

Consejo Directivo
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

RESOLUCIÓN Nº 353/2022

GENERAL PICO, 01 de Diciembre de 2022.-

VISTO:

La evaluación positiva enviada por las/los integrantes del Comité Científico de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, respecto del Proyecto de Investigación: *"Evaluación de la fertilidad y caracterización molecular de los procesos inflamatorios endometriales en burras utilizando inseminación artificial con semen congelado"* y,

CONSIDERANDO:

Que estará bajo la dirección del Dr. Luis LOSINNO (Facultad de Agronomía y Veterinaria-URC) y la co.dirección de la Mg. Liliana ROSSETTO, participando en carácter de Investigador/a la Dra. María Guillermina BILBAO y el M.V. Gabriel FRANCO, en carácter de Tesista la M.V. Luisina CHAPERO y en carácter de Asistentes de Investigación la M.V. Jéssica SÁNCHEZ y la y el estudiante de la carrera Medicina Veterinaria: Juliana BARTH y Pablo TORRES.

Que tendrá una duración de treinta y seis (36) meses, a partir del 01 de Enero de 2023 y hasta el 31 de Diciembre de 2025.

Que de acuerdo a la presentación el citado proyecto es de Investigación Aplicada.

Que participan en su desarrollo las cátedras Patología General y Anatomía Patológica y Reproducción Animal, el Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF), el Centro de Reproducción Animal La Pampa (CERELAP), pertenecientes a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que, además, participarán el Laboratorio de Producción Equina de la FAyV-UNRC y la Unidad Ejecutora del CONICET.

Que el citado proyecto ha sido presentado de acuerdo con las normas vigentes y aprobado por el Comité Científico de la Facultad.

Que el Artículo 5º Anexo I de la Resolución Nº 100/99 y su modificatoria Nº 88/02 del Consejo Superior UNLPam, estipula que: *"Todo Programa y todo Proyecto de Investigación que obtenga dos (2) evaluaciones externas favorables será acreditado mediante resolución del Consejo Directivo de cada Facultad a la que pertenezca"*.

Que cuenta con dos (2) evaluaciones externas satisfactorias, de acuerdo con lo previsto en la Resolución Nº 100/99 y Nº 88/02 del Consejo Superior UNLPam.

Que las evaluaciones fueron realizadas por la Dra. María Ignacia CARRERTERO (UBA) y la Mg. Valentina HYNES (UM).

Que dicho proyecto cuenta con la aprobación del formulario del protocolo institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación bajo la responsabilidad el consejo asesor institucional para el uso y cuidado de animales de experimentación (CAICUAE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa.



Corresponde a Resolución N° 353/2022

//2.-

Que en Sesión Ordinaria del Consejo Directivo del día 01 de Diciembre de 2022 puesta la acreditación del Proyecto de Investigación a consideración de los/as Sres/as. Consejeros/as, es aprobada por unanimidad.

POR ELLO:

EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

RESUELVE:

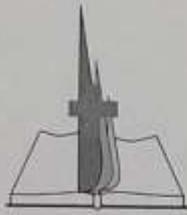
ARTICULO 1º: Acreditar como Proyecto de Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, el proyecto denominado: *"Evaluación de la fertilidad y caracterización molecular de los procesos inflamatorios endometriales en burras utilizando inseminación artificial con semen congelado"*, que se encuentra bajo la dirección del Dr. Luis LOSINNO (Facultad de Agronomía y Veterinaria-URC) y la co-dirección de la Mg. Liliana ROSSETTO, participando en carácter de Investigador/a la Dra. María Guillermina BILBAO y el M.V. Gabriel FRANCO, en carácter de Tesista la M.V. Luisina CHAPERO y en carácter de Asistentes de Investigación la M.V. Jéscica SÁNCHEZ y la y el estudiante de la carrera Medicina Veterinaria: Juliana BARTH y Pablo TORRES, el cual tiene doce (12) folios y que se adjunta como Anexo de la presente Resolución.

ARTICULO 2º: El proyecto tendrá una duración treinta y seis (36) meses, a partir del 01 de Enero de 2023 y hasta el 31 de Diciembre de 2025.

ARTICULO 3º: Justificar los gastos que se produzcan de pasajes, viáticos, combustibles, aparatos, material de laboratorio, etc., del citado proyecto.

ARTÍCULO 4º: Regístrese, comuníquese. Tomen conocimiento los/as interesados/as, Secretaría de Investigación, Posgrado y Extensión. Cumplido, archívese.

Presidencia
Consejo Directivo
Facultad de Ciencias Veterinarias UNLPam



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Plata



TITULO: EVALUACIÓN DE LA FERTILIDAD Y
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS
PROCESOS INFLAMATORIOS ENDOMETRIALES EN
BURRAS UTILIZANDO INSEMINACIÓN ARTIFICIAL
CON SEMEN CONGELADO

INTEGRANTES	FIRMA
LOSINNO, Luis	
ROSSETTO, Liliana	
BILBAO, María Guillermina	
CHAPERO, Luisina	
FRANCO, Gabriel	
SÁNCHEZ, Jésica	
BARTH, Juliana	
TORRES, Pablo	



Número de Proyecto:

Año:

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA
Facultad de Ciencias Veterinarias

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1. TÍTULO del PROYECTO: “Evaluación de la fertilidad y caracterización molecular de los procesos inflamatorios endometriales en burras utilizando inseminación artificial con semen congelado”.

1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN: Aplicada.

1.5 ÁREA DE CONOCIMIENTO: Agropecuarias y del ambiente.

1.6 SUBÁREA DE CONOCIMIENTO: Ciencias Veterinarias.

2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

2.1. AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS: Cátedra de Patología General y Anatomía Patológica, Cátedra de Reproducción Animal, Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF), Centro de Reproducción Animal La Pampa (CERELAP), de la FCV-UNLPam.

2.2. OTRAS INSTITUCIONES: Laboratorio de Producción Equina de la FayV-UNRC, CONICET-UNLPam.

2.3. EQUIPO de TRABAJO

2.3.1. INTEGRANTES

Apellido y Nombre	CUIL	Título Académico	Categ. Invest	Responsabilidad (1)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac. hs./semana
Losinno, Luis	23-12891023/9	Dr.	2	D	Lab. Prod. Equi	Asociado E	10 h
Rossetto, Liliana	23-22425321/4	Mg.	-	CD	Reproducción	Adj. E	10 h
Bilbao, María Guillermina	27-28004454/2	Dra.	4	I	CONICET	Adj. E	2 h
Chapero, Luisina	27-35592598/1	MV	-	Tesista	Patología Gral.	Ay. 1° S	10 h
Franco, Gabriel	20-34951040/6	MV	-	I	Reproducción	Adsc. Prof.	2 h
Sánchez, Jéssica	27-31192607/7	MV	-	AI	Patología Gral.	Ay. 1° S	2 h
Barth, Juliana	27-39942614/1	Est.	-	AI	FCV UNLPam	-	2 h
Torres, Pablo	20-36201749/2	Est.	-	AI	FCV UNLPam	-	2 h

D: Director, CD: Co-Director, A: Asesor, I: Investigador, AI: Asistente de Investigación.

2.3.1. BECARIOS:

Apellido y Nombre	Organismo que Financia	Tipo de Beca	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem

2.3.2. TESISTAS:

Apellido y Nombre	Título Académico al que Aspira	Título Proyecto de Tesis	Organismo	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem
Chapero, Luisina	Doctora	"Estrategias biotecnológicas para incrementar la eficiencia reproductiva en burros en programas de mejoramiento genético para la producción de leche"	CONICET	Losinno, Luis	40 h

2.3.3. PERSONAL de APOYO:

Apellido y Nombre	Categoría (Adm., Lab., Campo, etc.)	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
Sánchez Jérica	Laboratorio	2 h

2.3.4. INVESTIGADORES en PLAN de TESIS:

Apellido y Nombre	Función	Título Proyecto de Tesis	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
	Director Co-Director Tesis		

3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO:

3.1. FECHA de INICIO: 01/01/2023

FINALIZACIÓN: 31/12/2025

4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)

La producción de burros (*Equus asinus*) está generando interés científico y tecnológico como animales productores de leche para consumo humano. Los resultados *in vitro* obtenidos congelando semen de burro han sido satisfactorios, pero al momento de inseminar burras, las tasas de preñez son significativamente más bajas que cuando se utiliza para inseminar yeguas. El objetivo de este proyecto es estudiar las causas de subfertilidad en burras inseminadas con semen congelado, mediante la caracterización de los procesos inflamatorios del endometrio con técnicas de diagnóstico molecular. La hipótesis de trabajo es que la inseminación con semen congelado produce una endometritis persistente en las burras debido a un desbalance entre los mecanismos de respuesta inflamatoria frente a los espermatozoides dañados por la criopreservación en ausencia de plasma seminal (PS), lo que conduce a la subfertilidad. Se evaluará el efecto de diferentes medios de congelación con PS (0%, 10% y 20%) sobre la calidad del semen post descongelado. Una vez hallado el método más efectivo, se inseminarán burras para tomar muestras del endometrio y analizar citoquinas pro y antiinflamatorias (interleuquinas 1 β , 6, 8, 10 y factor de necrosis tumoral α). A su vez, se diagnosticará la presencia de vesícula embrionaria para determinar fertilidad.

4.1 Palabras claves: burros, semen criopreservado, endometritis

4.2 Abstract en Inglés: (Máximo 200 palabras)

The production of donkeys (*Equus asinus*) is generating scientific and technological interest as animals that produce milk for human consumption. *In vitro* results obtained by freezing donkey semen have been satisfactory, but when inseminating jennies, pregnancy rates are significantly lower than when used to inseminate mares. The aim of this project is to study the causes of subfertility in jennies inseminated with frozen semen, by characterizing the inflammatory processes of the endometrium with molecular diagnostic techniques. The working hypothesis is that insemination with frozen semen produces persistent endometritis in jennies due to an imbalance between the inflammatory response mechanisms against sperm damaged by cryopreservation in the absence of seminal plasma (SP), which leads to subfertility. The effect of different freezing media with SP (0%, 10% and 20%) on post-thaw semen quality will be evaluated. Once the most effective method has been found, donkeys will be inseminated to take samples of the endometrium and analyze pro- and anti-inflammatory cytokines (interleukin 1 β , 6, 8, 10 and tumor necrosis factor α). In turn, the presence of an embryonic vesicle will be diagnosed to determine fertility.

4.3. Key words: donkeys, frozen semen, endometritis

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

5.1. Introducción

Según diferentes estimaciones, entre 220 y 520 millones de personas padecen de alergias alimentarias (AA) en el mundo (ISAAC, 2006; OMS, 2009). Más frecuentes en la población pediátrica que en la adulta, han sido calificadas como un problema emergente de salud pública (Renz, 2018). Los cambios de prevalencia en términos de tasas de internación por cada millón de habitantes aumentaron de 16 a 107 específicamente por alergia alimentaria pediátrica (Gupta, 2011), lo que claramente marca una tendencia creciente, (0,5-4%) en niños de hasta un año de edad (Flom, 2019). En Argentina, en un estudio retrospectivo de prevalencia en niños, pacientes del Hospital Italiano de la ciudad de Buenos Aires, entre los años 2004 y 2014, Meyhaudi et al. (2018) determinaron que en el 68,7% de los casos, los síntomas iniciaron al momento de la incorporación de leche modificada comercial estándar a la dieta del niño. La prevalencia promedio en el periodo en estudio se triplicó en 10 años (0,4% a 1,2%). Ha sido reportado en múltiples publicaciones, que la alergia a la proteína de la leche de vaca (APLV), puede generar severos trastornos en el crecimiento y desarrollo de los niños, que persisten hasta la vida adulta debido a desequilibrios en micronutrientes esenciales y proteínas (Robbins, 2014). En la actualidad se considera que no hay una fuente única, integral, perfectamente balanceada y adecuada para la alimentación de niños con APLV que no puedan ser amamantados por sus madres hasta por lo menos el año de edad. La leche de burra es considerada por la Unión Europea como una alternativa válida debido a su composición muy semejante a la leche humana y por sus múltiples compuestos bioactivos. Su estudio para el desarrollo de fórmulas alternativas para niños lactantes con APLV, debería considerarse como una prioridad para que éstos puedan acceder a productos de calidad y de mercado nacional para su consumo, tales como leche cruda pasteurizada congelada, en polvo y como base de fórmulas balanceadas para diferentes etapas de los lactantes (Losinno y Flores, 2019). Las reacciones cruzadas con alérgenos de la leche de varias especies de mamíferos adquieren importancia clínica, y la mayor homología se encuentra entre la proteína de la leche de vaca, oveja y cabra dado que *Bos* (bovinos), *Ovis* (ovinos) y *Capra* (caprinos) son géneros que pertenecen a la familia de rumiantes Bovidae. Las proteínas de las leches de la familia Bovidae poseen menor similitud estructural con la leche humana en comparación con las provenientes de las familias de Suidae (cerdo), Equidae (caballo y burro) y Camelidae (camello y dromedario).

La revalorización de la leche de burra como alimento, ha incentivado la producción en países como Italia, Francia, Croacia, Albania, Bulgaria, Grecia, Turquía y Túnez entre otros. En Sudamérica, sobre una población de 442 millones de habitantes y 3 millones de burros (FAO, 2018), hemos identificado menos de 7 emprendimientos comerciales de producción de leche de burra (sólo uno en Argentina, en la provincia de Catamarca), la mitad de ellos de pequeña escala (menos de 30 animales en ordeño) y

un total de aproximadamente 800 burras productivas en el continente, todos orientados a la producción para consumo humano y en particular niños con APLV. La producción (casi inexistente) de leche de burra en Sudamérica debería ser objeto de estudios clínicos en centros hospitalarios locales para que estos niños afectados puedan acceder a productos de calidad y de mercado nacional e inclusive para su exportación a países de la región. Según el informe de SENASA de marzo de 2020, Argentina tiene un stock de 62.217 burros. Nuestro país cuenta con las posibilidades agroecológicas suficientes y óptimas para la producción de leche de burra, en particular en áreas áridas o semiáridas, y bajo el formato de pequeñas producciones sustentables dado que la especie es de alta adaptabilidad y bajos requerimientos nutricionales. Con esto, podríamos contribuir al desarrollo socioeconómico de áreas marginales y a generar un producto natural de origen rural que podría ser una alternativa para los niños con APLV (Losinno y Flores, 2019).

Durante años, los burros han sido una de las especies domésticas más relegadas por la ciencia, dado que su rusticidad y su utilización por los pueblos más pobres del planeta como transporte no los mostraban “atractivos” desde el punto de vista de la “Producción Animal” y para las inversiones en proyectos científico-tecnológicos. Debido a esto, la era de las biotecnologías reproductivas, que crecieron exponencialmente desde la segunda mitad del siglo pasado en animales domésticos, los encuentra sin el sustento científico-tecnológico para aplicar programas de mejoramiento genético. Realizando una búsqueda en la plataforma www.sciencedirect.com sólo con la palabra clave “donkey” se encuentran 49.774 artículos científicos, 28.613 corresponden a la última década, de los cuales 4.196 se encuentran con las palabras claves “donkey milk production” y 478 con “donkey reproduction biotechnologies”.

Mejorar el manejo de la cría en burros, que incluye el uso de biotecnologías de reproducción asistida, como la inseminación artificial (IA) y la criopreservación del semen, es crucial para la selección y conservación genética (Papas, 2019). Las biotecnologías que se aplican en burros están adaptadas de aquellas utilizadas en equinos (Oliveira, 2006), y su investigación es reciente e incipiente. Los resultados insatisfactorios probablemente se deban a las diferencias anatómicas y fisiológicas entre estas especies. Las tasas de preñez, cuando se utiliza semen congelado, son significativamente más bajas que cuando se utiliza semen fresco o refrigerado (Watson, 2000). Además, el uso de semen congelado, induce una reacción inflamatoria más severa en el útero de la burra que el semen fresco (Kotilainen, 1994). A pesar de la excelente calidad del semen fresco, las tasas de preñez en burras utilizando semen congelado de burro siguen siendo bajas (0-36%) en comparación a las tasas de preñez en yeguas inseminadas con el mismo semen (33-53%) (Oliveira, 2006; Vidament, 2009). El semen es el principal responsable de la respuesta inflamatoria uterina, desencadenando una fuerte quimiotaxis de polimorfonucleares (PMN), así como la expresión de citoquinas proinflamatorias poco después de la inseminación (Canisso, 2020). Ésta es una respuesta inflamatoria fisiológica del endometrio para eliminar del útero el exceso de espermatozoides y otros detritus. La inflamación se caracteriza por una afluencia de PMN que comienza aproximadamente 30 minutos después del servicio/inseminación. La respuesta máxima ocurre después de 12 horas y disminuye dentro de otras 12 a 24 horas. Las respuestas inmunes agudas están moduladas por citoquinas proinflamatorias como la interleuquina-1 β (IL-1 β), la interleuquina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF α). La endometritis post servicio es una respuesta que ocurre consistentemente después de la inseminación en cerdas y yeguas. A pesar de la filogenia cercana, esta respuesta inflamatoria aguda es más pronunciada en las burras que en las yeguas (Viles, 2013), y puede ser responsable de las bajas tasas de preñez cuando se utiliza semen congelado de burro (Canisso, 2019). Las bajas tasas de preñez logradas en los estudios que utilizan semen de burro congelado en burras, indican la necesidad de realizar más investigaciones para mejorar las técnicas de criopreservación de semen y los protocolos de inseminación artificial (Oliveira, 2015). Aún no hay suficientes estudios para determinar la influencia de la endometritis post servicio en la fertilidad posterior como sí ocurre en los equinos (Miró, 2020). La congelación de semen de burro, la criopreservación de embriones y la fertilización in vitro de ovocitos (ICSI) todavía están en las fases iniciales de desarrollo (Panzani, 2020).

El desarrollo de la producción de esta especie en nuestro país sería científicamente novedoso, productivo y con impacto social en lo referido a salud pública y generación de trabajos en toda la cadena productiva, para lo que es necesario contar con programas de mejoramiento genético para seleccionar los progenitores con mayor mérito genético; sin embargo, no habrá multiplicación eficiente si no podemos utilizar biotecnologías reproductivas con eficacia. El primer problema a resolver es la incorporación de individuos genéticamente superiores. Por lo tanto, este proyecto pretende clarificar determinados eventos reproductivos que generan infertilidad o baja eficiencia reproductiva, aplicando biotecnologías de tercera y cuarta generación. El estudio de la endometritis y su tratamiento en burras podría mejorar el éxito de las biotecnologías reproductivas y en particular del semen congelado. Sería interesante explorar qué mecanismos de la respuesta inflamatoria endometrial se ven afectados por la presencia de plasma seminal en burras, ya que este conocimiento podría contribuir a mejorar la fertilidad. Esta situación, que es dramática para el mantenimiento de la diversidad genética, lleva a cuestionar los procesos de la criopreservación de los espermatozoides de burro, la capacidad de las burras para preñarse con semen congelado y, en consecuencia, la validez de los métodos actuales de criopreservación.

5.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR el(los) INTEGRANTE(S) del PROYECTO DENTRO del ÁREA de CONOCIMIENTO del MISMO: (Publicados, enviados o aceptados para publicar, o inéditos)

Miragaya M, Bartolome J, Rossetto L, Zapata L, Bilbao MG, Chapero L, Pensotti M, Jauge C. "Determinación de parámetros reproductivos de padrillos de raza criolla en entrenamiento intensivo". Jornada de Ciencia y Técnica. Noviembre de 2018. <http://www.unlpam.edu.ar/images/InvestigacionPosgrado/ciencia-ytecnica/Resumenes%20de%20la%20Jornada%20CyT%202018.pdf>

- Boeris M, Bilbao MG, Marengo ML, Chapero L, Anconetani M, Schwindt C, Rossetto L, Cura S, Farcey MF, Zapata L, Ramos S, Molejón MI, Weiz G, Aimar-Chiesa I, Fernandez I, Bartolomé J, Breccia J. "Efecto de la proteína anticongelante anti-freeze protein III sobre la criopreservación y las curvas de descongelado de semen porcino". Jornada de Ciencia y Técnica. Noviembre de 2018. <http://www.unlpam.edu.ar/images/InvestigacionPosgrado/ciencia-ytecnica/Resumenes%20de%20la%20Jornada%20CyT%202018.pdf>
- Chapero LA, Marengo ML, Rossetto L, Nicolás A, Ramos S, Fernández F, Aimar-Chiesa I, Bilbao MG, Boeris MA. "Efecto de la centrifugación refrigerada como método de concentración sobre la calidad del semen porcino". IX jornadas de jóvenes investigadores. InVet Vol. 21 N° 1, 2019. ISSN 1514-6634 ISSN 1668-3498. <http://www.fvet.uba.ar/archivos/publicaciones/invet/vol21-1-2019/JORNADAS-JOVENES-2019.pdf>
- Rossetto L, Farcey MF, Chapero LA, Bilbao MG, Bartolome J, Miragaya M. "Hormonal levels and semen parameters of Criollo breed stallions under intensive training". Journal of Equine Veterinary Science. Volume 89, June 2020, 103046. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103046>
- Chapero LA, Pietrani M, Losinno L. Diagnóstico de endometritis en la yegua. Reflexiones y evidencias sobre los métodos y sus resultados. Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental. Facultad de Ciencias Agrarias. UNLZ. Vol. 7 (4) 2020: 89-107
- Rossetto L, Farcey MF, Chapero LA, Bilbao MG, Bartolome J, Miragaya M. "Hormonal levels and semen parameters of Criollo breed stallions under intensive training". Póster 10th International Symposium of Equine Embryo Transfer and Technology (ISEET) 2022.

5.3. TRABAJOS de INVESTIGACIÓN de los INTEGRANTES del EQUIPO, EN ESTA U OTRA INSTITUCIÓN, RELACIONADOS al PROYECTO:

"Desarrollo de sistemas de producción y procesamiento de pequeña y mediana escala y caracterización primaria de calidad de leche de burra para consumo humano (niños con alergia a la proteína de la leche de vaca -APLV-)"(2021). Director: Dr. Luis Losinno, UNRC. Aprobado y financiado por el

Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación, programa "Ciencia y Tecnología contra el hambre". En conjunto con la Universidad Nacional de Villa María.

6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

6.1. PROBLEMA CIENTÍFICO, OBJETIVOS, HIPÓTESIS y RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

Debido a que la baja tasa de preñez obtenida cuando se utiliza semen criopreservado es un cuello de botella para el alcance del mérito genético en zonas remotas, nos proponemos trabajar bajo la **hipótesis** de que la inseminación con semen congelado produce una endometritis persistente en las burras debido a un desbalance entre los mecanismos de respuesta inflamatoria frente a los espermatozoides dañados por la criopreservación en ausencia de plasma seminal, lo que conduce a la subfertilidad.

El **objetivo general** es identificar y desarrollar biotecnologías que contribuyan a mejorar la eficiencia reproductiva de la especie, por estudiar las causas de subfertilidad en burras inseminadas con semen congelado en comparación con los métodos que incluyen plasma seminal, mediante la caracterización de los procesos inflamatorios del endometrio con técnicas de diagnóstico molecular.

Para ello nos guiaremos en el trabajo a campo y en el laboratorio de acuerdo a los siguientes **objetivos específicos**:

1. Caracterizar los métodos de evaluación espermática en semen de burro post descongelado.
2. Evaluar diferentes protocolos de congelación de semen de burro para lograr dosis inseminantes con tasas de preñez superiores a 50% por ciclo.
3. Comparar el impacto de diferentes estrategias de congelado de semen sobre los eventos histológicos y moleculares relacionados con el estado inflamatorio del endometrio y su efecto sobre la fertilidad.

Con este proyecto se esperan hallar estrategias alternativas a las existentes que permitan identificar protocolos de congelación de semen de burro sin que se comprometa significativamente su potencial fertilizante y abastecimiento del mismo a zonas remotas.

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS

Animales. Se utilizarán eyaculados de un total de 5 burros, y 10 burras.

Materiales, equipamiento y procedimientos.

a. Procesamiento y acondicionamiento del semen fresco: Se realizará extracción de semen a 5 burros entrenados con vagina artificial tipo Missouri. Luego de la eliminación de la fracción de gel se medirá el volumen y se tomará una alícuota de 5 ml para obtener plasma seminal (PS). Estos 5 ml se centrifugarán a 1,000 g por 10 minutos para obtener el PS (Rota, 2011). Se evaluarán parámetros del semen crudo como: 1) concentración, por conteo en cámara de Neubauer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Alemania); 2) morfología, que se evaluará con tinción húmeda de solución salina bufferada formolada (BSF); 3) motilidad total y progresiva utilizado el software computarizado iSperm® Equine - J1470 (Dini, 2019).

b. Procesamiento y acondicionamiento del semen congelado: El resto del semen del punto anterior se diluirá en una fracción 1:1 con Equiplus (Minitube). Luego se centrifugará a 600g por 10 minutos. El pellet se diluirá a una concentración de 200×10^6 espermatozoides viables/ml en un medio con Equiplus, 5% de dimetilformamida y 2% de yema de huevo. Se identificarán los siguientes tratamientos: 1) Control, sin agregado de PS homólogo (0% PS); 2) Grupo 10: con agregado de 10% PS homólogo; y 3) Grupo 20: con agregado de 20% de PS homólogo. A su vez se empaquetará en pajuelas de semen de 0,5 ml que se mantendrán a una temperatura de 5°C por 20 minutos. Se programará una curva de congelación de -15°C/ min de 5°C a -10°C y de -40°C/ min entre -10°C y -140°C (Oliveira, 2006) en una congeladora de semen automática (Cryogen®). Se conservarán en nitrógeno líquido a -196°C hasta su uso. El descongelamiento se hará a 37°C por 30 segundos.

c. Métodos de evaluación espermática en semen de burro post descongelado: Los parámetros de cinética espermática post descongelado serán evaluados por medio iSperm®. Para determinar la viabilidad e integridad de la membrana plasmática post descongelado se tratarán los espermatozoides con fluorocromos para evaluar vivos/muertos (SYBR-14), permeabilidad de la membrana (YO-PRO-1) e integridad el acrosoma (Lectin from *Pisum sativum*), que se analizarán mediante citometría de flujo (Peña, 2016).

d. Inseminación artificial de burras: Se determinará el momento del ciclo estral de 10 burras mediante ecografía transrectal (Honda HS 1600V) para evaluar el momento adecuado para inseminar con semen congelado. Se tomarán registros de la dinámica de los folículos ováricos y del estado del útero, teniendo en cuenta la presencia o no de fluido intrauterino y de edema, graduando este último en una escala del 1 al 4 (Vidament, 2009). Se inducirá la ovulación con una dosis de 400 µg de buserelina subcutánea (Panzani, 2020). La inseminación se realizará entre las 0 a 6 horas post ovulación, de manera profunda en el cuerno ipsilateral del folículo ovulado y a una concentración de 500×10^6 espermatozoides viables por dosis.

e. Comparación el impacto de diferentes estrategias de congelado de semen sobre los eventos histológicos y moleculares relacionados con el estado inflamatorio del endometrio y su efecto sobre la fertilidad: Las muestras uterinas se tomarán 72 horas pre IA y a las 24 horas post IA (Fumuso, 2006). Las muestras para citología endometrial se tomarán mediante lavaje uterino con 250 ml de ringer lactato (Vilés et al., 2013). El efluente recuperado será centrifugado a $660 \times G$ por 15 minutos y con el pellet se realizará un extendido sobre un portaobjetos. Las muestras se teñirán con una coloración panóptica (Color FastKit, Biopack®). El porcentaje de PMN se determinará respecto de 200 células nucleadas (presumiblemente endometriales, macrófagos, linfocitos y PMN) bajo una magnificación de 400x (Nikon, Eclipse Ni, Tokio, Japón). El estado del endometrio será evaluado con dos muestras tomadas con una pinza de biopsia Wittner para histología. Una de estas muestras se colocará en formol bufferado al 10 % y luego de ser incluida en parafina y cortada será teñida con hematoxilina-eosina, se evaluarán y cuantificarán los cambios histopatológicos siguiendo la escala de Schoon (1992) para equinos. Se comparará el nivel de expresión génica de marcadores de inflamación o de regeneración de endometrio por qPCR. Para extraer mRNA de cada animal se utilizará la segunda muestra tomada por biopsia, que hasta el momento de la extracción, se almacenará a -196°C en nitrógeno líquido. Se recolectarán células del epitelio endometrial para cuantificación de la expresión de genes indicadores de inflamación ex vivo. Por qPCR se evaluará la expresión de interleuquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral α (TNF α) e interleuquina antiinflamatoria IL-10 (Schöniger, 2020). Los controles se realizarán sobre burras no inseminadas (grupo A); inseminadas solamente con plasma seminal sin contenido espermático conservado a -18°C hasta su uso (grupo B); inseminadas con semen congelado sin PS (grupo C), semen congelado con 10% de PS (grupo D) y semen congelado con 20% de PS (grupo E). El porcentaje de preñez se evaluará mediante ecografía transrectal, la presencia de vesícula embrionaria a los 15 días post ovulación para evaluar fertilidad post IA.

El análisis estadístico para el objetivo 1 se realizará estadística descriptiva. Para los objetivos 2 y 3, la variable independiente será el tratamiento (grupo control, grupo 10 y grupo 20), y las variables respuesta serán porcentajes de preñez, evaluación histológica y citológica, y niveles de expresión de genes proinflamatorios. La preñez se analizará por regresión logística, las variables discretas por regresión de Poisson y las variables continuas por ANOVA de un factor seguido del post-test de Duncan, o por estadística no paramétrica en caso de no seguir una distribución normal. Se considerarán diferencias significativas $s P < 0.05$ y tendencias cuando $0.05 \leq P < 0.1$.

NOTA: Para las actividades descritas en el punto "c" se contará con el apoyo técnico del Laboratorio de Biotecnologías Aplicadas a la Reproducción Animal, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-INTECH) de la Universidad Nacional de San Martín (Dra. Claudia Osycka).

6.3. **CONTRIBUCIÓN al CONOCIMIENTO CIENTÍFICO y/o TECNOLÓGICO y a la RESOLUCIÓN de los PROBLEMAS**

Hasta el momento hay escasos estudios que determinen las características seminales del burro evaluadas post descongelado, del uso del iSperm para evaluar la cinética espermática, y no hay reportes del uso del citómetro de flujo en el semen de esta especie ni del estudio molecular de los procesos inflamatorios del endometrio post IA con semen congelado. Por lo tanto el presente trabajo contribuiría en aportar a la comunidad científica y de veterinarios un trabajo que permita comprender y evaluar y mejorar los parámetros reproductivos de los burros.

6.4. **CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES**

ACTIVIDADES	MESES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AÑO 1												
Entrenamiento de los animales		X	X									
Extracción de semen				X	X	X	X					
Evaluación macro y micro de semen fresco				X	X	X	X					
Criopreservación de semen						X	X					
Análisis de resultados								X	X	X	X	
Revisión bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
AÑO 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Evaluación micro pos descongelado					X	X	X	X				
Comparación CASA vs iSperm					X	X	X	X				
Análisis de resultados									X	X	X	X
Comunicación parcial de los resultados												X
Revisión bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
AÑO 3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Inseminación artificial (IA)		X	X	X	X							
Toma de muestras uterinas pre y pos IA		X	X	X	X							
Evaluación del potencial fertilizante del semen		X	X	X	X							
Evaluación de la expresión génica en el endometrio						X	X	X	X	X		
Análisis de resultados									X	X	X	X
Comunicación parcial de los resultados												X
Revisión bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

7. **INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO**

7.1. **INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES REQUERIDOS por el PROYECTO YA EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN:**

La extracción de semen e inseminación artificial se realizarán en la UDEP. Para el análisis de semen y de marcadores moleculares de inflamación se requerirá de equipamiento perteneciente a la Cátedra de Reproducción y CIDEF. Para el llenado de pajuelas y la criopreservación y almacenamiento de semen se utilizará equipamiento del CERELAP. Para el estudio de cortes histológicos de útero se requerirá del equipamiento perteneciente a la Cátedra de Patología General y Anatomía Patológica.-

7.2. **INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES NECESARIOS para el PROYECTO y NO DISPONIBLES en esta FACULTAD**

Para la estimación de los parámetros de motilidad total y progresiva objetiva se requiere del iSperm (Laboratorio de Producción Equina, FAyV, UNRC), y para la validación del mismo del CASA (IBB-INTECh, UNSam). Para la criopreservación del semen se requiere de una congeladora de semen automática Cryogen® (Laboratorio de Producción Equina, FAyV, UNRC). Para la evaluación de los parámetros de viabilidad, integridad de la membrana y estado del acrosoma se requiere de un citómetro de flujo (IBB-INTECh, UNSam).

7.3. JUSTIFICACIÓN de la ADQUISICIÓN o FACTIBILIDAD de ACCESO en CONDICIONES de PRESTAMO o USO de los BIENES NO EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN

7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN

Por el momento, no se disponen de otras fuentes de financiación.

7.5. PRESUPUESTO ESTIMADO para el PROYECTO PRESENTADO (Anual y Total)

AÑO 1	
Equipamiento e Infraestructura.....	\$
Bienes de Consumo.....	\$ 100.000
(alcohol 70°, guantes de látex, guantes de tacto, algodón, bolsas estériles, cubetas iSperm, cubreobjetos, porta objetos, detergente enzimático, tips, dimetilformamida, eppendorf, equiplus, botucro, gel estéril, gel de tacto, nitrógeno líquido, pajuelas de 0,5 ml, alcohol polivinílico, pipetas pasteur, tubos de 15 y 50 ml, formol, primers, prostaglandina, estrógeno, buserelina, tinciones)	
Bibliografía.....	\$
(publicaciones)	
Viajes.....	\$
(combustible, presentación de resultados en congresos)	
Personal de Apoyo	\$
Otros (especifique)	\$
AÑO 2	
Equipamiento e Infraestructura.....	\$
Bienes de Consumo.....	\$ 100.000
(alcohol 70°, guantes de látex, guantes de tacto, algodón, bolsas estériles, cubetas iSperm, cubreobjetos, porta objetos, detergente enzimático, tips, dimetilformamida, eppendorf, equiplus, botucro, gel estéril, gel de tacto, nitrógeno líquido, pajuelas de 0,5 ml, alcohol polivinílico, pipetas pasteur, tubos de 15 y 50 ml, formol, primers, prostaglandina, estrógeno, buserelina, tinciones)	
Bibliografía.....	\$
(publicaciones)	
Viajes.....	\$
(combustible, presentación de resultados en congresos)	
Personal de Apoyo	\$
Otros (especifique)	\$
AÑO 3	
Equipamiento e Infraestructura.....	\$
Bienes de Consumo.....	\$ 30.000
(alcohol 70°, guantes de látex, guantes de tacto, algodón, bolsas estériles, cubetas iSperm, cubreobjetos, porta objetos, detergente enzimático, tips, dimetilformamida, eppendorf, equiplus, botucro, gel estéril, gel de tacto, nitrógeno líquido, pajuelas de 0,5 ml, alcohol polivinílico, pipetas pasteur, tubos de 15 y 50 ml, formol, primers, prostaglandina, estrógeno, buserelina, tinciones)	
Bibliografía.....	\$ 20.000
(publicaciones)	
Viajes.....	\$ 50.000
(combustible, presentación de resultados en congresos)	
Personal de Apoyo	\$
Otros (especifique)	\$
TOTAL.....	\$ 300.000

* El Consejo Directivo adjudicará presupuesto a cada Proyecto de acuerdo a su Presupuesto de Ciencia y Técnica anual, tomando en cuenta normas y criterios que el mismo determine.

8.1. BIBLIOGRAFÍA

- Canisso IF, Panzani D, Miró J, Ellerbrock RE. (2019) Key aspects of donkey and mule reproduction. Vet Clin Equine 35 607–642 <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2019.08.014>

- Cocchia N, Paciello O, Auletta L, Uccello V, Silvestro L, Mallardo K, et al. (2012) Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology* 2012;77:89–98.
- Dini P, Troch L, Lemahieu I, Deblende P, Daels P. (2019) Validation of a portable device (iSperm®) for the assessment of stallion sperm motility and concentration. *Reprod Dom Anim.* 2019;54:1113–1120. <https://doi.org/10.1111/rda.13487>
- Fumuso E, Aguilar J, Giguere S, David O, Wade J, Rogan D. (2006) Interleukin-8 (IL-8) and 10 (IL-10) mRNA transcriptions in the endometrium of normal mares and mares susceptible to persistent post-breeding endometritis. *Animal Reproduction Science* 94 282–285 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.04.006>
- Kotilainen T, Huhtinen M, Katila T. (1994) Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology* 41, 3, 2 [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90173-G](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90173-G)
- Machado Dornelles J, Flores Bragulat AP, Alonso C, Losinno L. (2020) Inseminación artificial con semen congelado en burros. *Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental, UNLZ.* Vol. 7 (4) 2020: 157-166
- Miró J, Marín H, Catalán J, Papas M, Gacem S, Yeste M. Seminal plasma, sperm concentration, and sperm-PMN interaction in the donkey: an in vitro model to study endometrial inflammation at post-insemination. *Int. J. Mol. Sci.* (2020) 21, 3478 <https://doi.org/doi:10.3390/ijms21103478>
- Panzani D, Fanelli D, Camillo F, Rota A. Embryo technologies in donkeys (*Equus Asinus*). (2020) *Theriogenology* 156 130e137 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.041>
- Papas M, Catalan J, Barranco I, Arroyo L, Bassols A, Yeste M, Miró J. (2019) Total and specific activities of superoxide dismutase (SOD) in seminal plasma are related with the cryotolerance of jackass spermatozoa. *Cryobiology* <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.11.043>
- Peña FJ, Ortega Ferrusola C, Martín Muñoz P. (2016) New flow cytometry approaches in equine andrology. *Theriogenology* 1–7 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.050>
- Oliveira JV, Alvarenga MA, Melo CM, Macedo LM, Dell’Aqua Jr JA, Papa FO. (2006) Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. *Animal Reproduction Science* 94 82–84 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.04.010>
- Rota A, Panzani D, Sabatini C, Camillo F. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. (2012) *Theriogenology* 78:1846e54. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.07.015>
- Schöniger S, Schoon HA. (2020) The healthy and diseased equine endometrium: a review of morphological features and molecular analyses. *Animals* 10, 625 <https://doi.org/10.3390/ani10040625>
- Schoon HA, Schoon D, Klug E. (1992). Uterusbiopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute. *Pferdeheilkunde* 8, 355–362.
- Vidament M, Vicent P, Marton RX, Magistrini M, Blesbois E. (2009) Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Animal Reproduction Science*
- Vilés K, Rabanal R, Rodríguez-Prado M, Miró J. (2013) Influence of seminal plasma on leucocyte migration and amount of COX-2 protein in the jenny endometrium after insemination with frozen–thawed semen. *Animal Reproduction Science* <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.11.002>

- Watson PF. (2000) The causes of reduce fertility with cryopreservation semen. Anim Reprod Sci 2000;60:481-92