudios se han basado en aspectos endocrinológicos y mediciones de la masa testicular fetal, sin profundizar en la histología testicular.

Nuestro grupo observó, en el trabajo con ovejas estabuladas, que los testículos de los corderos del Grupo 70% fueron 17% más liviano que los del Grupo 110%. En forma similar, el peso testicular presentó una reducción del 15% en el trabajo en pastoreo, con el Grupo OF 5% presentando los valores más bajos. La diferencia desapareció cuando se incluyeron en el modelo el peso del cordero al nacer, lo que sugiere que no hubo diferencia en la priorización del desarrollo testicular (datos no publicados aún). A los estudios histológicos, los testículos del Grupo 70% presentaron un menor volumen absoluto de cordones testiculares, pero no se observaron diferencias en el diámetro de los mismos (Bielli et al, 2002). Interesantemente, en el trabajo a campo, sí se observaron diferencias tanto en el volumen absoluto (diferencia: 17%) como en el diámetro (diferencia: 2,5%) de los cordones testiculares (datos no publicados aún).

Nuestro equipo ha postulado que las células de Sertoli son fuertes candidatas a expresar programación fetal porque el número de estas células en los testículos está

altamente correlacionado con el tamaño testicular en el adulto y con la producción espermática máxima. En efecto, las células de Sertoli juegan un rol fundamental en la regulación de la función testicular regulando la esteroidogénesis a través de su influencia sobre la células de Leydig y la espermatogénesis a través de su fuerte influencia sobre la proliferación y diferenciación de las células germinales (Petersen y Söder, 2006). Por otra parte, la proliferación y diferenciación de las células de Sertoli es uno de los primeros eventos de la formación testicular. En el carnero, la diferenciación gonadal comienza alrededor del día 34 de la vida fetal. La células de Sertoli comienzan, entonces, a dividirse y lo continúan haciendo en la vida posnatal alcanzando su máximo antes de la pubertad, alrededor del día 40-80, cuando la mitosis celular se detiene (Hochereau-de-Reviere et al., 1987). La población de células de Sertoli establecida define el número de estas células en el testículo adulto y por lo tanto su capacidad de producción de espermatozoides. Si bien el número final de células de Sertoli en el testículo estaría determinado genéticamente (Hochereau-de-Reviere et al., 1978), nuestro equipo, ha demostrado que la sub-nutrición intrauterina puede disminuir su número. En efecto, se observó una disminución del número de células de Sertoli por corte de sección de los cordones y por testículo en el Grupo 70% con respecto a los corderos del Grupo 110% (Bielli et al., 2002). En el reciente estudio a campo se confirmaron estas observaciones, hemos encontrado una reducción del 13,5% en el número de células de Sertoli/testículo, así como una reducción del 27% en el número de gonocitos/testículo, y del 17% en el número de células mioideas/testículo. Estos datos parecen indicar que la proliferación de células de Sertoli (que ocurre sólo antes del inicio de la pubertad) tiene cierta prioridad sobre la proliferación de células mioideas y sobre todo de gonocitos células de tipos que mantienen la capacidad proliferativa luego de alcanzada la pubertad (datos no publicados aún).

No solo el testículo fue afectado por la nutrición de las madres. En los fetos de 70 días la longitud del pene y del escroto así como el diámetro de la base de este último también fueron afectados por el plano nutricional de las madres (Bielli et al, 2013). En efecto, los corderos hijos de las madres OF5% presentaron una reducción en la longitud del pene del 17% y del 20% en la longitud próximo-distal del escroto y del 15% en el diámetro de la base del escroto con respecto a los hijos de las madres del Grupo OF 10%. Al nacimiento, la reducción del peso de la bolsa escrotal en los corderos del Grupo 5% fue 17% ( $P=0,07$ ) (datos no publicados aún). En ninguno de los dos experimentos, se observaron cambios en el peso de los epidídimos, sugiriendo que éste órgano es menos susceptible a la subnutrición durante la etapa fetal.

## **VII. Conclusiones**

En los últimos años se ha generado una interesante cantidad de información sobre la programación fetal por subnutrición en ovinos. No hay dudas hoy de que la subnutrición de la madre gestante produce una restricción en el crecimiento intrauterino del feto. El retardo en el desarrollo no es igual en todos los órganos dado que el mecanismo de adaptación a la injuria fetal es la redistribución del gasto cardíaco priorizando los órganos centrales, especialmente al cerebro. En la redistribución de oxígeno y nutrientes el músculo esquelético y los órganos reproductivos parecen tener poca prioridad. Nuestro equipo ha comprobado efectos de distintos niveles de subnutrición de ovejas gestantes en características vinculadas a

la carcasa y al aparato reproductor. De confirmarse dichos efectos en etapas posteriores (vida adulta), estos fenómenos parecen constituirse en factores relevantes para la cría ovina.

## REFERENCIAS

- 1 Abecia, J.A.; Lozano, J.M; Forcada, F.; Zaraga, L. Effect of level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eight of pregnancy in Rasa Aragonesa ewes. *Anim. Reprod. Sci.*, 48:209-218. 1997.
- 2 Ameghino, E.; Reif, J.S.; Inope, L.; Laos, A.; Gamarra, M. Perinatal lambmortality in the central sierra of Peru. *Preventive Veterinary Medicine*, 2: 833-843. 1984.
- 3 Banchemo, G.; Pérez-Clariget, R.; Bencini, R.; Linday, D.; Milton, J.B.T.; Martin, G.B. Endocrine and metabolic factors involved in the effect of nutrition on the production of colostrum in female sheep. *Reprod. Nutr. Dev.*, 46: 477-460. 2006.
- 4 Barker, D.K.P. The fetal origins of adult disease. *BMJ*;322doi: 10.1136/bmj.322.7283.375. 2001
- 5 Barker, D.K.P. The origin of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.*, 261:412-417. 2007
- 6 Bielli, A.; Pérez-Clariget, R.; Pedrana, G.; Milton, J.T.B.; López, A.; Blackberry, M.; Duncombe, G.; Rodríguez-Martínez, H.; Martin, G.B. Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reprod. Fertil. Dev.*, 14:333-337. 2002.
- 7 Bielli, A.; Genovese, P.; Riaño, V.; Abud, M.J.; Álvarez, A.; Ithurralde, J.; López-Pérez, A.; Pérez-Clariget, R. La oferta de forraje afecta la longitud del pene y el tamaño del escroto en fetos ovinos de 70 días de gestación. XXIII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal, La Habana, Cuba. 18-22 noviembre 2013.
- 8 Bello, J.; Ibáñez, X. Efecto de la subalimentación energética de madres gestantes sobre algunas variables metabólicas y fisiológicas de las crías. Tesis Facultad de Agronomía, UdelaR, Montevideo, Uruguay. pp. 50. 2003
- 9 Blair, H.T.; van der Linden, D.S.; Jenkinson, C.M.C.; Morris, S.T.; Mackenzie, D.D.S; Peterson, S.W.; Forth, E.C.; Kenyon, P.R. Do ewe size and nutrition during pregnancy affect foetus and foetal organ weight in twins? *Livestock Science*, 142:99-107. 2011.
- 10 Borwick, S.C. Effect of undernutrition of ewes from the time of mating on fetal ovarian development in mid gestation. *Reprod. Fer. Dev.*, 9(7):711-715. 1997.

- 11 Borwick, S.C.; Rae, M.T.; Brooks, J.; McNeilly, A.S.; Racey, P.A.; Rhind, S.M. Undernutrition of ewe lambs in utero and in early post-natal life does not affect hypothalamic-pituitary function in adulthood. *Anim. Reprod. Sci.*, 77:61-70. 2003.
- 12 Burton, G.J.;Fowden, A.L. Review: The placenta and developmental programming: Balancing fetal nutrient demands with maternal resource allocation. *Placenta* 33, Supplement A, *Trophoblast Research*, 26:S23eS27. 2012.
- 13 Deligeorgis; S.G., Chadio, S.; Menegatos, J. Pituitary responsiveness to GnRH in lambs undernourished during fetal life. *Anim. Reprod. Sci.*, 43:113-121. 1996.
- 14 Dwyer, C.M. The welfare of the neonatal lamb. *Small Ruminant Research*. 76: 31-41. 2008.
- 15 Edwards, L.J.; McMillen, I.C. Maternal undernutrition increases arterial blood pressure in the sheep fetus during late gestation. *J Physiol.*, 533(Pt 2): 561-570. 2001.
- 16 Erhard, H.W.; Boissy, A.; Rae, M.T.; Rhind, S.M. Effects of prenatal undernutrition on emotional reactivity and cognitive flexibility in adult sheep. *Behav, Brain. Res.*, 151:25-35. 2004.
- 17 Ford, S.P.; Hess, B.W.; Schwoppe, M.M.; Nijland, M.J.; Gilbert, J.S.; Vonnahme, K.A.; Means, W.J.; Han, H.; Nathanielsz, P.W.. Maternal undernutrition during early to mid-gestation in male offspring. *J. Anim. Sci.* 85:1285-1294. 2007.
- 18 Fowden, A.L.; Forhead, A. J. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Early Human Development* 81:723-734. 2005.
- 19 Gadner, D.S.; Tingey, K.; Van Bon, B.W.M.; Ozanne, S.E.; Wilson, V.; Dandrea, J.; Keisler, D.H.; Stephenson,T; Symonds, M.E. Programming of glucose-insulin metabolism in adult sheep after maternal undernutrition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 289:947-954. 2005.
- 20 Gallaher, B.W. Fetal programming of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3: evidence for an altered response to undernutrition in late gestation following exposure to periconceptual undernutrition in the sheep. *JEndocrinol.*, 159(3):501-8. 1998.
- 21 Gao, F.; Liu, Y.; Li, L.; Lo, M.; Zhang, Ch.; Ao, Ch.; Hou, X. Effect of maternal undernutrition during late pregnancy on the development and function on fetal liver. *Anim. Reprod. Sci.*, 147: 99=105. 2014.
- 22 Godfrey, K. and Robinson, S. Maternal nutrition, placenta growth and fetal programming. *Proceedings of the Nutrition Society*, 57: 105-111.1998



- 23 Gopalakrishnan, G.S.; Gadner, D.S.; Rhind, S.M.; Rae, J.T.; Kyle, C.E.; Brooks, A.N.; Walker, R.M.; Ramsay, M.M.; Keisler, D.H.; Stephenson, T.; Symonds, M.E., Programming of adult cardiovascular function after early maternal undernutrition in sheep. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 287:R12-R20. 2004.
- 24 Gunn, R.G.; Sim, D.A.; Hunter, E.A. Effects of nutrition *in utero* and in early life on the subsequent lifetime reproductive performance of Scottish Blackface ewes in two managements systems. *Animal Science*, 60:223-230. 1995.
- 25 Hernández, C.E; Mathews, L.R.; Oliver, M.H.; Bloomfield, F.H.; Harding, J.E. Effects of sex, litter size and periconceptual ewe nutrition on offspring behavioural and physiological response to isolation. *Physiol. Behav.*, 101:588-594. 2010.
- 26 Hernández Guillam, G.; González García, L.; García Guevara, C.; Romero Leal, N. Ecografía Doppler en las patologías obstructivas. *Revista Ciencias Médicas, La Habana*, 15, 2. 2009.
- 27 [http://www.cpicmha.sld.cu/hab/vol15\\_2\\_09/hab18209.html](http://www.cpicmha.sld.cu/hab/vol15_2_09/hab18209.html)
- 28 Hochereau-de-Reviere, M.T.; Courot, M.; Perrau, C.; Pisselet, C. Sertoli cells and development of seminiferous epithelium. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 18:573-583. 1978.
- 29 Hochereau-de-Reviere, M.T.; Monet-Kuntz, C.; Courot, M. Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 34:101-14. 1987.
- 30 Ithurralde, J.; Abud, M.J.; Figueroa, E.; Álvarez, A.; Genovese, P., Riaño, V.; López-Pérez, A.; Pérez-Clariget, R.; Bielli, A. Efecto de la oferta gestacional de forrajes sobre el área de los principales músculos del bife y el lomo en fetosovinos de 70 días. XXIII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal, La Habana, Cuba. 18-22 noviembre 2013.
- 31 Kenyon, P.R.; Blair, H.T. Foetal programming in sheep – Effects on production. *Small Ruminant Research*, 118: 16-30. 2014
- 32 Lea, R.G.; Andrade, L.P.; Rae, M.T.; Hannah, L.T.; Kyle, C.E.; Murray, J.F.; Rhind, S.M.; Miller, D.W. Effects of maternal undernutrition during early pregnancy on apoptosis regulators in the ovine fetal ovary. *Reproduction*, 131:113-124. 2006.
- 33 Mellor, D.J. Nutritional and placental determinantsof foetal growth rate in sheep and consequences for the newborn lamb. *Br. Vet. J.*, 139:307-324. 1983.
- 34 Nathanielsz, P.W.; Hanson, M.A. The fetal dilemma: Spare the brain and spoil the liver. *J. Physiol*, 584, 2:333.

- 35 Osgerby, J.C.; Wathes, D.C.; Howard, D.; Gadd, T.S. The effect of maternal undernutrition on ovine fetal growth. *J. of Endocr.*, 173:131-141. 2002.
- 36 Pérez-Clariget, R.; Banchero, G.; López, A.; Blackberry, M.A.; Blache, D.; Milton, J.T.B.; Martin, G.B. IX World Conference on Animal Production, October 26 - 31 2003. Porto Alegre - Rio Grande do Sul – Brasil. Versión electrónica. 2003.
- 37 Petersen, C.; Soder, O. The Sertoli cell—a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm. Res.*, 66(4):153-161. 2006.
- 38 Rae, M.T.; Palassio, S.; Kyle, C.E.; Brooks, A.N.; Lea, R.G.; Miller, D.W.; Rhind, S.M. Effect of undernutrition during pregnancy on early ovarian development and subsequent follicular development in sheep fetuses. *Reproduction*, 122: 915-922. 2001.
- 39 Rae, M.T.; Rhind, S.M.; Kyle, C.E.; Miller, D.W.; Brooks, A.N. Maternal undernutrition alters triiodothyronine concentrations and pituitary response to GnRH in fetal sheep. *J. of Endocr.*, 173:449-455. 2002a.
- 40 Rae, M.T.; Kyle, C.E.; Miller, D.W.; Hammond, A.J.; Brooks, A.; Rhind, S.M. The effects of undernutrition in utero on reproductive function in adult male and female sheep. *Anim. Reprod. Sci.*, 15: 63-71. 2002b
- 41 Rae, M.T.; Rhind, S.M.; Fowler, P.A.; Miller, D.W.; Kyle, C.E.; Hammond, A.J.; Brooks, A.N.; Effect of maternal undernutrition on fetal testicular steroidogenesis during the CNS androgen – responsive period in male sheep fetuses. *Reproduction*, 124, 33;-39. 2002c
- 42 Rhind, S.M. Effects of maternal nutrition on fetal and neonatal reproductive development and function. *Anim. Reprod. Sci.*, 82-83:169-181. 2004.
- 43 Torrens, C.; Snelling, T.H.; Chau, R.; Shanmuganathan, M.; Cleal, J.K.; Poore, K.R.; Noakes, D.R.; Poston, L.; Hanson, M.A.; Grenn, L.R. Effects of pre and periconceptual undernutrition on arterial function in adult female sheep are vascular bed dependent. *Exp. Physiol.*, 94:1024-1033. 2009

## **APLICACIÓN DE LAS TECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS EN VACAS INFÉRTILES.**

**M.V. Claudio Centeno Gabancho**  
Email: [claudiocentenogab@yahoo.es](mailto:claudiocentenogab@yahoo.es)

La causa de descarte o eliminación de vacas en el rebaño por causas de infertilidad se está incrementando año a año debido a que la alta producción de leche se está también incrementando por las mejoras en la genética y en la tecnología de la nutrición y alimentación para la alta producción lechera en detrimento de la fertilidad de las vacas y que el mercado de lácteos presiona hacia una alta producción para sobrellevar los costos de producción, sin considerar los riesgos que ello conlleva en el organismo de los semovientes como los trastornos de la reproducción que van en aumento a diferencia de otros trastornos de eliminación que van descendiendo por mejores tratamientos de prevención y protocolos eficaces como en problemas de la ubre, problemas de locomoción, problemas metabólicos peripartales, causas de emergencias y otras causas.

La reproducción tiene un bajo índice de heredabilidad lo cual no permite realizar una adecuada selección en esta característica, siendo el factor ambiental el más importante a desarrollar para lograr una adecuada eficiencia en la reproducción; el manejo reproductivo se relaciona directamente antes y después del parto, para lograr una eficiente salud reproductiva así como su reactivación hacia el final de la espera voluntaria, donde la involución uterina y la reactivación ovárica es esencial para la siguiente reproducción, la adecuada alimentación y nutrición es el factor más importante seguido del manejo y la salud reproductiva.

Pero aun así quedan vacas infértiles, debido que aún no está en estrecha coordinación la formulación de raciones para la alta producción la reproducción y la inmunidad están desfasados en su conocimiento.

Las alternativas que los productores y profesionales en el campo realizan como tecnologías aplicadas para recuperar vacas infértiles son variadas, las más sobresalientes en nuestro medio siguen siendo las siguientes:

- Inducción Láctea vía hormonal que cae por estar en contra de la inocuidad de los alimentos que por ética no se debe realizar, y porque no soluciona eficientemente la infertilidad solo la prolonga.
- La utilización de semen sexado como alternativa de seguir creciendo frente a la saca forzada por infertilidad parece ser una tecnología más eficiente pues logra los reemplazos necesarios para el establo y un superávit de semoviente disponible a la venta, no mejora la infertilidad de las vacas y requiere una inversión adicional.

- La transferencia de Embriones es una tecnología que se está ya implementando para resolver preñez en vacas infértiles de alta calidad genética con embriones del mismo rebaño o de otra procedencia logra permanecer mucho más tiempo esos semovientes que ahora son infértiles esperando que a futuro vuelvan a gestar, también es una inversión más costosa.
- Los programas de sincronizaciones es una tecnología con un uso adecuado de hormonas, muy eficiente en la medida que cosecha un número mayor de vacas preñadas en un rebaño por un periodo de tiempo, donde el manejo en la detección de celos no es eficiente y/o la existencia de muchas vacas repetidoras, existen innumerable protocolos de sincronización, unos más eficiente que otros pero requiere que el programa de sincronización sea disciplinado, con alto uso de la mano de obra y una inversión adicional que eleva los costos por reproducción, estos programas de sincronización busca como objetivo preñar las vacas antes que acabe su campaña de producción lechera, por tanto no eleva la fertilidad de un rebaño.

Las verdaderas causas de estas vacas infértiles pueden estar en un porcentaje bajo por problemas patológicos, infecciosos y anomalías anatómicas; pero la gran mayoría de las vacas infértiles repetidoras todo es normal sus ciclos reproductivos normales muchas de ellas no tienen problemas de mastitis crónicas se inseminan pero no preñan, esta parte de la incomprensión del problema a llevado al extremo de la veterinarias de los productores, los técnicos y aun a profesionales a determinar a la endometritis como causa principal de la infertilidad.

El nuevo concepto que en la prevención está el verdadero manejo para una siguiente eficiencia reproductiva de la vaca ha llevado a realizar nuevas investigaciones, las enfermedades metabólicas que relacionan alta producción con eficiencia reproductiva e inmunidad está en el manejo de la alimentación y nutrición no solo para la producción, reproducción e inmunidad.

La Cetosis es el problema número uno para la reproducción que comienza antes y después del parto incide primaria o secundariamente sobre la Producción lechera de la vaca, pero su real importancia está que incide en la Reactivación ovárica y la Inmunidad de la vaca alta productora y determina el número creciente de vacas repetidoras o infértiles, una adecuada estrategia del manejo de la alimentación nos permitirá tener mayor porcentaje de vacas preñadas a los 120 días de DEL, por una adecuada producción de Insulina y factores de crecimiento que permitirá la reactivación del ovario en su fase de foliculogénesis (gonadotropina independiente). Y a pesar de ello también se siguen produciendo vacas infértiles o repetidoras. Se ha investigado que las sustancias reactivas de oxígeno ROS impiden que el ARN mensajero transforme en factores de crecimiento como FCE a nivel de mitocondrias para obtener un nivel alto al tercer y catorceavo día del ciclo estrual impidiendo el desarrollo del oocito a su maduración.

Por estos motivos se han ensayado protocolos de corrección:

- Aplicación de Plasma Rico en Plaquetas a las 48 horas después de la inseminación, aplicación intrauterina.
- Aplicación de una dosis elevada de 5 mg de Benzoato de estradiol en un protocolo de dispositivo intravaginal progestágeno (DIV Ovsynch).

Probablemente para prevenir se utilicen nuevos y mayores antioxidantes en la dieta para mejorar la fertilidad.

### Referencias bibliográficas

- 1 ADASHI, E. Y.; RENSNICK, C. E.; D'ERCOLE, A. J.; SVOBODA, M. E.; VAN WYK, J. J. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. (Endocr. Rev. 6: 400-420. 1985).
- 2 Cremonesi F, A Bignotti, A Polloni, R Garlappi, A Meucci, AL Consiglio. Treatment of repeat breeder cows with intrauterine infusion of platelet rich plasma (PRP). ICAR 2012.
- 3 Freitas B.G., Sales J.N.S., Teixeira A.A., Ferreira R.M., Ayres H., Ranieri A.L., Rodrigues C.A. & Baruselli P.S. 2010. Pregnancy loss (between 30 and 60 days) following artificial insemination or embryo transfer in high production Holstein cows. 24th Brazilian Embryo Technology Society (SBTE) Annual Meeting.
- 4 Garnsworthy P C, A Fouladi-Nashta, G E Mann, K D Sinclair, and R Webb Effect of dietary-induced changes in plasma insulina concentrations during the early post-partum period on pregnancy rate in dairy cows. *Reproduction* 2009 137: 759-768.
- 5 Gong ,J.G., W. J. Lee, P. C. Garnsworthy and R. Webb Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows *Reproduction* (2002) 123, 419–427.
- 6 GREEWALD, G. S.; ROY, S. K. Follicular development and its control. In: *The Physiology of Reproduction*.
- 7 Hernández CJ, Morales RJS. 2001. Falla en la concepción en el ganado lechero: Evaluación de terapias hormonales. *Vet Méx* 2001;32:279-287.
- 8 MONGET, P.; MONNIAUX, D. Growth factors and the control of folliculogenesis. *Reprod Fertil. suppl* 49:321- 333. 1995.
- 9 Orrego A, Jorge, Delgado C, Alfredo and Echevarría C, Luisa Vida productiva y principales causas de descarte de Vacas Holstein en la Cuenca de Lima. *Rev. investig. vet. Perú*, Ene 2003, vol.14, no.1, p.68-73. ISSN 1609-9117.
- 10 Seiji Katagiri, 2011. A New Approach to Repeat Breeding in Cows: Treatments Targeting the Endometrial Growth Factor-cytokine Network. *Thai J Vet Med Suppl*. 2011. 41: 51-53.

# EXPERIENCIAS SOBRE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN OVINOS

Dr. Eduardo G. Aisen

*Laboratorio de Teriogenología "Dr. Héctor H. Morello" Facultad de Ciencias Agrarias.  
Universidad Nacional del Comahue. Cinco Saltos, Río Negro. ARGENTINA.  
teriogenologia@hotmail.com*

**Palabras clave:** inseminación artificial ovina; factores del macho; factores de la hembra; técnicas de inseminación

## INTRODUCCION

La Inseminación artificial (IA) en ovinos es una técnica reproductiva de gran impacto en los programas de mejoramiento genético. Su aplicación correcta, en función de claros objetivos productivos, redundará en beneficios económicos para el productor. La técnica de siembra deberá ser elegida de acuerdo al sistema de producción, recordando que la fertilidad resultante también será función de las condiciones nutricionales y reproductivas de las hembras, del material seminal y del operador. Existen nuevos desarrollos tecnológicos tendientes a mejorar los resultados de fertilidad con métodos de inseminación cervical, por su mayor simplicidad y menor costo.

Existe un gran número de factores que intervienen en la fertilidad hasta la consecución de los partos, y al mismo tiempo las interrelaciones que se establecen entre ellos afectan a la misma.

A continuación se realiza una revisión de los factores de variación más importantes que influyen en los resultados de las campañas de IA ovina tras la aplicación cervical del semen, previa sincronización hormonal de la ovulación, encuadradas en los programas de selección.

## FACTORES DEPENDIENTES DEL MACHO

El **estado general** del animal, y en especial la condición corporal y la influencia de posibles afecciones patológicas, son de importancia definitiva en ciertos momentos de la vida del semental. No obstante, hay que tener en cuenta que las condiciones controladas en los centros de IA evitan gran parte de las variaciones que pueden alterar el estado de los machos, permitiendo el máximo rendimiento de los mismos.

La **raza**, si bien no presenta importantes diferencias, podría relacionarse con la libido al momento de la extracción de semen. La obtención de un eyaculado de calidad es el factor más importante, tanto para la evaluación reproductiva del macho, como para su uso en IA. Dentro de los métodos de recolección de semen, el uso de vagina artificial presenta ventajas respecto a otros como la electroeyaculación, en cuanto a concentración seminal y bienestar animal. Sin embargo, requiere de un entrenamiento previo que incluye acostumbramiento a la presencia de operadores y a la técnica. El

macho manifiesta rasgos comportamentales de apareamiento con los que aumenta su grado de excitación y corrobora la receptividad de la hembra. En estudios recientes con carneros de la raza Merino, se distinguieron dos grupos de machos de acuerdo a los rasgos registrados durante el entrenamiento: uno constituido por aquellos que realizaron montas con eyaculación y otro por los que no eyacularon, lo que coincidió con carneros con fuerte reflejo de búsqueda frente a la hembra y sin éste, respectivamente.

El **factor individual** presenta una variabilidad muy acusada sobre los índices de fertilidad, variando entre el 30% y el 80% (usando semen refrigerado). La calidad inicial de los eyaculados puede verse afectada por aumento de formas anormales y porcentaje de espermatozoides muertos, entre otros factores. Para carneros Merino Australiano, se observó una frecuencia homogénea de eyaculados de buena calidad. El descarte promedio fue del 28%, valor semejante al observado en otras razas. Dentro de los factores de descarte, el volumen del eyaculado y la motilidad masal fueron los más frecuentes, sumando entre ambos un 90%. Cuando estos parámetros fueron aceptables, la motilidad individual fue la causa particular de rechazo. Estos hechos llevan a concluir que, en la práctica, la evaluación de volumen y motilidad masal sería suficiente para considerar la aceptación inicial de eyaculados. La evaluación de semen congelado-descongelado proveniente de eyaculados de buena calidad indica que en algunos carneros la capacidad de criopreservación está disminuida. Varios trabajos han reportado la variación entre individuos del daño producido por el proceso de congelación-descongelación en los espermatozoides, denominado "criosusceptibilidad". Una alternativa para incrementar la eficiencia de la IA cervical con semen congelado podría ser explorar las diferencias en fertilidad del semen congelado que existen dentro de una población de carneros. Algunos estudios demuestran, a través de pruebas de fertilidad a campo, que los cambios en los parámetros de calidad seminal que se obtuvieron entre carneros de alta y baja congelabilidad, se vieron reflejados en los índices de preñez (usando semen congelado), los que variaron entre 6 y 40%.

La **edad** del macho es un factor importante en los resultados reproductivos. Por debajo de los 7 meses de vida, el semental no resulta recomendable para su utilización en IA, ya que la espermatogénesis no está aún plenamente desarrollada. Los machos con más de 4 años de edad comienzan a disminuir la producción seminal y también la calidad del eyaculado, lo que se puede traducir en la consecución de menor porcentaje de fertilidad. Este hecho supone un problema en los programas de selección puesto que es a esa edad, precisamente, cuando se puede llegar a conocer la valoración genética de un macho a través de su descendencia, con lo que se verá limitado su uso en la difusión de la mejora obtenida, a no ser que se disponga de dosis congeladas.

El **fotoperiodo** es uno de los factores ambientales que, de forma importante, influye en los resultados reproductivos, incluso por delante de otros, como la temperatura o la alimentación, siendo su efecto objeto de numerosos estudios en relación con la producción y la calidad seminal. En este sentido, diversos trabajos evidencian la influencia del fotoperiodo sobre los parámetros reproductivos de la IA debidos al macho, encontrándose diferencias en la fertilidad y prolificidad, según el

periodo del año, con peores resultados, siempre, en los de fotoperiodo creciente, bien sea en condiciones de iluminación natural o controladas. Este hecho está muy relacionado con la mayor presencia de formas anormales en los eyaculados obtenidos durante dicha época del año frente a los procedentes de época de fotoperiodo decreciente (22% vs 10%). Esta influencia del fotoperiodo sobre las características seminales de los carneros no parece afectar por igual a los individuos de todas las razas.

La **temperatura** ambiental por encima de 41°C produce en los machos, de manera casi inmediata, inhibición de la libido, y en periodos más prolongados, la degeneración celular en el ciclo espermatogénico, que necesita, al menos, 60 días para restablecerse. Recientemente se determinó que el estrés térmico actuando sobre carneros esquilados se acompaña con la aparición de espermatozoides con cabezas más elípticas en los eyaculados. Estos cambios están asociados a la generación de anomalías primarias a nivel de los túbulos seminíferos.

### **FACTORES PENDIENTES DE LAS HEMBRAS A INSEMINAR**

Al igual que en los machos, la importancia que el **fotoperiodo** presenta en la reproducción de la oveja se evidencia en los resultados de la IA, con diferencias de fertilidad de hasta un 10%.

La **temperatura** influye en la duración de la estación sexual; de esta forma, el aumento de la temperatura provocaría retraso en la aparición de la actividad ovárica tras el anestro, mientras que los días más frescos en época calurosa adelantarían el inicio de la época reproductiva favorable. Frente a esta circunstancia, las razas tropicales son menos sensibles al estrés térmico que las de clima templado.

No se han encontrado referencias expresas a la influencia de la **raza** en los resultados de la inseminación. Se ha demostrado que el momento de ovulación varía de unas razas a otras, por lo que este factor deberá ponerse en estudio en cada caso para fijar el momento en el que se realiza la IA con mayor probabilidad de éxito. Por otro lado, parece lógico considerar que, en aquellas razas que llevan muchos años utilizando la IA en un colectivo importante de su población, haya una selección indirecta de los animales que mejor responden a la técnica.

Desde el punto de vista del **individuo**, existen hembras con celos cortos que presentan resultados de fertilidad más bajos tras la IA, ya que se reducen las posibilidades de coincidencia entre ovulación y presencia de espermatozoides en oviducto. Por el contrario, la existencia de celos que tienen una duración de más de 24 h está asociada a la obtención de mejor fertilidad tras la IA. Existe una distribución particular del tipo de presentación del orificio externo del **cuello uterino** de la oveja, verificándose un predominio del tipo tapa y roseta, siendo el tipo hendidura el menos frecuente. Esta distribución se ve influenciada, además, por la edad de las hembras y su historia reproductiva previa (partos).



El **estado reproductivo** de las hembras es un factor relevante. Entre ellos, es el periodo post-parto quien determina la aparición de la actividad ovárica siguiente. La longitud del período a respetar entre el parto y tratamiento de sincronización para realizar la IA tiene especial importancia ya que, de no ser suficiente, se traduce en una menor precisión de la respuesta ovulatoria y en una peor predisposición a la concepción por la inadecuación del ambiente uterino. El mantenimiento de la lactación hasta 40 días aumenta el intervalo para el reinicio de las ovulaciones, aunque lleva asociado un aumento de la fertilidad en primavera, posiblemente debido a la mejor disposición del útero.

Las situaciones de **estrés** pueden provocar el retraso, de hasta 24 horas, en la ovulación, con la consiguiente disminución en la fertilidad por asincronía al inseminar a tiempo fijo. La sujeción de las hembras mediante amarres especiales o inmovilizados en la sala de ordeño en los momentos de la IA, mejora los resultados de fertilidad hasta un 10%, frente a la sujeción manual, que facilita mayor grado de movimientos incontrolados de los animales y, consecuentemente, mayor estrés. Luego de la inseminación, todo tipo de alteraciones que supongan estrés puede reducir los resultados reproductivos por aumentar las pérdidas embrionarias. Acciones como la esquila en condiciones de monta natural han supuesto disminuciones de hasta un 15% respecto a los resultados de los lotes control. En este mismo sentido, se ha recomendado evitar la concurrencia de tratamientos generalizados, manejo brusco o con perros en los momentos cercanos a la IA. Factores como la trashumancia son causa muy importante para explicar los bajos resultados de fertilidad en ovejas inseminadas que se trasladan a las zonas de prados de montaña.

La **edad** de las ovejas es un factor de gran influencia. Los rangos en los que se consiguen los mejores resultados de fertilidad se encuentran delimitados entre los 2 y 5 años, disminuyendo considerablemente cuando se sobrepasa ese nivel. La razón de esta variación pasa por la propia fisiología de la hembra, que acusa este mismo efecto con los sistemas de reproducción convencional. La IA en corderas está siendo muy utilizada, especialmente por la ventaja que supone reducir el intervalo generacional en los programas de selección, siempre y cuando se respete en las hembras a inseminar un grado de desarrollo de, al menos, dos tercios del peso adulto.

## **TECNOLOGÍA DE LA INSEMINACIÓN**

Los factores principales relacionados con la tecnología de la inseminación incluyen los tratamientos de sincronización e inducción de la ovulación, el momento y lugar de la aplicación seminal, el número y concentración de espermatozoides administrados, el volumen de la dosis, el técnico inseminador, entre otros. Seguidamente se desarrollarán algunos de estos factores.

La siembra del material seminal en pequeños rumiantes puede realizarse por medio de diferentes técnicas. Las mismas difieren en su complejidad, costo y expectativas de éxito. El objetivo de éstas es depositar los espermatozoides en el tracto genital de la hembra, en el sitio y momento más convenientes para que éstos alcancen el oviducto y fecunden a los óvulos presentes. La (IA) de la oveja puede ser:

- Vaginal
- Exocervical
- Intracervical
- Intrauterina:
  - Transcervical
  - Translaparoscópica

De las siembras indicadas anteriormente, las más utilizadas son la exocervical por vía vaginoscópica y la intrauterina por vía laparoscópica.

La fertilidad obtenida en la IA ovina con semen congelado por vía vaginoscópica (deposición cervical) se ve condicionada, en parte, por la anatomía particular de cuello uterino en esta especie. El mismo resulta un obstáculo al momento de identificar la apertura hacia la luz del órgano, y sus anillos impiden la penetración del instrumental de IA. Se observan diferencias estadísticamente significativas cuando se compara el tipo de cuello con la penetración y con el reflujo. Los cuellos tipo hendidura muestran menor posibilidad de penetración (no más de 0,3 cm) y mayor reflujo de la dosis hacia el fondo de vagina. Cuando se alcanza una profundidad de 0,5 cm en los tipos pico de pato, tapa y roseta (que suman el 83% de los tipos observados), al menos un 65% de una dosis de 0,1 ml queda retenido en el cuello uterino, y si la penetración es de 1 cm, se retendrá el 77%. La **reducción del volumen** de la dosis introduce mejoras en la siembra seminal, al disminuir, por una reducción considerable del reflujo de la dosis, la pérdida de espermatozoides en el fondo de vagina, cuyo ambiente es poco favorable para la viabilidad del semen congelado-descongelado.

El **número de espermatozoides** por dosis y su relación con los resultados reproductivos tras la IA no suele ser un factor limitante en la fertilidad, ya que las dosis contienen normalmente 300-400 millones de espermatozoides, cantidad sobrada con respecto a la requerida para la fertilización. Únicamente se señalan mermas importantes en la fertilidad cuando se insemina con menos de 100 millones de espermatozoides en ciclos sincronizados. En el caso del uso de semen refrigerado, la reducción del volumen de la dosis posibilita disminuir el número total de espermatozoides, manteniendo la fertilidad e introduciendo mejoras sustantivas en la práctica de la IA, al aumentar del número de dosis por eyaculado.

En la deposición cervical, la dinámica del material seminal depositado condiciona los resultados de la IA. El reconocimiento de los pliegues que proyecta el extremo posterior del cuello uterino ha sido estudiado con diferentes objetivos, y resulta uno de los obstáculos al momento de identificar la apertura hacia la luz del órgano. Durante el estro, el cuello uterino se muestra enrojecido, observándose frecuentemente recubierto por un flujo claro y copioso. La pared interna del **cervix** del ovino presenta una serie de crestas y huecos que, cuando están fijadas entre sí, lo hacen prácticamente impenetrable con el instrumental de inseminación. Por lo expuesto, en algunas razas ovinas (como el merino) resulta difícil establecer depósitos de semen en proximidades de la luz uterina, con miras a lograr una fertilidad aceptable luego de la IA. Se ha intentado penetrar con distintos tipos de pipetas y/o jeringas,

variadas maniobras con instrumental, se utilizaron fármacos para relajar el órgano, se seleccionaron ovejas por su facilidad de pasaje, etc.

El **personal inseminador** es una fuente de variación importante, que en muchos casos supone la explicación del 15-20% de la preñez obtenida. El grado de formación y destreza del personal que realiza esta función es determinante en los resultados. No obstante, hay que tener en cuenta la existencia de factores como la ganadería que pueden enmascarar la influencia de la persona que realiza la IA ya que, de forma habitual, suelen coincidir ganadería e inseminador. Cuando se usa la IA por vía vaginoscópica con deposición del material seminal en el canal cervical, la habilidad del inseminador es uno de los factores relevantes. Los resultados sugieren que el menor tiempo requerido para la IA y la mayor destreza del operador para sembrar los espermatozoides lo más profundamente posible en la luz del cuello uterino serían factores cruciales en el éxito de la preñez, ya que ocasionarían, un menor estrés en el animal y menor reducción del poder fecundante del semen.

## **FACTORES DEL ESTABLECIMIENTO GANADERO**

El conjunto de actividades que constituyen el manejo de cada una de los establecimientos ganaderos (situación sanitaria, alimentación y condición corporal de los animales, personal técnico y laboral y ritmo reproductivo), tiene efectos directos en los resultados reproductivos tras la IA. Dentro de la explotación, los efectos de la alimentación son determinantes en la reproducción. Tanto un déficit de reservas corporales como un estado de excesivo de engrasamiento, pueden tener efectos perjudiciales en la fertilidad. Para el caso de las borregas, la condición corporal y el peso en las corderas son más importantes, incluso, que la edad.

Otro aspecto interesante en los resultados de fertilidad en las distintas explotaciones ganaderas se asocia con el grado de **conocimiento** y de habituación del productor a las actividades que conlleva la IA.

Para un correcto manejo de los trabajos de IA, deberá contarse con planillas de **registro de datos** para el semen y la práctica de la IA propiamente dicha. De esta manera se dispondrá de la información necesaria para la evaluación del proceso y de los resultados obtenidos (medidos estos en número de animales sincronizados, detectados en celo, inseminados, preñados, paridos, señalados, destetados, etc.).

## **REFERENCIAS**

- 1 Aisen, E., García-Cervigón, M., Álvarez, H., Morello, H., Montoro-Angulo, V. Cervical artificial insemination with cooled ram semen: modification of dose volume. 15° International Congress on Animal Reproduction. Belo Horizonte (Brasil). 2004.
- 2 Aisen, E.; Álvarez, H., Medina, V., Hick, M., Frank, E. Modificación del volumen de la dosis de semen congelado y su efecto en la inseminación artificial ovina. 3° Congreso de la Asociación Latinoamericana d Especialistas

- en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Viña del Mar (Chile). 2003.
- 3 Aisen, E.G. "Reproducción ovina y caprina". Ed. Intermédica, Bs. As. 250 p. 2004.
  - 4 Ambrosi, C.P., López Armengol, M.F., Venturino, A., Aisen, E.G. Variaciones del comportamiento sexual en el entrenamiento de carneros Merino Australiano para recolección de semen con vagina artificial. 37º Congreso Argentino de Producción Animal 2nd Joint Meeting ASAS – AAPA. Buenos Aires. 2014.
  - 5 Chemineau, P. Medio ambiente y reproducción animal. 6 Jorn. AERA. Libro de ponencias 292-306. Salamanca, España. 1992.
  - 6 Evans, G., Maxwell, W.M.C. "Inseminación Artificial de ovejas y cabras". Editorial Acribia S.A., Zaragoza. 1990.
  - 7 Martí JI, Aparicio IM, Leal CLV, García-Herreros M. Seasonal dynamics of sperm morphometric subpopulations and its association with sperm quality parameters in ram ejaculates. *Theriogenology* 2012; 78:528–541.
  - 8 Medina, V., Aisen, E., Venturino, A., de la Sota, L. Inseminación artificial con semen congelado en ovinos merino: efecto de los crioprotectores y la variación individual. 34º Congreso Argentino de Producción Animal. Mar del Plata. 2011.
  - 9 Medina, V., Bogado, D., Venturino, A., Morello, H., Aisen, E. Efecto del factor inseminador en el éxito de la inseminación artificial ovina a campo. 43º Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Jao Pessoa, PB (Brasil). 2006.
  - 10 Medina, V.H., Venturino, A., Morello, H., Vera B., D.V., Aisen, E.G. Comparación de la calidad de eyaculados individuales de carneros merino australiano para su criopreservación. II Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. XI Congreso Nacional de Producción Ovina. Mérida, México. 2001.
  - 11 Watson, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen - *Animal Reproduction Science* 60–61, 481–492; 2000.

# **Efecto de la adición de progesterona inyectable en base oleosa a un protocolo de sincronización de celos en vacas de carne sometidas a destete precoz**

Effect of the addition of oil-based injectable progesterone to an estrus synchronization protocol in early weaned beef cows

Irazábal A.<sup>1</sup>, PérezClariget R.<sup>2\*</sup>, Cavestany D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>: DCV, Estudiante de Maestría, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay.

<sup>2</sup>DV, PhD, Facultad de Agronomía, Garzón 780 y <sup>3</sup>DV, PhD, Facultad de Veterinaria, Lasplaces 1620, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

[\\*raquelpc@fagro.edu.uy](mailto:*raquelpc@fagro.edu.uy) (Autor para correspondencia)

## **Resumen**

Con el objetivo de comparar el efecto de la adición de progesterona (P4) inyectable en base oleosa (MAD-4) a un protocolo Select Synch (SS) + eCG se utilizaron 120 vacas de carne pastoreando campo natural (22 primíparas y 98 multíparas) con  $3,4 \pm 0,03$  de condición corporal, 64 – 79 días de paridas y destetadas diez días antes. Los tratamientos fueron: Grupo SS+eCG (n=59, 11 primíparas y 48 multíparas: Día 0: GnRH y Día 7: Prostaglandina (PG) más 400 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG); Grupo SS+eCG+P4 (n=61, 11 primíparas y 50 multíparas): similar tratamiento excepto que el Día 0, junto con la GnRH, recibieron una dosis subcutánea de 200 mg de MAD-4. Se detectó celos desde el Día 4 al 13 y la inseminación se realizó 12 horas después de detectado el celo. La preñez fue diagnosticada el Día 43. Los Días -10, 0 y 7 se extrajeron muestras de sangre a todas las vacas y se determinó la concentración de P4. El destete indujo la ciclicidad en el 91% de las vacas. El MAD-4 no impidió la presentación de celos prematuros entre la aplicación de GnRH y la de PG (SS+eCG: 15%, SS+eCG+P4: 10%;  $P = 0,42$ ), no aumentó el porcentaje de vacas en celo (SS+eCG: 60,0% vs. SS+eCG+P4: 65,5%;  $P = 0,40$ ), tampoco el porcentaje de concepción (SS+eCG: 70% vs. SS+eCG+P4: 80,6%;  $P = 0,48$ ), ni el de preñez (SS+eCG: 46% vs. SS+eCG+P4: 54%,  $P = 0,36$ ). En las condiciones del presente trabajo, agregar MAD-4 al protocolo SS+eCG no mejoró el porcentaje de celos ni el de preñez.

Palabras claves: Select Synch, celo prematuro

## **Summary**

In order to compare the effect of the addition of oil-based injectable progesterone (P4) (MAD-4) to a Select Synch (SS) protocol + eCG, 120 grazing beef cows (22 primiparous and 98 multiparous) with body condition score of  $3.4 \pm 0.03$ , 64 - 79 days postpartum and weaned ten days earlier, were used. The treatments were: Group SS+eCG (n=59; 11 primiparous and 48 multiparous): Day 0: GnRH and Day 7: Prostaglandin (PG) plus 400 IU equine chorionic gonadotropin (eCG); group SS+eCG+P4 (n=61; 11 primiparous and 50 multiparous): similar treatment except that on Day 0 together with GnRH cows received 200 mg of MAD-4 subcutaneously. Estrus was detected from Day 4 to 13 and cows in heat were inseminated 12 hours later. Pregnancy was diagnosed on Day 43. On Days -10, 0, and 7 blood samples were collected from all the cows to determine P4 concentrations. Weaning induced cyclicity in 91% of the cows. The addition of MAD-4 did not prevent the occurrence of premature heats (SS+eCG: 15%, SS+eCG+P4: 10%, P

=0.42), did not increase the percentage of cows detected in heat (SS+eCG: 60% vs. SS+eCG+P4: 65.5%,  $P = 0.40$ ), or the conception rate (SS+eCG: 70% vs. SS+eCG+P4: 80.6%,  $P = 0.48$ ), nor the pregnancy rate (SS+eCG: 46% vs. SS+eCG+P4: 54%,  $P = 0.36$ ). In the conditions of the present study, addition of MAD-4 to the SS+eCG Protocol, did not improve the percentage of heats or pregnancy.

Keywords: anestrus, Select Synch, premature estrus

## Introducción

La sincronización de celos es una herramienta fundamental cuando se usa inseminación artificial (IA) en rodeos de carne porque minimiza o elimina el tiempo dedicado a la detección de celos, disminuye la duración de los servicios, agrupa las pariciones logrando terneros más homogéneos y acorta el anestro posparto (Lucy y col., 2001). En la actualidad hay varios protocolos disponibles de sincronización de celos que permiten realizar la IA con detección de celo o la inseminación a tiempo fijo (IATF) (Pursley y col., 1995; Geary y Whittier, 1998; Patterson y col., 2003; Larson y col., 2006; Meneghetti y col., 2009; Wilson y col., 2010). Sin embargo, uno de los problemas de los protocolos basados en la aplicación de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y prostaglandinas (PG) es la presencia de celos prematuros que se detectan después de la aplicación de GnRH y antes de la PG disminuyendo el grado de sincronización y la tasas de preñez (Twagiramungu y col., 1995). En efecto, entre 5% y 15% de los animales ciclando se encuentran en la fase final del diestro el Día 0 cuando se aplica la GnRH, en consecuencia no se produce el recambio de onda folicular y por ello presentan celo antes de la inyección de PG (Twagiramungu y col., 1995; Mapletoft y col., 2009; Lamb y col., 2010).

La incorporación de progesterona (P4) a estos protocolos mejora el grado de sincronización de celos, la tasa de preñez (Dejarnette y col., 2001; Larson y col., 2006; Schafer y col., 2007) y permite su utilización en vacas en anestro tanto pre-puberal (Lamb y col., 2010) como pos parto (Mapletoft y col., 2009; Lamb y col., 2010). Las presentaciones de P4 o progestágenos disponibles en el mercado internacional permiten su uso por vía oral (acetato de melengestrol: MGA; Kojima y col., 2000), implante auricular (Norgestomet; Thompson y col., 1999) o intravaginal (CIDR; Larson y col., 2006; Schafer y col., 2007; esponjas de poliuretano impregnadas con Acetato de Medroxiprogesterona (MAP; Viñoles y col., 2004; De Nava y col., 2009). La vía oral no asegura que todas las vacas consuman la misma dosis y plantea dificultades de implementación en sistemas pastoriles extensivos. Los dispositivos auriculares presentan dificultades para su colocación y retiro. Los dispositivos intravaginales son los más usados en la región pero plantean dificultades en la gestión de sus residuos lo que a la larga podría representar un posible riesgo de contaminación ambiental (Kolak y col., 2007). La P4 inyectable en base oleosa ofrece la ventaja de ser más fácil, rápida y segura de aplicar, garantiza la dosis que cada vaca recibe y disminuye el problema de la eliminación de los desechos, debido a que toda la P4 suministrada es metabolizada por el animal y los frascos e implementos utilizados para su inoculación son de más fácil gestión que los dispositivos intravaginales o auriculares. Con la hipótesis que el agregado de P4 oleosa inyectable al protocolo SS+eCG mejora los porcentajes de celo y preñez cuando se incluye en protocolos de inducción de ciclicidad, se planteó el objetivo de comparar la adición de ésta a un protocolo Select Synch más eCG en vacas

de carne en anestro sometidas a destete precoz e inseminadas artificialmente y se evaluó su efecto en los porcentajes de celos, concepción y preñez obtenidos.

### **Materiales y Métodos**

Los procedimientos con animales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay.

#### ***Localización, animales, diseño experimental y tratamientos***

El trabajo se llevó a cabo en un establecimiento comercial localizado en el Departamento de Flores, Uruguay, durante el periodo de entore (diciembre 2007 a febrero 2008). Se utilizaron 120 vacas Hereford primíparas (22) y multíparas (98), amamantando, que habían parido entre el 15 al 30 de setiembre del 2007. Cuando las vacas tenían entre 64 y 79 días posparto (DPP), todos los terneros fueron destetados de sus madres (Día -10: destete precoz). En ese momento las vacas tenían una condición corporal (CC) de  $3,4 \pm 0,03$  unidades (promedio  $\pm$  e.e.m; escala: 1-8; Vizcarra y col., 1986). Diez días después (Día 0: inicio de los tratamientos) las vacas fueron estratificadas por CC y categoría (primíparas y multíparas) formando dos grupos homogéneos de animales; los animales de cada grupo se asignaron al azar a los siguientes tratamientos: i) Grupo Select Synch + eCG (SS+eCG; n=59, 11 primíparas y 48 multíparas): estos animales recibieron el Día 0, 12  $\mu$ g de un análogo sintético de GnRH (Buserelina, Gestar, Laboratorio Over, Santa Fe, Argentina) intramuscular y el Día 7, 0,15 mg de un análogo sintético de PG(D-cloprostenol, Veteglan, Laboratorio Calier, Barcelona, España) y 400 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG; Biogón Plus, Laboratorio Biogénesis Bagó, Montevideo, Uruguay), intramuscular; ii) Grupo Select Synch + eCG + P4 (SS+eCG+P4; n=61, 11 primíparas y 50 multíparas): estos animales recibieron similar tratamiento que el grupo anterior excepto que el Día 0, junto con la GnRH, recibieron también una dosis de 8 cc subcutánea de 200 mg de P4 inyectable (MAD-4, Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina).

Todas las vacas pastoreaban en un mismo potrero de campo natural y fueron manejadas en forma similar.

#### ***Detección de celos, IA y diagnóstico de gestación***

Desde el Día 4 al 13 se detectó celo dos veces por día y se consideró que la vaca estaba en celo cuando se dejaba montar. Esas vacas fueron inseminadas 12 horas post detección, por el mismo técnico y utilizando semen de seis toros de calidad y fertilidad conocida. Los toros fueron distribuidos en forma similar entre los tratamientos. La preñez fue diagnosticada el Día 43 por medio de ultrasonografía (Agroscan ALR 575, Angoulême, Francia) con sonda lineal de uso transrectal de 5 MHz.

#### ***Muestras y determinaciones***

Los Días -10, 0 y 7 se extrajeron muestras de sangre a todas las vacas por venipunción yugular, utilizando tubos con vacío. Las muestras fueron centrifugadas y el suero almacenado a -20°C hasta su procesamiento. La concentración de P4 fue determinada por radioinmunoanálisis de fase sólida (Coat-a-Count, Medlab SA, Montevideo, Uruguay) en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria. Todas

las muestras fueron analizadas en un solo ensayo, con una sensibilidad de 0,01ng/mL. El coeficiente de variación intraensayo para los controles bajo (0,7 ng/mL), medio (2,1 ng/mL) y alto (7,7 ng/mL), fue 9,6%, 6,9% y 10,3%, respectivamente. Se consideró que una vaca había reiniciado la actividad ovárica cuando presentaba por lo menos una muestra con  $P4 \geq 1$  ng/mL (Meikle y col, 2004).

### **Análisis Estadístico**

Los datos de celo y preñez fueron analizados utilizando modelos generalizados (procedimiento GENMOD del paquete estadístico SAS, SAS Institute, Inc., Cary, NC, EEUU) especificando la distribución binomial y la transformación logit de los datos. El modelo incluyó los efectos del tratamiento, la CC y el número de partos como efectos fijos y la vaca como efecto aleatorio. Para analizar el efecto de la CC las vacas fueron categorizadas en  $CC \geq 3,5$  y  $CC < 3,5$ . También se estudió el efecto de la concentración de P4 los Días 0 y 7 sobre los porcentajes de celo y preñez. Para ello, las vacas fueron categorizadas de acuerdo a los niveles de P4 en: Alta-Alta (AA): progesterona  $\geq 1$  ng/mL los Días 0 y 7; Alta-Baja (AB): progesterona  $\geq 1$  ng/mL el Día 0, progesterona  $< 1$  ng/mL el Día 7; Baja-Alta (BA): progesterona  $< 1$  ng/mL el Día 0, progesterona  $\geq 1$  ng/ml el Día 7, y Baja-Baja (BB): progesterona  $< 1$  ng/mL ambos días. La separación de medias se realizó por el test de Tukey-Kramer cuando el efecto principal fue significativo. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $P \leq 0,05$  y se consideró que existía una tendencia cuando  $0,05 < P \leq 0,10$ . Los resultados se expresan como media  $\pm$  es cuando corresponde.

### **Resultados**

Antes de realizar el destete solo dos vacas (2%) presentaban niveles de P4 compatibles con un CL funcional. Diez días después del destete al iniciar los tratamientos, 93% presentaban valores de P4 por encima de 1 ng/mL por lo que se definió que las vacas ya habían reiniciado su ciclicidad ovárica cuando se aplicaron los tratamientos.

La aplicación de la progesterona inyectable no afectó el intervalo tratamiento-celo detectado (SS+eCG:  $6 \pm 0,13$  vs SS+eCG+P4:  $7 \pm 0,13$  días;  $P = 0,42$ ). En el grupo SS+eCG+P4, las seis vacas que manifestaron celo habían tenido niveles de progesterona compatibles con un CL funcional el Día 0. En el Grupo SS+eCG de las nueve vacas seis presentaron progesterona  $\geq 1$  ng/mL el Día 0 y tres por debajo de esa concentración. De las primeras, 5 quedaron gestantes y de las segundas solo una quedó gestante (P Alta: 83% vs. P Baja: 33%;  $P = 0,135$ ). Los resultados se presentan en los cuadros 1 y 2.



**Cuadro 1: Tasas de celos, concepción y preñez en los periodos de detección de celos en vacas sometidas a un protocolo SelectSynch + gonadotropina coriónica equina que recibieron (SS + eCG + P4) o no (SS + eCG progesterona oleosa)**

	Tratamiento <sup>1</sup>	
	SS+eCG n (%)	SS+eCG+P4 n (%)
<b>Período 0-7 días</b>		
n	59	61
Celo	9 (15)	6 (10)
Concepción	6 (67)	4 (67)
<b>Período 7-13 días</b>		
n	50	55
Celo	30 (60)	36 (65)
Concepción	21 (70)	29 (81)
<b>Periodo 0-13 días</b>		
n	59	61
Celo	39 (66)	42 (69)
Preñez	27 (46)	33 (54)

<sup>1</sup>SS+eCG= los animales recibieron el Día 0, 12 µg de un análogo sintético de GnRH intramuscular y el Día 7, 0,15 mg de un análogo sintético de PG+ 400 UI de eCG; SS+eCG+P4= los animales recibieron similar tratamiento que el grupo anterior excepto que el Día 0 junto con la GnRH recibieron también una dosis subcutánea de 200 mg de P4 inyectable.

**Cuadro 2: Tasas de celos y preñez según el periodo de detección de celos y nivel sérico de P4 en vacas sometidas a un protocolo SelectSynch + gonadotropina coriónica equina que recibieron (SS + eCG + P4) o no (SS + eCG progesterona oleosa)**

	Tratamiento <sup>1</sup>					
	SS+eCG			SS+eCG+P4		
	n	Celo n (%)	Preñez n (%)	n	Celo n (%)	Preñez n (%)
<b>Período 0-7 días</b>						
Nivel de P4 Día 0						
Alto	6	6 (100)	5 (83)	6	6 (100)	4 (67)
Bajo	3	3 (100)	1 (33)	0		
<b>Período 7-13 días</b>						
Nivel de P4 Día 0 y 7						
Alto - Alto	25	19 (76) <sup>a</sup>	12 (48)	40	30 (75) <sup>a</sup>	23 (58)
Alto – Bajo	20	9 (45) <sup>b</sup>	7 (35)	14	6 (43) <sup>b</sup>	6 (43)
Bajo – Alto	3	2 (67) <sup>ab</sup>	2 (67)	0	0	0
Bajo - Bajo	2	0	0	1	0	0

<sup>1</sup>SS+eCG= los animales recibieron el Día 0, 12 µg de un análogo sintético de GnRH intramuscular, y el Día 7 0,15 mg de un análogo sintético de PG+ 400 UI de eCG; SS+eCG+P4= los animales recibieron similar tratamiento que el grupo anterior excepto

que el Día 0 junto con la GnRH recibieron también una dosis subcutánea de 200 mg de P4 inyectable.

Literales diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ).

La PG fue, entonces, aplicada a 50 y 55 animales del grupo SS+eCG y SS+eCG+P4, respectivamente. El agregar la P4 inyectable al tratamiento SS no aumentó el número de vacas detectadas en celo ( $P = 0,40$ ), ni el porcentaje de concepción ( $P = 0,48$ ), ni la de celos totales ( $P = 0,74$ ), ni la tasa de preñez ( $P = 0,36$ ). Los resultados se presentan en el Cuadro 1. La aplicación de la progesterona inyectable tampoco afectó el intervalo fin del tratamiento-celo (SS+eCG:  $3 \pm 0,26$  vs SS+eCG+P4:  $3 \pm 0,26$  días;  $P = 0,38$ ).

No se contaba con la información de la concentración de progesterona al momento de asignar los tratamientos. El azar determinó que 86% y 98% ( $P = 0,009$ ) de las vacas que presentaron valores  $\geq 1$  ng/mL de progesterona fueran asignadas a los grupos SS+eCG y SS+eCG+P4, respectivamente. El Día 7, previo a la aplicación de la PG, una mayor ( $P = 0,005$ ) proporción de vacas del grupo SS + eCG + P4 presentaron valores de P4  $\geq 1$  ng/mL los Días 0 y 7 (72%) que las vacas del grupo SS + eCG (72%). No se observó diferencia ( $P = 0,36$ ) entre grupos en la proporción de vacas que mostraron valores de P4  $\geq 1$  ng/mL el Día 0 y P4  $< 1$  ng/mL el Día 7 (SS + eCG: 40% vs. SS + eCG + P4: 25%).

Independientemente de los tratamientos, la ocurrencia de celos fue afectada ( $P = 0,001$ ) por los niveles de P4 los Días 0 y 7, sin embargo, ello no afectó la tasa de concepción ( $P = 0,33$ ). Los resultados se presentan en el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Tasas de celo y preñez de acuerdo a los niveles séricos de progesterona el día de inicio de los tratamientos hormonales (Día 0) y el día de la aplicación de la prostaglandina (Día 7)**

Niveles de P4 <sup>1</sup>	n	Celo		Preñez	
		n	%	n	%
AA	65	49	75 <sup>a</sup>	35	54
AB	34	15	44 <sup>b</sup>	13	38
BA	3	2	67 <sup>ab</sup>	2	67
BB	3	0	0 <sup>c</sup>	0	

<sup>1</sup>AA= P4alta el Día 0 y alta el Día 7; AB= P4alta el Día 0 y baja el Día 7; BA= P4baja el Día 0 y alta el Día 7; BB= P4baja el Día 0 y baja el Día 7.

Literales diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ).

Independientemente de los tratamientos, la categoría afectó la presentación de celos luego de la aplicación de PG ( $P = 0,0097$ ) y durante el total del periodo ( $P = 0,0042$ ) pero no la presencia de celos prematuros ( $P = 0,16$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias ( $P = 0,66$ ) entre categorías en el porcentaje de vacas que presentaron niveles de P4  $\geq 1$  ng/mL los Días 0 y 7. A pesar que 15% más de vacas primíparas presentaron niveles de P4  $< 1$  ng/mL el Día 7 esta diferencia no fue estadísticamente

significativa. El porcentaje de concepción no fue afectado por la categoría ( $P=0,36$ ), pero la tasa de preñez fue mayor ( $P=0,05$ ) en las multíparas que en las primíparas. Los resultados se presentan en el Cuadro 4.

**Cuadro 4. Porcentajes de celos, concepción y preñez de acuerdo a la categoría y periodo de detección**

Categoría	Período de detección de Celos <sup>1</sup>			Concepción		Preñez n (%)	
	Post GnRH n (%)	Post PG n (%)	Total n (%)	Post GnRH n (%)	Post PG n (%)		
Multíparas	9 8	14 (14)	58/84 (69) <sup>a</sup> (73) <sup>a</sup>	72/98	9/14 (64)	44/58 (76)	53/98 (54) <sup>a</sup>
Primíparas	2 2	1 (5)	8/21 (38) <sup>b</sup>	9/22 (41) <sup>b</sup>	1/1 (100)	6/8 (75)	7/22 (32) <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Período de detección de celo post GnRH = Período 0-7 días; Período de detección de celo post PG = Período 7-13 días.

Literales diferentes (a, b) en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

La CC fue similar entre las vacas multíparas y las vacas primíparas ( $P=0,85$ ) y entre tratamientos ( $P=0,70$ ). Independientemente de los tratamientos y la categoría, la CC afectó el porcentaje de celos ( $p=0,009$ ) y de preñez ( $P=0,04$ ) pero no el de concepción ( $CC \geq 3,5$ : 76% vs  $CC < 3,5$ : 72%;  $P=0,80$ ). El porcentaje de vacas en celo y preñadas fue mayor en las vacas con  $CC \geq 3,5$  que en vacas con  $CC < 3,5$  ( $CC \geq 3,5$ : 76% y 58% vs  $CC < 3,5$ : 54% y 39%, porcentaje de celos y preñez; respectivamente).

### Discusión

Agregar subcutáneamente 200 mg de P4 en base oleosa al protocolo SS +eCG el mismo día de la aplicación de la GnRH a vacas de carne destetadas 10 días antes y que habían re-iniciado su ciclicidad ovárica, no resultó en una mayor tasa de celo o preñez, ni disminuyó la presentación de celos prematuros, por lo que no mejoró el grado de sincronización. Independientemente de los tratamientos, la presencia de un CL, indicado por niveles de P4  $\geq 1$  ng/mL, el día de la aplicación de la PG resultó en una mayor proporción de vacas manifestando celos, sin lograr influir la tasa de preñez. Por otra parte, las vacas multíparas y las que presentaban una  $CC \geq 3,5$ , al comienzo de los tratamientos, independientemente de la categoría, tuvieron un mejor desempeño tanto en la presentación de celos como en el porcentaje de preñez, sin que la tasa de concepción fueran diferente.

Los porcentajes de celo y preñez observados en ambos tratamientos, independientemente de la categoría de las vacas, son similares a los reportados por otros autores que utilizaron protocolos a base a GnRH – PG (Stevenson y col., 2000; Dejarnette y col., 2001; Richardson y col., 2002; Larson y col., 2006).

Una de las ventajas que tiene asociar una fuente de P4a protocolos de sincronización de celos a base a GnRH – PG, es prevenir la incidencia de celos prematuros que se presentan luego del GnRH y antes de la PG (Lamb y col., 2010). En efecto, agregar MGA (Dejarnette y col., 2001) o CIDR (Larson y col., 2006) disminuye o inhibe la

presentación de celos luego de la aplicación de GnRH. En el presente trabajo, contrariamente a lo reportado por estos autores, la aplicación de MAD-4 no impidió o disminuyó la incidencia de celos prematuros. Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por autores que utilizaron el protocolo SS sin P4 asociada (Geary y col., 2000). Estos celos anticipados disminuyen el grado de sincronización y por lo tanto de vacas inseminadas pos aplicación de la PG y afectan los resultados. Los celos prematuros obligan a detectar celos durante los 7 días que transcurren entre la aplicación de la GnRH y la PG con los perjuicios que ello implica en tiempo y personal y movimiento de animales.

La aplicación de GnRH induce la liberación de LH que es responsable de la ovulación de folículos dominantes (Twagiramungu y col., 1995). Altas concentraciones plasmáticas de P4 interfieren con la pulsatilidad de LH (Bergfeld y col, 1996), por lo que una alta concentración de P4 al momento de aplicar la GnRH interfiere con la respuesta ovulatoria inducida por la gonadotropina (Colazo y col., 2008; Perry y Perry, 2009). Es posible que la fuente de P4 utilizada en el presente trabajo no fuera capaz de mantener concentraciones altas del esteroide durante el tiempo suficiente para inhibir la ovulación y los celos prematuros. Existe evidencia que los niveles de P4 circulantes disminuyen a las 52 h (Cavestany y col., 2008) o 96 h (Corrêa Rocha y col., 2011) post-inyección de dosis entre 250 a 400 mg de la misma P4 utilizada en este trabajo.

Si bien este trabajo no fue diseñado para evaluar el impacto del destete precoz sobre el re-inicio de la ciclicidad ovárica, los resultados sugieren que el destete 10 días antes del inicio de los tratamientos indujo el re-inicio de la ciclicidad ovárica en la mayoría de las vacas. Es frecuente que vacas de carne con CC similar a la del presente trabajo, se encuentren en anestro a los 70 DPP, tal como lo estaban previo al destete (Quintans y col, 2009; Astessiano y col, 2011, 2013; Mechaca y col, 2013). Por otra parte, los resultados obtenidos son similares a los reportados por Mechaca y col. (2013) cuando asocian un tratamiento de IATF utilizando sales de estradiol, P4, PG y eCG al destete precoz (56,5%), pero fueron superiores a cuando el mismo tratamiento fue aplicado a las vacas con ternero al pie (34,8%).

Hay que tener en cuenta que, independientemente del tratamiento hormonal, la aplicación de la PG indujo el celo solo en 63% de las vacas. La mayoría de ellas (77%) presentaban niveles altos de progesterona el día de la aplicación. Es posible que las vacas que se identificaron en celo y presentaron valores de P4 < 1 ng/mL se encontraran al final de la fase luteal. Independientemente de los niveles de P4 presentados por las vacas, los resultados de presentación de celos pos aplicación de PG coinciden con los que se reportan cuando se aplica una sola dosis de PG en animales ciclando (Odde, 1990). Se podría asumir, entonces, que la GnRH aplicada el día de inicio de los tratamientos, no logró inducir la ovulación y la subsiguiente formación de un CL en la tercera parte de las vacas tratadas. Es posible que, los niveles elevados de progesterona el día de la aplicación de la GnRH, como consecuencia de la inducción de la ovulación por el destete realizado 10 días antes, interfirieran con la liberación de LH y disminuyeran la respuesta ovulatoria en las vacas (Colazo y col., 2008). Quizás, protocolos que comienzan con la aplicación de la GnRH el Día 0, no serían los más adecuados para asociar a la técnica de destete.

La falla en la sincronización de celo se hizo más evidente en las vacas primíparas que en las múltiparas lo que determinó que el resultado de preñez final fuera menor en esta categoría. Se suele tener mejores resultados de preñez cuando los tratamientos hormonales son aplicados a vacas múltiparas que a primíparas (Stevenson y col., 2000).

Como era esperable, la CC afectó la tasa de preñez; las vacas con  $CC \geq 3,5$  tuvieron 19% más de preñez que las vacas con CC inferior. La probabilidad de preñez está condicionada por la CC al parto y comienzo del entore (Orcasberro y col, 1992). En el presente trabajo todas las vacas, tanto múltiparas como primíparas estaban en CC subóptima (Orcasberro y col, 1992), sin embargo, la asociación de destete precoz con los protocolos estudiados permitió preñar al 50% de las hembras al primer servicio.

### **Conclusión**

En el presente trabajo el agregar P4 inyectable oleosa al protocolo SS+eCG, no mejoró el porcentaje de animales que presentaron celo, ni el porcentaje de preñez. Independientemente del tratamiento, se obtuvieron mejores resultados de preñez en las vacas múltiparas y en vacas con  $CC > 3,5$ .

### **Bibliografía**

- 1 Astessiano AL, Pérez-Clariget R, Espasandín A, López-Mazz C, Soca P, Carriquiry M. (2013). Metabolic, productive and reproductive responses to postpartum short-term supplementation in primiparous beef cows. *R Bras Zootec* 42:246-253.
- 2 Astessiano AL, Pérez-Clariget R, Quintans G, Soca P, Carriquiry M. (2011). Effects of a short-term increase in the nutritional plane before the mating period on metabolic and endocrine parameters, hepatic gene expression and reproduction in primiparous beef cows on grazing conditions. *J AnimPhysiolAnimNutr* 96:535-544.
- 3 Bergfeld EGM, Kojima FN, Cupp AS, Wehrman ME, Peters KE, Mariscal V, Sanchez T, and Kinder JE. (1996). Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of  $17\beta$  estradiol in bovine females. *BiolReprod* 54:546-553.
- 4 Bó GA, Baruselli PS, Martinez MF(2003). Pattern and manipulation of follicular development in *Bosindicus* cattle. *AnimReprodSci* 78:307-326.
- 5 Cavestany D, Fernández D, Salazar E, Sánchez A, Leyton L, Crespi D. (2008). Determinación de niveles de progesterona en sangre luego de la administración parenteral de progesterona en vacas Holando ovariectomizadas o ciclando. XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, pp. 218-219.
- 6 Colazo MG, Kastelic JP, Davis H, Rutledge MD, Martínez MF, Small JA, Mapletoft RJ. (2008). Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. *DomestAnimEndocrinol* 34:109-117.
- 7 Corrêa Rocha D, Beskow A, Mc Manus Pimentel CM, Costa Mattos R, Macedo GR. (2011). Níveis séricos de progesterona em vacas ovariectomizadas tratadas com MAD4 com diferentes concentrações e vias de administração. *Acta ScientiaeVeterinariae* 39: 974.
- 8 Dejarnette JM, Wallace RW, House RB, Salverson RR, Marshall CE. (2001). Attenuation of premature estrous behaviour in postpartum beef cows synchronized to estrus using GnRH and  $PGF_{2\alpha}$ . *Theriogenology* 56:493-501.

- 9 De Nava GT, Rodríguez Sabarrós M, Corti M, Tutt D, Martínez MF. (2009). Efecto de diferentes fuentes de progesterona y análogos de GnRH sobre la fertilidad de vaquillonas en un programa de inseminación a tiempo fijo. VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal (IRAC), Córdoba, Argentina, Disponible en CD.
- 10 De Nava GT(2011). Reproducción en los rodeos de cría pastoriles: el enfoque de un veterinario de campo. XV Congreso Latinoamericano de Buiatría, XXXIX, Paysandú, pp. 68-77.
- 11 Echternkamp SE, Thallman RM.(2011). Factors affecting pregnancy rate to estrus synchronization and fixed-time artificial insemination in beef cattle. J AnimSci 89:3060-3068.
- 12 Geary TW, Downing ER, Bruemmer JE, Whittier JC. (2000). Ovarian and estrous response of suckled beef cows to the Select Synch estrous synchronization protocol. The Professional Animal Scientist 16:1-5.
- 13 Geary TW, Whittier JC. (1998). Effects of a timed insemination following synchronization of ovulation using the Ovsynch or CO-Synch protocol in beef cows. The Professional Animal Scientist 14:217-220.
- 14 Kojima FN, Salfen BE, Bader JF, Ricke WA, Lucy MC, Smith MF, and Patterson DJ. (2000). Development of and estrus synchronization protocol for beef cattle with short-term feeding of melengestrol acetate: 7-11 Synch. J AnimSci 78:2186-2191.
- 15 Kolok AS, Snow DD, Kohno S, Sellin MK, Guillette LJ Jr. (2007). Occurrence and biological effect of exogenous steroids in the Elkhorn River, Nebraska, USA. Sci Total Environ 388:1-3, pp.104-115.
- 16 Lamb GC, Dahlen CR, Larson JE, Marquezini G, Stevenson JS. (2010). Control of the estrus cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: A review. J AnimSci 88 (E Suppl.):E181-E192.
- 17 Larson JE, Lamb GC, Stevenson JS, Johnson SK, Day ML, Geary TW, Kesler DJ, DeJarnette JM, Schrick FN, Dicostanzo A, Arseneau JD.(2006). Synchronization of estrus in suckled beef cows for detected estrus and artificial insemination and timed artificial insemination using gonadotropin-releasing hormone, prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ , and progesterone. J AnimSci 84:332-342.
- 18 Long ST, Yoshida C, Nakao T. (2009). Plasma progesterone profile in ovariectomized beef cows after intra-vaginal insertion of new, once-used or twice-used CIDR. ReprodDomestAnim 44:80-82.
- 19 Mapletoft RJ, Bó GA, Baruselli PS. (2009). Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. AnimReprod 6:114-124.
- 20 Meikle A, Kulcsar M, Chilliard Y, Febel H, Delavaud C, Cavestany D, Chilibroste P. (2004). Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. Reproduction 127:727-737.
- 21 Menchaca A, Núñez R, Wijma R, García Pintos C, Fabini F, de Castro T. (2013). Como mejorar la fertilidad de los tratamientos de IATF en vacas *Bostaurus*. X Simposio Internacional de Reproducción Animal (IRAC), Córdoba, Argentina. pp: 103-134.
- 22 Odde KG.(1990). A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. J AnimSci 68:817-830.
- 23 Orcasberro R, Soca P, Beretta V, Trujillo A. (1992). Estado corporal de vacas Hereford y comportamiento reproductivo. 1era Jornada de Producción Animal.

- Evaluación física y económica de alternativas tecnológicas en predios ganaderos. Paysandú, Facultad de Agronomía. pp. 32-36.
- 24 Quintans G, Vázquez AI, Weigel KA. (2009). Effect of suckling restriction with nose plates and premature weaning on postpartum anestrous interval in primiparous cows under range conditions. *AnimReprodSci* 116: 10-18.
  - 25 Perry GA, Perry BL. (2009). Effect of the timing of controlled internal drug-releasing hormone induced luteinizing hormone surge and ovulatory response. *J AnimSci* 87: 3983-3990.
  - 26 Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2α</sub> and GnRH. *Theriogenology* 44:915-923.
  - 27 Richardson AM, Hensley BA, Marple TJ, Johnson SK, Stevenson JS. (2002). Characteristics of estrus before and after first insemination and fertility of heifers after synchronized estrus using GnRH, PGF<sub>2α</sub>, and progesterone. *J AnimSci* 80:2792-2800.
  - 28 Sartori R, Fricke PM, Ferreira JCP, Ginther OJ, Wiltbank MC. (2001). Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *BiolReprod* 65:1403-1409.
  - 29 Schafer DJ, Bader JF, Meyer JP, Haden JK, Eilersieck MR, Lucy MC, Smith MF, Patterson DJ. (2007). Comparison of progestin-based protocols to synchronize estrus and ovulation before fixed-time artificial insemination in postpartum beef cows. *J AnimSci* 85:1940-1945.
  - 30 Schmitt EJP, Drost M, Diaz T, Roomes C, Thatcher WW. (1996). Effect of a Gonadotropin-Releasing Hormone agonist on follicle recruitment and pregnancy rate in cattle. *J AnimSci* 74:154-161.
  - 31 Simeone A, Beretta V. (2002). Destete precoz en ganado de carne., Ed. Hemisferio Sur, Montevideo. 118 p.
  - 32 Small JA, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. (2009). Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based timed-AI in beef cattle. *Theriogenology* 71:698-706.
  - 33 Stevenson JS, Thompson KE, Forbes WL, Lamb GC, Grieger DM, Corah LR. (2000). Synchronizing estrus and (or) ovulation in beef cows after combinations of GnRH, norgestomet, and prostaglandin F<sub>2α</sub> with or without timed insemination. *J AnimSci* 78: 1747-1758.
  - 34 Thompson KE, Stevenson JS, Lamb GC, Grieger DM, Loest CA. (1999). Follicular, hormonal, and pregnancy responses of early postpartum suckled beef cows to GnRH, Norgestomet, and prostaglandin PGF<sub>2α</sub>. *J AnimSci* 77:1823-1832.
  - 35 Twagiramungu H, Guilbault LA, Dufour JJ. (1995). Synchronization of ovarian follicular waves with a GnRH agonist to increase the precision of estrus in cattle: A review. *J AnimSci* 73:3141-3151.
  - 36 Viñoles C, Quintans G, Paiva N, Cavestany D. (2004). Treatment of suckling beef cattle with a progestagen sponge and oestradiol benzoate or equine chorionic gonadotrophin. *Vet Rec* 154:106-109.
  - 37 Vizcarra JA, Ibañez W, Orcasberro R. (1986). Repetibilidad y reproductibilidad de dos escalas para estimar la Condición Corporal de vacas Hereford. *Investigaciones Agronómicas* 7:45-47.
  - 38 Yavas Y, Walton JS. (2000). Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: A review. *Theriogenology* 54:1-23.

# INIA: TRANSFERENCIA DE EMBRIONES INTERESPECIES EN CAMÉLIDOS DOMESTICOS

## Interspecific embryo transfer in domestic camelids

Huanca, T.<sup>a</sup>; González, M. L.<sup>a</sup>; Cárdenas, Naveros M. L.<sup>a</sup>.O.<sup>a</sup>; Sapana, R.<sup>a</sup>; Mamani-Cato, R. H.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA, Programa Nacional de Innovación en Camélidos, Puno. E-mail: teodosio\_huanca@yahoo.es

### RESUMEN

El interés internacional por la producción de alpacas de fibra fina viene incrementando en las últimas dos décadas. Este desarrollo tiene que ir acompañado de una creciente demanda de asistencia en biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial y la transferencia de embriones. El objetivo del estudio fue evaluar la transferencia de embriones de alpacas donadoras sin estímulo hormonal en receptoras llamas. El proceso de transferencia de embriones se realizó en el Centro de Investigación y producción Quimsachata, la metodología de transferencia de embriones fue de acuerdo al protocolo establecido en el CIP-Quimsachata. Los resultados indican que el tamaño promedio de los folículos y cuerpos lúteos de alpacas donadoras fue  $9.26 \pm 1.97$  y  $11.05 \pm 1.78$  mm respectivamente no habiendo diferencia significativa entre lado de ovario ( $p \geq 0.05$ ). La tasa de ovulación y de recuperación de embriones fue de 88 y 62.79% respectivamente, tampoco se observó el efecto del lado de ovario y cuerno uterino respectivamente ( $p \geq 0.05$ ). El mayor porcentaje de embriones recuperados fue de calidad excelente (59.26%), buena (25.93%), regular (11.11%) y mala (3.7%) y el tamaño promedio fue de 433.33  $\mu$ m, no se observa diferencia entre calidad de embriones por efecto lado de cuerno uterino ni tamaño de embriones por efecto lado de cuerno uterino y calidad de los embriones ( $p \geq 0.05$ ). El tamaño promedio de los folículos y cuerpos lúteos de llamas receptoras fue  $10.18 \pm 2.89$  y  $11.18 \pm 1.74$  mm respectivamente, no habiendo diferencia significativa entre lado de ovario ( $p \geq 0.05$ ). El porcentaje de fertilidad global fue de 57.14%; siendo de 62.05% si la calidad es excelente y 40% si es buena, sin embargo no existe diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ). Se concluye que la transferencia de embriones de alpacas en receptoras llamas es viable y los porcentajes de fertilidad son aceptables.

**Palabras clave:** Alpaca donadora, cuerpo lúteo, embrión, folículo, Llama receptora.

### TRANSFERENCIA DE EMBRIONES INTER ESPECIES, 01 EMBRIÓN DE ALPACA DONADORA NATURAL EN LLAMA RECEPTORA

Se transfirió 15 embriones de alpaca, siendo para el lugar contralateral (2)13.33 % de los cuales el 100% de los embriones son de calidad buena. Se transfirió en el lugar ipsilateral 86.67 % de los embriones, de los cuales el (2)13.33 % son de calidad bueno y (11)73.33 % de calidad excelente (Novoa *et al.*, 199). El tamaño de los embriones transferidos en general es de  $461.33 \pm 155.74$  mm. El tamaño de los embriones transferidos a nivel contralateral fue de  $440 \pm 84.85$  mm. El tamaño promedio de los



embriones transferidos a nivel ipsilateral fue  $464.62 \pm 166.16$  mm, los de calidad bueno su tamaño promedio fue  $210.00 \pm 14.14$  mm y de calidad excelente  $510.91 \pm 133.38$  mm. El porcentaje general de preñez alcanzo 53.33 %. Al transferir el embrión a nivel contralateral el porcentaje de preñez fue 50.00 % y cuando se realiza a nivel ipsilateral la cifra aumenta a 53.85 %. El porcentaje de preñes de acuerdo a la calidad del embrión, fue de 25.00 % para los embriones de calidad bueno y de 63.64 % para los embriones de calidad excelente, dichos resultados demuestran que es posible utilizar las llamas como vientres receptoras de embrión de alpaca.

## **02 EMBRIONES DE ALPACAS SUPERESTIMULADAS EN RECEPTORAS LLAMAS**

Se trabajo con 10 receptoras llamas, se transfirieron 20 embriones de alpaca, el 50% fueron de calidad excelente, 30% bueno y 20% regular. El tamaño promedio de los embriones alcanzo  $422.00 \pm 117.14$  um. El tamaño de los embriones de calidad excelente  $458.00 \pm 59.22$  um (Novoa *et al.*, 1999), para calidad bueno  $413.33 \pm 145.69$  um y para los de calidad regular  $345.00 \pm 169.21$  um. Cuando se transfieren dos embriones de alpacas en llamas receptoras el porcentaje de preñez alcanzo el 70.00%. El porcentaje de preñez para el grupo de receptoras que recibió a lo menos 01 embrión de calidad excelente en general fue de 66.67%, de los cuales para el grupo de hembras que recibió 01 embrión de calidad excelente y 01 embrión de calidad excelente el porcentaje de preñez fue de 100%, para el grupo de hembras receptoras a quienes se les transfirió 01 embrión de calidad excelente y 01 embrión de calidad bueno, el porcentaje de preñes fue de 60.00% y para el grupo que recibió 01 embrión de calidad excelente y 01 embrión de calidad regular fue de 66.67%. El porcentaje de preñez es dependiente de la calidad y tamaño de los embriones, siendo los de calidad excelente los mejores con un tamaño comprendido entre 400 a 1000 micrones

## **01 EMBRIÓN DE LLAMA DONADORA NATURAL EN RECEPTORA ALPACA**

Se trabajo con 14 receptoras, el 100% de las transferencias se realizó a nivel ipsilateral, el 100% de los embriones eran de calidad excelente, el tamaño promedio de los embriones fue de  $432.86 \pm 179.33$  um, El porcentaje de preñez alcanzada fue de 42.86%, con ello se demuestra de que es posible realizar la transferencia de embriones de llama en receptoras alpacas y lograr crías llamas en alpacas.

## **PARA EL PESO AL NACIMIENTO, DESTETE, AL AÑO DE EDAD Y CURVA DE CRECIMIENTO DE ALPACAS Y LLAMAS CRÍA NACIDAS POR TRANSFERENCIA DE EMBRIONES INTERESPECIES SE TIENE:**

### **PESO VIVO AL NACIMIENTO**

El peso vivo promedio al nacimiento de alpacas y llamas crías nacidas por transferencia de embriones de receptoras alpacas y llamas se observa en la tabla 1, donde se observa que el peso vivo al nacimiento de las alpacas crías cuya madre es llamas es superior en 0.88 kg en comparación a las alpacas crías cuya madre es alpaca, siendo esta diferencia significativa ( $p < 0.01$ ), en tanto que el peso vivo al nacimiento de las llamas crías cuya madre es llamas es superior en 1.33 kg en comparación a las llamas crías cuya madre es alpaca, siendo esta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Tabla 1. Peso vivo al nacimiento de alpaca y llamas nacidas por transferencia de embriones interespecies

Madre	Cría	n	Promedio Desv. Estánd., kg	±	Coefficiente de variabilidad, %	Intervalo de confianza al 95%	de Valor-p
Alpaca	Alpaca	14	5.79 ± 0.58 <sup>b</sup>		10.01	5.45 - 6.12	0.0049
Llama		12	6.67 ± 0.86 <sup>a</sup>		12.92	6.12 - 7.21	
Total		26	6.19 ± 0.84		13.53	5.85 - 6.53	
Alpaca	Llama	6	8.17 ± 0.82 <sup>b</sup>		10.00	7.31 - 9.02	0.0224
Llama		6	9.50 ± 0.89 <sup>a</sup>		9.42	8.56 - 10.44	
Total		12	8.83 ± 1.07		12.15	8.15 - 9.52	

<sup>a,b</sup> Literales diferentes en la misma columna dentro de cada factor cría indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), prueba t-student.

### PESO VIVO AL DESTETE

El peso vivo promedio al destete de alpacas y llamas crías nacidas por transferencia de embriones de receptoras alpacas y llamas se observa en la tabla 2, donde se observa que el peso vivo al destete de las alpacas crías cuya madre es llamas es superior en 3.09 kg en comparación a las alpacas crías cuya madre es alpaca, siendo esta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), en tanto que el peso vivo al destete de las llamas crías cuya madre es llama es superior en 3.39 kg en comparación a las llamas crías cuya madre es alpaca, siendo esta diferencia no significativa ( $p \geq 0.05$ ).

Tabla 2. Peso vivo al destete de alpaca y llamas nacidas por transferencia de embriones interespecies

Madre	Cría	n	Promedio Desv. Estánd., kg	±	Coefficiente de variabilidad, %	Intervalo de confianza al 95%	de Valor-p
Alpaca	Alpaca	14	22.20 ± 2.67 <sup>b</sup>		12.03	20.66 - 23.74	0.0228
Llama		12	25.29 ± 3.79 <sup>a</sup>		14.97	22.89 - 27.70	
Total		26	23.63 ± 3.53		14.95	22.20 - 25.05	
Alpaca	Llama	6	33.38 ± 1.19		3.56	32.13 - 34.62	0.2921
Llama		6	36.77 ± 6.70		19.04	29.42 - 44.11	
Total		12	35.07 ± 5.10		14.55	31.83 - 38.31	

<sup>a,b</sup> Literales diferentes en la misma columna dentro de cada factor cría indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), prueba t-student.

### PESO VIVO AL AÑO DE EDAD

El peso vivo promedio al año de edad de alpacas y llamas crías nacidas por transferencia de embriones de receptoras alpacas y llamas se observa en la tabla 3, donde se observa que el peso vivo al año de edad de las alpacas crías cuya madre es llamas es superior en 5.78 kg en comparación a las alpacas crías cuya madre es alpaca, siendo esta diferencia significativa ( $p < 0.01$ ), en tanto que el peso vivo al año de edad de las llamas crías cuya madre es llama es superior en 1.41 kg en comparación a las llamas crías cuya madre es alpaca, siendo esta diferencia no significativa ( $p \geq 0.05$ ).

Tabla 3. Peso vivo al año de edad de alpaca y llamas nacidas por transferencia de embriones interespecies

Madre	Cría	n	Promedio ± Desv. Estánd., kg	Coefficiente de variabilidad, %	Intervalo de confianza 95%	de Valor-p
Alpaca	Alpaca	14	26.32 ± 3.52 <sup>b</sup>	13.37	24.29 - 28.35	0.0005
Llama		12	32.10 ± 3.75 <sup>a</sup>	11.68	29.72 - 34.48	
Total		26	28.99 ± 4.61	15.90	27.13 - 30.85	
Alpaca	Llama	6	44.45 ± 2.52	5.68	41.80 - 47.09	0.6071
Llama		6	45.86 ± 6.00	13.08	39.56 - 52.15	
Total		12	45.15 ± 4.48	9.85	42.32 - 47.98	

<sup>a,b</sup> Literales diferentes en la misma columna dentro de cada factor cría indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), prueba t-student.

### CURVA DE CRECIMIENTO

En la tabla 2 se observan los parámetros de la curva de crecimiento y su error estándar así como sus respectivos coeficientes de determinación para alpacas y llamas crías nacidas por transferencia de embriones de receptoras alpacas y llamas; la asíntota “ $b_0$ ” de la función utilizada representa el peso potencial estimado hasta la edad de 12 meses para las alpacas y llamas crías nacidas de receptoras alpacas y llamas respectivamente. Observándose que las alpacas crías nacidas de receptoras llamas y las llamas crías nacidas de receptoras alpacas presentan el peso vivo estimado a los 12 meses más elevado en comparación a las alpacas crías nacidas de receptoras alpacas y llamas crías nacidas de receptoras llamas. El parámetro “ $b_1$ ” es una constante de integración que ajusta los valores del peso vivo al nacimiento. El parámetro “ $b_2$ ”, comúnmente referido como índice de madurez, está relacionado con la tasa de crecimiento relativo, este valor indica una estimación de la precocidad fisiológica. Los valores del parámetro “ $b_2$ ” obtenidos para alpacas crías cuyas madres fueron alpacas y llamas fue 0.00956 y 0.0103 respectivamente, lo que indica que las alpacas crías cuyas madres son alpacas son relativamente precoces. Según Brody (1945) los valores “ $b_0$ ” y “ $b_2$ ” son características intrínsecas o genéticas de los animales expresadas sobre determinadas condiciones ambientales. Como las crías fueron mantenidos exclusivamente en praderas nativas, la nutrición dependió principalmente de la habilidad materna y de las condiciones de las praderas, sujetas a muchas variaciones en la calidad nutritiva de las especies forrajeras disponibles en época de lluvia y seca. Los valores del parámetro “ $b_2$ ” obtenidos para llamas crías cuyas madres fueron alpacas y llamas fue 0.00489 y 0.00772 respectivamente, lo que indica que las llamas crías cuyas madres son alpacas son relativamente precoces. Las ecuaciones que describen la curva de crecimiento son las siguientes:

$y = 24.7641(1 - 0.7668 \exp(-0.00956t))$  y  $y = 28.8788(1 - 0.7373 \exp(-0.0103t))$  Con coeficientes de determinación ajustados de 84.6830% y 75.6894% para crías alpacas nacidas de madre alpaca y llama respectivamente; en tanto que las ecuaciones para llamas crías son las siguientes:  $y = 45.7212(1 - 0.8145 \exp(-0.00489t))$  y  $y = 43.1222(1 - 0.7767 \exp(-0.00772t))$  con coeficientes de determinación ajustados de 92.4530% y 78.3762% cuyas madres son alpaca y llama respectivamente, con éstas ecuaciones se procedió a graficar sus respectivas curvas de crecimiento (figuras 1 y 2).

Tabla 4. Parámetros de la curva de crecimiento de alpacas y llamas nacidas por transferencia de embriones interespecies obtenidos a través del modelo de Brody, desde el nacimiento hasta los 12 meses de edad, en el CIP-Quimsachata INIA.

Madre	Cría	$b_0 \pm E.E.$	$b_1 \pm E.E.$	$b_2 \pm E.E.$	$R^2$ Ajustado, %
Alpaca	Alpaca	$24.7641 \pm 0.4883$	$0.7668 \pm 0.0213$	$0.00956 \pm 0.000842$	84.6830
Llama		$28.8788 \pm 0.7373$	$0.7578 \pm 0.0310$	$0.0103 \pm 0.00126$	75.6894
Alpaca	Llama	$45.7212 \pm 2.5409$	$0.8145 \pm 0.0172$	$0.00489 \pm 0.000711$	92.4530
Llama		$43.1222 \pm 2.1613$	$0.7767 \pm 0.0379$	$0.00772 \pm 0.00146$	78.3762

E.E. = Error Estándar       $R^2$  = Coeficiente de determinación

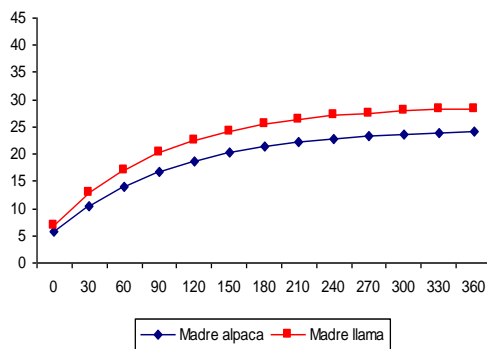


Figura 1. Curva de crecimiento de alpacas nacidas por transferencia de embriones interespecies

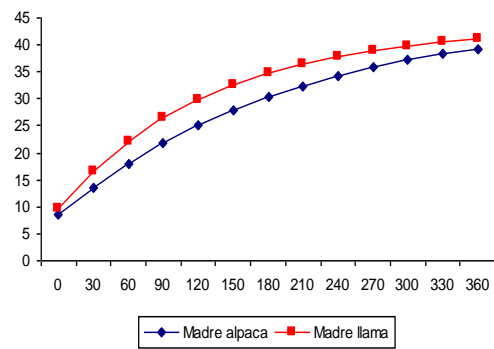


Figura 2. Curva de crecimiento de llamas nacidas por transferencia de embriones interespecies.

## CONCLUSIONES

Las alpacas crías nacidas de madres llama presentan mayor peso vivo al año de edad en comparación a las que nacieron de madres alpaca.

Las llamas crías nacidas de madres llama presentan similar peso vivo al año de edad en comparación a las que nacieron de madres alpaca.

Las alpacas crías nacidas de madres llama presentan mayor peso vivo estimado a los 12 meses de edad y mayor velocidad relativa de crecimiento en comparación a las que nacieron de madres alpaca.

Las llamas crías nacidas de madres alpaca presentan mayor peso vivo estimado a los 12 meses de edad, pero menor velocidad relativa de crecimiento en comparación a las que nacieron de madres llamas.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Adams GP. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. J Reprod Fertil 1999; Supplement 54: Reproduction in Domestic Ruminants IV, 17-32.
- 2 Agüero A.; Chavez M.E.; Capdevielle E.; y Russo A. 1999. Superovulación en llamas: comparación de dos métodos. II Congreso Mundial de Camelidos – Cuzco pag. 94
- 3 Bourke DA, Kyle CE, McEvoy TG, Young P, Adam CL. Superovulatory responses to eCG in llamas (*Lama glama*). Theriogenology 1995; 44: 255-268.
- 4 Brody, S. 1945. Bioenergetics and growth. Reinhold Publishing Corporation. New York.
- 5 Correa JE, Ratto MH, Gatica R. Superovulation in llamas (*Lama glama*) with pFSH and equine Chorionic Gonadotrophin used individually or in combination. Anim Reprod Sci 1997; 46: 289-296.
- 6 Gordon I. 1997. Reproduction in Horses, Deer and Cameldis, Vol. 4. CAB International.
- 7 Huanca W.; Cardenas O., Cordero A.; Huanca T. 1999. Respuesta ovárica a gonadotropinas (eCG y hCG) en alpacas durante la época seca. II Congreso Mundial de Reproducción Animal –Cuzco pag. 92
- 8 Huanca W.; Cárdenas O., Cordero A. Y Huanca T. 2003. Respuesta ovárica a la estimulación hormonal en llamas de 6 y 8 meses de edad. Pag. 428 Resumen de V simposio Internacional de Reproducción Animal – 27 – 29 Junio. IRAC – Córdoba – Argentina.

- 9 Huanca T. 2001. Experiencia del INIA en la implementación del banco de germoplasma de camélidos domésticos. Pag. 115 -124 Resumen de la XXIV Reunión APPA – 10 – 13 Setiembre, Lima.
- 10 Kaps, M. and W. R. Lamberson, 2004. Biostatistics for Animal Science. CABI Publishing, Cambridge, USA.
- 11 Ratto MH, Singh J, Huanca W., Adams GP. Ovarian follicular wave synchronization and fixed-time natural insemination in llamas. *Theriogenology* 2003; 60:1645-1656.
- 12 Skidmore J.A. 2000. Embryo Transfer in the dromedary camel. IN *Recent advances in Camelid Reproduction*.
- 13 SAS Institute Inc. 2009. *SAS/STAT<sup>®</sup> 9.2 User's Guide, Second Edition*. Cary, NC: SAS Institute Inc.

# Procedimientos Para Remover Microorganismos de Embriones

Jesús Manuel Palomino  
[Palomino.manuel@gmail.com](mailto:Palomino.manuel@gmail.com)

**Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Saskatchewan**

Las tecnologías reproductivas han venido desarrollándose rápidamente en estos últimos años. Dentro de estas tecnologías, la transferencia de embriones (TE) ha permitido acortar el progreso genético cuando ha sido aplicado en especies domesticas. Asimismo, la TE es una de las mejores herramientas para la preservación de especies en peligro. Sin embargo, es la prevención de enfermedades una de las aplicaciones más importantes que tiene la TE, lo cual es compartida con otras tecnologías reproductivas.

Existen enfermedades y/o patógenos que pueden ser transmitidas mediante la TE, los cuales han sido sujetos de estudio a lo largo de los años. Agentes virales, bacterias, hongos, y parásitos pueden estar presentes en el semen y fluidos del tracto femenino los cuales estarían relacionados con la transmisión sexual, a pesar que muchos de ellos tienen diferente patología (Hare, 1985). La Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) clasifica a estos patógenos en 4 categorías de acuerdo a su habilidad para ser eliminado de los embriones usando las recomendaciones del caso (Stringfellow y Givens, 2010). En la categoría 1 están las enfermedades o agentes patógenos sobre los que se han reunido pruebas suficientes que indican que su riesgo de transmisión es insignificante si los embriones son manipulados correctamente entre su colección y su transferencia. Ej. Lengua azul (Bovinos), Encefalopatía espongiiforme bovina (bovinos), *Brucella abortus* (bovinos), etc. Categoría 2 están enfermedades sobre las que se han reunido pruebas sustanciales que indican que su riesgo de transmisión es insignificante si los embriones son manipulados correctamente entre su recolección y su transferencia, pero que requieren transferencias suplementarias para corroborar los datos existentes. Ej. Lengua azul (ovinos), peste porcina clásica, encefalitis/artritis caprina, y Scrapie (ovinos). Categoría 3 están enfermedades o agentes patógenos sobre los que pruebas preliminares indican que el riesgo de transmisión es insignificante si los embriones son manipulados correctamente entre su recolección y su transferencia, pero sobre los que se requieren datos experimentales complementarios in vitro e in vivo para corroborar los resultados preliminares. Ej. Virus de la inmunodeficiencia bovina, encefalopatía espongiiforme bovina (caprinos), virus de la diarrea viral bovina (bovinos), fiebre aftosa (suidos, ovinos y caprinos), etc. Categoría 4 están enfermedades o agentes patógenos sobre los que se están realizando estudios experimentales o tienen resultados inconclusos. Ej. Peste porcina africana, virus Akabane (bovinos), Lengua azul (caprinos), Herpesvirus 4 de los bovinos, entre otros.

El IETS, a través de su manual (Stringfellow y Givens, 2010), ha dado una serie de recomendaciones para la descontaminación de embriones posiblemente infectados. Los métodos que se usan para obtener embriones libre de patógenos son el lavado de embriones, uso de tratamientos enzimáticos, uso de antibióticos, uso de

métodos inmunológicos, agentes antivirales, y el uso de interferón, entre otros. De todos estos métodos, es el lavado de embriones la técnica que asegura que los embriones no sean un riesgo de transmisión de enfermedades. La técnica es pasar los embriones (no más de 10 embriones por lavado) por 10 diferentes placas Petri de 30 mm (también pueden usarse las placas con múltiple hoyos) que contienen medio de lavado. Este medio de lavado consiste en Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) + 0.4% de Bovine Serum Albumin (BSA). El factor de dilución es 1:100, lo que asegura obtener no detectable niveles de patógenos después del decimo lavado. Usualmente, antibióticos (100 UI/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomocina) son añadidos al medio de lavado para asegurar la eliminación de bacterias. Sin embargo, si se sospecha de agentes virales que pueden ser transmitidos por transferencia de embriones, entonces el protocolo de lavado debe incluir tripsina. Este protocolo incluye el paso de los embriones por 5 medios de lavado con 0.4% de BSA, seguido por 2 lavados en Solución Salina Balanceada de Hank que contiene 0.25% de tripsina por 45 segundos a 25°C y 7.6 de pH, y finalmente 5 pasos más en 0.4% de BSA (Singh, 1985).

Sin embargo, estos métodos de descontaminación de los embriones no son efectivos por muchos microorganismos. Especialmente aquellos que se encuentran en la Categoría 4 de clasificación de enfermedades y patógenos. Para no tener que usar los métodos de lavado y asegurar que los embriones estén libres de patógenos, es necesario seleccionar machos y hembras que estén libres de enfermedades, aunque esta opción es mucho más difícil y usualmente muy cara.

## **REFERENCIA**

1. Hare WCD. Diseases transmissible by semen and embryo transfer techniques. OIE Technical Bull. 1985; 4:1-117.
2. Stringfellow DA, Givens MD. Manual of the International Embryo Transfer Society. 4<sup>th</sup> edition. USA: IETS, Savoy, Illinois. 2010.
3. Singh EL. Disease control: Procedures for handling embryos. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 1985; 4:867-872.



# CONSIDERACIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *In vitro*

**Wilfredo Huanca L.**

Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria – Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Email: [whuanca2002@yahoo.com](mailto:whuanca2002@yahoo.com)

## 1. INTRODUCCION

La utilización de las biotecnologías reproductivas en las especies domésticas ha alcanzado una rápida difusión especialmente en los últimos años. Entre estas biotecnologías, una de las que más desarrollo e impacto han generado es la Fecundación *In vitro* (FIV) con la consiguiente producción de embriones *In vitro* bajo las condiciones de laboratorio. El uso de estas biotecnologías ha permitido obtener crías de alto valor genético a partir de animales vivos con características genéticas deseables mediante la técnica de colección de ovocitos vía aspiración de los gametos (OPU) y su posterior maduración, fecundación y cultivo en el Laboratorio. Igualmente, esta biotecnología permite la disponibilidad de un material biológico para la investigación en el campo de la reproducción, cuando se obtienen ovocitos a partir de ovarios procedentes de animales sacrificados.

El éxito de un programa de Fecundación *In vitro* está determinado por el número de hembras gestantes después de la transferencia de los embriones cultivados en condiciones del laboratorio pero estos resultados dependen de diversos factores entre las que se pueden señalar la calidad de los ovocitos obtenidos, una óptima sincronización de las hembras receptoras, un adecuado manejo de las condiciones del laboratorio y si la transferencia se realiza con embriones frescos o congelados.

En nuestro país, si bien existen algunas experiencias preliminares sobre Fecundación *In vitro*, es evidente que se requiere establecer un intercambio de experiencias que puedan estar orientados a conocer aspectos que pueden contribuir a mejorar los resultados obtenidos.

## 2. CONSIDERACION REFERIDAS AL MATERIAL BIOLÓGICO

### 2.1 CALIDAD DE LOS OVOCITOS

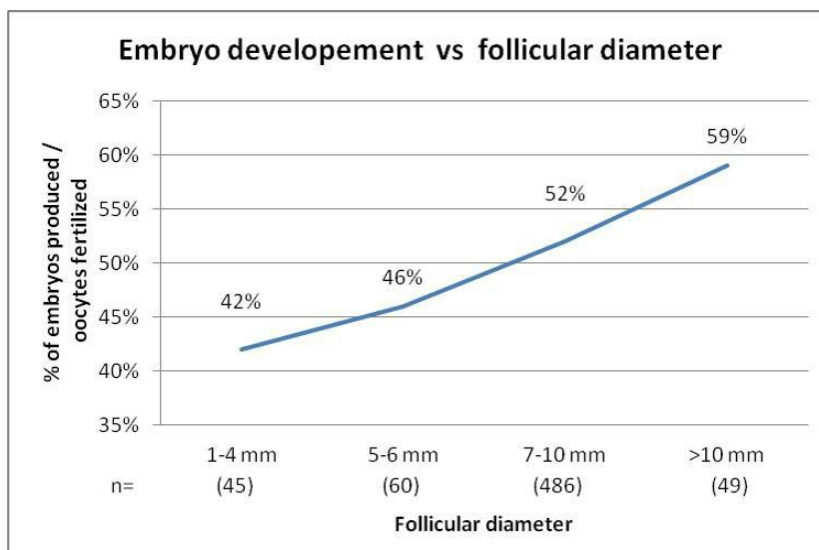
Uno de los aspectos básicos a tener en cuenta para el éxito de la FIV es la recuperación de ovocitos de calidad y muchas veces este factor no es considerado como una variable de importancia y se busca recuperar la mayor cantidad de ovocitos antes que ovocitos de calidad. Hay que considerar que el concepto de calidad del ovocito finalmente está determinado por su capacidad para adquirir competencia para ser fecundado y continuar con su desarrollo embrionario; sin embargo, la adquisición de competencia de un ovocito depende de diferentes factores que no son fáciles de medir utilizando únicamente parámetros que nos permiten determinar la morfología del ovocito (Sirard 2006). Un ovocito debe tener la capacidad para completar la

maduración, capacidad de ser fecundado, capacidad de continuar con su desarrollo hasta el estadio de blastocisto y transferida (Watson 2007).

El ovocito adquiere capacidad para desarrollarse a través de la biosíntesis y almacenamiento de muchas moléculas que resultan de procesos moleculares, que ocurren en el núcleo y en el citoplasma, durante los estadios de crecimiento y maduración del ovocito bajo condiciones fisiológicas *In vivo*. Un ovocito no es un gameto que permanece estático y está sometido a cambios constantes desde los estadios de folículos primordiales hasta llegar a los estadios de folículos preovulatorios y la ocurrencia de la ovulación. Una vez que el ovocito alcanza su máximo desarrollo, los cambios continúan presentándose y cambios finales ocurren cuando el ovocito decrece progresivamente en su actividad de transcripción (Fair, 1995).

## 2.2 TAMAÑO DEL FOLICULO

Otra variable de importancia es el tamaño del folículo, afectando la capacidad del ovocito para adquirir competencia. Estudios realizados señalan que ovocitos provenientes de folículos pequeños (menor a 4 mm) pueden tener capacidad para que ocurra una fecundación exitosa pero tienen una disminuida capacidad para el cigoto pueda continuar con su desarrollo (Blondin, 1995; Marchal, 2002). Esta deficiencia de los ovocitos recuperados tempranamente, pueden explicarse por una posible pérdida de algunos factores foliculares adicionales y que tienen una gran importancia para que el ovocito tenga adquiera la competencia suficiente para desarrollar después de la fecundación. Estudios realizados mediante la colección de ovocitos de folículos de diferentes tamaños, por la técnica de OPU, confirman esta tendencia (Blondin et al. 2014).



Pocos estudios han evaluado el efecto de las características foliculares, como el diámetro y porcentaje de células de la granulosa y de la teca atrésicos, sobre una base individual, confirmando un incremento de ovocitos competentes con respecto al tamaño folicular (Blondin, 1995; Hagemann, 1999). Estudios recientes con obtención de ovocitos por la técnica de OPU han demostrado que condiciones con bajos perfiles

de FSH (92 horas entre la última aplicación de FSH a la aspiración de ovocitos) permite que los folículos continúen creciendo y que contengan ovocitos con una reducida capacidad de adquirir competencia (Nivet, 2012). Este mismo estudio demostró que la mayor producción de embriones fue obtenido cuando los ovocitos fueron aspirados de folículos mayores a 7 mm después de una estimulación con FSH e intervalos de 44 a 68 horas a la recuperación desde la última aplicación de la FSH, pero hay que señalar que bajo un contexto comercial se considera que los tamaños ideales de folículos está entre 7 a 10 mm y que los mayores a 10 mm no siempre son fáciles de ser colectados.

### **2.3 ESTADIO FISIOLÓGICO DE LOS FOLÍCULOS**

Por lo general el folículo dominante y el folículo subordinado de mayor tamaño se encuentran aptos o ligeramente atrésicos y los ovocitos contenidos en estos folículos tienen una buena capacidad de competencia para el desarrollo, con una alta producción de blastocistos (Vassena 2003). La atresia folicular se inicia con signos de apoptosis en las células foliculares de la granulosa y posteriormente presentan estos signos en las células del cumulus para finalmente afectar al ovocito (Zeuner, 2003). En bovinos, complejos cumulus - ovocitos con ligeros signos de apoptosis en las capas externas del cumulus presentan una alta capacidad de adquirir competencia (Zeuner, 2003; Feng, 2007). Un estudio reciente describe que la condensación de la cromatina nuclear en ovocitos bovinos es progresiva y está relacionada con el tamaño y condición de los folículos, lo que sugiere que la transcripción se detiene en forma progresiva en folículos que se aproximan a la ovulación o en folículos subordinados que están iniciando el proceso de la atresia (Blondin 2014), lo que permitiría una mejor habilidad para el desarrollo cuando la maquinaria de la transcripción está detenida.

### **2.4 ESTIMULACION HORMONAL Y COMPETENCIA DE LOS FOLÍCULOS**

En FIV los avances respecto a la colección de ovocitos procedentes de animales vivos se está convirtiendo en una alternativa promisorio. El desarrollo en el conocimiento de la fisiología reproductiva y regulación hormonal de las ondas foliculares ha contribuido a mejorar las estrategias de estimulación, minimizando los patrones hormonales normales y fisiológicos. Sin embargo, la tasa promedio de blastocistos después de un protocolo de FIV y Maduración In vitro permanece sin cambio significativos (Sirard, 2006).

Estudios recientes permiten asumir que el periodo de inhibición entre la última inyección de FSH y la secreción pulsátil de LH es favorable para que los ovocitos puedan adquirir competencia para su posterior desarrollo, sugiriéndose que si el intervalo entre la última inyección de FSH es corta, la competencia de los ovocitos es baja debido al estadio de crecimiento final de los ovocitos y aún no ha ocurrido la diferenciación y de otro lado, si este intervalo es bastante largo, la diferenciación está bastante avanzada e iniciando el proceso de atresia (Nivet, 2012). La identificación del intervalo ideal entre la última inyección de FSH y la secreción de LH es el cambio esperado para mejorar la respuesta en la obtención de ovocitos de calidad.

### 3. CONSIDERACION REFERIDAS AL LABORATORIO

Si bien muchos parámetros deben ser considerados para obtener una exitosa producción de embriones de alta calidad utilizando FIV pero muchas veces descuidamos aspectos básicos o rutinarios. Hay que considerar que el ovocito y los embriones pueden ser considerados bastante resistentes pero si están sujetos a diversos factores de estrés, afectara la calidad y traerá como resultado blastocistos de calidad deficiente y que solo serán perceptibles cuando no se obtiene las tasas esperadas de implantación, pérdidas de preñez y no resultan en el nacimiento de una cría. Las condiciones de manejo en el laboratorio son muy importantes para el éxito de la producción de embriones (Lane et al., 2008). Entre algunos de estos aspectos se tiene:

- a) Colección de ovocitos: La presión utilizada para colectar los ovocitos es muy importante y más aún cuando se trata de utilizar la técnica de OPU. La presión utilizada afecta la calidad de los ovocitos a nivel del complejo de células del cumulus (Ward et al 2000). De otro lado, los ovocitos son muy sensibles a las variaciones de temperatura, la que debe permanecer alrededor de 30 grados (Gordon 2004). Los ovocitos madurados son muy sensibles al shock de frio, la formación del huso meiotico ocurre muy rápidamente y no se recupera completamente si el shock de frio es bastante largo o muy intenso (Tan, 2009). La búsqueda de ovocitos debe ser bastante rápida y en bajo una placa térmica.
- b) Los medios de cultivo han sido desarrollados para mantener las condiciones ideales y minimizar las diferencias con el medio uterino y tratar de minimizar cualquier situación de estrés (Lane et al. 2008). Es muy importante mantener las condiciones adecuadas de temperatura, osmolaridad y pH durante la manipulación e incubación del embrión. La calidad del agua es clave para la preparación de los medios y por lo general debería limitarse el número de proveedores del material de plástico a utilizarse por las diferencias en calidad que puede existir entre las diferentes compañías.
- c) Adecuados equipos como un buen estereomicroscopio y una estufa que mantenga las condiciones adecuadas sin variaciones bruscas. No siempre el número de blastocistos obtenidos después de un ciclo de trabajo con FIV es el mejor indicador de un buen trabajo, siendo más importante la calidad del blastocisto obtenido.

### REFERENCIAS

- 1 Blondin P., Grand F.X., Vigneault C. 2014. What can impact the success of an IVF laboratory?. Meeting SATE Argentina, Mayo 2014.
- 2 Blondin P., Bousquet D., Twagiramungu H., Barnes F., Sirard M.A. (2002) Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. In Biol Reprod **66**: 38-43

- 3 Blondin P., Dufour M., Sirard M.A. (1996) Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classic histology. In *Biol Reprod* **54**: 631-637
- 4 Blondin P., Guilbault L.A., Sirard M.A. (1997) The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. In *Theriogenology* **48**: 803-813
- 5 Blondin P., Sirard M.A. (1995) Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. In *Mol Reprod Dev* **41**:
  - a. 54-62.
- 6 Fair T., Hyttel P., Greve T. (1995) Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. In *Mol Reprod Dev* **42**: 437-442
- 7 Feng W.G., Sui H.S., Han Z.B., Chang Z.L., Zhou P., Liu D.J., Bao S., Tan J.H. (2007) Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: a study using the well-in-drop culture system. In *Theriogenology* **67**: 1339-1350
- 8 Lane M, Mitchell M, Cashman KS, Feil D, Wakefield S, Zander-Fox DL. (2008) To QC or not to QC: the key to a consistent laboratory? In *Reprod Fertil Dev* **1**:23-32.
- 9 Machatkova M., Jokesova E., Horky F., Krepelova A. (2000) Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. In *Theriogenology* **54**: 543-550.
- 10 Marchal R., Vigneron C., Perreau C., Bali-Papp A., Mermillod P. (2002) Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. In *Theriogenology* **57**: 1523-1532 .
- 11 Merton J.S., de Roos A.P., Mullaart E., de Ruigh L., Kaal L., Vos P.L., Dieleman S.J. (2003) Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. In *Theriogenology* **59**: 651-674
- 12 Sirard M.A., Richard F., Blondin P., Robert C. (2006) Contribution of the oocyte to embryo quality. In *Theriogenology* **65**: 126-136.
- 13 Tan J.H., Wang H.L., Sun X.S., Liu Y., Sui H.S., Zhang J. (2009) Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. In *Mol Hum Reprod* **15**: 1-9

- 14 Vassena R., Mapletoft R.J., Allodi S., Singh J., Adams G.P. (2003) Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. In *Theriogenology* **60**: 923-932
- 15 Watson A.J. (2007) Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. In *J Anim Sci* **85**(E. Suppl.):E1–E3.
- 16 Zander, D. L., Thompson, J. G., Lane, M. (2006). Perturbations in mouse embryo development and viability caused by ammonium are more severe after exposure at the cleavage stages. In *Biol. Reprod.* **74**: 288-294
- 17 Zeuner A., Muller K., Reguszynski K., Jewgenow K. (2003) Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. In *Theriogenology* **59**: 1421-1433

# PRINCIPIOS FISICO-QUÍMICOS APLICADOS A LA CRIOPRESERVACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES

Dr. Eduardo G. Aisen

*Laboratorio de Teriogenología "Dr. Héctor H. Morello" Facultad de Ciencias Agrarias.  
Universidad Nacional del Comahue. Cinco Saltos, Río Negro. ARGENTINA.  
teriogenologia@hotmail.com*

**Palabras clave:** congelación-descongelación; cambios osmóticos; hielo intracelular; crioprotectores.

## INTRODUCCION

El espermatozoide fue una de las primeras células en la cuales se aplicó con éxito la congelación profunda. La preservación de la vida celular a temperaturas muy inferiores a 0°C, donde se produce un cambio físico del estado líquido al estado sólido, es el objetivo de la criopreservación. Esta preservación en frío se basa en el hecho de que las reacciones metabólicas ocurren más lentamente a medida que desciende la temperatura, y se considera que por debajo de -140 °C toda actividad biológica prácticamente se detiene. Sin embargo, también ocurre que, antes de llegar a estas temperaturas, la muestra en cuestión es incapaz de resistir el proceso de enfriamiento y muere.

Mientras se produce la congelación de una suspensión celular ocurren cambios en los medios intra y extracelulares. Al comienzo, parte del agua extracelular se congela, y el medio circundante aumenta su concentración. El medio interno permanece aún sin congelar, dado que la membrana plasmática actúa como una barrera ante la propagación del hielo. Puesto que el punto de congelación de una solución disminuye a medida que aumenta su concentración osmolar, este medio permanece todavía en estado líquido, pero con mayor proporción de solutos. Esta condición de hipertonicidad causa una salida de agua intracelular (que se congela en el exterior) por diferencia de presión osmótica, deshidratando a la célula. Para el caso de los espermatozoides, al prolongarse esta condición, puede disminuir bruscamente la sobrevivencia de los mismos debido a la elevada concentración de solutos, cambios de pH, precipitación de sales y proteínas. Si la velocidad de congelación es alta, no se produce el efecto de solución mencionado, pero el agua intracelular no abandona la célula, congelándose en forma de grandes cristales de hielo. Si la velocidad de congelación es baja, no se producirá la formación de cristales grandes de hielo intracelular, pero, como se expuso anteriormente, se comprometerá la vida celular por aumento de la concentración de solutos en el citoplasma.

El hielo es un cristal de agua pura. A medida que el hielo extracelular se va formando, excluye de su estructura solutos tales como sales, azúcares y proteínas. Esta alta concentración externa supone un estrés osmótico para la célula, con salida de agua y entrada de algunos solutos. Si durante la reducción del volumen celular se sobrepasa

un cierto límite, la bicapa de fosfolípidos de la membrana se comprime y rompe su estructura. Las funciones de transporte cesan, y el contenido celular se vierte por las roturas de la membrana, creándose una vía permeable para que el hielo extracelular penetre y se propague hacia el interior celular.

Los métodos de congelación y descongelación afectan principalmente al sistema de membranas celulares, causando alteraciones ultraestructurales, bioquímicas y funcionales de la célula espermática en una proporción significativa.

### **Crioprotectores**

Las lesiones celulares producidas por la congelación-descongelación del agua intracelular pueden reducirse mediante la incorporación de agentes crioprotectores (ACPs), tales como glicerol, propanodiol, etilenglicol, sorbitol, manitol, inositol, adonitol, DMSO. En general se trata de moléculas que atraviesan velozmente la membrana plasmática, acomplejan agua intracelular, y disminuyen en tamaño y número los cristales de hielo. También se ensayaron la prolina, glicina, y otros aminoácidos, con distintos resultados.

Específicamente, el mecanismo de protección de los ACPs permeables es doble. En primer lugar, como el medio es enfriado por debajo de 0°C y se produce la “nucleación” del hielo (es decir, una microscópica formación de cristales de hielo formada en la solución), el agua pura se congela, concentrándose así los solutos del medio, reduciendo su punto de fusión. En segundo lugar, cuando las temperaturas se reducen aún más, este proceso continúa a lo largo de la curva de equilibrio líquido-sólido de la solución, hasta que se alcanza la temperatura de transición vítrea o el punto eutéctico, momento en el que la solución ya no puede existir en forma líquida y cristaliza en su lugar con los solutos.

El sobreenfriamiento de una solución (estado de equilibrio metaestable que puede llevar a que la misma se encuentre en estado líquido muy por debajo de su punto de congelación) es un fenómeno que ocasiona cambios térmicos muy bruscos en las células, con formación de cristales de hielo grandes y daños irreversibles. Este fenómeno se ve fuertemente disminuido por la acción de los ACPs permeables y por la presencia de macromoléculas en los medios de congelación (lipoproteínas de la yema de huevo o de la leche), que actúan como puntos de formación de cristales de hielo extracelular al momento de alcanzar la temperatura de congelación de la solución.

En esencia, la congelación de las células las somete a condiciones extremas de presión osmótica. En consecuencia, su respuesta a la congelación puede, a menudo, ser descrito satisfactoriamente por las relaciones físico-químicas que rigen el movimiento osmótico normal de agua y solutos a través de las membranas plasmáticas. Cuándo se conocen las respuestas, se pueden tomar medidas para evitar o reducir al mínimo el daño, y con ello, lograr la paralización del “tiempo biológico”.

Existen animales que naturalmente se congelan y permanecen vivos luego de la descongelación. Éstos sintetizan distintas sustancias crioprotectoras que mantienen las



estructuras celulares durante el enfriamiento y congelación, tanto por efecto osmótico como por protección específica de la membrana celular, ligándose con los fosfolípidos de la misma. En este grupo se encuentra el disacárido trealosa y el aminoácido prolina, de especial actividad en la supervivencia invernal de ciertas larvas de dípteros. La primera ha sido incorporada a los diluyentes para la congelación de dosis seminales, en base a sus dos mecanismos de acción: por un lado, inhibe la fusión lipídica durante la deshidratación, y por otro, reduce la temperatura de transición de los fosfolípidos deshidratados. Esto permite que los fosfolípidos en este estado coexistan en una fase líquida cristalina, a temperaturas a las cuales normalmente se encontrarían en una fase de gel. Por otra parte, se sintetizan ciertas proteínas nucleadoras de hielo que propician la formación de pequeños cristales de hielo extracelular, y proteínas anticongelantes que evitan la formación de cristales grandes, una vez que comienza la congelación de los fluidos corporales de estos animales.

### **Formación de cristales de hielo**

Los cristales de hielo se forman tanto fuera como dentro de la célula, siendo los cristales intracelulares los que, comportándose como “cuchillas”, cortan las estructuras internas de la célula, especialmente las membranas. El hielo es dinámico; entre los 0°C y los -30°C cambia continuamente de conformación, lo que provoca que se acentúe el efecto cuchilla del mismo. Este proceso se vuelve a presentar cuando las muestras se descongelan.

Debido a estos efectos durante la congelación, se debe evitar la formación de hielo intracelular siguiendo una serie de reglas:

Deshidratar la célula: Hay que extraer el agua de la célula y sustituirla por ACPs o criopreservantes que mantengan el equilibrio osmótico. Sin embargo, si la célula llega al 30% de deshidratación se alcanza un punto de no retorno, a partir del cual las condiciones biológicas son irrecuperables.

Utilización de agentes penetrantes: ACPs con bajo peso molecular, permeables a través de la membrana. Desplazan el agua intracelular evitando la formación de cristales de hielo. Se utilizan para congelaciones a velocidad lenta.

Utilización de agentes no penetrantes: Son ACPs con un alto peso molecular, y por lo tanto no permeables a través de la membrana. Promueven la rápida deshidratación celular. Se utilizan para las congelaciones a velocidades altas. Un ejemplo de ellos son los azúcares: sacarosa, glucosa, trealosa.

Controlar la velocidad de congelación: Hay que controlar la velocidad de congelación para que la formación de los cristales intracelulares sea lo menos dañina posible. Si la congelación se produce demasiado rápido se forma el hielo intracelular y si se da demasiado lento se produce el colapso celular.

Ralentizar el metabolismo celular: Para ello se trabaja a temperatura ambiente o a 4°C.

Descongelación. Para realizar la descongelación se debe utilizar una tasa suficientemente rápida, para evitar la recristalización antes del punto de cambio de fase. La presencia intra y extracelular de los ACPs suele ser tóxica a elevadas concentraciones, por lo cual la incubación post-congelación debería realizarse diluyendo la muestra en un medio isotónico.

### **Modificaciones de Volumen**

Mientras los ACPs son esenciales para la supervivencia celular durante la criopreservación, su adición y eliminación posterior crea un medio ambiente anisomótico para las células, lo que resulta en una modificación de su volumen y un potencial daño. Durante la adición de un ACP permeable a una suspensión de células, éstas se exponen a un entorno hiperosmótico. Las células primero se contraen debido al agua que sale a través de la membrana plasmática, y luego se hinchan según el ACP entra en la célula y el agua vuelve a entrar para mantener el potencial químico. Durante la eliminación de un ACP, las células inicialmente se hinchan debido a un influjo de agua, y luego vuelven lentamente a un volumen normal (isomótico) conforme el ACP y el agua salen de la célula. Los cambios repetidos en la osmolaridad pueden resultar en una pérdida significativa de la integridad funcional, tal como la motilidad espermática, o incluso la muerte celular, sin pérdida de integridad de la membrana plasmática. Además de causar daño osmótico, los ACP pueden causar pérdida de la viabilidad debido a su propia toxicidad química. En este sentido, una pérdida de motilidad de los espermatozoides puede ser el resultado de la exposición prolongada a ACPs, siendo esta sensibilidad diferente de acuerdo a cada especie (variando con respecto al tipo y concentración de los ACPs que pueden tolerar).

### **Lípidos de membrana**

Los cambios térmicos provocan modificaciones en la bicapa lipídica de las membranas espermáticas. Los lípidos permiten la difusión de diferentes solutos hasta alcanzar su temperatura crítica (temperatura de cambio de fase de cada lípido). A esta temperatura, los fosfolípidos se estructuran de tal manera que su movilidad está netamente restringida, y la función de permeabilidad se modifica.

Por otro lado, el calentamiento de las células para su descongelación produce complejos lípido-proteína diferente a los iniciales. Su localización original puede restablecerse con el tiempo, o no, modificando el comportamiento funcional de la membrana.

Se ha encontrado que aquellas especies que poseen una alta relación molar de colesterol/fosfolípidos, o un alto grado de saturación de las cadenas hidrocarbonadas unidas a esos fosfolípidos, tienen más resistencia al descongelado. Por otra parte, la baja proporción de colesterol le confiere menor fluidez a la membrana plasmática, originando mayor susceptibilidad a la separación lateral de las cadenas lipídicas, y en

consecuencia, desplazamiento de las proteínas intrínsecas durante los cambios de estado.

A pesar de los diferentes tipos de fosfolípidos encontrados en los espermatozoides, existe una relativamente pequeña variación en las temperaturas termotrópicas de la transición de fases. Estos picos ocurren entre los 20 y 25°C sin relación con la sensibilidad al choque térmico.

### **Choque Térmico**

Cuando la temperatura disminuye, ocurren cambios en el flujo de iones. Las altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular pueden disminuir la motilidad y el metabolismo espermático en general, representando así uno de los factores del “choque térmico”.

Tradicionalmente, el período de enfriamiento y equilibrio a 5°C se ha considerado como la etapa en la que los espermatozoides permanecen en contacto con el ACP, que penetra en la célula, para establecer un equilibrio intra y extracelular antes de la congelación. Pero este período no sólo incluye el equilibrio del componente crioprotector (generalmente glicerol), sino también de los componentes osmóticamente activos del diluyente. Es un intervalo necesario para que las membranas espermáticas se estabilicen en las bajas temperaturas (5°C) y toleren así el movimiento de agua que se produce a través de ellas durante la congelación. Durante este período, los fosfolípidos de las membranas deben reagruparse y desplazar parcialmente a las proteínas para que las membranas sean más resistentes. El período óptimo de equilibrio depende del tipo de azúcar y la concentración de glicerol presentes en el diluyente. En este sentido, se demostró que la presencia de rafinosa en el diluyente permite una disminución en el equilibrio de 2,5 a 1 hora. No parece haber ninguna evidencia convincente que apoye un período de equilibrio mayor.

### **Conclusiones**

El proceso de criopreservación debe ser considerado como una sucesión de eventos, con diferencias importantes entre los pasos del proceso. Así, la refrigeración de 37 a 5°C causa un tipo específico de alteración que se relaciona con la fase de transición de los lípidos de la membrana y son muy diferentes de aquéllas causadas por la congelación-descongelación, que incluye cambios mecánicos y osmóticos.

El éxito del proceso de preservación en frío depende de la capacidad para optimizar todos los parámetros puestos anteriormente de relieve: la velocidad de enfriamiento, la concentración de ACPs, el tipo de ACP a utilizar, la temperatura última de almacenamiento, la forma de recuperación (descongelación), etc. Y para ello es fundamental explorar ciertos detalles relacionados tanto con la fisiología celular (permeabilidad al agua, a los ACPs, resistencia de la membrana celular, control del

tamaño de sus poros, etc.) como con las propiedades físico-químicas de los ACPs (punto de congelación, viscosidad, toxicidad, etc.).

Como regla general podemos afirmar que aproximadamente el 50% de las células que congelamos no sobrevivirán a la descongelación. Actualmente se ha logrado superar esta etapa y de la congelación se ha pasado a la vitrificación, de tal forma que con este nuevo método se consigue que no se creen cristales de hielo y sobrevivan prácticamente la totalidad de las células inmersas en el proceso.

## REFERENCIAS

1. Aisen, E.G., Álvarez, H, Venturino, A., Garde, J.J. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram seminal diluents. *Theriogenology*, 53 (5) 1053-1061, 2000.
2. Aisen, E.G., Quintana, M.M., Medina, V.H., Morello, H., Venturino, A. Ultramicroscopic and biochemical changes of the cryoprotecting action of trehalose-based hypertonic extenders on ram sperm membrane. *Cryobiology*, 50, 239-249. 2005.
3. Benson, J.D., Woods, E.J., Walters, E.M., Critser, J.K. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology* 78, 1682–1699. 2012.
4. Cisale, H., Fernández, H.A. Crioconservación de Gametas. En "Reproducción y Obstetricia Veterinaria". Editorial Interamericana, España. 2010.
5. Guthrie, H.D., Liu, J.Critser, J.K. Osmotic Tolerance Limits and Effects of Cryoprotectants on Motility of Bovine Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 67, 1811–1816. 2002.
6. Holt, W. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53:47-58. 2000.
7. Mazur, P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular ice in frozen and thawed cells. *F. Proc.*, 24 (suppl. 15): S175-182. 1965.
8. Molinia, F., Evans, G., Maxwell, W. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluent for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology*, 42:849-858, 1994.
9. Salamon, S., Maxwell, W.M.C. Storage of ram semen - *Animal Reproduction Science* 62:77–111, 2000.
10. Watson, P.F. Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7:871-891. 1995.
11. Watson, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen - *Animal Reproduction Science* 60–61, 481–492; 2000.
12. Wharton, D.A. Supercooling and Freezing Tolerant Animals. In *Supercooling*. Prof. Peter Wilson Ed. InTech, 134 p. Rijeka. 2012.

# Cloning and Stem Cells: possibilities for species preservation

Gabriela F. Mastromonaco

Reproductive Physiology, Toronto Zoo, Toronto, Ontario, Canada

Significant advancements in embryo production technologies have occurred in the past decade. The capacity of somatic cells as genetic resources for offspring production has been demonstrated by researchers applying somatic cell nuclear transfer (SCNT) and induced pluripotent stem cell (iPSC) techniques in a variety of livestock and laboratory animal species. These methods can likewise be applied to exotic species using banked somatic cells to infuse new genetic material into captive and wild populations.

Culture and cryopreservation of somatic cells is a standard technique that has been widely applied to mammals, as well as birds, fishes, reptiles and amphibians<sup>1</sup>. Unlike gametes, somatic cells can be collected from animals that are: pre- or post-reproductive, outside of their breeding season, sterile / castrated, or died unexpectedly<sup>2</sup>. Use of somatic cell technologies, SCNT and iPSC, permits the contribution of genetic material from animals that would not have had the opportunity to produce offspring using standard reproductive technologies. Furthermore, they eliminate the need for sperm and oocytes from endangered species, which are difficult and valuable to obtain.

SCNT has been attempted in more than 30 non-domestic species from frogs to primates<sup>1</sup>. In most cases, interspecies SCNT (iSCNT) is used in which the exotic donor cell is transferred to a related domestic oocyte. This eliminates the need for oocytes from the exotic species, which are not only difficult to obtain, but in many cases, are not possible to mature in vitro. Although there are numerous challenges with this technique, including early pregnancy loss and poor neonatal survival, live offspring from diverse species have been born at similar rates to in vitro fertilization attempts. Interestingly, embryos have been produced by iSCNT in many exotic species that have not been possible to produce by in vitro fertilization (e.g. giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*), Asian black bear (*Ursus thibetanus*))<sup>1</sup>. Recently, researchers have shown the potential of SCNT to resurrect genetic resources with the birth of a Pyrenean ibex (*Capra pyrenaica pyrenaica*) from an extinct subspecies<sup>3</sup>.

iPSC is a novel technique that has gained recent interest in the field of species conservation. The ability to reprogram somatic cells in vitro into sperm or oocytes has many benefits as mentioned above, but primarily that access to the animal's sperm or oocytes is not necessary. Successful induction of stem cells from fibroblasts has already been demonstrated in several non-domestic species, including the snow leopard (*Panthera uncia*) and white rhinoceros (*Ceratotherium simum cottoni*)<sup>1</sup>. The next step is to induce the stem cells to derive gametes with the ability to fertilize and develop into viable embryos as has been done in the mouse<sup>4</sup>.

Although these novel somatic cell-based technologies are highly inefficient and costly, the possibilities provided by them are incalculable: ability to produce an inexhaustible supply of gametes and embryos, and potential to reintroduce long-dead

individuals. Collaboration between biobanks to ensure that adequate material is stored and available for research should be a priority. However, support from conservation organizations is essential in order to justify the continued investment in the development of these technologies.

## REFERENCES

- 1 Mastromonaco GF, Gonzalez L, Filice M, Comizzoli P. Somatic cells, stem cells, and induced pluripotent stem cells: How do they now contribute to conservation? In: Reproductive Sciences in Animal Conservation – Progress and Prospects, Holt WV, Brown JL, Comizzoli P (eds.). Springer 2014, in press.
- 2 Mastromonaco GF, King WA. Cloning in companion animals, non-domestic and endangered species: can the technology become a practical reality? *Reprod Fertil Dev* 2007; 19:748-761.
- 3 Folch J, Cocero MJ, Chesné P, Alabart JL, Dominguez V, Cognie Y, Roche A, Fernandez-Arias A, Marti JI, Sanchez P, Echegoyen E, Beckers JF, Bonastre AS, Vignon X. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology* 2009; 71:1026-1034.
- 4 Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M. Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science* 2012; 338:971-975.