

7th PERUVIAN CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION
7mo CONGRESO PERUANO DE REPRODUCCION ANIMAL

2018. Cusco- Perú
 05 a 07 de septiembre
 PARANINFO UNIVERSITARIO

PONENTES -SPEAKERS

PERÚ	Dr. Ahmed Tibary, PhD
BRASIL	Dr. William Vivanco, PhD
MEXICO	Dr. José F. García, PhD
CANADÁ	Dr. Teodosio Huanca, PhD
URUGUAY	Dr. Pablo Wappner, PhD
ARGENTINA	Dr. Atevel Santiani, PhD
ESTADOS UNIDOS	Dr. Ignacio Aguilar, PhD.
	Dr. Jaime Ruiz Bejar, PhD
	Dr. José A. Delgado, PhD
	Dr. Pedro Jorge Ntola, MBA
	Dr. Jenin Cortez P., MSc
	Dr. Patrick Blondin, PhD
	Dr. Guido Pérez D., PhD
	Dr. Alejo Menchaca, PhD
	Dr. Joao M. Viana, PhD
	Ing. Hernán Cucho, MSc.
	Dr. Miguel Quevedo

+51.939050332
 +56.953827817

congreso.aspra@gmail.com

ORGANIZAN
 ASPRA IETS UNSAAC

AUSPICIAN
 Andeanvet GLORIA INNOVACION Avianca

www.reproduccionanimal.blog

Proceedings of the VI Peruvian Congress Animal Reproduction of the Asociación Peruana de Reproducción Animal (ASPRA), Cusco, Peru, September 5 to 7th, 2018

DOI. 10.18548/aspe/0006.08

Dear Colleagues,

We are pleased to formally present the Proceedings of the VI Peruvian Congress Animal Reproduction of the Asociación Peruana de Reproducción Animal (ASPRA). We hope you enjoy the meeting and take advantages of the opportunity to gain new scientific insights, renew friendships and make new contacts. The organizers are pleased with SPERMOVA editors and staff for the support of included abstract of our congress. Our goal of this publication of abstracts in English Language, is to encourage students and researchers the adoption of English as the universal language of science. Similar to the previous year, this event was planned considering both the Organizer Committee along with the members of Scientific Committee has brought together diverse topics and speakers to stimulate thoughts and discussion. In addition to the traditional plenary, we will have roundtables to discuss relevant issues are also part of the program.

The abstracts were classified into 4 themes:

1. Application biotechnology
2. Spermatozoa function
3. Oocyte function
4. General diversity

We also want to thank all the speakers who have agreed to attend this meeting and share their knowledge with us. My special thanks for all ASPRA Board and collaborators, whom have turned this meeting in to a reality.

Kind regards

Edwin Mellisho
 President
 (2018-2019)

1. Application biotechnology

#1802. EFFECT OF INTRARUMINAL SELENIUM ON THE ACTIVITY OF GLUTATHIONE PEROXIDASE, CALVING TO FIRST SERVICE INTERVAL AND PRODUCTION OF DAIRY CATTLE

Efecto de selenio intraruminal en la actividad de glutatión peroxidasa, intervalo parto primer servicio y producción de leche en bovinos

G. Bianchini^{1*}, E. Frana¹, M. Vega¹, S. Bernardi^{1,2}, P.R. Marini^{1,2}

¹Investigador Centro Latinoamericano de Estudios de Problemáticas Lecheras (CLEPL). ²CIC-Universidad Nacional de Rosario. Argentina. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

* Corresponding author: pmarini@unr.edu.ar

ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate the effect of the use of intraruminal selenium on the activity of glutathione peroxidase, calving to first service interval and milk production in cattle. The investigation was carried out from September to December 2017, with 55 primiparous and multiparous clinically healthy Holstein cows from a commercial branch in Centeno, province of Santa Fe, Argentina. The productive system corresponds to a completely closed rodeo, with an average production of 28 daily liters per cow, with a diet provided at the corral with the following formula: Alfalfa roll 1.3 Kg, wet corn 4.8 Kg, soybean expeller 2.2 Kg, maize silage 5.2 Kg, soybean silage 3.2 Kg, cottonseed 1.3 and alfalfa pasture 4.2 Kg (dry matter basis). Cows were divided into two random groups (all were in similar dry period): G1 (n=27) with no intraruminal bolus and G2 (n=28) with intraruminal bolus of bovine long action selenium, PERMATRACE®. The same day the bolus was placed (60 days before calving) paired samples of blood with no anticoagulant were taken from both groups, afterwards, every 30 days; twice from the first sample (30 d before calving and 30 d after calving). The blood was obtained from the coccygeal vein, using sterile needles and syringes. The blood was placed in tubes with heparin, refrigerated and sent to the Azul Laboratory (Azul, Province of Buenos Aires) to determine the activity of the peroxidase glutathione (GPX). Averages and standard errors were obtained in each group about the peroxidase glutathione, the Days from calving to first artificial insemination (IPPS) in days and milk production (PL) in liters. The existence of significant differences between both groups was tested by applying the analysis of variance to one classification criterion. The averages and GPX standard errors for G1 and G2 at three sampling times (-60, -30 and 30 postpartum days) were (G1: 324 ± 34, 284 ± 20 and 320 ± 39, G2: 313 ± 37, 322 ± 28 and 418 ± 23 U/gHb), respectively. The level of GPX at 30 days postpartum was statistically different (p≤0.05) in the treated group (G2). However, the IPPS in days (G1: 55 ± 4, G2: 56 ± 4) and PL in liters (G1: 31 ± 1.3 G2: 31 ± 1.3) were not statistically different (p> 0.05). The results indicate that the GPX values are above the appropriate ≥ 130 U/gHb and the statistical difference of GPX levels were observed at 90 days (30 days postpartum) of the initiation of treatment with long-acting selenium. It is concluded that the use of intraruminal selenium increases the activity of glutathione peroxidase but does not affect the calving to first service interval and milk production in the cows analyzed.

Keywords: Dairy cows, selenium, production, reproduction, grazing system.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la utilización de selenio intraruminal en la actividad de glutatión peroxidasa, intervalo parto primer servicio y producción de leche en bovinos. El trabajo se realizó durante septiembre de 2017 a diciembre de 2017, con 55 vacas Holstein primíparas y múltiparas clínicamente sanas procedentes de un establecimiento comercial de la localidad de Centeno, provincia de Santa Fe-Argentina. El sistema productivo corresponde a un rodeo totalmente encerrado, con un promedio de producción de 28 litros diarios por vaca, con una dieta administrada en el corral formulada de la siguiente manera: Rollo de alfalfa 1,3 Kg, Maíz Húmedo 4,8 Kg, Expeller de soja 2,2 Kg, Silo Maíz 5,2 Kg, Silo de soja 3,2 kg, semilla de algodón 1,3 y pastura de alfalfa 4,2 kg (base seca). Las vacas se dividieron en dos grupos al azar (todas estaban en similar período de seca): G1 (n=27) sin bolo intraruminal y G2 (n=28) con bolo intraruminal de selenio de larga acción (PERMATRACE®). El mismo día de la colocación de los bolos (60 días antes del parto) se colectaron muestras pareadas de sangre sin anticoagulante del grupo G1 y G2, luego cada 30 días dos veces más desde la primera muestra a ambos grupos (30 días antes del parto y 30 días posparto). La sangre se obtuvo de la vena cocciógea, utilizando agujas y jeringas estériles. La sangre se colocó en tubos con heparina, se refrigeró y se remitió al Laboratorio Azul (Azul, provincia de Buenos Aires) para realizar la determinación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPX). Se obtuvieron los promedios y errores estándar en cada grupo de glutatión peroxidasa, el intervalo parto primer servicio (IPPS) en días y producción de leche (PL) en litros. Se probaron existencia de diferencias significativas entre los grupos mediante la aplicación de análisis de la variancia a un criterio de clasificación. Los promedios y errores estándar de GPX para G1 y G2 en tres momentos de muestreo (-60, -30 y 30 días postparto) fueron de (G1: 324±34, 284±20 y 320±39; G2: 313±37, 322±28 y 418±23 U/gHb), respectivamente. Siendo el nivel de GPX a los 30 días postparto estadísticamente diferente (p≤0,05) en el grupo tratado (G2). Sin embargo, el IPPS en días (G1:55±4, G2:56±4) y PL en litros (G1:31±1,3 G2:31±1,3) no fueron estadísticamente diferentes (p>0,05). Los resultados indican que los valores de GPX están por encima de lo adecuado ≥ 130 U/gHb y la diferencia estadística de niveles GPX se observaron a 90 días (30 días post parto) de iniciado el tratamiento con selenio de larga acción. Se concluye que la utilización del selenio intraruminal aumenta la actividad de glutatión peroxidasa, pero no afecta el intervalo parto primer servicio y producción de leche en las vacas analizadas.

Palabras Clave: Vacas lecheras, selenio, producción, reproducción, sistema a pastoreo

#1804. EFFECT OF THE USE OF DESLORELIN ACETATE ON THE INDUCTION OF OVULATION IN PERUVIAN PASO HORSE MARES

Efecto el uso de acetato de deslorelina en la inducción de ovulación de yeguas caballo peruano de paso

Elsa Chávez^{1,*}, Juan Baltodano¹, Carlos Caballero¹

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo, La Libertad, Perú

* Corresponding author: elsitalch65_94@hotmail.com

ABSTRACT

The aim was to evaluate the effect of the administration of deslorelin acetate at the time of ovulation and pregnancy rate. The mares were randomly divided into experimental (EX: n=8) and control groups (CO: n=8). The animals were examined 4 times a week by ultrasonography with a 7 MHz linear transducer to monitorize follicular development until the detection of a dominant follicle (DF) from 35 mm and an endometrial edema of 3rd degree. The day of this finding (day 1), the mares of EX were treated immediately with 1 ml of deslorelin acetate via IM (equivalent to 1.75 mg / animal), recording the application date and time. Likewise, on day 1, the first service of mares in both groups was performed by artificial insemination (AI) using fresh semen. A single stallion was used during the study. The semen was collected minutes before performing the service by using a Missouri artificial vagina model, at a temperature ranging 45 to 52 °C inside the internal chamber, previously lubricated with sterile gel without spermicide. After the seminal evaluation, the average results were: ejaculate volume of 45 ml, sperm concentration equal to 350 million/ml and 70% of progressive motility. Applying the established formula, we obtained a minimum volume of diluted inseminating dose of 30 ml with a concentration of 1000 million/ml of sperm with 70% of progressive motility for each mare. Monitoring was continued every 24 h until ovulation was recorded. Service was repeated every 48 hours until ovulation to mares presenting ovulation delay. For EX, the time in hours (h) was calculated between the date and time of application of the hormone and the ultrasonographic observation of an hemorrhagic body. In CO, the starting point was taken as the time on day 1 to calculate the ovulation time. For the analysis of the ovulation time (in hours) and the percentage of pregnancy, the statistical program InfoSTAT was used, obtaining the descriptive statistics; likewise, the "t" test was applied for paired samples with a confidence interval of 95%. Only 37.5% of CO mares ovulated within 48 h after the detection of a DF. In contrast, 87.5% of those in EX ovulated between 32 and 48 h post-treatment, obtaining an average of 69.00 ± 8.41 h and 43.13 ± 4.48 h, respectively, finding statistically significant differences between both (p = 0.03). On average, 2 AI/mare were made for CO and 1 AI/mare for EX. However, there was no statistically significant differences between groups (p=0.17). The diagnosis of pregnancy was performed 14 days after ovulation. 50% (4/8) of the mares of CO and 87% (7/8) of those treated with deslorelin were pregnant, although no statistical difference between groups was observed (p=0.08). At the end of the study we concluded that the administration of a hormone based treatment using deslorelin acetate at the time of finding a DF from 35 mm reduces considerably the time of ovulation, allowing to perform the AI at the appropriate time and therefore, reduce the number of services without affecting the conception rate.

Keywords: Deslorelin acetate, ovulation induction, mare, pregnancy

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto de la administración de acetato de deslorelina en el tiempo de ovulación y tasa de preñez. Las yeguas fueron distribuidas aleatoriamente en un grupo experimental (EX: n=8) y un grupo control (CO: n=8). Éstas fueron examinadas 4 veces por semana mediante ultrasonografía usando un transductor lineal de 7 MHz para monitorear el desarrollo folicular hasta la detección de un folículo dominante (FD) a partir de 35 mm y un grado de edema endometrial de 3. El mismo día de este hallazgo (día 1), se trató, inmediatamente, a las yeguas del EX con 1 ml de acetato de deslorelina vía IM (equivalente a 1.75 mg/animal), registrándose la fecha y hora de aplicación. Asimismo, en el día 1 se realizó el primer servicio por inseminación artificial (IA) con semen fresco a las yeguas de ambos grupos. Un solo padrillo fue utilizado durante el estudio. El semen se colectó minutos antes de realizar el servicio, mediante el uso de una vagina artificial modelo Missouri, a una temperatura de entre 45 y 52 °C dentro de la cámara interna, previamente lubricada con gel estéril no espermicida. Luego de la evaluación seminal, los resultados (en promedio) fueron: volumen de eyaculado de 45 ml, concentración de espermatozoides igual a 350 millones/ml y motilidad progresiva de 70%. Aplicando la fórmula establecida obtuvimos un volumen mínimo de dosis inseminante diluida de 30 ml con una concentración de 1000 millones/ml de espermatozoides con motilidad progresiva de 70% para cada yegua. El monitoreo se continuó cada 24 h hasta registrar la ovulación. A las yeguas que tardaron en ovular, se les repitió el servicio cada 48 h hasta la ovulación. Para el EX se calculó el tiempo en horas (h) desde la fecha y hora de aplicación de la hormona hasta la observación ultrasonográfica de un cuerpo hemorrágico. En el CO se tomó como partida la hora en el día 1 para realizar el cálculo del tiempo de ovulación. Para el análisis del tiempo de ovulación (en horas) y del porcentaje de preñez se hizo uso del programa estadístico InfoSTAT, obteniéndose la estadística descriptiva; asimismo, se aplicó la prueba de "t" para muestras apareadas con un intervalo de confianza de 95%. Sólo el 37.5% de las yeguas del CO ovularon dentro de las 48 h a partir de la detección de un FD; en contraste, 87.5% de las del EX ovularon entre las 32 y 48 h post-tratamiento, obteniendo un promedio de 69.00 ± 8.41 h y 43.13 ± 4.48 h, respectivamente, encontrándose diferencia estadística significativa entre ambos (p=0.03). Se efectuaron, en promedio, 2 IA/yegua para el CO y 1 IA/yegua para el EX. Sin embargo, no hubo diferencia estadística significativa entre grupos (p=0.17). El diagnóstico de preñez se hizo a los 14 días post-ovulación. El 50% (4/8) de las yeguas del CO y el 87% (7/8) de las tratadas con deslorelina quedaron preñadas, aunque no se observó diferencia estadística entre grupos (p=0.08). Al término del estudio concluimos que la administración de un tratamiento hormonal a base de acetato de deslorelina en el momento de hallazgo de un FD a partir de 35 mm reduce considerablemente el tiempo de ovulación, permitiendo efectuar la IA en el momento adecuado y, por lo tanto, reducir el número de servicios sin afectar la tasa de concepción.

Palabras claves: Acetato de deslorelina, inducción de ovulación, yeguas, preñez

1813. APPLICATION OF LOW AND HIGH PMSG DOSES FOR ESTRUS SYNCHRONIZATION OF SERRA DA ESTRELA EWES: PARITY EFFECTS ON REPRODUCTIVE EFFICIENCY, PREGNANCY LENGTH, POSTPARTUM BODY WEIGHT AND BODY CONDITION SCORE

Aplicación de PMSG a bajas y altas dosis para la sincronización del estro de ovejas Serra da Estrela: efecto del número de partos en la eficiencia reproductiva, duración de la gestación, peso y condición corporal post-parto

C.C. Belo¹, M.R. Marques¹, A.T. Belo¹, J.M. Ribeiro¹, M.A. Gutierrez-Reinoso^{2,3}, M. Garcia-Herreros¹

¹Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, IP), Santarém, Portugal

²Universidad de Concepción (UDECE), Concepción, Chile

³Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC), Latacunga, Ecuador

*Corresponding author: herrerosgm@gmail.com

ABSTRACT

The Protected Designation of Origin (PDO) of "Serra da Estrela" cheese is elaborated with raw milk from Serra da Estrela sheep, which is considered as the most important dairy breed in Portugal. Since decades, this breed has been maintained under traditional management systems and this fact may affect substantially the flock reproductive efficiency as well as other important productive characteristics. The main aim of the present research was to assess the effects of the administration of low and high PMSG doses for estrus synchronization of primiparous and multiparous Serra da Estrela ewes to evaluate its impact on reproductive performance, pregnancy length, postpartum body weight and body condition score at lambing. A total of 48 primiparous and 92 multiparous ewes were enrolled in the study. The primiparous (P) and multiparous (M) ewes were randomly divided into 6 experimental groups [2 control groups (PT1 and MT1) and 4 treatment groups [(PT2 and MT2) and (PT3 and MT3)]. All ewes from T2 and T3 groups received fluorogestone acetate (FGA) via impregnated intravaginal sponges (40 mg) for 12 days. The treatment consisted of one single i.m. injection of 250 U.I. (T2) or 500 U.I. (T3) of PMSG 24h before sponge removal. Fertility [Ftl = (ewes lambbed / ewes mated) x 100], fecundity [Fcd = lambs born / ewes mated] and prolificacy [PrI = lambs born / ewes lambbed] values were scored for each assessed group. Additionally, the following scores were evaluated: pregnancy length (days), postpartum body weight at lambing (PBWL: kg), postpartum body weight at weaning (PBWW: kg at day 42 after lambing), body condition score at lambing [BCSL (1-5)] and body condition score at weaning [BCSW (1-5)]. ANOVA was carried out after a preliminary examination of the data (SPSS software v.15 for Windows). Multiple differences were observed among the reproductive efficiency values (Ftl, Fcd and PrI) obtained from PT1, and MT1 (p=0.04), as well as when control groups were compared with T2 and T3 groups, indistinctly from the analysed parity type (P or M) with a p value of 0.04. No significant differences were detected in pregnancy length among the different studied groups (p>0.05). PBWL and PBWW as well as BCSL and BCSW values differed significantly between T1 and T2-T3 groups (p<0.05). However, no differences were observed among T2, T3 groups irrespective of the parity group to which they belonged (p>0.05). In conclusion, PMSG application in Serra da Estrela ewes during estrus synchronization had important effects on the reproductive efficiency, PBWL, PBWW, BCSL and BCSW values compared to the control groups. Moreover, PMSG treatments had no effects on pregnancy length independly from the type of parity which they belonged even when compared to non-treated groups.

Keywords: PMSG; parturition number; reproductive performance; pregnancy length; body weight; ovine

RESUMEN

El queso de Denominación de Origen Protegida (DOP) "Serra da Estrela" se elabora con leche cruda de ovejas Serra da Estrela, cuya raza lechera se considera la más importante de Portugal. Desde décadas, esta raza se ha mantenido bajo sistemas de manejo tradicionales y este hecho puede afectar sustancialmente la eficiencia reproductiva del rebaño, así como otras características productivas importantes. El objetivo principal de la presente investigación fue evaluar los efectos de la administración de bajas y altas dosis de PMSG para la sincronización del estro de ovejas Serra da Estrela primíparas y múltiparas con el fin de evaluar su impacto en la performance reproductiva, duración de la gestación, peso corporal postparto y condición corporal al parto. Se utilizaron en el estudio un total de 48 ovejas primíparas y 92 múltiparas. Las ovejas primíparas (P) y múltiparas (M) se dividieron aleatoriamente en 6 grupos experimentales [2 grupos control (PT1 y MT1) y 4 grupos tratados [(PT2 y MT2) y (PT3 y MT3)]. Todas las ovejas de los grupos T2 y T3 recibieron esponjas intravaginales impregnadas con Acetato de Fluorogestona (FGA) (40 mg) durante 12 días. El tratamiento consistió en una única inyección i.m. de 250 U.I. (T2) o 500 U.I. (T3) de PMSG 24 horas antes de la eliminación de la esponja. Se obtuvieron los valores de Fertilidad [Ftl = (ovejas paridas / ovejas cubiertas) x 100], fecundidad [Fcd = corderos nacidos / ovejas cubiertas] y prolificidad [PrI = corderos nacidos / ovejas paridas] para cada grupo evaluado. Además, se evaluaron los siguientes parámetros: duración de la gestación (días), peso corporal al parto (PBWL: kg), peso post-parto al destete (PBWW: kg al día 42 post-parto), condición corporal al parto [BCSL (1 -5)] y condición corporal al destete [BCSW (1-5)]. Tras realizar un examen preliminar de los datos obtenidos se llevó a cabo un análisis ANOVA de éstos (software SPSS v.15 para Windows). Se observaron múltiples diferencias entre los valores de eficiencia reproductiva (Ftl, Fcd y PrI) obtenidos en PT1 y MT1 (p=0,04), así como cuando ambos grupos control se compararon con los grupos T2 y T3 independientemente del número de partos (P o M) (p=0,04). No se observaron diferencias significativas en la duración de la gestación entre los diferentes grupos estudiados (p>0,05). Los valores de PBWL y PBWW, así como los de BCSL y BCSW difirieron significativamente entre los grupos T1 y T2-T3 (p<0,05). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos T2 y T3, independientemente del número de partos (p>0,05). En conclusión, la aplicación de PMSG en ovejas Serra da Estrela durante la sincronización del estro tuvo efectos importantes sobre la eficiencia reproductiva, y en los valores de PBWL, PBWW, BCSL y BCSW en comparación con los grupos control. Además, los tratamientos con PMSG no tuvieron ningún efecto sobre la duración de la gestación, independientemente del número de partos, incluso cuando se compararon con los grupos no tratados.

Palabras clave: PMSG; número de parto; desempeño reproductivo; duración de gestación; peso corporal; ovino

#1817. VITRIFICATION AND SURVIVAL OF EMBRYOS RECOVERED AFTER OVARIAN STIMULATION IN ALPACAS

Vitrificación y sobrevivencia de embriones recuperados postestimulación ovárica en alpacas

Aldo Cassa Salas*¹, Nilton Gómez Urviola², Teodosio Huanca Mamani³

¹Médico Veterinario y Zootecnista – Actividad privada² Profesor de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

³Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) – Puno.

* Corresponding author: wilva1mardo@gmail.com

ABSTRACT

The development and application of reproductive biotechnologies in alpacas and other camelids has been slow and limited in Perú. This situation occurs due to the limited availability of specialized laboratories, trained personnel, validated protocols and financial support. However, the investigations continue because an eleven months gestation time and low fertility in this species do not allow to accelerate the processes of genetic improvement, which leads to look for alternatives for the diffusion of the characteristics of the best animals. For this reason, the Research and Production Center "Quimsachata" of INIA Puno, proposed to vitrify and evaluate the survival of alpaca embryos recovered after ovarian stimulation. Sixteen alpacas with a good reproductive history were selected and stimulated with eCG, recovering and vitrifying 26 embryos using the Open Pulled Straw technique. For the vitrification, a three solutions protocol was elaborated, (1) equilibration solution: (10% glycerol + 0.1 M sucrose + 0.1 M xylose + 20 % fetal bovine serum (SFB) + 6mg/2 ml gentamicin) at a temperature of 28 °C where the embryo was placed for 5 min, (2) vitrification solution: (10% glycerol + 10% ethylene glycol + 0.2 M sucrose + 0.2 M xylose + 20 % fetal bovine serum (SFB)+ 6mg/2 ml gentamicin), where the embryos remained for 5 min, and (3) solution for washing and preservation: in straws of 0.25 ml per embryo (20% glycerol + 20% ethylene glycol + 0.3 M sucrose + 0.3 M xylose + 20 % fetal bovine serum (SFB) + 3mg/1 ml gentamicin), being submerged in liquid nitrogen (-196 °C) after one minute. Before vitrification and conservation, recovered embryos were classified as excellent (30.77%), good (46.15%) and regular (23.08%) with an average size of 467.50, 410.00, and 400.00 µm, 3 months later the devitrification was performed and these were reclassified as excellent (20%), good (44%) and regular (36%) with a size of 448.00, 438.18, and 342.00 µm, respectively. Chi-square test evaluation demonstrated that between the quality of the vitrified and devitrified embryo; and between the quality of the devitrified embryo and the pregnancy condition, there is an association (p = 0.001). Only transferred embryos of excellent quality were viable, reaching 60% (3/5) of pregnancy in recipient llamas.

Keyword: vitrification, embryos, alpacas, survival.

RESUMEN

El desarrollo y aplicación de biotecnologías reproductivas en alpacas y otros camélidos ha sido lento y limitado en el Perú. Esta situación ocurre por la poca disponibilidad de laboratorios especializados, personal capacitado, protocolos validados y apoyo económico. No obstante, las investigaciones continúan, porque el tiempo de gestación de once meses y baja fertilidad en esta especie, no permiten acelerar los procesos de mejora genética, lo que impulsa a buscar alternativas para la difusión de las características de los mejores animales. Es por esta razón que en el Centro de Investigación y Producción Quimsachata del INIA Puno, se planteó vitrificar y evaluar la sobrevivencia de embriones de alpaca recuperados post estimulación ovárica. Se seleccionaron 16 alpacas con buen historial reproductivo, las que fueron estimuladas con eCG, logrando recuperar y vitrificar 26 embriones mediante la técnica *Open Pulled Straw*. Para la vitrificación se elaboró un protocolo que consistió en utilizar tres soluciones, (1) solución de equilibrio : (10% glicerol + 0.1 M sucrosa + 0.1 M xilosa + 20 % suero fetal bovino (SFB) + 6mg/2 ml gentamicina) a una temperatura de 28 °C donde se colocó el embrión por 5 min, (2) solución de vitrificación : (10% glicerol + 10% etilenglicol + 0.2 M sucrosa + 0.2 M xilosa + 20 % suero fetal bovino (SFB) + 6mg/2 ml de gentamicina), donde los embriones permanecen 5 min, (3) solución para el lavado y conservación: en pajillas de 0.25 ml por embrión (20% glicerol + 20% etilenglicol + 0.3 M sucrosa + 0.3 M xilosa + 20 % suero fetal bovino (SFB) + 3mg/1ml de gentamicina), estas después de un minuto son sumergidas en nitrógeno líquido (-196 °C). Antes de la vitrificación y conservación los embriones recuperados fueron clasificados como excelentes (30.77%), buenos (46.15%) y regulares (23.08%) con un tamaño promedio de 467.50, 410.00, y 400.00 µm, y después de la desvitrificación a los tres meses, fueron reclasificados como excelentes (20%), buenos (44%) y regulares (36%) con un tamaño de 448.00, 438.18, y 342.00 µm, respectivamente. A la evaluación con la prueba de Chi-cuadrado, se demostró que entre la calidad del embrión vitrificado y desvitrificado; y entre la calidad del embrión desvitrificado y la condición de preñez, existe asociación (p=0.001). Únicamente los embriones de calidad excelente transferidos a llamas receptoras fueron viables, alcanzando un 60% (3/5) de preñez.

Palabra clave: vitrificación, embriones, alpacas, sobrevivencia.

#1821. EFFECT OF SYNTHETIC SEMINAL PLASMA IN PARTURITION AND PROLIFICACY OF CAMBOROUGH 29 NULLIPAROUS SOWS**Efecto de plasma seminal sintético en parto y prolificidad de cerdas nulíparas Camborough 29****D. Zea-Gonzales^{1*}, U. S. Quispe-Gutiérrez¹, D.T. Salinas-Izquierdo²**¹ Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú.² Private practice, Abancay, Perú.

* Corresponding author: ulisessandro@yahoo.com

ABSTRACT

The desired fertility in pigs is above 80%, through artificial insemination (AI), this percentage is hardly reached due to several factors including seminal plasma. The aim of this study was to evaluate the use of synthetic seminal plasma during insemination on the birth rate and prolificacy of nulliparous sows. Camborough 29 (C-29) clinically healthy nulliparous sows, older than 210 days old, and having presented more than one estrus were used. Two clinically healthy boars of approximately 1,5 years old of age, from the same PIC gene line and of known fertility were used; management and feeding were according to the recommendations of the PIC genetics. Two treatment groups were formed (T), T1: control without seminal plasma (n = 30); T2: with synthetic seminal plasma (n = 30). Insemination was made using fresh semen, being previously stored for 2 h at a temperature ranging 20-23 °C, with or without synthetic seminal plasma (PSS) (PREDIL® MR-A®) and diluted with 45 g in 1 L of bidistilled water between 40-42 °C, to later be preserved between 16-17 °C until its use. 30 mL of the PSS was put inside the cervix, at the time of the start of the reflex to the mount tolerance, every 12 h for three times. The study variables were: percentage of births and prolificacy, both analyzed with Chi square test. Birth rates were similar ($P > 0,05$) between the two groups (92.3% in sows without PSS, 97% in sows with PSS). Higher prolificacy was obtained in the PSS group versus the control group (11,4 piglets per sow with PSS, 13,3 piglets per sow without PSS). In conclusion, the use of synthetic seminal plasma in the insemination of nulliparous Camborough 29 would favor prolificacy, so it could be an alternative use.

Key words: Synthetic plasma of semen, piglets born.

RESUMEN

La fertilidad deseada en los cerdos está por encima del 80%, mediante inseminación artificial (IA), se alcanza con dificultad este porcentaje, debido a varios factores entre ellos el plasma seminal. El objetivo del estudio fue evaluar el uso de plasma seminal sintético durante la inseminación sobre la tasa de parto y prolificidad cerdas nulíparas. Se utilizaron cerdas nulíparas Camborough 29 (C-29) mayores a 210 días de edad, clínicamente sanas, con más de un celo presentado. Se usaron dos verracos de la misma línea genética PIC, de 1,5 años aproximadamente, clínicamente sanos y de fertilidad conocida, el manejo y la alimentación fueron de acuerdo a las recomendaciones de la genética PIC. Se formaron dos grupos de tratamiento (T), T1: control sin plasma seminal (n = 30); T2: con plasma seminal sintético (n = 30). Se inseminó con semen fresco conservado por 2 h entre 20 a 23 °C, con o sin plasma seminal sintético (PSS) (PREDIL® MR-A®) diluido con 45 g en 1 L de agua bidestilada entre 40 a 42 °C, luego se preservó entre 16 a 17 °C hasta su utilización. El PSS se depositó dentro del cérvix 30 mL, al momento del inicio del reflejo a la tolerancia de monta, cada 12 h por tres veces. Las variables de estudio fueron: porcentaje de parto y prolificidad, analizadas con prueba de Chi cuadrada. Las tasas de parto fueron similares ($P > 0,05$) entre los dos grupos (92,3% en cerdas sin PSS; 97% en cerdas con PSS). Se obtuvo mayor prolificidad en el grupo con PSS versus el grupo control (11,4 lechones por marrana con PSS; 13,3 lechones por marrana sin PSS). Se concluye, que la utilización de plasma seminal sintético en la inseminación de cerdas nulíparas Camborough 29 favorecería la prolificidad, por lo que podría ser una alternativa de uso.

Palabras clave: Plasma sintético del semen, lechones nacidos.

#1832. USE OF TWO IATF PROLONGED PROESTRUS PROTOCOLS AND THEIR RESPONSE IN COWS OF THE ECUADORIAN AMAZON WITH DIFFERENT OPEN DAYS

Utilización de dos protocolos con proestro prolongado en IATF y su respuesta sobre vacas de la Amazonía ecuatoriana con diferentes días abiertos

D. Yáñez ^{*1}, J.C. López ^{1,2}, M. Ortega¹, J.C. Moyano^{1,2}, R. Quinteros ^{1,2}, V. Tonato¹, L. Moreno¹, P.R. Marini ^{3,4}

¹Centro Latinoamericano de Estudios de Problemáticas Lecheras (CLEPL), Argentina

²Universidad Estatal Amazónica-Centro de Investigación, Posgrado y Conservación Amazónica - Ecuador. ³Facultad de Ciencias Veterinarias-UNR. ⁴CIC-UNR. Argentina

* Corresponding author: pmarini@fveter.unr.edu.ar

ABSTRACT

During the last decade, new generations of protocols denominated "short treatments" have been developed, these had demonstrated their ability to improve pregnancy rates being based on the reduction of the inclusion period of progesterone devices, reducing follicle dominance period and prolonging the pre ovulatory proestrus. This treatment has been called J-Synch and the proestrus extension is correlated with higher serum levels of estradiol, increasing the fertility in IATF. The objective of this study was to evaluate two protocols with prolonged proestrus with artificial insemination in fixed time (IATF) after 60 to 72 hours and their response on Brown Swiss double purpose breeding cows the foot of the Ecuadorian Amazon with different open days. The investigation took place in the province of Pastaza, Ecuador. In this zone there is a fluvial precipitation of 4000 – 5000 mm/year. The weather is warm and humid. The temperature varies between 18°C - 24°C and the topography is rather irregular, having farms with an average area of 50 ha, conformed by its own grassland (Gramalote) *Axonopusscoparius* and agricultural parcels. From October 2015 to October 2016, 226 multiparous cows were inseminated with $\geq 2,5$ body condition. Two treatments were applied. T1 (J-Synch 60 hours IA+eCG) (n=115): On day zero, the first ultrasound evaluation was carried out to analyze the uterine and ovarian status discarding possible reproductive affections, and specially in acyclic animals an intravaginal device with progesterone (0,5 g) and 2 mg of Estradiol Benzoate was applied via intramuscular administration. On day six, the device was removed and the quality of the implant was observed (presence or absence of vaginitis). Dosages of 500 μ g of cloprostenol plus 500UI of pregnant mare seric gonadotropin (eCG – Folligon) were given; ultrasonographic measurement and monitoring was performed for follicular development and possible presence of heat prior to IATF. On day nine or proestrus 60 hours after, the prostaglandine luteolitic (PGF) application, another ultrasonography-guided measurement of the prolonged proestrus follicles behavior was performed and 2,5 ml of buserelina acetate (GnRH) was applied via intramuscular injection. The IATF was carried out 60 hours after the progesterone device was removed. The T2 (J-Synch 72 hours IA + eCG) (n=111), On day zero, the first ultrasonographic evaluation was performed with the purpose of analyzing the uterine and ovarian status, to later apply an intravaginal progesterone device (0,5 g) and 2 mg Estradiol Benzoate via intramuscular administration. In day six, the progesterone device was removed, checking on its quality and 500 μ g cloprostenol plus 500UI of pregnant mare seric gonadotropin were given alongside an ultrasonographic measurement of follicular development and visual monitoring of the presence of heat prior to IATF. On day nine or proestrus, after 72 hours of PGF application, another ultrasonographic measurement to observe prolonged proestrus follicles behavior was performed and it 2,5ml buserelina acetate (GnRH) were applied via intramuscular injection; Cows were inseminated 72 hours after progesterone device removal. Both treatments were applied to the four experimental groups (G): G1: ≤ 60 days, G2: from 61 to 90 days, G3: from 91 to 120 days and G4: from 120 to 150 open days postpartum. The conception rate T1 was 61% (70/115) and for T2 was 47% (52/111), showing statistically significant

differences ($p \leq 0,05$). Follicular growth in IATF was better on G3 (T1: $12,8 \pm 0,24$ mm; T2: $11,7 \pm 0,2$ mm), as well as the size of the luteus body (T1: $23,1 \pm 0,14$ mm; T2: $22,8 \pm 0,15$ mm), showing no statistically significant differences between both protocols ($p \geq 0,05$). J-Synch protocol plus eCG application 60 hours after obtains better pregnancy rates, follicular development to IATF and luteus body size than J-Synch Protocol plus eCG application 72 hours after in cows with open days intervals between 91 and 120 days.

Keywords: Cows, open days, follicular development, Amazon.

RESUMEN

Durante la última década, se han desarrollado nuevas generaciones de protocolos denominados "tratamientos cortos", que han demostrado mejorar la tasa de preñez, y se fundamentan en que disminuyen el período de inserción de dispositivos con progesterona, reducen el período de dominancia del foliculo y prolongan el proestro previo a la ovulación, a este tratamiento se lo ha denominado J-Synch y la prolongación del proestro se correlaciona con mayores concentraciones séricas de estradiol, aumentando así la fertilidad en la IATF. El objetivo de este trabajo fue evaluar dos protocolos con proestro prolongado con inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) a las 60 o 72 horas y su respuesta sobre vacas doble propósito Pardo Suizo con cría al pie de la Amazonía Ecuatoriana con diferentes días abiertos. La investigación se realizó en la provincia de Pastaza, Ecuador, en esta zona existe una precipitación fluvial de 4000 – 5000 mm/año, el clima es cálido y húmedo, con una temperatura que varía entre los 18 y 24°C. Además, cuenta con una topografía irregular, fincas con un área promedio de 50 ha, conformadas por pastizales propios de la zona (Gramalote) *Axonopusscoparius*, y parcelas agrícolas. Se realizó desde octubre de 2015 a octubre de 2016. Se inseminaron 226 vacas multiparas con estado corporal $\geq 2,5$, se aplicaron dos tratamientos. El T1 (J-Synch 60 horas IA + eCG) (n=115), en el Día cero se realizó la primera evaluación ecográfica, para analizar el estatus uterino y ovárico, descartando posibles afecciones reproductivas y sobre todo animales acíclicos, se aplicó un dispositivo intravaginal con progesterona (0,5 g) y 2 mg de Benzoato de Estradiol vía intramuscular. En el Día seis se removió el dispositivo y se observó la calidad del implante (presencia o ausencia de vaginitis), se administró 500 μ g de cloprostenol más 500 UI de gonadotropina sérica de yegua preñada (eCG - Folligon), y se realizó una medición ecográfica del desarrollo folicular y seguimiento visual de la presencia de celo anticipada a la IATF. Al día nueve o proestro a las 60 h de la aplicación de prostaglandina luteolítica (PGF), se realizó otra medición con ecografía para ver el comportamiento de los foliculos con un proestro prolongado y se aplicó 2,5 ml de acetato de buserelina (GnRH) vía intramuscular; la IATF se realizó a las 60 h de retirado el dispositivo con progesterona. El T2 (J-Synch 72 horas IA + eCG) (n=111). Al Día cero o proestro a las 72 h de la aplicación de PGF, se realizó otra medición con ecografía para ver el comportamiento de los foliculos con un proestro prolongado y se aplicó 2,5 ml de acetato de buserelina (GnRH) vía intramuscular; las vacas se inseminaron a las 72 h de retirado el dispositivo con progesterona. Los dos tratamientos

fueron aplicados sobre cuatro grupos (G): G1: ≤ 60 días, G2: 61 a 90 días, G3: 91 a 120 días, G4: 120 a 150 días abiertos posparto. Se probó si existían diferencias significativas entre los tratamientos mediante la aplicación de análisis de la variancia (ANOVA) a un criterio de clasificación. La tasa de preñez se obtuvieron la mediana y sus rangos y se la analizó a través del test Wilcoxon/Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$). La tasa de concepción para T1 fue del 61% (70/115) y para T2 el 47% de preñez (52/111), con diferencias significativas ($p \leq 0,05$). El crecimiento folicular a la IATF fue mayor en el G3 (T1: $12,8 \pm 0,24$ mm; T2: $11,7 \pm 0,2$ mm) respectivamente, al igual que el tamaño del

cuerpo lúteo (T1: $23,1 \pm 0,14$ mm; T2: $22,8 \pm 0,15$ mm), no mostrando diferencias significativas entre ambos protocolos, pudiendo ser el tiempo prudente de recuperación posparto en vacas de la Amazonía Ecuatoriana. Se concluye que con el protocolo J-Synch más eCG 60 horas se obtienen mejores tasas de preñez y con respecto a los intervalos hubo una tendencia a un mayor desarrollo folicular a la IATF y tamaño de cuerpo lúteo, con el intervalo de entre 91 y 120 días abiertos.

Palabras Clave: Vacas, días abiertos, desarrollo folicular, Amazonía.

#1837. EFFECT OF TWO OVULATION INDUCERS ON PREGNANCY IN REPEAT-BREEDING ALPACA AND LLAMA AT FIELD LEVEL

Efecto de dos inductores de ovulación sobre la preñez en alpaca y llama repetidoras a nivel de campo

T. Huanca^{1*}, P. Vargas¹; J. Ccopa¹; L. Pahuara¹; R.H. Mamani-Cato¹

¹ National Institute of Agrarian Innovation, Experimental Agricultural Station Illpa, Puno - Peru.

* Corresponding author: thuanca@inia.gob.pe

ABSTRACT

The South American camelids are species of induced ovulation, since they need the stimulation of copulation to trigger the ovulation process. The study was conducted at CIP Quimsachata at an altitude of 4,210 meters above sea level. The objective was to evaluate the effect of two ovulation inducers on pregnancy in alpacas and repetitive llamas under the controlled breeding system. We used 136 female alpacas divided into two groups; lactating and non-lactating females and 66 non-lactating llamas; all repeaters to the service of controlled breeding. Alpacas and female llamas were examined by transrectal ultrasonography, selection was based on the presence of ovarian follicles ≥ 7 mm in diameter. The animals were randomly assigned, the first group was administered 1ml of intramuscular seminal plasma (50/50% of seminal plasma and PBS + antibiotics). The used semen was obtained by the artificial vagina in mannequin method from a total of 8 previously trained males. Semen was centrifuged at 2000 rpm for 15 min and the absence of spermatozoa in the supernatant (seminal plasma) was verified; the second group was given 1ml of intramuscular GnRH (0.0042mg of buserelin acetate) for then be served by natural assembly, to the lactating females the service was performed 15 days after delivery. At 40 days post copula all the animals were sonographed to determine the pregnancy percentage. Data was analyzed using the Chi-square test with continuity adjustment and processed with the SAS program version 9.4. The results indicate that the pregnancy percentage was 57.89% and 51.52% for GnRH and seminal plasma respectively in non-lactating alpacas; for lactating alpacas the percentage of pregnancy was 54.55% for the group treated with seminal plasma and 50.00% for the group treated with GnRH; in non-lactation llamas, 58.33% of pregnancies were treated with seminal plasma, in contrast to 46.67% of llamas treated with GnRH. The association between ovulation inducers and pregnancy does not determine a statistically significant increase ($p \geq 0.05$).

Keywords: Alpacas, GnRH, ovulation induction, llamas, seminal plasma

RESUMEN

Los camélidos sudamericanos son especies de ovulación inducida, dado que necesitan del estímulo de la cópula para desencadenar el proceso de ovulación. El estudio se realizó en el CIP Quimsachata a una altitud de 4,210 msnm. El objetivo fue evaluar el efecto de dos inductores de ovulación sobre la preñez en alpacas y llamas repetidoras bajo el sistema de empadre controlado. Se utilizó 136 alpacas hembra divididas en dos grupos, hembras lactantes y no lactantes y 66 llamas no lactantes; todas eran repetidoras al servicio de empadre controlado. Las alpacas y llamas hembras fueron examinadas por ultrasonografía transrectal, la selección se basó en la presencia de folículos ováricos ≥ 7 mm de diámetro. Los animales fueron designados aleatoriamente, al primer grupo se le administro 1ml de plasma seminal intramuscular (50/50% de plasma seminal y PBS + antibióticos), el semen empleado fue obtenido por el método de vagina artificial en maniquí, de un total de 8 machos previamente entrenados para esta técnica, el semen se centrifugó a 2000 rpm por 15 min, y se verificó la ausencia de espermatozoides en el sobrenadante (plasma seminal); al segundo grupo se le aplicó 1ml de GnRH intramuscular (0.0042mg de acetato de buserelina), posteriormente fueron servidas por monta natural, a la hembras lactantes el servicio se realizó a los 15 días post parto. A los 40 días post copula todos los animales fueron ecografiados para determinar el porcentaje de preñez. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Chi-cuadrado con ajuste por continuidad y procesados con el programa SAS versión 9.4. Los resultados indican que el porcentaje de preñez fue de 57.89% y 51.52% para GnRH y plasma seminal respectivamente en alpacas no lactantes; para alpacas lactantes el porcentaje de preñez se obtuvo un 54.55% tratadas con plasma seminal y 50.00% del grupo tratado con GnRH; en llamas no lactantes se obtuvo un 58.33% de preñez tratadas con plasma seminal a diferencia de 46.67% de llamas tratadas con GnRH. La asociación entre los inductores de ovulación y la preñez no determina un incremento estadísticamente significativo ($p \geq 0.05$).

Palabras clave: Alpacas, GnRH, inducción de ovulación, llamas, plasma seminal.

#1843. REPRODUCTIVE INDEXES OF BROWN SWISS CATTLE CROSSED IN THE CACHI ALTA-AYACUCHO BASIN, FROM 2013 TO 2015

Índices Reproductivos de Ganado Brown Swiss cruzado en la Cuenca Cachi Alta-Ayacucho, desde el año 2013 al 2015

A. Pozo^{1*}, J.C. Gutiérrez¹, L.V. Sulca¹, J. Loza¹, A. Guerrero², L.A. Rodríguez¹

¹Laboratory of Reproduction and Biotechnology, Professional School of Veterinary Medicine, National University of San Cristobal of Huamanga -Ayacucho

²Non-Governmental Organization (NGO) "Pro-Leche"-Ayacucho

* Corresponding autor: alfredo.pozo@unsch.edu.pe

ABSTRACT

The purpose of the study was to determine the reproductive indexes of crossed Brown Swiss cattle in the Cachi Alta-Ayacucho milk basin from 2013 to 2015. 201 records were analyzed from 54 herds of the Communities of Cusibamba (07), Satica (13), Munaypata (8), Unión Paqchaq (12) and Manzanayoq (14), compiled by the NGO "PRO-LECHE". The interval between births (IBP), birth-conception interval (BCI), age at first service (AFS), age at first birth (AFB) and percentage of problem cows (% PC) with more than 120 days without pregnancy and the number of services per pregnancy/cow (NSP) was determined. Data was processed in Excel® and the index variance analysis of the three years of study was performed with the "R" software. From 2013 to 2015 the IBP, BCI, AFS, AFB, %PC and NSP showed an average of 439±24.93d, 179±31.11d, 623±82.64d, 912±66.07d, 8.7±4.1 problem animals and 1.4±0.14 services/cow, respectively. According to the community, the IBP in Cusibamba (392d, 390d, 423d), Satica (437d, 455d, 453d), Munaypata (458d, 388d, 430d), Unión Paqchaq (483d, 399d, 498d) and Manzanayoq (416d, 491d, 471d) were similar; meanwhile, the BCI in Cusibamba (117d, 167d, 156d), Satica (270d, 178d, 242d), Munaypata (103d, 141d, 295d), Unión Paqchaq (174d, 145d, 202d) and Manzanayoq (104d, 188d, 198d) were different; likewise, AFS in Cusibamba (665d, 487d, 642d), Satica (597d, 508d, 649d), Munaypata (556d, 613d, 480d), Unión Paqchaq (605d, 620d, 628d) and Manzanayoq (797d, 788d, 706d) did not show differences; finally, the AFB in Cusibamba (963d, 900d, 803d), Munaypata (830d, 868d, 872d), Unión Paqchaq (902d, 866d, 942d), Manzanayoq (1075d, 977d) were similar with the exception of Satica (854d, 806d, 989d) (P = 0.031). On the other hand, in Cusibamba, Satica, Munaypata, Unión Paqchaq and Manzanayoq, the %PC was 16.9, 31.5, 11.5, 28.4, 11.5 and the NSP of 1.0, 1.5, 1.2, 1.3, 1.4 services/cow, respectively. In conclusion, the reproductive indexes from 2013 to 2015 were similar and superior in most cases to the theoretical reference values (IPP = 390d, IPC = 100d, EPS = 660d, EPP = 900d, VP = <20%; NSP = <1.7), causing silent economic losses to the detriment of the livestock producer.

Key words: Brown Swiss, bovine, indices, records.

RESUMEN

El propósito del estudio fue determinar los índices reproductivos de ganado Brown Swiss cruzado en la Cuenca Lechera Cachi Alta-Ayacucho desde el año 2013 al 2015. Se analizaron 201 registros de 54 hatos de las Comunidades de Cusibamba (07), Satica (13), Munaypata (8), Unión Paqchaq (12) y Manzanayoq (14), compilados por el ONG "PRO-LECHE". Se determinó en días (d) el intervalo entre partos (IPP), intervalo parto-concepción (IPC), edad al primer servicio (EPS), edad al primer parto (EPP) y porcentaje de vacas problema (%VP) con más de 120 días sin preñez y el número de servicios por preñez/vaca (NSP). La data se procesó en Excel® y el análisis de varianza de índices en los tres años de estudio con el software "R". Del año 2013 al 2015 el IPP, IPC, EPS, EPP, VP y NSP fue en promedio 439±24.93d, 179±31.11d, 623±82.64d, 912±66.07d, 8.7±4.1 animales problema y 1.4±0.14 servicios/vaca, respectivamente. Según comunidad, el IPP en Cusibamba (392d, 390d, 423d), Satica (437d, 455d, 453d), Munaypata (458d, 388d, 430d), Unión Paqchaq (483d, 399d, 498d) y Manzanayoq (416d, 491d, 471d) fueron similares; también el IPC en Cusibamba (117d, 167d, 156d), Satica (270d, 178d, 242d), Munaypata (103d, 141d, 295d), Unión Paqchaq (174d, 145d, 202d) y Manzanayoq (104d, 188d, 198d) no fueron diferentes; así mismo, la EPS en Cusibamba (665d, 487d, 642d), Satica (597d, 508d, 649d), Munaypata (556d, 613d, 480d), Unión Paqchaq (605d, 620d, 628d) y Manzanayoq (797d, 788d, 706d) no mostraron diferencias; finalmente, la EPP en Cusibamba (963d, 900d, 803d), Munaypata (830d, 868d, 872d), Unión Paqchaq (902d, 866d, 942d), Manzanayoq (1075d, 977d) fueron similares a excepción de Satica (854d, 806d, 989d) (P=0.031). Por otro lado, en Cusibamba, Satica, Munaypata, Unión Paqchaq y Manzanayoq, el %VP fue 16.9, 31.5, 11.5, 28.4, 11.5 y el NSP de 1.0, 1.5, 1.2, 1.3, 1.4 servicios/vaca, respectivamente. En conclusión, los índices reproductivos desde el año 2013 al 2015 se mostraron similares y superiores en la mayoría de los casos a los valores referenciales teóricos (IPP=390d; IPC=100d; EPS=660d; EPP=900d; VP=<20%; NSP=<1.7), ocasionándose pérdidas económicas silenciosas en perjuicio del productor ganadero.

Palabras clave: Brown Swiss, bovino, índices, registros.

#1844. EVALUATION OF FOLLICULAR WAVE RESET BY A MECHANICAL AND TWO PHARMACOLOGICAL TREATMENTS

Evaluación del reinicio de la onda folicular generada con dos tratamientos farmacológicos y un mecánico

Daniel Supliguicha², Jesús Pesantez², Miguel Naulaguari², Santiago Sarmiento², Julio Romero², María Gómez², Marco Cárdenas², Guido Calle¹, Jhonny Narváez¹, Luis Ayala¹, Ramiro Rodas¹, Yury Murillo¹, Jorge Samaniego^{3*}

¹Docente Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Ecuador.

²Estudiante Pregrado, Universidad de Cuenca, Ecuador.

³Medico Veterinario Zootecnista asociado, Universidad de Cuenca, Ecuador.

* Corresponding author: jorge.samaniegoc@ucuenca.ec

ABSTRACT

The effect of estradiol benzoate (BE), GnRH and follicular ablation on the resumption of the follicular wave have been deeply studied as essential factors for the application of biotechniques such as fixed-time insemination (IATF), superovulation (SOV) and ovum pick-up (OPU). However, it has been described that breed and factors such as diet, management, nutritional status, time of year, milk production and environmental conditions could alter the follicular behavior pattern. Therefore, it was proposed to evaluate the restart time of the follicular wave by applying two pharmacological treatments (BE and GnRH) and follicular ablation, in Holstein crossbreed heifers under an extensive grazing system over 3,000 m.a.s.l. The research was carried out in the experimental farm from Universidad de Cuenca. 9 heifers ranging the age of 15-20m and CC of 3-3.5 were evaluated. Prior to the start of the experiment, the animals were synchronized: Day 0 = DIV + BE; Day 7 = removal of DIV + PGF2 α ; Day 8 = BE, colorimetric patches were placed to detect heat. 54h post-DIV removal the presence of the preovulatory follicle (FPO) was assessed by ultrasound, ovulation detection was carried out 48h later, due to the absence of the FPO. The ovulating heifers entered the experiment 6 days post ovulation (zero day), confirmed by corpus luteum (CL) and a dominant follicle (≥ 10 mm) presence. The 9 heifers were randomly distributed into the three treatments: T1: n = 3 (GnRH, 250ug IM); T2: n = 3 (estradiol benzoate, IM 2mg) and T3: n = 3 (follicular ablation > 5mm), later being alternated in the treatments, generating three repetitions. Every 24h during 5 consecutive days, the moment of the re-initiation of the follicular wave was determined by ultrasound, determined by the appearance of a group of follicles ≥ 4 mm. For the determination of FSH levels, blood samples were taken every 24h. The samples were centrifuged at 3,500 rpm / 15 min., collecting and freezing the supernatant (serum) at -20 °C up until evaluation by electrochemiluminescence. An experimental 3x3 Latin square design was used. The data was processed in SPSS version 24. Follicular ablation (T3) induced a peak of FSH 24h post treatment, after which the appearance of a new group of follicles ≥ 4 mm occurred. Treatments 1 (GnRH) and 2 (BE) generated a high level of FSH on average 2 days after the treatments, followed by the new follicular wave restart. In conclusion, follicular ablation presented a peak of FSH in a shorter period of time, unlike GnRH and BE under the conditions proposed in the study; However, the time in which the follicular wave restarts when using GnRH and BE in crossbreed Holstein heifers, fed to grazing, in an extensive exploitation system, over 3,000m.a.s.l. is shorter compared to that described by other authors for this breed in different conditions.

Keywords: Reset follicular, ablation follicular, FTAI, OPU, bovine

RESUMEN

Se ha estudiado a profundidad el efecto del benzoato de estradiol (BE), la GnRH y la ablación folicular sobre el reinicio de la onda, factor indispensable para la aplicación de biotécnicas como la inseminación a tiempo fijo (IATF), superovulación (SOV) y ovum pick-up (OPU). Sin embargo, se ha descrito que la raza y factores como dieta, manejo, estado nutricional, época del año, producción lechera y condiciones medioambientales podrían alterar el patrón de comportamiento folicular. Por lo tanto, se planteó evaluar el tiempo de reinicio de la onda folicular mediante la aplicación de dos tratamientos farmacológicos (BE y GnRH) y la ablación folicular, en vaquillas Holstein mestizas bajo sistema extensivo al pastoreo sobre los 3.000 msnm. La investigación se realizó en la granja experimental Universidad de Cuenca. Se evaluaron 9 vaquillas, edad 15-20m, CC de 3-3,5. Previo al inicio del experimento los animales fueron sincronizados: Día 0= DIV +BE; Día 7= Retiro del DIV+ PGF2 α ; Día 8= BE, se colocó parches colorimétricos para detectar celo. 54h post retiro del DIV se valoró la presencia del folículo preovulatorio (FPO) mediante ecografía, 48h después se determinó si hubo ovulación, esto por la ausencia del FPO. Las vaquillas que ovularon ingresaron en el experimento, 6 días post ovulación (día cero), siempre que presentaran cuerpo lúteo (CL) y un folículo dominante (≥ 10 mm). Las 9 vaquillas fueron repartidas al azar en los tres tratamientos: T1: n=3 (GnRH, 250ug IM); T2: n=3 (Benzoato de estradiol, 2mgIM) y T3: n=3 (ablación folicular >5mm), los animales fueron alternadas en los tratamientos, generando tres repeticiones. Mediante ecografía cada 24h durante 5 días consecutivos se valoró el momento del reinicio de la onda folicular, determinada por la aparición de un grupo de folículos ≥ 4 mm. Para la determinación de los niveles de FSH, se tomó muestras de sangre cada 24h. Las muestras fueron centrifugadas a 3.500rpm/15min., el sobrenadante (suero) fue congelado a -20°C hasta la evaluación mediante electroquimioluminiscencia. Se utilizó un diseño experimental de cuadrado latino de 3x3. Los datos fueron procesados en SPSS versión 24. La ablación folicular (T3) indujo un pico de FSH 24h post tratamiento, posterior a lo cual se produjo la aparición de un nuevo grupo de folículos ≥ 4 mm. Los tratamientos 1 (GnRH) y 2 (BE) generaron nivel alto de FSH en promedio 2 días luego de los tratamientos, seguido del reinicio de la nueva onda folicular. En conclusión, la ablación folicular presentó pico de FSH en un periodo de tiempo más corto, a diferencia de la GnRH y BE bajo las condiciones propuestas en el estudio; sin embargo, el tiempo en el cual se produce el reinicio de la onda folicular al utilizar GnRH y BE en vaquillas Holstein mestizas, alimentadas al pastoreo, en un sistema de explotación extensivo, sobre los 3.000msnm es más corto en comparación con lo descrito por otros autores para esta raza en condiciones diferentes.

Palabras clave: Reinicio folicular, ablación folicular, IATF, OPU, bovino

#1850. COMPARISON OF BOROSCOPE AND A CONVENTIONAL LAPAROSCOPY EQUIPMENTS ON INTRAUTERINE ARTIFICIAL INSEMINATION WITH FROZEN SEMEN IN CREOLE EWES

Comparación de un equipo boroscopio y un equipo de laparoscopia convencional en la inseminación artificial intrauterina con semen congelado en borregas criollas

Erlan F. Gutiérrez^{1*}; Rosmery Huanca¹; Mario Alvarez²; Wilma E. Condori².

¹ Carrera de Ingeniería en Zootecnia e Industria Pecuaria, Módulos de Investigación y Producción Pecuaria, Sub Sede Kallutaca, Universidad Pública de El Alto, La Paz-Bolivia.

² Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Pública de El Alto, La Paz-Bolivia.

* Corresponding author: erlangutierrez@hotmail.com

ABSTRACT

The laparoscopic artificial insemination at fixed time (LAIFT) in sheep has been established as an important tool for genetic progress, limited by its high equipment cost, hence the importance of alternative equipment allowing intrauterine insemination at low cost reports. The objective of this study was to compare the borescope and the conventional laparoscopic equipments, both used in intrauterine artificial insemination with frozen semen in Creole ewes. The study was conducted from May to July 2018 in the Kallutaca Community of Laja municipality, La Paz department, Bolivia, located at 3,900 meters above sea level. The borescope equipment (Wifi Endoscope®, Teslong) was used, with an 8.5mm diameter lens, provided with a LED light and 2 metal cattle trocars adapted to facilitate the entry of the camera and insemination device. Likewise, a conventional laparoscopy equipment (Laparoscope® Stryker) was used, which lens measured 5 mm in diameter and had a 0 ° vision angle, together with all its accessories for the insemination process (Trocars 5mm, insemination aspic, palpation rod, portable light source). The heat synchronization of 18 ewes to inseminate with the borescope equipment and 19 ewes for insemination with conventional laparoscopy equipment, inserting intravaginal silicone devices with progesterone 0.3 g (Dico®, Syntex) for 14 days, after withdrawal, administrating consequently 250 IU of eCG (Novormon®, Syntex). 52.35 ± 0.33 hours after intravaginal device removal, the LAIFT was performed with frozen semen in 0.50cc straws with 40x10⁶ spermatozoa. The procedure of insemination of the ewes was by placing them on swivels at an angle of 45 ° after sedation with a dose of 0.10 mg / kg live weight of Xylazine Hydrochloride (Dorcipec®, Vallee), then proceeding to perform two incisions in the abdominal region of the skin and subcutaneous tissue, 4 cm in front of the udder and 3 cm into the left and right lateral direction to the alba line to facilitate the entry of the trocars into the abdominal cavity and through them the entrance of the camera or telescope and the aspic insemination respectively, depositing half dose in each uterine horn. The pregnancy diagnosis was carried out 45 days post insemination using an ultrasound scan with a rectal transducer (EMP 820 vet plus®, Emperor). The gestation rate was 72.2% and an insemination time of 2.3 ± 0.44 min for the ewes inseminated with the borescope equipment and 73.7% and an insemination time of 3.6 ± 1.36 min for ewes inseminated with conventional laparoscopy equipment, having no significant differences between the pregnancy rates (P≥0.05) (Chi square) although showing for the insemination times (P≤0.05) (student's t-test). In conclusion, it is possible to obtain the same pregnancy rates with both equipments, however, the conventional laparoscopy equipment turns out to be more versatile and inseminates in less time.

Keywords: Boreoscope, laparoscope, sheep, pregnancy, artificial insemination.

RESUMEN

La inseminación artificial laparoscópica a tiempo fijo (IALTF) en ovinos se ha constituido como una herramienta importante del progreso genético, pero con una limitante por su alto costo de equipamiento, a su vez se ha reportado equipos alternativos que permite inseminar de forma intrauterina a bajo costo. El objetivo de este estudio fue comparar un equipo boroscopio y un equipo de laparoscopia convencional en la inseminación artificial intrauterina con semen congelado en borregas criollas. El estudio se realizó entre mayo a julio del 2018 en la Comunidad Kallutacadel municipio de Laja, departamento de La Paz, Bolivia, ubicada a 3,900 msnm. Se empleó el equipo boroscopio (Wifi Endoscope®, Teslong), con una lente de diámetro 8,5mm, provista de luz LED, se adecuaron 2 trocares metálicos de uso en vacunos para facilitar el ingreso de la cámara y dispositivo de inseminación. Así mismo, se utilizó un equipo laparoscópico convencional (Laparoscope® Stryker), cuya lente mide 5 mm de diámetro y 0° de ángulo de visión, junto con todos sus accesorios para el proceso de inseminación (Trocares 5mm, aspic de inseminación, varilla de palpación, fuente de luz portátil). La sincronización de celo fue con 18 borregas para inseminar con el equipo boroscopio y 19 borregas para inseminar con el equipo de laparoscopia convencional, insertando en la vagina dispositivos de silicona con progesterona 0,3 g (Dico®, Syntex) por 14 días, al retiro de los dispositivos intravaginales se aplicó una dosis de 250 UI de eCG (Novormon®, Syntex). Transcurridas 52,35±0,33 horas post retiro de dispositivos intravaginales se realizó la IALTF con semen congelado en pajillas de 0,50cc con 40x10⁶ espermatozoides. El procedimiento para inseminarlas borregas fue colocándolas en camillas pivotantes en un ángulo de 45° previa sedación con Clorhidrato de Xilazina (Dorcipec® Vallee) dosis de 0,10 mg/kg peso vivo, procediendo luego a realizar dos incisiones en la región abdominal sobre piel y tejido subcutáneo, a 4cm por delante de la ubre y 3cm en dirección lateral izquierda y derecha de la línea alba para facilitar el ingreso de los trocares en la cavidad abdominal y a través de ellos el ingreso de la cámara o telescopio y el áspic de inseminación respectivamente, depositando media dosis en cada cuerno uterino. El diagnóstico de preñez se realizó a 45 días post inseminación utilizando un ecógrafo con transductor rectal (EMP 820 vet plus®, Emperor). La tasa de gestación fue de 72,2% y un tiempo de inseminación de 2,3±0,44 min para las borregas inseminadas con el equipo boroscopio y 73,7% y un tiempo de inseminación de 3,6±1,36 min para borregas inseminadas con el equipo de laparoscopia convencional no existiendo diferencia significativa entre la tasa de preñez (P≥0,05) (Chi cuadrado) pero si para el tiempo de inseminación (P≤0,05) (t student). En conclusión, es posible obtener las mismas tasas de preñez con ambos equipos, sin embargo, el equipo de laparoscopia convencional resulta ser más versátil y se logra inseminar en menor tiempo.

Palabras clave: Boroscopio, laparoscopia, oveja, preñez, inseminación artificial.

2. Spermatozoa function

#1805. EVALUATION OF SPERM VIABILITY USING ZOMBIE GREEN IN RAW (0 HOURS) AND FORMALDEHYDE FIXED (24 HOURS AND 1 WEEK) SAMPLES OF ALPACA SPERMATOZOA

Evaluación de la viabilidad espermática utilizando Zombie Green en muestras frescas (0 horas) y fijadas con formaldehído (24 horas y 1 semana) de espermatozoides de alpaca

M. Cucho^{1*}, J. Delgado¹, J. Juárez¹, O. Quispicóndor¹, A. Santiani¹

¹ Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru

• Corresponding author: cuchoacurio@hotmail.com

ABSTRACT

Zombie Green is a new fluorochrome that would be a good sperm viability indicator even in samples that are later fixed with formaldehyde. Therefore, the objective of this study was to compare sperm viability percentages in raw (0 hours) and formaldehyde fixed alpaca spermatozoa samples at different evaluation times (24 hours and one week) using Zombie Green staining. Twenty-two testicles/epididymis of alpaca were processed from the Ninacaca Municipal Slaughterhouse, in Pasco. Spermatozoa were recovered from the tail of the epididymis in 1mL of PBS. Three groups of 100 μ L were formed from each sperm sample, which were incubated with 0.5 μ L of Zombie Green (stock 1: 100 in DMSO) at 38 °C for 30 minutes in the dark, to obtain a final concentration of 100 nM. Then, samples were washed by centrifugation with 1 ml PBS at 600g for 8 minutes and pellets were re-suspended in 100 μ L of PBS (Group 0 hours) to be evaluated immediately or in 100 μ L 2% formaldehyde (Groups 24 hours and 1 week) to be stored at 5 °C in the dark. Before evaluating, the stored samples were washed with 1ml of PBS by centrifugation at 600g for 8 minutes for formaldehyde removal and re-suspended with 100 μ L of PBS. Samples were evaluated by imaging flow cytometry, acquiring ten thousand compatible events for sperms per sample. A laser of 488 nm at 15 mW was used for Zombie Green excitation, while fluorescence emission was detected in Ch02 (505-560 nm) channel. Spermatozoa showing green fluorescence (Zombie Green positive) were considered dead, whereas the sperm that did not show fluorescence were considered as live sperm. The treatments effect (0 h, 24 h and 1 week) on sperm viability was evaluated by ANOVA. In addition, percentages of sperm viability at 0 hours were compared with those of 24 hours and 1 week using the Pearson correlation coefficient. Viability at 0 hours ($67.6 \pm 10.2\%$) was similar ($p > 0.05$) to those obtained at 24 hours ($70.7 \pm 9.4\%$) and 1 week ($71.8 \pm 8.8\%$). Even so, strong and significant positive correlations were found when comparing viability in spermatozoa fixed for 24 hours ($r = 0.91$, $p < 0.0001$) and 1 week ($r = 0.82$, $p < 0.0001$) in relation to control group (0 hours, without fixing). Therefore, it would be possible to process samples of alpaca sperm in the country and evaluate them by flow cytometry at least 24 hours later. These results could be a tool for the reliable and accurate evaluation of breeding males in high-Andean areas.

Keywords: alpaca, sperm, viability, Zombie Green, flow cytometer, formaldehyde.

RESUMEN

El Zombie Green es un nuevo fluorocromo que sería un buen indicador de viabilidad espermática aún en muestras que posteriormente sean fijadas con formaldehído. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue comparar los porcentajes de viabilidad espermática en muestras frescas (0 horas) y fijadas con formaldehído en distintos tiempos de evaluación (24 horas y una semana) de espermatozoides de alpaca utilizando Zombie Green. Se procesaron 22 testículos/epidídimos de alpaca procedentes del Camal Municipal de Ninacaca, Pasco, de donde se recuperaron espermatozoides de la cola del epidídimo en 1mL de PBS. De cada una de las muestras colectadas se formaron 3 grupos (0 horas, 24 horas y 1 semana) de 100 μ L cada uno, que se incubaron con 0.5 μ L de Zombie Green (stock 1:100 en DMSO) a 38°C durante 30 minutos en oscuridad, para obtener a una concentración final de 100nM. Luego, se realizó un lavado con 1ml PBS por centrifugación a 600g por 8 min y los pellets fueron re-suspendidos en 100 μ L de PBS (Grupo 0 horas) para ser evaluadas inmediatamente o en 100 μ L formaldehído al 2% (Grupos 24 horas y 1 semana) para ser almacenadas a 5°C en oscuridad por el tiempo indicado. Antes de evaluar las muestras fijadas, se realizó un lavado con 1ml PBS por centrifugación a 600g por 8 minutos para retirar el formaldehído y fueron re-suspendidas con 100 μ L de PBS para ser evaluadas. Las muestras se evaluaron mediante citometría de flujo con analizador de imágenes, adquiriendo diez mil eventos compatibles con espermatozoides por muestra. Para la excitación del Zombie Green se utilizó el láser 488nm a 15 mW, mientras que la fluorescencia emitida por el Zombie Green fue detectada por el canal Ch02 (505–560 nm). Los espermatozoides que presentaron fluorescencia verde (Zombie Green positivos) fueron considerados como espermatozoides muertos, mientras que los espermatozoides que no presentaron fluorescencia fueron considerados como espermatozoides vivos. El efecto de los tratamientos (0 h, 24 h y 1 semana) sobre la viabilidad espermática fue evaluado mediante ANOVA. Asimismo, los porcentajes de viabilidad espermática a las 0 horas fueron comparados con los de 24 horas y 1 semana utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. La viabilidad a las 0 horas ($67.6 \pm 10.2\%$) fue similar ($p > 0.05$) a las obtenidas a las 24 horas ($70.7 \pm 9.4\%$) y 1 semana ($71.8 \pm 8.8\%$). No obstante, se encontraron correlaciones positivas fuertes y significativas al comparar la viabilidad en espermatozoides fijados por 24 horas ($r=0.91$, $p<0.0001$) y 1 semana ($r=0.82$, $p<0.0001$) con respecto al grupo control (0 horas, sin fijar). Por lo tanto, sería posible procesar muestras de espermatozoides de alpaca en campo, y evaluarlas por citometría de flujo al menos 24 horas después. Estos resultados podrían constituir una herramienta para la evaluación confiable y precisa de machos reproductores en las zonas altoandinas.

Palabras clave: alpaca, espermatozoide, viabilidad, Zombie Green, citómetro de flujo, formaldehído.

#1807. EFFECT OF CRYOPRESERVATION ON ALPACA EPIDIDYMAL SPERMATOZOA VIABILITY**Efecto de la criopreservación sobre la viabilidad en espermatozoides epididimarios de alpaca****Javier Juárez¹, Alexei Santiani¹**¹Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

*Corresponding autor: javierjuarezvera@gmail.com

ABSTRACT

Evaluation of spermatic viability is based on the analysis of the spermatozoon plasmatic membrane, being considered viable those with intact plasmatic membrane, and non-viable those with altered integrity of it. Due to the damage that occurs on the spermatozoon plasmatic membrane during cryopreservation, post-thawing evaluation is important. Therefore, the objective of this study was to determine the effect of cryopreservation on Alpaca epididymal spermatozoa viability through flow cytometry. For this, 41 Alpaca testicles were obtained from the Municipal Slaughterhouse of Ninacaca, Pasco. Samples were chosen based on $\geq 30\%$ motility and $\geq 50 \times 10^6$ sperm/mL concentration. Spermatozoa were collected from the epididymis tail using 1 mL of skim milk-based dilutor and separated on two 500 μ L aliquots. The first aliquot was used for initial viability evaluation, and the second was placed on 0.25mL straws for slow freezing, using program number 7 in an automatic freezing device (Freeze Control Cryologic®). Finally, straws were stored in a liquid nitrogen tank at -196°C , until the evaluation day. All samples, fresh and thawed, were washed twice through centrifugation with a PBS solution to remove the dilutor. For viability evaluation, 100 μ L of each sample were incubated with 0.5 μ L of SYBR-14 (20 μ M) and 0.5 μ L of propidium iodide (2.4nM) for 10 minutes at 38°C , to reach a final concentration of 100nM and 12 μ M, respectively. Immediately after, samples were evaluated with a flow cytometer FlowSight (Amnis), obtaining ten thousand spermatozoa compatible events per sample. For SYBR-14 and propidium iodide excitation, a 488nm laser was used, and the emitted fluorescence of SYBR-14 and propidium iodide were detected by Ch02 (505–560 nm) and Ch05 (642–740 nm) channels, respectively. Spermatozoa with green fluorescence (SYBR-14) on their heads were considered viable, and those with red fluorescence (propidium iodide) were considered non-viable. A paired T-student analysis was performed to determine how cryopreservation affected viability. It was found that spermatozoa initial viability ($48.97 \pm 11.47\%$) was significantly higher ($p < 0.05$) than post-thawing viability ($32.30 \pm 9.57\%$). It is concluded that cryopreservation of epididymal spermatozoa causes a significant reduction of their viability.

Key words: alpaca, sperm, viability, SYBR-14, loduro propidium.

RESUMEN

La evaluación de la viabilidad espermática está basada en el análisis de la membrana plasmática del espermatozoide, considerándose viables aquellos que presentan una membrana plasmática intacta, y no viables aquellos que presentan una alteración en la integridad de su membrana plasmática. Debido al daño que sufre la membrana plasmática de los espermatozoides durante la criopreservación es importante su evaluación post-descongelamiento. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la criopreservación sobre la viabilidad en espermatozoides epididimarios de alpaca mediante la citometría de flujo. Se trabajó con 41 testículos de alpaca obtenidos del Camal Municipal de Ninacaca, Pasco. Se utilizaron solamente las muestras que presentaron una motilidad $\geq 30\%$ y concentración espermática $\geq 50 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Los espermatozoides se recuperaron de la cola del epidídimo con 1mL de dilutor a base de leche descremada, separándose luego en 2 alícuotas de 500 μ L. La primera alícuota se utilizó para la evaluación de la viabilidad inicial y la segunda alícuota se colocó en pajillas de 0.25mL para congelarse en forma lenta utilizando el programa número 7 en un equipo de congelación automático (Freeze Control Cryologic®), finalmente se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido a -196°C hasta el día de su evaluación. Todas las muestras, frescas y descongeladas fueron lavadas 2 veces mediante centrifugación con solución PBS (phosphate buffered saline) para retirar el dilutor. Para evaluar la viabilidad, 100 μ L de cada muestra fueron incubados con 0.5 μ L de SYBR-14 (20 μ M) y 0.5 μ L de loduro de Propidio (2.4 nM) por 10 minutos a 38°C , para llegar a una concentración final de 100nM y 12 μ M, respectivamente. Inmediatamente después, las muestras fueron evaluadas mediante un citómetro de flujo FlowSight (Amnis), adquiriéndose diez mil eventos compatibles con espermatozoides por muestra. Para la excitación del SYBR-14 y loduro de Propidio se utilizó el láser de 488nm y la fluorescencia emitida por el SYBR-14 y el loduro de Propidio fueron detectadas por los canales Ch02 (505–560nm) y Ch05 (642–740nm) respectivamente. Los espermatozoides con fluorescencia verde (SYBR-14) en sus cabezas se consideraron viables y los que mostraron fluorescencia roja (loduro de Propidio) en sus cabezas se consideraron no viables. Se realizó un análisis de T-student pareado para determinar como la criopreservación afecta la viabilidad. Se encontró que la viabilidad espermática inicial ($48.97 \pm 11.47\%$) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que la viabilidad espermática post-descongelamiento ($32.30 \pm 9.57\%$). Se concluye que la criopreservación de espermatozoides epididimarios causa una disminución significativa de la viabilidad espermática.

Palabras clave: alpaca, espermatozoide, viabilidad, SYBR-14, loduro de Propidio.

#1808. CHARACTERIZATION OF PERUVIAN HAIRLESS DOG SEMEN BY FLOW CYTOMETRY**Caracterización del semen del perro sin pelo del Perú mediante citometría de flujo****Carlos Challoco¹, María Perez², Alexei Santiani^{1,2}**

1. Laboratory of Reproductive Biotechnologies, Faculty of Veterinary and Biological Sciences, Universidad Científica del Sur, Lima, Peru
2. Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, National University of San Marcos, Lima, Peru

* Corresponding author: cychalloco@gmail.com

ABSTRACT

The Peruvian hairless dog is a breed recognized as the nation's cultural heritage. In order to preserve and know this breed it is important to know the normal seminal characteristics. Therefore, the objective of this study was to characterize sperm viability, mitochondrial membrane potential (PMM) and acrosomal integrity in a group of clinically normal males. Ten male dogs of Peruvian hairless breed aged between 1 and 5 years, enrolled in the Peruvian Kennel Club, were used for semen collection (n = 10) by digital manipulation. Initial motility and sperm concentration were recorded as reference values. Subsequently, 3 aliquots of 100 µL of each sample were made for evaluation of (1) sperm viability (SYBR-14 and Propidium iodide, final concentration of 100 nM and 12 µM respectively), (2) MMP (MitoTracker Deep Red FM, concentration final 100 nM) and acrosomal integrity (FITC-PSA / PI, final concentration 2.5 µg / mL). Each aliquot was incubated at 38 ° C for 10 minutes in darkness. Analysis was performed using flow cytometry, acquiring 10,000 events compatible with sperm. Excitation lasers of 488 nm (for SYBR14, PI and FITC-PSA) and 642 nm (for MitoTracker) were used and the fluorescence emission was detected using the Ch02 (505-560 nm) for SYBR14 and FITC-PSA; Ch05 (642-740 nm) for PI and Ch11 (642-740) for MitoTracker channels. Live spermatozoa showed green fluorescence (SYBR14) and dead spermatozoa red fluorescence (PI); spermatozoa with high MMP showed orange fluorescence (MitoTracker) in the middle piece meanwhile sperm with acrosomal damage to those showed green fluorescence (FITC-PSA) in the acrosomal region. Initial motility and sperm concentration values were $58.75 \pm 21.83\%$ and $253.75 \times 10^6 \pm 31.10 \times 10^6$ sperm / mL. The values obtained by flow cytometry were $81.41 \pm 16.87\%$ sperm viability; of $83.21 \pm 16.86\%$ PMM and $67.5 \pm 32.31\%$ viability / acrosomal integrity. These results represent the first report on the semen characteristics of this breed and could constitute a basis for future research, as well as reference values for a better selection of breeding males oriented to the preservation of the hairless Peruvian dog. Financial Source: Universidad Científica del Sur, thesis project funds test 2018-1

Key words: Peruvian hairless dog, semen, flow cytometry**RESUMEN**

El perro sin pelo del Perú es una raza reconocida como patrimonio cultural de la nación. Para poder preservar y conocer esta raza es importante conocer las características seminales normales. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar la viabilidad espermática, potencial de membrana mitocondrial (PMM) e integridad acrosomal en un grupo de machos clínicamente normales. Diez machos de raza Perro sin pelo del Perú de edad entre 1 a 5 años, inscritos en el Kennel Club Peruano fueron utilizados para coleccionar semen (n = 10) mediante manipulación digital. Inicialmente se registró la motilidad y concentración espermática como valores de referencia. Posteriormente, se formaron 3 alícuotas de 100 µL de cada muestra para evaluar (1) viabilidad espermática (SYBR-14 y Ioduro de Propidio, concentración final de 100 nM y 12 µM respectivamente), (2) PMM (MitoTracker Deep Red FM, concentración final 100 nM) e (3) integridad acrosomal (FITC-PSA/PI, concentración final 2.5 µg/mL). Cada alícuota fue incubada a 38°C por 10 minutos en oscuridad. Las lecturas fueron realizadas utilizando un citómetro de flujo con sistema analizador de imágenes, adquiriendo 10 mil eventos compatibles con espermatozoides. Se utilizaron láseres de excitación de 488 nm (para SYBR14, PI y FITC-PSA) y 642 nm (Para MitoTracker) y la emisión de fluorescencia fue detectada utilizando los canales Ch02 (505-560 nm) para SYBR14 y FITC-PSA; Ch05 (642-740 nm) para PI y Ch11 (642-740) para MitoTracker. Se consideraron espermatozoides vivos a aquellos que presentaron fluorescencia verde (SYBR14), espermatozoides muertos a aquellos que presentaron fluorescencia roja (PI), espermatozoides con alto PMM a aquellos que presentaron fluorescencia naranja (MitoTracker) en la pieza media y espermatozoides con daño acrosomal a aquellos que presentaron fluorescencia verde (FITC-PSA) en la región acrosomal. Los valores iniciales de motilidad y concentración espermática fueron $58.75 \pm 21.83\%$ y $253.75 \times 10^6 \pm 31.10 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Los valores obtenidos mediante citometría de flujo fueron $81.41 \pm 16.87\%$ de viabilidad espermática; $83.21 \pm 16.86\%$ de PMM y $67.5 \pm 32.31\%$ viabilidad/integridad acrosomal. Estos resultados representan el primer reporte sobre las características seminales de esta raza y podrían constituir una base para futuras investigaciones, como también valores de referencia para una mejor selección de machos reproductores orientados a la preservación del perro sin pelo del Perú. Fuente de Financiamiento: Universidad Científica del Sur, Concurso de fondos de proyectos de tesis 2018-1

Palabras clave: Perro sin pelo del Perú, semen, citometría de flujo

#1809. USE OF AMIDES AS CRYOPROTECTANTS FOR THE CRYOPRESERVATION OF EPIDIDYMAL ALPACA SPERMATOZOA

Uso de amidas como crioprotectores para el congelamiento de espermatozoides epididimarios de alpaca

Winnie Contreras^{1*}, Rodolfo Zurita², Alexei Santiani^{1,2}

¹Animal Reproduction Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

²Reproductive Biotechnology Laboratory, Faculty of Veterinary and Biological Sciences, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

*Corresponding autor: michellecontrerasmarmolejo@gmail.com

ABSTRACT

Cryoprotectant agents are important for a successful cryopreservation process. In South American camelids, post-thawing sperm quality results are still discouraging, so it is necessary to stimulate the search for alternative cryoprotectant agents such as amides: dimethylacetamide (DMA) and dimethylformamide (DMF). Therefore, the aim of this study was to compare the effect of DMA and DMF as cryoprotectant agents on sperm functionality during the process of cryopreservation of epididymal alpaca spermatozoa. Thirty alpaca testes with a weight of 13.8 ± 3.7 g, length of 4.0 ± 0.5 cm, sperm concentration of $151.9 \pm 81.1 \times 10^6$ sperm/mL and initial motility of $62.5 \pm 19.4\%$ were processed. Spermatozoa were recovered from the tail of the epididymis with 1 mL of extender based on skim milk, egg yolk and fructose. Two aliquots of 300 μ L of each sample were made and DMA and DMF was added at a final concentration of 1 M. Then, samples were loaded into plastic straws. For cryopreservation, an automatic freezing system was used and straws were stored in liquid nitrogen until evaluation. All thawed samples were washed twice by centrifugation with PBS to evaluate (1) viability and acrosomal integrity (FITC-PSA and Propidium Iodide, final concentration of 2.5 μ g/mL and 10 μ g / mL, respectively) and (2) mitochondrial membrane potential (MMP) (MitoTracker Deep Red 633, final concentration of 100 nM). Each aliquot was incubated at 38 °C in the dark for 10 minutes. Readings were performed using a flow cytometer with image analyzer, acquiring 10 000 events compatible with sperm. Excitation lasers of 488 nm and 642 nm were used for FITC-PSA/PI and MitoTracker, respectively; and emission fluorescence was detected by channels Ch02 (505-560 nm) for FITC-PSA, Ch05 (642-740 nm) for PI and Ch11 (642-740 nm) for MitoTracker. Cells that showed no fluorescence in the acrosome nor sperm head were considered acrosome-intact viable spermatozoa; while cells that showed red fluorescence in the midpiece were considered spermatozoa with MMP. A T-student test was used to analyze the effect of cryoprotectants used. The mean values in the DMF group were 17.9% motility, 34.2% viability, 26.3% acrosome-intact viable sperm and 35.3% MMP. These results were slightly higher ($p > 0.05$) than group DMA (13.6% motility, 33.8% viability, 25.8% of intact-acrosome viable spermatozoa and 34.4% of PMM). In conclusion, DMA and DMF at 1M allows to preserve functional characteristics during the cryopreservation process of alpaca epididymal spermatozoa.

Keywords: Cryopreservation, Dimethylacetamide, Dimethylformamide, alpaca spermatozoa, flow cytometer.

RESUMEN

Los agentes crioprotectores constituyen un factor importante para un exitoso proceso de criopreservación. En camélidos sudamericanos, los resultados de calidad espermática post-descongelamiento aún son desalentadores, por lo que es necesario estimular la búsqueda de agentes crioprotectores alternativos como las amidas: dimetilacetamida (DMA) y dimetilformamida (DMF). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue comparar el efecto de DMA y DMF como agentes protectores de la funcionalidad espermática durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. Se trabajó con 30 testículos de alpaca con un peso de 13.8 ± 3.7 g, longitud testicular de 4.0 ± 0.5 cm, concentración espermática de 151.9 ± 81.1 millones de espermatozoides/mL y motilidad inicial de $62.5 \pm 19.4\%$, en promedio. Los espermatozoides fueron recuperados de la cola del epidídimo con 1 mL de dilutora base de leche descremada, yema de huevo y fructosa. Se utilizó 10 μ L de la muestra para la evaluación de la motilidad espermática y 10 μ L para evaluar la concentración, separándose luego en 2 alícuotas de 300 μ L a las que se adicionaron los crioprotectores DMA y DMF a una concentración de 1 M, y se procedió a empajillar. Para la criopreservación se utilizó un sistema automático de congelamiento y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta el momento de su evaluación. Todas las muestras descongeladas fueron lavadas 2 veces por centrifugación con solución PBS para evaluar (1) la viabilidad e integridad acrosomal (FITC-PSA y Ioduro de Propidio, concentración final de 2.5 μ g/mL y 10 μ g/mL, respectivamente) y (2) el potencial de membrana mitocondrial (PMM) (MitoTracker Deep Red 633, concentración final de 100 nM). Cada alícuota fue incubada a 38°C en oscuridad por 10 minutos. Las lecturas fueron realizadas utilizando un citómetro de flujo con analizador de imágenes, adquiriendo 10 000 eventos compatibles con espermatozoides. Los láser de excitación 488 nm y 642 nm fueron utilizados para FITC-PSA/PI y MitoTracker, respectivamente; y la fluorescencia emitida fue detectada por los canales Ch02 (505-560 nm) para FITC-PSA, Ch05 (642-740 nm) para PI y Ch11 (642-740 nm) para MitoTracker. Se consideraron espermatozoides vivos con integridad acrosomal a aquellos que no presentaron fluorescencia en la zona acrosomal ni en la cabeza; y espermatozoides con PMM a los que presentaron fluorescencia roja en la pieza media. Se realizó la prueba de T-student pareada para comparar el efecto de los agentes crioprotectores utilizados. Los valores promedio en el grupo DMF fueron 17.9% de motilidad, 34.2 % de viabilidad, 26.3 % de viabilidad e integridad acrosomal y 35.3 % de PMM. Estos resultados fueron ligeramente mayores ($p > 0.05$) a los del grupo DMA donde se encontró 13.6 % de motilidad, 33.8% de viabilidad, 25.8 % de viabilidad e integridad acrosomal y 34.4 % de PMM. En conclusión, DMA y DMF al 1M permiten mantener las características funcionales durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca.

Palabras clave: Criopreservación, Dimetilacetamida, Dimetilformamida, espermatozoides de alpaca, citometría de flujo.

#1810. ESTIMATION OF MOTILITY PARAMETERS IN EPIDIDYMAL SPERMATOZOA OF PORONCOY (*Cavia aperea tschudii*)**Estimación de los parámetros de motilidad de espermatozoides epididimarios de poroncoy (*Cavia apereatschudii*)****R. Ccalta¹; R. Mamani²; A. Meza¹; N. Huanca¹; A. Ccalta¹; E. Ampuero; H. Cucho¹**¹Universidad Nacional San Antonio Abad Del Cusco; ²Universidad Nacional del Altiplano- Puno.

* Corresponding author: frisky_rut@hotmail.com

ABSTRACT

Sperm motility is an important and determinant characteristic of seminal quality, which is why we decided to determine the sperm motility parameters of poroncoy (*Cavia aperea tschudii*) using a computerized semen analysis system - ISAS®. The study was carried out at the Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos CICAS - La Raya – UNSAAC, between February and April 2018. The poroncoy epididymis (400 to 500 g of live weight) were obtained from 3 animals sacrificed by general anesthesia overdose. Epididymis were sectioned with a scalpel and washed with 1.5 mL of a Tris base diluent. Semen concentration, motility and another motility parameters were evaluated at the mobility module of the Integrated Semen Analysis System (ISAS® v1.2), which uses a UOP-UB200i microscope. 5 µL samples were analyzed with a 10X negative phase contrast lens; the video signal was acquired with a Proiser 782C video camera. 25 images per second were captured, analyzing the sperm in the configuration established for rodents. The areas of the captured particles were between 5 and 80 µm², a 75% progressivity of the STR (straightness index) and a connectivity of 14 was used, capturing no less than 500 sperm cells for each epididymis in 10 fields; in the estimation, the spermatozoa that formed rouleaux and the individual ones were not differentiated. Being an exploratory study, descriptive statistics were used. The sperm concentration was 28.87 ± 8.46 x10⁶spz/mL; progressive motility was 52.53 ± 12.97%, with a maximum motility of 65.1% and a minimum of 39.2%. The kinematic parameters of sperm motility were: curvilinear velocity (VCL) 80.43 ± 27.49 µm/s; straight line velocity (VSL) of 19.86 ± 4.28 µm/s; the average path velocity (VAP) was 40.60 ± 10.13 µm/s; linearity (LIN) 25.73 ± 4.59 %; the straightness (STR) was 50.80 ± 2.80 %; the wobble (WOB) was 50.53 ± 7.51 %; the amplitude of lateral head movement (ALH) was 3.63±1.24 µm, and the beat cross frequency (BCF) was 4.16 ± 1.35 Hz. In conclusion, we made the first estimation of the kinematic parameters of motility in poroncoy epididymal sperm.

Keywords: Poroncoy, sperm, motility, kinematic parameters**RESUMEN**

La movilidad espermática es una característica importante y determinante de la calidad seminal, es por ello que se planteó determinar los parámetros de motilidad espermática del poroncoy (*Cavia apereatschudii*) utilizando un sistema computarizado de análisis de semen - ISAS®. El trabajo, se realizó en el Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos CICAS - La Raya – UNSAAC, entre febrero y abril del 2018. Los epidídimos de poroncoy (400 a 500g de peso vivo), fueron obtenidos de 3 animales sacrificados por sobredosis de anestesia general. Sus epidídimos fueron seccionados con un bisturí y lavados con 1.5 mL de un diluyente base Tris. La motilidad, parámetros de motilidad y concentración del semen fueron evaluadas en el módulo de movilidad del Integrated Semen Analysis System (ISAS® v1.2), que emplea un microscopio UOP – UB200i. Muestras de 5 µL se analizaron con un lente de 10X de contraste de fase negativo; la señal de video fue adquirida con una video cámara Proiser 782C. Se capturaron 25 imágenes por segundo, analizando a los espermatozoides en la configuración establecida para roedores. Las áreas de las partículas capturadas estuvieron comprendidas entre 5 y 80 µm², se utilizó una progresividad de 75% del STR (índice de rectitud) y una conectividad de 14, capturándose no menos 500 células espermáticas por cada epidídimo en 10 campos; en la estimación no se ha diferenciado los espermatozoides que formaban rouleaux y los individuales. Al ser un estudio exploratorio se empleó la estadística descriptiva. La concentración de espermatozoides fue 28.87 ± 8.46x10⁶spz/ml; la motilidad progresiva fue de 52.53 ± 12.97 %, con una movilidad máxima de 65.1 % y una mínima de 39.2%. Los parámetros cinéticos de motilidad espermática fueron: velocidad curvilínea (VCL) 80.43±27.49 µm/s; velocidad rectilínea (VSL) de 19.86±4.28 µm/s; la velocidad promedio (VAP) fue 40.60±10.13 µm/s; el índice de linealidad (LIN)25.73±4.59 %; el índice de rectitud (STR) fue 50.80±2.80 %;el índice de oscilación(WOB) fue 50.53±7.51 %; el movimiento lateral de la cabeza(ALH) fue 3.63±1.24 µm, y la frecuencia de batida de la cola (BCF) fue 4.16±1.35 Hz. En conclusión, se ha realizado la primera estimación de los parámetros cinéticos de motilidad en espermatozoides epididimarios de poroncoy.

Palabras claves: Poroncoy, esperma, movilidad, parámetros de motilidad.

#1811. EFFECT OF DIMETHYLFORMAMIDE ON THE MOTILITY PARAMETERS OF CRYOPRESERVED RAM SPERM**Efecto de la dimetilformamida en los parámetros de motilidad en espermatozoide de carnero criopreservado****F Contreras¹; R Caceres¹; A Meza¹; C Ordóñez¹; H Cucho¹**¹Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

* Corresponding author: fiorella.contreras.26@gmail.com

ABSTRACT

Motility is one of the most used parameters in the evaluation of sperm quality; it describes the energetic state of the spermatozoa. The purpose of this study was to compare the effect of freezing with 2% dimethylformamide (DMF) and glycerol, on the motility parameters of ram sperm. The work was carried out in the Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos "La Raya" – UNSAAC, between March and September of 2017. 3 Corriedale rams ranging the ages of 2 to 3 years were used, obtaining 4 ejaculates of each, with intervals of 8 days. The semen was collected using an artificial vagina for sheep (Minitube®), thermoregulated at 37 ° C, using a ewe with induced estrus as a stimulus. In the freezing process, a TRIS base diluent with, 2% DMF and glycerol was used as cryoprotectant. The kinematic parameters of thawed semen of rams were evaluated in a CASA system, the Integrated Semen Analysis System (ISAS® v1.2). 5 µL samples were analyzed with a 10X negative phase contrast lens; the video signal was acquired with a Proiser 782C video camera. We captured 25 images per second, analyzing the sperm in the configuration for rams. The cryopreservation was carried out in 0.5 mL straws, which had a concentration of 50x10⁶spz/straws, freezing was horizontal, thawing the samples after one week. A t test was used to compare the values of thawed semen. The initial sperm concentration was 2264.20 ± 669.65 x10⁶spz/mL, with a motility of 86.35 ± 4.96%. At thawing, motility was 49.12 ± 10.42 and 49.26 ± 2.99% for DMF and glycerol, respectively. The sperm motility parameters were: curvilinear velocity (VCL) 59.03 ± 5.39 and 55.05 ± 5.60 µm/s for DMF and glycerol; the average path velocity (VAP) 32.67 ± 2.11 for DMF and 31.18 ± 2.01 µm/s for glycerol; the amplitude of lateral head movement (ALH) was 3.35 ± 0.27 in DMF and 2.93 ± 0.30 µm in glycerol, and the beat cross frequency (BCF) 9.92 ± 1.54 for DMF and 9.19 ± 1.62 Hz for glycerol. Significant differences were found (p <0.05) for the VCL and ALH. It is concluded that the use of 2% of DMF shows better VCL and ALH, than the use of 2% of glycerol, when defrosting ram semen.

Keywords: ram, dimethylformamide, kinetic parameters, semen, cryopreservation

RESUMEN

La motilidad es uno de los parámetros más usados en la evaluación de la calidad espermática; describe el estado energético de los espermatozoides. El propósito del estudio fue comparar el efecto de la congelación con 2% dedimetilformamida (DMF) y glicerol, en los parámetros de motilidad del espermatozoide del carnero. El trabajo, se realizó en el Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos La Raya – UNSAAC, entre marzo y septiembre del 2017. Se utilizaron 3 carneros de la raza Corriedale de 2 y 3 años de edad, obteniendo 4 eyaculados de cada uno de éstos, con intervalos de 8 días. El semen se colecto empleando una vagina artificial para ovinos (Minitube®), termorregulada a 37°C, empleando una hembra con celo inducido como estímulo. En el proceso de congelación se empleó un diluyente base TRIS, con DMF y glicerol al 2% como crioprotectores. Los parámetros cinéticos del semen descongelado de los carneros fueron evaluados en un sistema CASA, el Integrated Semen Analysis System (ISAS® v1.2). Muestras de 5 µL se analizaron con un lente de 10X de contraste de fase negativo; la señal de video fue adquirida con una video cámara Proiser782C. Se capturaron 25 imágenes por segundo, analizando a los espermatozoides en la configuración establecida para carneros. La criopreservación se realizó en pajillas de 0.5 mL, que tenían una concentración de 50x10⁶spz/pajilla, la congelación fue horizontal, descongelándose las muestras luego de una semana. Se usó una prueba de t para comparar los valores del semen descongelado. La concentración inicial de espermatozoides fue 2264.20 ± 669.65 x10⁶spz/mL, con una motilidad de 86.35 ± 4.96%. Al descongelado se tuvo una motilidad de 49.12 ± 10.42 y 49.26 ± 2.99% con DMF y glicerol, respectivamente. Los parámetros de motilidad espermática fueron: velocidad curvilínea (VCL) 59.03 ± 5.39 y 55.05 ± 5.60 µm/s para DMF y glicerol; la velocidad promedio (VAP) 32.67 ± 2.11 para DMF y 31.18 ± 2.01 µm/s para glicerol; la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza de espermatozoide (ALH) fue de 3.35 ± 0.27 en DMF y 2.93 ± 0.30 µm en glicerol, y la frecuencia de batida (BCF) 9.92 ± 1.54 para DMF y 9.19 ± 1.62 Hz para glicerol. Se halló diferencias significativas (p<0.05) para el VCL y ALH. Se concluye que el empleo de 2% de DMF muestra mejor VCL y ALH, que el uso de 2% de glicerol, al descongelado del semen de carnero.

Palabras clave: ovino, dimetilformamida, parámetros cinéticos, semen, criopreservación

#1812. ANTIOXIDANT CONTRIBUTION OF LYOPHILIZED SEMINAL PLASMA CAN IMPROVE STALLION SEMEN FREEZABILITY

La contribución antioxidante del plasma seminal liofilizado puede mejorar la congelabilidad del semen equino

Alexandra Usuga^{1*}, Giovanni Restrepo², Benjamín Rojano³

¹Grupo de Investigación INCA-CES, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES, Medellín, Colombia.

²Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA), Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Medellín, Colombia.

³Grupo de Investigación en Ciencias de los Alimentos, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Medellín, Colombia.

*Corresponding author: ausuga@ces.edu.co

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of lyophilized seminal plasma (LSP) supplementation, according to its total antioxidant capacity (TAC), on stallion semen freezability. Semen from 30 horses was collected to obtain a pool of LSP. For this, a volume of 20 mL from each ejaculate was centrifuged for 15 minutes at 800 x g. Then was re-centrifuged for 10 minutes at 3400 x g and stored at -20°C for a minimum of 24 hours before freeze-drying. TAC of LSP pool was evaluated by the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. Later, fifteen ejaculates from five stallions were collected and cryopreserved using a programmable freezing protocol. Each ejaculate was centrifuged for 15 minutes at 800 x g. The precipitate was extended for a final concentration of 100 x 10⁶ sperm per mL, in EquiPlus® supplemented with 5% of egg yolk and 5% of dimethyl-formamide was divided into four aliquots, of which three were supplemented with the required amounts of LSP to obtain three ORAC levels: low, medium and high (1.44 mg/mL, 5.04 mg/mL and 8.68 mg/mL of LSP to obtain 4000, 14000 and 24000 ORAC units, respectively). The fourth aliquot was used as control group without supplementation. Post-thaw, total (TM) and progressive (PM) motility, kinetics (VCL, VSL and VAP), sperm viability (SV), normal morphology (NM) and the integrity of the plasma membrane (HOS) were evaluated. For statistical analysis, completely randomized mixed models were fitted. Semen samples with PM>35% after freeze-thaw were considered as good freezability, and samples with PM≤35% after freeze-thaw were considered as poor freezability. Comparison of means between treatments and groups were done with Tukey's test. The significance level used for all assessments was p<0.05. Semen supplementation with LSP to obtain low and medium ORAC levels, showed a positive effect on post-thaw TM and HOS (p<0.0001). Supplementation with LSP to achieve a high ORAC level, showed a decrease in post-thaw TM, PM, VSL and SV (p<0.0001). For poor freezability samples, supplementation with LSP to obtain low and medium ORAC levels, showed higher post-thaw TM (50.1 ± 11.3% and 50.7 ± 11.4%) regarding high level and control group (43.8 ± 13.1% and 46.4 ± 8.8%) and higher HOS (44.4 ± 7.9% and 46.1 ± 8.5% regarding 37.6 ± 9.2% and 36.6 ± 10.9% respectively) (p<0.0001). For good freezability samples, supplementation showed no significant effect (p>0.05). In conclusion, supplementing stallion semen with LSP, according to the TAC contribution, can improve its freezability. High TAC level of LSP can decrease post-thaw semen quality, because some antioxidants present in seminal plasma can become prooxidants.

Keywords: sperm, freezing, oxidative stress, equine

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la suplementación de plasma seminal liofilizado (PSL), de acuerdo con su capacidad antioxidante total (CAT), sobre la congelación del semen equino. El semen de 30 caballos fue colectado para obtener un pool de PSL. Para esto, se centrifugó un volumen de 20 ml de cada eyaculado durante 15 minutos a 800 x g. Luego se re-centrifugó durante 10 minutos a 3400 x g y se almacenó a -20 ° C durante un mínimo de 24 horas antes de la liofilización. La CAT del pool de PSL se evaluó mediante la prueba de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC). Luego, quince eyaculados de cinco caballos se colectaron y criopreservaron usando un protocolo de congelación programable. Cada eyaculado se centrifugó durante 15 minutos a 800 x g. El precipitado se diluyó para una concentración final de 100 x 10⁶ espermatozoides por ml, en EquiPlus® suplementado con 5% de yema de huevo, 5% de dimetil-formamida y se dividió en cuatro alícuotas, de las cuales tres se suplementaron con las cantidades requeridas de PSL para obtener tres niveles de ORAC: bajo, medio y alto (1.44 mg/mL, 5.04 mg/mL y 8.68 mg/mL de LSP para obtener 4000, 14000 y 24000 unidades ORAC respectivamente). La cuarta alícuota se utilizó como grupo control sin suplementación. Se evaluaron la movilidad total (MT) y progresiva (MP) post-descongelación, la cinética espermática (VCL, VSL y VAP), la viabilidad de los espermatozoides (VE), la morfología normal (MN) y la integridad de la membrana plasmática (HOS). Para el análisis estadístico, se ajustaron modelos mixtos completamente aleatorizados. Las muestras de semen con PM>35% después de la descongelación se consideraron como de buena congelabilidad, y las muestras con PM≤35% después de la descongelación se consideraron de baja congelabilidad. La comparación de las medias entre los tratamientos y grupos se realizó mediante la prueba de Tukey. El nivel de significancia usado para todas las evaluaciones fue p <0.05. La suplementación de semen con PSL para obtener niveles bajos y medios de ORAC, mostró un efecto positivo en MT y HOS post-descongelación (p<0.0001). La suplementación con PSL para lograr un alto nivel de ORAC, mostró una disminución en MT, MP, VSL y VE post-descongelación (p<0.0001). Para las muestras de baja congelabilidad, la suplementación con PSL para obtener niveles bajos y medios de ORAC, mostró una mayor MT post-descongelación (50.1 ± 11.3% y 50.7 ± 11.4%) respecto al nivel alto y el grupo control (43.8 ± 13.1% y 46.4 ± 8.8%) y mayores HOS (44.4 ± 7.9% y 46.1 ± 8.5% respecto 37.6 ± 9.2% y 36.6 ± 10.9% respectivamente). Para las muestras de buena congelabilidad, la suplementación no mostró un efecto significativo (p> 0.05). En conclusión, suplementar el semen equino con PSL, de acuerdo con su contribución de CAT, puede mejorar su congelabilidad. El alto nivel de CAT del PSL puede disminuir la calidad del semen post-descongelación, debido a que algunos antioxidantes presentes en el plasma seminal pueden convertirse en prooxidantes.

Palabras clave: semen, congelación, estrés oxidativo, equino.

#1814 EVALUATION OF MALONDIALDEHYDE AS AN INDICATOR OF OXIDATIVE STRESS ON ROOSTER SPERM MEMBRANE

Evaluación del malondialdehído como indicador de estrés oxidativo en la membrana espermática de gallo

C. Cruz-Valencia^{1*}, J.A. Herrera-Barragán², J.L. Quintanar-Stephano¹, C. Guerrero-Méndez³, R.M. Chávez-Morales¹

¹Universidad Autónoma de Aguascalientes, Departamento de Fisiología y Farmacología. Edif. 202, Ciudad Universitaria, C. P. 20131, Aguascalientes, Ags. México.

²Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Ciudad de México, México.

³Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Departamento de Ciencias Básicas, Aguascalientes, Ags. México.

* Corresponding author: cuaubiol@hotmail.com

ABSTRACT

During *in vitro* management of rooster ejaculates, one of the mechanisms that induces sperm damage is the oxidative attack of the lipid membrane, promoting the initiation of the peroxidation cascade. Malondialdehyde (MDA) is the final product of this peroxidation, which can be evaluated by the thiobarbituric acid test (TBA). The determination of the MDA amount in an ejaculate gives an idea of the oxidation state of the sperm cells membrane, which is directly related to its fertilizing capacity. In the present experiment, the concentration of MDA of capacitated, reacted and fresh, ejaculates were evaluated. As negative control, samples previously refrigerated for 24 hours at 4°C were used to provide cold-induced oxidative stress. The ejaculates were adjusted to a concentration of 2500x10⁶ sperm/mL and only samples that met an acceptable quality were used. The MDA concentration was determined in nmol MDA/ml. Data was analyzed in the statistical software Prism Version 6.0 through ANOVA analysis and Tukey test to determine the differences between the means. Results indicate that the MDA concentration in fresh spermatozoa was 1.59 nmol/ml, being statistically lower (P=0.0001) than sperm previously refrigerated for 24 hours (negative control), with an MDA concentration of 2.27 nmol/ml; the MDA concentration in different metabolic states was similar (P> 0.05) among these, meanwhile the capacitated spermatozoa showed a concentration of 1.05 nmol/ml and the reacted sperm 1.07 nmol/ml. This suggests that the normal physiological processes of rooster spermatozoa when being carried out *in vitro* do not promote membrane damage by oxidative processes. It is concluded that cold promotes membrane oxidation of rooster spermatozoa. *In vitro* induced acrosome capacitation and reaction processes do not promote membrane lipid peroxidation.

Keywords: oxidative stress, malondialdehyde, sperm membrane, rooster.

RESUMEN

Durante el manejo *in vitro* de eyaculados de gallo, uno de los mecanismos que induce daño en los espermatozoides es el ataque oxidativo de la membrana lipídica, promoviendo el inicio de la cascada de peroxidación, el malondialdehído (MDA) es el producto final de esta peroxidación, el cual puede ser evaluado mediante el ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBA). El determinar la cantidad de MDA en un eyaculado, otorga una idea del estado de oxidación que presentan las células espermáticas en su membrana, lo que está directamente relacionado con la capacidad fertilizante. En el presente experimento se evaluó la concentración de MDA de eyaculados de gallo frescos, capacitados y reaccionados; Como control negativo se usaron muestras que fueron refrigeradas durante 24 horas a 4° C, para inducir el estrés oxidativo por frío. Los eyaculados se ajustaron a una concentración de 2500x10⁶ y sólo se emplearon las muestras que cumplieran con una calidad aceptable. La concentración de MDA se determinó en nmol MDA/ml. Los datos fueron analizados en el software estadístico Prisma Versión 6.0 mediante un análisis ANOVA y una prueba Tukey para determinar las diferencias entre las medias. Los resultados indican que la concentración de MDA en espermatozoides frescos fue de 1.59 nmol/ml y estadísticamente menores (P=0.0001) al compararlos con los espermatozoides refrigerados 24 horas (control negativo) con una concentración de MDA de 2.27 nmol/ml. La concentración de MDA en los diferentes estados metabólicos fue similar (P>0,05) entre éstos, los espermatozoides capacitados mostraron una concentración de 1.05 nmol/ml y los espermatozoides reaccionados 1.07 nmol/ml, esto sugiere que los procesos fisiológicos normales de los espermatozoides de gallo cuando son llevados a cabo *in vitro* no promueven el daño membranar por procesos oxidativos. Se concluye que el frío es un promotor de la oxidación membranar de los espermatozoides de gallo. Los procesos de capacitación y reacción acrosomal inducidos *In Vitro*, no promueven la lipoperoxidación membranar.

Palabras clave: estrés oxidativo, malondialdehído, membrana espermática, gallo.

#1815 EVALUATION OF ACROSOMAL INTEGRITY IN VIABLE SPERMATOZOA OF ALPACA RECOVERED FROM THE EPIDIDYMIS, BEFORE AND AFTER THE CRYOPRESERVATION PROCESS

Evaluación de la Integridad acrosomal en espermatozoides viables de alpaca recuperados del epidídimo, antes y después del proceso de criopreservación

María Perez-Rosales^{1*}, Brian Román², Alexei Santiani^{1, 2}

¹Laboratory of Animal Reproduction, Veterinary Medicine Faculty, Universidad Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

²Laboratory of Reproductive Biotechnology, Veterinary and Biological Sciences Faculty, Universidad Científica del Sur.

* Corresponding author: mariaperezrosales@gmail.com

ABSTRACT

To obtain optimal alpaca sperm cryopreservation protocols, it is necessary to know how the fertilizing capacity of spermatozoa after thawing is affected. The acrosomal integrity of viable sperm is one of the factors that determines the fertilizing capacity of spermatozoa. In this regard, the objective of this study was to determine the effect of cryopreservation on the acrosomal integrity of viable alpaca sperm recovered from the epididymis, determined by flow cytometry. Samples from 46 alpaca testicles obtained from The Municipal Slaughterhouse of Ninacaca, Pasco, were analyzed. They showed motility $\geq 30\%$ and sperm concentration $\geq 50 \times 10^6$ spermatozoa / ml, on average 46.6% and 61×10^6 spermatozoa / mL, respectively, of the total samples obtained. The spermatozoa were recovered from the tail of the epididymis with 1ml of dilutor based on skimmed milk, egg yolk, fructose and DMA; then separated in 2 aliquots of 500 μ l. The first aliquot was used for the evaluation of the initial viability and acrosomal integrity and the second aliquot was frozen in straws by means of an automatic cryopreservation system, and then stored in liquid nitrogen until the day of its evaluation. All samples, fresh and thawed, were washed twice by centrifugation with PBS solution to remove the dilutor. For the evaluation of viability and acrosomal integrity, 100 μ l of each sample was incubated with 2.5 μ l of FITC-PSA (100 μ g / ml) and 0.5 μ l of propidium iodide (PI, 2.4 nM) for 10 minutes at 38 ° C, to reach a final concentration of 2.5 μ g / ml and 12 μ M, respectively. Immediately afterwards, samples were evaluated by flow cytometry with image analyzer, acquiring ten thousand events compatible with sperm per sample. FITC-PSA and PI were excited with the 488 nm laser, while the fluorescence emission was detected using the Ch02 channels (505-560 nm) for FITC-PSA and Ch05 (642-740nm) for PI. The viable sperm population (PI negative) was selected, which on average was 75% of fresh semen and 42% of thawed semen, for determination of the acrosomal integrity (FITC-PSA negative) or acrosomal reaction (FITC-PSA positive) percentages. A paired T-student analysis was performed to determine how cryopreservation affects acrosomal integrity in viable sperm. It was found that the acrosomal integrity of the initial viable spermatozoa ($98.17 \pm 5.52\%$) was similar ($p > 0.05$) to the acrosomal integrity of viable post-thaw sperm ($98.70 \pm 2.21\%$). It is concluded that although cryopreservation decreases the amount of viable sperm, the acrosomal structure is not altered in alpaca sperm that survives this process.

Keywords: alpaca, spermatozoa, viability, acrosomal integrity, FIT-PSA, propidium iodide, flow cytometry.

RESUMEN

Con el fin de obtener óptimos protocolos de criopreservación de espermatozoides de alpaca, es necesario conocer como se ve afectada la capacidad fecundante de los espermatozoides después del descongelamiento. La integridad acrosomal de los espermatozoides viables es uno de los factores que determina la capacidad fecundante del espermatozoide. En tal sentido, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la criopreservación sobre la integridad acrosomal de los espermatozoides viables de alpaca recuperados del epidídimo, determinado mediante citometría de flujo. Se procesaron muestras de 46 testículos de alpaca obtenidos de Camal Municipal de Ninacaca, Pasco, que presentaron una motilidad $\geq 30\%$ y concentración espermática $\geq 50 \times 10^6$ espermatozoides/mL, en promedio 46.6% y 61×10^6 espermatozoides/mL, respectivamente del total de las muestras obtenidas. Los espermatozoides se recuperaron de la cola del epidídimo con 1mL de dilutor a base de leche descremada, yema de huevo, fructuosa y DMA; separándose luego en 2 alícuotas de 500 μ L. La primera alícuota se utilizó para la evaluación de la viabilidad e integridad acrosomal inicial y la segunda alícuota se congeló en pajillas mediante un sistema automático de criopreservación, para luego almacenarse en nitrógeno líquido hasta el día de su evaluación. Todas las muestras, frescas y descongeladas fueron lavadas 2 veces por centrifugación con solución PBS para retirar el dilutor. Para la evaluación de viabilidad e integridad acrosomal, 100 μ L de cada muestra fue incubada con 2.5 μ L de FITC-PSA (100 μ g/mL) y 0.5 μ L de Ioduro de Propidio (PI, 2.4 nM) por 10 minutos a 38°C, para llegar a una concentración final de 2.5 μ g/mL y 12 μ M, respectivamente. Inmediatamente después las muestras fueron evaluadas mediante citometría de flujo con analizador de imágenes, adquiriéndose diez mil eventos compatibles con espermatozoides por muestra. FITC-PSA y PI fueron excitados con el láser de 488 nm, mientras que la emisión de fluorescencia fue detectada utilizando los canales Ch02 (505-560 nm) para FITC-PSA y Ch05 (642-740nm) para PI. Se seleccionó la población de espermatozoides viables (PI negativos), que en promedio fue el 75% del semen fresco y un 42% del semen descongelado, para de ellos determinar el porcentaje de integridad acrosomal (FITC-PSA negativos) y de reacción acrosomal (FITC-PSA positivos). Se realizó un análisis de T-student pareado para determinar como la criopreservación afecta la integridad acrosomal en los espermatozoides viables. Se encontró que la integridad acrosomal de los espermatozoides viables inicial ($98.17 \pm 5.52\%$) fue similar ($p > 0.05$) a la integridad acrosomal de los espermatozoides viables post descongelamiento ($98.70 \pm 2.21\%$). Se concluye que, si bien la criopreservación disminuye la cantidad de espermatozoides viables, la estructura acrosomal no se altera en los espermatozoides de alpaca que sobreviven a este proceso.

Palabras clave: alpaca, espermatozoides, viabilidad e integridad acrosomal, FITC-PSA, Ioduro de Propidio, Citometría de flujo

#1816. CRYOPRESERVATION AND IN VITRO FERTILITY OF EPIDIDYMAL SPERM OBTAINED FROM CREOLE RAMS**Criopreservación de espermatozoides colectados del epidídimo de carneros criollos y fertilidad *in vitro*****Duany Condemayta^{1*}, Zacarías Condemayta², Harold Pérez³, Natalio Luque², Vladimiro Ibañez⁴**¹Gobierno Regional Puno, Proyecto Especial PRADERA, Puno.²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNA-Puno.³ Estación Experimental del centro de investigación IVITA El Mantaro, UNMSM-Lima.⁴ Facultad de Estadística e Informática, UNA-Puno.

* Corresponding author: zacariasconde@hotmail.com

ABSTRACT

The research was carried out with the objective of evaluating the *in vitro* fertilizing capacity of the frozen / thawed sperm obtained from the epididymis tail during the May-June reproductive period, at the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the National University of the Altiplano - Puno. Testes from creole breed rams of 2-years-old (n = 10) and of 3-years-old (n = 10) were obtained from the municipal slaughterhouse El Collao-llave. Sperm was collected from the epididymis tail through slicing and the retrograde washing technique. Microscopic evaluations of the main sperm characteristics were carried out before and after Freezing/thawing. Afterwards, oocytes were collected from adult sheep ovaries obtained from a slaughterhouse. Post-thaw sperm fertility was analyzed by *in vitro* fertilization of oocytes using sperm collected by washing and slicing. Results were transformed into angular values for ANOVA analysis through completely randomized block design; differences were determined using the Tukey statistical test processed by S.A.S. version 9.0. The results in the spermatid quality were: mass motility 57.3% and 50.1%, individual motility 54.9% and 47.9%, Hypo-osmotic Test 46.6% and 43.5% ($p \leq 0.05$), vitality 49.5% and 47.8%, abnormalities 19.1% and 18.9%, acrosome integrity 67.7% and 64.9% ($p \geq 0.05$) for spermatozoa before freezing and after thawing, respectively. Collection techniques (retrograde washing and slicing) and the age of the rams did not influence these values. In *in vitro* fertilization, 89.2% of fertilized oocytes were obtained with spermatozoa obtained by retrograde washing and 88.8% by slicing technique. All fertilized oocytes were developed up to the morula stage. It is concluded that the frozen / thawed sperm obtained from the epididymis tail by retrograde washing and slicing methods maintain their fertilizing capacity.

Keywords: epididymis, spermatozoon, *in vitro* fertilization, Creole sheep.

RESUMEN

La investigación se realizó con el objetivo de evaluar la capacidad fecundante *In vitro* de los espermatozoides congelados/descongelados provenientes de la cola del epidídimo durante la época reproductiva. Se utilizaron testículos de carneros de 2 años(n=10) y de carneros de 3 años(n=10) de la raza Criolla provenientes del Camal Municipal de El Collao-llave. Los espermatozoides fueron recolectados de la cola del epidídimo a través de la técnica de lavado retrógrado y corte. Se realizaron las evaluaciones microscópicas previas y posteriores al descongelamiento de las principales características espermáticas. Se procedió a la obtención de ovocitos proveniente de ovarios de ovejas adultas sacrificadas en matadero. Se analizó la capacidad fecundante de los espermatozoides post descongelamiento mediante la fecundación *in vitro* de ovocitos con espermatozoides recolectados por lavado y corte. Los resultados fueron transformados en valores angulares para el ANOVA y fueron analizados utilizando el diseño bloque completamente al azar, las diferencias determinadas usando la prueba estadística Tukey procesadas mediante el S.A.S. versión 9.0. Los resultados en la calidad espermática fueron: motilidad masal 57,3 % y 50,1%, motilidad individual 54,9 % y 47,9 %, Test Hipo-osmótico 46,6 % y 43,5 % ($p \leq 0.05$), vitalidad 49,5 % y 47,8 %, anomalidades 19,1 % y 18,9 %, integridad de acrosoma 67.7 % y 64.9% ($p \geq 0,05$) para espermatozoides antes de la congelación y después de la descongelación respectivamente, las técnicas de colección (lavado retrógrado y corte) y la edad de los carneros no influyeron en dichos valores. En la fecundación *in vitro* se obtuvo el 89,2 % de óvulos fecundados con espermatozoides obtenidos por lavado retrógrado y 88,8 % por técnica de corte respectivamente, se desarrollaron todos los ovocitos fecundados hasta la fase de mórula. Se concluye que los espermatozoides congelados/descongelados obtenidos de la cola del epidídimo por el método de lavado retrógrado y corte mantienen su capacidad fecundante.

Palabras clave: epidídimo, espermatozoide, fecundación *in vitro*, ovino criollo.

#1818 EVALUATION OF BIOCHEMICAL COMPONENTS OF SEMINAL PLASMA AND THEIR RELATIONSHIP WITH FRESH AND THAWED SEMEN QUALITY OF COLOMBIAN CREOLE DONKEYS

Evaluación de componentes bioquímicos del plasma seminal y su relación con la calidad del semen fresco y descongelado de asnos criollos colombianos

Juan D. Montoya Paez^{1*}, Benjamín A. Rojano², Giovanni Restrepo-Betancur³

¹Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA), Facultad de Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín, Colombia. ²Grupo Investigación en Química de los Productos Naturales y los Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia. ³Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

* Corresponding author: jdmontoya@elpoli.edu.co

ABSTRACT

Seminal plasma is a fluid mixture secreted by the testicles, epididymis and accessory sex glands that play an important role in the development and maturation of sperm in the female genital tract. Under natural conditions, seminal plasma under is involved in several events that precede sperm fertilization, such as the activation of motility, antimicrobial action, neutralization of metabolites and a mediating effect of sperm capacitation and the postcoital uterine inflammatory response. The aim of this work was to identify some seminal plasma biochemical components (Vitamin C, Vitamin E, stearic acid) and their relationship with fresh and thawed semen quality parameters in Colombian Creole donkeys. Semen from five Colombian Creole donkeys (two ejaculates per animal) was evaluated and cryopreserved in liquid nitrogen with a freezing curve of 0.6°C/min, using extenders based on semi-skimmed milk, 5% of egg yolk, 5% of dimethylformamide and 20% of seminal plasma. The seminal plasma used for each process came from the same donkey and ejaculate. In fresh and thawed semen, the total motility (MT), progressive motility (MP), spermatic kinetics (curvilinear velocity VCL, linear velocity VSL and mean velocity VAP), sperm vitality (VE), abnormal morphology (MA) and membrane integrity (IM), were assessed. Some plasmatic biochemical components were identified, as vitamin C (VITC) and vitamin E (VIT). Additionally, protein concentration (CPROT), protein oxidation (OXP) and lipid profile (STEARIC) were evaluated in the seminal plasma. For the statistical analysis, mixed models were adjusted and correlation analyzes between the components of the seminal plasma and the quality of fresh and thawed semen were performed. The Tukey test was used for the comparison of means. All evaluations were made with the SAS 9.2 software. For fresh and thawed semen, the mean values for MT, MP, VE and IM were $92.2 \pm 7.1\%$; $34.2 \pm 22.6\%$; $68.2 \pm 12.1\%$, $22.0 \pm 17.3\%$ and $88.2 \pm 6.5\%$, $34.1 \pm 14.0\%$ $63.9 \pm 6.9\%$, $26.7 \pm 12.2\%$ respectively. For fresh semen, only significant correlation coefficients ($P \leq 0.05$) for the VITC content with respect to MT and MP were found, with values of $r = -0.703$ ($P \leq 0.05$) and $r = -0.833$ ($P \leq 0.05$). For thawed semen, correlations for MT, VE and IM of $r = -0.264$, $r = -0.289$, $r = -0.192$ ($P \leq 0.05$) with respect to CPROT, were found. For MT and MP of $r = -0.134$, $r = -0.125$, ($P \leq 0.05$) with respect to VITC and for IM of $r = -0.203$ ($P \leq 0.05$) for STEARIC. There is a negative association between the concentration of VITC and the semen quality of donkeys related with sperm motility. Similarly, a high concentration of proteins and stearic acid in the seminal plasma supplemented to the extenders is related to a lower post-thawing semen quality in donkeys.

Keywords: Seminal plasma, sperm quality, freezing semen, donkey.

RESUMEN

El plasma seminal es una mezcla de líquido secretado por los testículos, epidídimo y glándulas sexuales accesorias que juega un papel importante para el desarrollo y maduración de los espermatozoides en el tracto genital femenino. El plasma seminal en condiciones naturales está involucrado en varios eventos que preceden la capacidad fecundante de los espermatozoides tal como la activación de la movilidad, la acción antimicrobiana, la neutralización de metabolitos y un efecto mediador de la capacitación espermática y de la respuesta inflamatoria uterina postcoital. El objetivo del trabajo fue identificar algunos componentes bioquímicos (Vitamina C, Vitamina E, ácido esteárico) del plasma seminal y la relación con parámetros de la calidad del semen fresco y descongelado en asnos criollos colombianos. El semen de cinco asnos criollos colombianos (dos eyaculados por animal), fue evaluado y criopreservado en nitrógeno líquido con una curva de congelación de 0.6°C/min, empleando diluyentes con base en leche semidescremada, 5% de yema de huevo, 5% de dimetilformamida y 20% de plasma seminal. El plasma seminal utilizado para cada proceso provino del mismo asno y eyaculado. En semen fresco y post-descongelación, se realizó la evaluación de la movilidad total (MT), movilidad progresiva (MP), cinética espermática (Velocidad curvilínea VCL, velocidad lineal VSL y velocidad media VAP) vitalidad espermática (VE), morfología anormal (MA) e integridad de membrana (IM). Se identificaron componentes bioquímicos del plasma como vitamina C (VITC) y vitamina E (VIT). Adicionalmente en el plasma seminal se evaluó la concentración de proteínas (CPROT), la oxidación proteica (OXP) y perfil lipídico (ESTEARICO). Para el análisis estadístico se ajustaron modelos mixtos y se realizaron análisis de correlación de los componentes del plasma seminal con la calidad del semen fresco y post-descongelación. Se utilizó la prueba de Tukey para la comparación de medias. Todas las evaluaciones se realizaron con el programa SAS 9.2. Para el semen fresco y descongelado los valores medios para MT, MP, VE e IM fueron de $92.2 \pm 7.1\%$; $34.2 \pm 22.6\%$; $68.2 \pm 12.1\%$, $22.0 \pm 17.3\%$; $88.2 \pm 6.5\%$, $34.1 \pm 14.0\%$ y $63.9 \pm 6.9\%$, $26.7 \pm 12.2\%$ respectivamente. Para el semen fresco solo se encontraron coeficientes de correlación significativos ($P \leq 0.05$), para el contenido de VITC respecto a MT y MP, con valores de $r = -0.703$ ($P \leq 0.05$) y $r = -0.833$ ($P \leq 0.05$). Para el semen descongelado se encontraron correlaciones para la MT, la VE e IM de $r = -0.264$, $r = -0.289$, $r = -0.192$ ($P \leq 0.05$) con respecto a la CPROT. Para MT y MP de $r = -0.134$, $r = -0.125$, ($P \leq 0.05$) con respecto a VITC y para IM de $r = -0.203$ ($P \leq 0.05$) para ESTEARICO. Existe una asociación negativa entre la concentración de VITC y la calidad del semen de asnos asociado a la movilidad espermática. De igual forma, una alta concentración de proteínas y ácido esteárico en el plasma seminal suplementado a los diluyentes se relaciona con una menor calidad del semen post-descongelación en asnos.

Palabras clave: Plasma seminal, calidad espermática, congelación de semen, asno.

#1819 EVALUATION OF CRYOPRESERVED SEMEN FROM DAIRY CATTLE OF NATIONAL ORIGIN.**Evaluación de semen criopreservado bovino lechero de origen nacional.****G. Quispe*¹, F. Fernández^{1,2}, V. Pacheco^{1,2}, X. Barriga¹, A. Rodríguez¹, J. Reátegui².**¹Animal Biotechnology Laboratory. Vice-Rectorate for Research. Catholic University of Santa María. Arequipa. ² Research Associate at Latin American Studies Center Problematic Dairy (CLEP). Faculty of Veterinary Science. National University of Rosario. Argentina.

* Corresponding author: g.nardelly@gmail.com

ABSTRACT

The quality of preserved bovine semen is very important nowadays for dairy producers, due to the use of this in artificial insemination for specific purposes regarding the increase of pregnancy rates in females. The main objective of this research was to determine the seminal and functional quality of the commercial cryopreserved semen from dairy cattle in three National Seminal Collection Centers. A total of 30 semen straws were evaluated, 10 for each Seminal Collection Center (2 bulls per center) and considering 5 straws/ bull/ center, being randomly chosen, for which this is a descriptive and analytical investigation. The used parameters were: concentration (number of sperm per straw) by counting in the Neubauer chamber with a dilution of 1:50; progressive motility at 0h and 2h after thawing; vitality, using eosin nigrosin staining; morphology, with rose bengal staining and observation with immersion objective; integrity of the plasmatic membrane, using the hypoosmotic solution observed in a phase contrast microscope; and integrity of acrobatics with the help of the Rose Bengal stain, being the samples, solutions and stains at 37 ° C at the moment of evaluation. Statistical analysis was carried out with the SPSS software and for the hypothesis test the Levene analysis and the Tukey test with a statistical significance of 0.05 were performed. Obtained results for Center 1, Center 2 and Center 3 after thawing were in progressive motility: 41%, 49% and 46%; in concentration: 22.25 x10⁶, 27.25 x10⁶, 19.88 x10⁶ spermatozoa per straw (0.5ml); in abnormal morphology: 22.20%, 17.95% and 22.45%; in vitality: 55.60%, 55.90% and 52.90%; in plasma membrane integrity: 69.75%, 64.40% and 56.05% and in acrosome integrity: 3.75%, 4.60% and 5.25% of the separated acrosomes respectively. It was found that the sperm parameters showed a great difference (P <0.05) only in the parameter of total morphology (abnormal <25%) in the Collection Center 2 with 17.95%, and in relation to the functional parameters, the only result that showed a significant difference (P <0.05) was the integrity parameter of the plasmatic membrane (<40% damaged acrosomes) in Center 2 with 64.40%. Therefore, taking into account the basic parameters of evaluation compared with the averages of all the Seminal Collection Centers evaluated in this research, the Seminal Collection Center 2 had better samples of commercial cryopreserved semen of dairy cattle of national origin.

Keywords: bovine, HOS, spermatozoa, acrosome.**RESUMEN**

La calidad del semen crio preservado bovino, es de gran importancia en la actualidad para los productores lecheros, por el uso de este en la inseminación artificial con la finalidad de lograr un aumento en la tasa de preñez en hembras. Por tanto, el objetivo principal de esta investigación fue determinar la calidad seminal y funcional del semen crio preservado comercial de bovinos lecheros en tres Centros de Colección Seminal nacionales. Se evaluaron en total 30 pajillas de semen, 10 por cada Centro de Colección Seminal (2 toros por centro), 5 pajillas por toro de cada centro, que fueron elegidas aleatoriamente dado que esta es una investigación descriptiva y analítica. Los parámetros utilizados para evaluar fueron: concentración (número de espermatozoides por pajilla) haciendo un conteo en la cámara de Neubauer con una dilución de 1:50 ; motilidad progresiva a las 0h y 2h después del descongelamiento; vitalidad, utilizando la tinción de eosina nigrosina ; morfología, con la tinción de rosa de bengala y observado con objetivo de inmersión; integridad de membrana plasmática, utilizando solución hiposmótica observado en microscopio de contraste de fases; e integridad de acrosoma con la ayuda de la tinción Rosa de Bengala, tanto las muestras como las soluciones y tinciones se encontraban a 37°C para ser evaluadas. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS y para el contraste de hipótesis se hizo el análisis de Levene y la prueba de Tukey con significancia estadística del 0.05. Los resultados obtenidos para el Centro 1, Centro 2 y Centro 3 después de la descongelación fueron en motilidad progresiva: 41%, 49% y 46%; en concentración: 22.25 x10⁶, 27.25 x10⁶, 19.88 x10⁶ espermatozoides por pajilla (0.5ml); en morfología anormal: 22.20%, 17.95% y 22.45%; en vitalidad: 55.60%, 55.90% y 52.90%; en integridad de membrana plasmática: 69.75%, 64.40% y 56.05% y en integridad de acrosoma: 3.75%, 4.60% y 5.25% acrosomas dañados respectivamente. Se encontró que de los parámetros espermáticos evaluados hubo diferencias significativas (P<0,05) sólo en el parámetro de morfología total (anormales <25%) en el Centro de Colección 2 con un 17.95%, y en relación a los parámetros funcionales sólo se encontraron diferencias significativas (P<0,05) en el parámetro de integridad de membrana plasmática (<40% acrosomas dañados) en el Centro 2 con un 64.40%. Por lo tanto, teniendo en cuenta los parámetros básicos de evaluación comparados con los promedios de todos los Centros de Colección Seminal evaluados en esta investigación, el Centro de Colección Seminal 2 cuenta con mejores muestras de semen crio preservado comercial de origen nacional de bovinos lecheros.

Palabra clave: bovine, HOS, espermatozoide, acrosoma.

#1820. CLOPROSTENOL AND THE MALE EFFECT ON THE ESTRUS SYNCHRONIZATION IN PERU BREED GUINEA PIGS (*Cavia porcellus*)

Cloprostenol y el efecto macho en la sincronización del celo en cuyes (*Cavia porcellus*) raza Perú

J. Roldan-Juárez^{1*}, J.R. Soncco-Quispe², V. Paucara-Ocsa²; U.S. Quispe-Gutiérrez²

¹ Práctica privada, Apurímac, Perú

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú

* Corresponding author: ulissandro@yahoo.com

ABSTRACT

The current market demands for guinea pig quality, quantity and consistency of meat are a challenge for producers who must make optimal reproductive management, allowing the obtention of cuyes with suitable age and weight for commercialization. The aim of the study was to evaluate the dose of cloprostenol and the male effect in the oestrus synchronization of guinea pigs (*Cavia porcellus*). 128 cuyes of Peru breed (120 females and 8 male) were used, ranging the ages from 8 to 12 months old, weighing between 800 to 1200 g and were distributed having 8 animals per cage and with or without the presence of male. Females were subjected to process of pre estrus synchronization based on sodium cloprostenol (+/- cloprostenol; Lutaprost® 250, agrovetmarket, Peru) to three days after their natural estrus, all females received different doses of cloprostenol via IM, these divided into 8 treatments and 15 repetitions (dose of cloprostenol mg kg⁻¹ with the presence of the male (PM) or without the presence of the male (WPM): 0 + PM; 0 + SPM; 20 + PM; 20 + WPM; 25 + PM; 25 + WPM; 30 + PM; 30 + WPM). Estrus was detected with an apron wearing male. It was considered that the female was in heat when accepting the mount. The study variables were; starting period of estrus post application and duration of estrus. Statistical analysis of the variables was carried out by analysis of variance and GLM procedure of SAS. The onset period of estrus post application of prostaglandin presents an interaction between doses of cloprostenol and presence of male ($P \leq 0,05$), with the shortest time (47 ± 0.22 h) with a dose of 30 mg kg⁻¹ of cloprostenol and presence of male ($P \leq 0,05$). The duration of estrus shows interaction between doses of cloprostenol and presence of male ($P \leq 0,05$). The duration of estrus was higher (7,1 h) with the presence of the male and without administration of cloprostenol. In conclusion, cloprostenol synchronized estrus in guinea pigs showing dependency between cloprostenol doses and presence of the male in to the onset period of estrus post application of prostaglandin and duration of estrus in guinea pigs.

Keywords: PGF2 α , oestrus, guinea pig, synchronization.

RESUMEN

EL mercado actual de la carne de cuy exige calidad, cantidad y uniformidad, constituyendo un reto para los productores que deben realizar un manejo reproductivo óptimo, que permita obtener cuyes con edad y peso adecuado para su comercialización. El objetivo del estudio fue evaluar la dosis de cloprostenol y el efecto macho sobre la sincronización del celo en cuyes (*Cavia porcellus*). Se utilizaron 128 cuyes de raza Perú (120 hembras y 8 machos) de 8 a 12 meses de edad, con pesos entre 800 a 1200 g, se distribuyó 8 animales por jaula y con o sin presencia de macho. Las hembras fueron sometidas a un proceso de pre-sincronización del celo a base de cloprostenol sódico a tres días después de su celo natural, se administró a toda las hembras cloprostenol a diferentes dosis vía intramuscular, distribuidos en 8 tratamientos y 15 repeticiones (dosis de cloprostenol $\mu\text{g kg}^{-1}$ más presencia del macho (PM) o sin presencia del macho (SPM): 0 + PM; 0 + SPM; 20 + PM; 20 + SPM; 25 + PM; 25 + SPM; 30 + PM; 30 + SPM). El celo se detectó con un macho provisto con mandil. Se consideró que la hembra está en celo cuando acepta la monta. Las variables de estudio fueron: periodo de inicio del celo post aplicación y duración del celo. Se realizó el análisis de varianza mediante procedimiento GLM del SAS para las variables periodo a inicio del celo post aplicación y duración del celo. El periodo a inicio del celo post aplicación de prostaglandina presenta una interacción entre dosis de cloprostenol y presencia del macho ($P \leq 0,05$), siendo el menor tiempo (47 ± 0.22 h) con una dosis de 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de cloprostenol y con presencia del macho ($P \leq 0,05$). La duración del celo muestra interacción entre dosis de cloprostenol y presencia del macho ($P \leq 0,05$). La duración del celo fue mayor (7,1 h) con la presencia del macho y sin administración de cloprostenol. Se concluye, que la cloprostenol sincroniza el celo en cuyes, hay dependencia entre dosis del cloprostenol y presencia del macho en el periodo de inicio del celo post aplicación de prostaglandina y la duración del celo en cuyes.

Palabras clave: PGF2 α , estro, cuy, sincronización.

#1822. EFFECT OF TWO CRYOPROTECTANTS ON QUALITY PARAMETERS OF SPERM RECOVERED FROM EPIDIDYMAL TAIL AND ELECTROEJACULATION IN FIGHTING BULLS.

Efecto de dos crioprotectores en los parámetros de calidad de espermatozoides recuperados de cola de epidídimo y electroeyaculación en toros de lidia

J. Rodríguez*¹, X. Barriga¹, S. Herrera^{1,2}, F. Fernández^{1,2}, V. Pacheco^{1,2}, J. Reátegui^{1,2}

¹Laboratorio de Biotecnología Animal. Vicerrectorado de Investigación. Universidad Católica de Santa María. Arequipa.

²Investigador Asociado al Centro Latinoamericano de Estudios de Problemáticas Lecheras (CLEP). Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

*Corresponding autor: ireategui@ucsm.edu.pe

ABSTRACT

With the intention to evaluate the effect of two penetrating cryopreservants: glycerol and dimethylformamide on sperm quality parameters of bulls (Lidia's bulls) recovered from the epididymis tail and complete ejaculate, 5 semen samples were collected by the electroejaculation technique and 5 others from the epididymis tail, of adult bulls of reproductive age. The semen extraction by electroejaculation was performed using the Palmer technique, while the epididymal tail semen was collected with the retrograde flow technique. Samples were analyzed by progressive motility (Scale: 0 = No movement, less than 5% at 5 = Progressive movement very fast, 80 - 100%), vigor (motility at 0 and 2 h), integrity - plasmatic membrane functionality (Hypo Osmotic test) and morphological abnormalities (stained with eosin/nigrosin). Data was analyzed by descriptive statistics ($\mu \pm \sigma$). The significance was determined by the Student's t-test ($p = 0.05$). Results showed: Cryopreservation of ejaculated semen: with Glycerol, it reports motility averages of 3.80 ± 0.41 and 1.80 ± 0.50 at 0 and 2 hours respectively; morphological head abnormalities $5.04 \pm 2.23\%$; Acrosome morphological abnormalities $5.32 \pm 2.08\%$; tail morphological abnormalities $6.20 \pm 2.68\%$ and plasmatic membrane functionality of $43.30 \pm 3.31\%$. With Dimethylformamide averages of motility of 2.52 ± 0.51 and 0.68 ± 0.63 at 0 and 2 hours respectively; morphological head abnormalities $7.56 \pm 2.68\%$; Acrosome morphological abnormalities $6.64 \pm 2.50\%$; tail morphological abnormalities $9.68 \pm 2.01\%$ and plasmatic membrane functionality of $32.76 \pm 3.36\%$. Semen cryopreservation from the epididymis: with glycerol, motility averages of 2.64 ± 0.49 and 0.80 ± 0.65 at 0 and 2 hours respectively; Morphological head abnormalities $8.60 \pm 1.66\%$; acrosome morphological abnormalities $8.76 \pm 2.01\%$; tail morphology $9.08 \pm 2.12\%$ and plasmatic membrane functionality of $47.96 \pm 6.34\%$. With Dimethylformamide: averages of motility of 1.36 ± 0.57 and 0.40 ± 0.50 at 0 and 2 hours respectively; morphological head abnormalities $8.36 \pm 2.02\%$; Acrosome morphological abnormalities $8.68 \pm 1.57\%$; tail morphological abnormalities $8.96 \pm 2.34\%$ and plasmatic membrane functionality of $22.16 \pm 6.76\%$. It is possible to conclude that Glycerol shows better seminal quality indicators when compared with Dimethylformamide, having statistically significant differences ($P < 0.05$). The semen collection by electroejaculation showed better seminal characteristics compared to the collection of the epididymis tail, there being significant statistical difference ($P < 0.05$).

Keywords: sperm recovery, epididymal tail, electroejaculation, cryoprotectants, fighting bulls.

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto de dos criopreservantes penetrantes: Glicerol y Dimetilformamida en los parámetros de calidad de espermatozoides de toros de lidia recuperados de cola del epidídimo y de eyaculado, se recolectaron 5 muestras de semen mediante la técnica de electroeyaculación y 5 muestras de semen de cola del epidídimo, de toros en edad reproductiva, adultos. La extracción del semen por electroeyaculación se realizó utilizando la técnica de Palmer, el semen de cola de epidídimo fue colectado con la técnica de flujo retrógrado. Las muestras se analizaron por motilidad progresiva (Escala: 0=Sin movimiento; menos de 5% a 5= Movimiento progresivo muy rápido; 80 - 100%), vigor (motilidad a 0 y 2 h), integridad - funcionalidad de membrana plasmática (prueba hipo osmótica) y anomalidades morfológicas (coloración con eosina/nigrosina). Los datos se analizaron mediante estadística descriptiva ($\mu \pm \sigma$). La significancia se determinó por la prueba de t de Student ($p=0,05$). Los resultados son: Criopreservación de semen de eyaculado: con Glicerol, reporta promedios de motilidad de $3,80 \pm 0,41$ y $1,80 \pm 0,50$ a las 0 y 2 horas respectivamente; anomalidades morfológicas de cabeza $5,04 \pm 2,23\%$; anomalidades morfológicas de acrosoma $5,32 \pm 2,08\%$; anomalidades morfológicas de cola $6,20 \pm 2,68\%$ y funcionalidad de membrana plasmática de $43,30 \pm 3,31\%$. Con Dimetilformamida promedios de motilidad de $2,52 \pm 0,51$ y $0,68 \pm 0,63$ a las 0 y 2 horas respectivamente; anomalidades morfológicas de cabeza $7,56 \pm 2,68\%$; anomalidades morfológicas de acrosoma $6,64 \pm 2,50\%$; anomalidades morfológicas de cola $9,68 \pm 2,01\%$ y funcionalidad de membrana plasmática de $32,76 \pm 3,36\%$. Criopreservación de semen de la cola del epidídimo: con Glicerol, promedios de motilidad de $2,64 \pm 0,49$ y $0,80 \pm 0,65$ a las 0 y 2 horas respectivamente; anomalidades morfológicas de cabeza $8,60 \pm 1,66\%$; anomalidades morfológicas de acrosoma $8,76 \pm 2,01$; morfología de cola $9,08 \pm 2,12\%$ y funcionalidad de membrana plasmática de $47,96 \pm 6,34\%$. Con Dimetilformamida promedios de motilidad de $1,36 \pm 0,57$ y $0,40 \pm 0,50$ a las 0 y 2 horas respectivamente; anomalidades morfológicas de cabeza $8,36 \pm 2,02\%$; anomalidades morfológicas de acrosoma $8,68 \pm 1,57\%$; anomalidades morfológicas de cola $8,96 \pm 2,34\%$ y funcionalidad de membrana plasmática de $22,16 \pm 6,76\%$. Se puede concluir que el Glicerol muestra mejores indicadores de calidad seminal al ser comparado con la Dimetilformamida, existiendo diferencia estadística significativa ($P < 0,05$). La recolección de semen con electroeyaculador muestra mejores características seminales frente a la recolección de cola del epidídimo, existiendo diferencia estadística significativa ($P < 0,05$).

Palabras clave: Recuperación de espermatozoides, cola del epidídimo, crioprotectores, electroeyaculación, toros de lidia.

#1823. COMPARISON OF TWO NON-PENETRATING CRYOPROTECTANTS: LOW DENSITY PROTEINS AND CHICKEN EGG YOLK, IN THE FREEZING OF PERUVIAN PASO HORSE SEMEN
Comparación de dos crioprotectores no penetrantes: Proteínas de Baja Densidad y Yema de Huevo de Gallina, en la congelación de semen de Caballo Peruano de Paso

X. Barriga^{1*}; J. Rodríguez¹; S. Herrera^{1,2}; V. Pacheco^{1,2}; F. Fernández^{1,2}; J. Reátegui^{1,2}

¹Laboratorio de Biotecnología Animal. Vicerrectorado de Investigación. Universidad Católica de Santa María. Arequipa.

²Investigador Asociado al Centro Latinoamericano de Estudios de Problemáticas Lecheras (CLEP). Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

* Corresponding author: 72194929@ucsm.edu.pe

ABSTRACT

The use of the artificial insemination technique with cryopreserved semen will allow increasing the genetic gain in breeding programs by spreading the characteristics of high value stallions. It is considered necessary for the improvement of the equine semen cryopreservation technique the usage of new types of diluents, containing non-penetrating cryoprotective agents. The objective was to evaluate the quality of cryopreserved semen using specific non-penetrating cryoprotectants such as Low-Density Lipoproteins (LDL) and chicken egg yolk. The semen collection of 4 adult Peruvian "Paso" horses was carried out. Samples were collected by artificial vagina and evaluated macroscopically for the indicators of: volume, color, density and pH to allow their cryopreservation. After the addition of the sperm activity preservative (EquiPlus®, diluent for equine semen) these were transferred to the laboratory to be cryopreserved using the conventional technique proposed by Moussa et al, (2002). Divided into two aliquots, one of them was added 3 gr of LDL and to the other, 3 gr of chicken egg yolk, both as non-penetrating cryoprotectants. After cryopreservation, microscopic evaluations were made: total motility immediately after de-freezing and at 20 minutes, progressive motility after de-freezing, concentration with 2.5 ml of saline formaldehyde and 50 µl of semen, viability with Eosin-Nigrosine stain, functional membrane integrity with the Endosmosis test (HOS) and morphological anomalies with the Rose Bengal stain. Data was analyzed using central tendency and dispersion statistics. The significance was determined by the Student's t-test for independent data at a level of 0.05. The results of macroscopic parameters were: average volume of 41.5 ml; color and milky white appearance and average pH 7.46, these values showed no statistical differences (P > 0.05). It was observed better seminal quality after de-freezing in cryopreserved straws with LDL compared to semen cryopreserved with chicken egg yolk, showing statistical differences (P < 0.05), for the variables: Total Motility at 0 minutes 48.9% and 27, 5%; total motility at 20 min. 38.2% and 19.3%; Progressive motility 38.3% and 21.5%; viability 45.9% and 31.7% and Membrane Integrity (HOS) 59.3% and 41.6% for LDL and egg yolk, respectively. No statistical differences were observed for the variable morphological anomalies (P > 0.05) where abnormalities were evaluated in acrosoma 0.55% and 1.05%; head abnormalities 0.5% and 0.95%; tail abnormalities 1.35% and 2.45% for LDL and egg yolk, respectively. It is concluded that there is an improvement in the quality of semen cryopreserved with LDL in relation to chicken egg yolk.

Keywords: cryoprotectant, egg yolk, semen, peruvian paso horse.

RESUMEN

El uso de la técnica de inseminación artificial con semen criopreservado permitirá incrementar la ganancia genética en los programas de mejoramiento difundiendo las características de los sementales de alto valor, se considera necesario mejorar la técnica de criopreservación de semen de equino, mediante la utilización de nuevos tipos de diluyentes, que contengan agentes crioprotectores no penetrantes. El objetivo fue evaluar la calidad de semen criopreservado utilizando crioprotectores no penetrantes específicos como las Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL) y yema de huevo de gallina, los cuales, no penetran en el interior de la célula. Se realizó la colección de semen de 4 caballos adultos Peruanos de Paso. Las muestras colectadas mediante vagina artificial fueron evaluadas macroscópicamente para los indicadores de: volumen, color, densidad y pH para ser aceptadas para realizar su criopreservación. Luego de la adición del preservante de la actividad espermática (EquiPlus®, diluyente para semen de equino) se trasladaron al laboratorio para ser criopreservadas mediante la técnica convencional planteada por Moussa et al, (2002). Divididas en dos alícuotas, a una de ellas se le adicionó 3 gr. LDL obtenidas en laboratorio y a la otra 3 gr de yema de huevo de gallina como crioprotectores no penetrantes. Posterior a la criopreservación se realizó las evaluaciones microscópicas de: motilidad total post descongelamiento y a los 20 minutos post descongelamiento, motilidad progresiva post descongelamiento, concentración con 2,5 ml de solución salina formolada y 50 µl de semen, viabilidad con tinción Eosina-Nigrosina, integridad de membrana funcional con el test de Endosmosis (HOS) y malformaciones morfológicas con la tinción Rosa de Bengala. Los datos se analizaron mediante estadística de tendencia central y dispersión. La significancia se determinó por la prueba de t de Student para datos independientes a un nivel de 0,05. Los parámetros macroscópicos observados obtuvieron como resultado, volumen promedio de 41,5 ml; color y aspecto blanco lechoso y pH 7,46 promedio, estos valores no mostraron diferencia estadística (P > 0,05). Se observó mejor calidad seminal post descongelamiento en pajillas criopreservadas con LDL respecto al semen criopreservado con yema de huevo de gallina, existiendo diferencia estadística (P < 0,05), para las variables: Motilidad total a los 0 min 48,9% y 27,5%; motilidad total a los 20 min. 38,2% y 19,3%; motilidad progresiva 38,3% y 21,5%; viabilidad 45,9% y 31,7% y membrana funcional (HOS) 59,3% y 41,6% para LDL y yema de huevo respectivamente. No se observó diferencia significativa para la variable malformaciones morfológicas (P > 0,05) donde se evaluó anomalías en acrosoma 0,55% y 1,05%; anomalías en cabeza 0,5% y 0,95%; anomalías en cola 1,35% y 2,45% para LDL y yema de huevo respectivamente. Se concluye que hay una mejora de la calidad del semen criopreservado con LDL con respecto a la utilización de la yema de huevo de gallina.

Palabras clave: crioprotector, yema de huevo, semen, caballo de paso peruano.

#1825 EVALUATION OF SPERM DNA FRAGMENTATION OF LLAMA (*Lama glama*) IN RAW AND THAWED SEMEN USING INTEGRATED SEMEN ANALYSIS SYSTEM (ISAS)®

Evaluación de la fragmentación del ADN espermático de llama (*Lama glama*) en semen fresco y descongelado utilizando el Sistema Integrado de Análisis de Semen (ISAS)®

Misael Rodríguez^{1,2*}, Hernán Cucho¹, César Ordoñez¹, Enrique Ampuero¹, Arturo Tamo³,

¹Escuela Profesional de Zootecnia, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco-Perú.

²Programa de Doctorado en Ciencia Animal, Universidad Nacional Agraria La Molina-Lima-Perú.

³PEGEN – Instituto Peruano de Genética-Lima-Perú.

* Corresponding autor: emercy_13@hotmail.com

ABSTRACT

Sperm DNA integrity is an important parameter to predict male fertility and early embryonic development. Its inclusion into semen routine assessments increases sperm fertilizing capacity prediction. The objective of the study was to determine the Sperm DNA Fragmentation Index (DFI) in fresh and thawed semen by Computer Assisted Sperm Analyzer (ISAS®, Proiser). We processed a total of 15 ejaculates obtained from 5 males by electroejaculation, in which quality (motility) and sperm count (concentration, volume) parameters were determined. Obtained seminal samples were divided in two aliquots, the first to be evaluated in raw conditions and the second after freezing with a commercial extender (Triladyl®). The Sperm Chromatin Dispersion (SCD) technique was used to evaluate sperm DNA fragmentation. Finally, Sperm DNA Fragmentation was evaluated by high melting point agarose gel (85°C), cell lysis solution (Halosperm) and Diff Quik and Wright stains. The halo area, residual core area and relative halo were determined, both in raw and thawed semen. An exploratory analysis was applied prior to statistical analysis. Evaluation of the effect of the treatment (raw and frozen semen) on the Sperm DNA Fragmentation Index was made through an analysis of variance. We evaluated a total of 16552 sperms (raw = 7935 and frozen = 8617). The seminal volume was 1.6 ± 0.69 ml, sperm motility was $13.9 \pm 13.53\%$ and sperm concentration was $84.4 \pm 71.93 \times 10^6$ spermatozoa/ml. Our results showed four dispersion patterns: no halo, small, medium and large halo between raw and thawed semen. The Sperm DNA Fragmentation Index was of $5.3 \pm 0.51\%$ in thawed semen and $5.3 \pm 0.56\%$ in fresh samples ($P > 0.05$). In conclusion, the process of cryopreservation did not increase the Llama Sperm DNA Fragmentation Index.

Keywords: Fragmentation, Sperm DNA, Semen, SCD, Llama.

RESUMEN

La integridad del ADN espermático es un parámetro importante para predecir la fertilidad del macho y el desarrollo embrionario temprano. Su inclusión en las evaluaciones rutinarias de semen aumenta la predicción de la capacidad fecundantes del espermatozoide. El objetivo del estudio fue determinar el Índice de Fragmentación del ADN Espermático (IFAE) en semen fresco y descongelado de llama asistido por un equipo computarizado de análisis seminal (ISAS®, Proiser). Se procesaron un total de 15 eyaculados obtenidos de 5 llamas mediante electroeyaculación, de los cuales se determinaron los parámetros de calidad (motilidad) y cantidad espermática (concentración, volumen). Las muestras de semen obtenidas se dividieron en dos alícuotas, la primera para ser evaluada en fresco y la segunda para ser evaluada después de ser congelada/descongelada, con un diluyente comercial (Triladyl®). Finalmente se evaluó la fragmentación del ADN espermático, según el método de la Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD), donde se empleó gel de agarosa de alto punto de fusión (85°C), solución de lisis celular (Halosperm) y tinciones Diff Quik y Wright. Se determinó el área del halo, área del núcleo residual y halo relativo, tanto en semen fresco como en descongelado. Previo al análisis estadístico se aplicó un análisis exploratorio a la data. La evaluación del efecto del tratamiento (semen fresco y descongelado) sobre el índice de fragmentación del ADN espermático, se realizó a través de un análisis de varianza. Se evaluaron un total de 16552 espermatozoides (Fresco = 7935 y descongelado = 8617). El volumen seminal fue de 1.6 ± 0.69 ml, la motilidad espermática fue de $13.9 \pm 13.53\%$ y la concentración espermática fue de $84.4 \pm 71.93 \times 10^6$ espermatozoides/ml. Nuestros resultados mostraron cuatro patrones de dispersión: sin halo, halo pequeño, mediano y grande tanto en semen fresco y descongelado. No se observaron diferencias del IFAE entre machos ($P > 0.05$). El índice de fragmentación del ADN espermático fue de $5.3 \pm 0.51\%$ en semen descongelado y de $5.3 \pm 0.56\%$ en fresco ($P > 0.05$). En conclusión, el proceso de criopreservación seminal no aumentó el índice de fragmentación del ADN espermático de llama.

Palabras clave: Fragmentación, ADN espermático, Semen, SCD, Llama.

#1827 DOMESTIC GUINEA PIG SEMEN COLLECTION PROTOCOL (*Cavia porcellus*) BY ELECTROEJACULATION METHOD. PRELIMINARY RESULTS

Protocolo de colección de semen de cuy doméstico (*Cavia porcellus*) por el método de electroeyaculación. Resultados preliminares

Aydee Meza^{1*}; Nancy Huanca¹; Sheyla Aragón¹; Hernán Cucho¹

Escuela Profesional de Zootecnia, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

* Corresponding autor: aydeemezach@gmail.com

ABSTRACT

The main problem for the application of reproductive biotechnologies in guinea pigs, is the difficulty of the semen collection, which is why electroejaculation (EE) as a collection method is presented as an alternative to repeatedly obtain guinea pig ejaculations. The objective of the present study was to establish a semen collection protocol in domestic guinea pigs by the electroejaculation method. The study was carried out at the CICAS La Raya. Seven type 1 adult animals were used, with an average weight of 1100 ± 100 g and with *ad libitum* feed of concentrate. From this group, 4 responded favorably to the protocol and one ejaculated sporadically. A Minitube® electroejaculator was used, with a transducer specially developed for the collection, being 0.4 cm of diameter and 6 cm long with a bipolar electrode. Guinea pigs were anesthetized intramuscularly with 2% xylazine (0.05 ml / kg) and 10% ketamine (0.10 ml / kg), based on weight. Between 1 and 2 minutes of waiting time, torpid status was ensured to later clean the penis-preputial area for its posterior unsheathing. The animals were held in decubitus-dorsal position with the head slightly raised. The transducer was lubricated with gel and introduced approximately 5 cm into the animal's rectum. The voltage to which the animals were subjected was ranging 2-8 volts (V), in steps of 1 V, and the duration of each stimulus was of 3 seconds (s), with 4 repetitions in each voltage value, resting intervals of 2-3 seconds. The process was carried out in an environmental temperature between 15 and 20 °C, collection tubes had a 5 cm length and a 1 cm diameter. The interval between collections was of 1 week, no weight loss was verified during the 10 weeks of evaluation. The erection of the penis occurred after 3 - 4 shocks of 5 - 6 V. The ejaculation happened after 4 - 5 shocks of 7 - 8 V. The process lasted from 10 to 20 minutes, with considerable individual variations. In the first collections, a whitish clot which hardened after environmental contact was obtained and after the expulsion of the latter, the semen ejaculation was produced; this clot was presented in 30% of successive collections but disappeared in the rest. A semen collection protocol for domestic guinea pigs by electroejaculation has been established, in which samples have been obtained with acceptable motility ($49.49 \pm 10.54\%$) and concentration ($43.87 \pm 19.68 \times 10^6$ spz/ml) in 69% of the occasions, making it a viable method given the animal's nervous temperament and the difficulty to train them.

Keywords: guinea pig, semen, electroejaculation, protocol.

RESUMEN

El principal problema para la aplicación de biotecnologías reproductivas en cuyes es la dificultad de la colección de semen, ante esta situación el método de colección por electroeyaculación (EE) se presenta como una alternativa para obtener eyaculados de manera reiterada de cuyes reproductores. El objetivo del presente estudio fue establecer un protocolo de colección de semen del cuy doméstico por el método de electroeyaculación. El estudio se efectuó en el CICAS La Raya. Se emplearon 7 animales adultos del tipo 1, con un peso promedio de 1100 ± 100 g y con alimentación *ad libitum* de concentrado. De éstos 4 respondieron favorablemente al protocolo y uno eyaculaba esporádicamente. Se utilizó un electroeyaculador Minitube®, al que se le adaptó un transductor especialmente elaborado para la colecta, éste tenía 0.4 cm de diámetro y 6 cm de largo, y poseía un electrodo bipolar. Los cuyes fueron anestesiados por vía intramuscular con xilasina 2% (0.05 ml/kg) y ketamina al 10% (0.10 ml/kg), en función al peso. Se esperó entre 1 y 2 minutos, para que el animal este completamente alestargado, y luego se realizó la limpieza de la zona pene-preputial, y se desvainó el pene. Los animales se sujetaban en posición decúbito-dorsal con la cabeza ligeramente levantada. El transductor se lubricó con gel y se introdujo aproximadamente 5 cm en el recto del animal. El voltaje al que fueron sometidos los animales fue de 2 a 8 voltios (V), éste se incrementaba en 1 V, la duración de cada estímulo fue 3 segundos (s), con 4 repeticiones en cada voltaje y con intervalos de descanso de 2 a 3 segundos. El proceso se realizó en un ambiente temperado entre 15 y 20 °C, los tubos de colección tenían una longitud de 5 cm por 1 cm de diámetro. El intervalo entre colectas fue de 1 semana, no se verificó una pérdida de peso durante las 10 semanas de evaluación. La erección del pene ocurrió después de 3 - 4 descargas de 5 - 6 V. El eyaculado sucedió después de 4 - 5 descargas de 7 - 8 voltios. El proceso duró de 10 a 20 minutos, con considerables variaciones individuales. En las primeras colectas, se obtuvo un coagulado blanquecino que se endurece al tomar contacto con el ambiente y luego de la expulsión de éste, se produce el eyaculado del semen, este tapón se presentó en el 30% de colectas sucesiva, pero en el resto desapareció. Se ha establecido un protocolo de colección de semen de cuy doméstico por electroeyaculación, en el cual se ha obtenido muestras con aceptable motilidad ($49.49 \pm 10.54\%$) y concentración ($43.87 \pm 19.68 \times 10^6$ spz/ml) en el 69% de las ocasiones. Convirtiéndose éste en un método viable dado el temperamento nervioso del animal y la dificultad de adiestramiento del animal.

Palabras clave: cuy, semen, electroeyaculación, protocolo.

#1828 EFFECT OF THE ADDITION OF LOW MOLECULAR WEIGHT PROTEINS (<16 kDa) OF BOVINE SEMINAL PLASMA ON POST-THAWING SEMINAL QUALITY IN BOS TAURUS SEMEN

Efecto de la adición de proteínas de bajo peso molecular (<16 kDa) de plasma seminal bovino en la calidad seminal post-descongelación en semen de *Bos taurus*

Jesús A. Polo-Olivella^{1, 3*}; Eliana Neira Rivera¹; Lidy V. Castillo Baron¹; Sonia L. Gutiérrez²; José G. Velásquez Penagos²; Jaime A. Cardozo Cerquera¹; Fabián L. Rueda¹.

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, AGROSAVIA. Grupo de Investigación en Reproducción Animal Tropical, Cundinamarca – Colombia.

² Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, AGROSAVIA. Grupo de Investigación en Reproducción Animal Tropical, Meta – Colombia.

³ Universidad del Atlántico, Puerto Colombia, Atlántico – Colombia.

* Corresponding author: jalbertopoloolivella@gmail.com

ABSTRACT

Proteins of low molecular weight (<16 kDa) in some mammals seminal plasma have been related to seminal quality parameters, in addition to the freezability of the semen, which affects it negatively; reason why it is presumed that the addition of some of these proteins could improve the post-thawing seminal quality. The objective of this work was to evaluate the effect of the addition of different concentrations of a fraction of plasmatic seminal proteins (<16 kDa) (FPPS) to the freezing diluent in the post-thaw sperm quality of *Bos taurus* bulls. FPPS was obtained from 10 colombian creole bulls, separating them by size-exclusion chromatography with a Biologic LP chromatograph (Bio-Rad). Semen cryopreservation was developed using OptiXcell (IMV). Control treatment (Ctrl) was established without the addition of FPPS, and its post-thawing quality was evaluated according to progressive motility with CASA system (IVOS) at 0, 2 and 4 hours, maintaining the semen at $36\pm 1^\circ\text{C}$; integrity of the membrane was evaluated by sperm count with fluorescence microscopy, stained with 1.5 mM IP and 10 mM CFDA. Analysis of variance was performed with R 3.4.2 to determine the effect of the different FPPS (four repetitions). Fresh semen showed motility of $55 \pm 4\%$ and viability of $65 \pm 4\%$. The percentage of viable post-thawing sperm in the Ctrl was $39.0\pm 4.3\%$; the highest percentage was obtained in the $1/4$ FPPS dose ($44.8 \pm 4.3\%$). In the case of progressive motility, the defrost control was $20.75 \pm 3.49\%$, exceeded by the $1/8$ ($29.00 \pm 1.87\%$) and $1/16$ ($29.75 \pm 3.90\%$) doses of FPPS. The analysis in different post-thawing moments showed that the lower doses of FPPS had better behavior than the control and the $1/16$ treatment allowed progressive motility to be maintained during the 4 hours of evaluation (2 h: $31.25 \pm 2.86\%$; 4 h: $31.25 \pm 3.63\%$), this difference was significant at 2 hours of evaluation ($p < 0.05$). Thus, findings suggest that the effect of adding specific and purified seminal plasma proteins (<16 kDa) on post-thawing seminal quality is dose-dependent, and low doses of FPPS allow both an improvement in the viability and in the progressive motility, effect that is maintained for four hours after thawing. These results give evidence of the potential utilities of FPPS in IVF procedures or artificial insemination.

Keywords: Seminal plasma, sperm quality, post-thawing, bovine,

RESUMEN

Las proteínas de bajo peso molecular (<16 kDa) en el plasma seminal de algunos mamíferos, se han relacionado con los parámetros de calidad seminal, además con la congelabilidad del semen, la cual lo afecta negativamente, por lo que se presume que la adición de algunas de estas proteínas podría mejorar la calidad seminal post-descongelación. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de una fracción de proteínas (<16 kDa) de plasma seminal (FPPS) al diluyente de congelación, en la calidad espermática post-descongelación de toros *Bos taurus*. La FPPS se obtuvo de 10 toros criollos colombianos, separándola mediante cromatografía de exclusión por tamaño con un cromatógrafo Biologic LP (Bio-Rad). La criopreservación del semen se realizó usando OptiXcell (IMV). Se estableció un tratamiento control (Ctrl) sin adición de FPPS, y su calidad post descongelación fue evaluada en función de la motilidad progresiva con CASA (IVOS) a las 0, 2 y 4 horas, manteniendo el semen a $36\pm 1^\circ\text{C}$, y la integridad de membrana por el recuento de espermatozoides en microscopía de fluorescencia, teñidos con IP 1.5 mM y CFDA 10 mM. Se realizó un análisis de varianza con R 3.4.2 para determinar el efecto de las diferentes FPPS (4 repeticiones). El semen fresco presentó motilidad de $55\pm 4\%$ y viabilidad de $65\pm 4\%$. El porcentaje de espermatozoides viables post-descongelación en el Ctrl fue de $39.0\pm 4.3\%$; el mayor porcentaje se obtuvo en la dosis $1/4$ FPPS ($44.8\pm 4.3\%$). En el caso de la motilidad progresiva, el control al descongelamiento fue de $20.75\pm 3.49\%$, superado por las dosis $1/8$ ($29.00\pm 1.87\%$) y $1/16$ ($29.75\pm 3.90\%$) de FPPS. El análisis en diferentes momentos post-descongelación evidenció que las dosis menores de FPPS tuvieron mejor comportamiento que el control y el tratamiento $1/16$, permitió que la motilidad progresiva se mantuviera durante las 4 horas de evaluación (2 h: $31.25\pm 2.86\%$; 4 h: $31.25\pm 3.63\%$), siendo significativa esta diferencia a las 2 horas de evaluación ($p < 0.05$). Los resultados demuestran que el efecto de adicionar proteínas específicas del plasma seminal (<16 kDa) sobre la calidad seminal post-descongelación es dosis-dependiente, y dosis bajas de FPPS permiten una mejoría tanto en la viabilidad, como en la motilidad progresiva, efecto que se mantiene por cuatro horas luego del descongelamiento. Estos resultados dan indicios de las potenciales utilidades de FPPS en procedimientos de FIV o inseminación artificial.

Palabras claves: Plasma seminal, calidad espermática, post-descongelación, bovinos

#1829 DESCRIPTION OF THE MITOCHONDRIAL DISTRIBUTION AND ACTIVITY IN IMMATURE OOCYTES FROM ALPACAS. PRELIMINARY RESULTS

Descripción de la distribución y actividad mitocondrial en ovocitos inmaduros de alpaca. Resultados preliminares

Paula Quijano¹, Alejandra Ugarelli¹, Bruna Medranda¹, Shirley Evangelista-Vargas¹

¹Laboratorio de Biotecnología Reproductiva y Celular, Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

* Corresponding author: sevangelista@cientifica.edu.pe

ABSTRACT

Oocyte quality is determined by the cytoplasm homogeneity and the amount of compact cumulus cells. However, these morphological parameters are insufficient to estimate an adequate maturation and fertilization of the oocyte. In other species, it has been established that the evaluation of the mitochondrial distribution and activity, predicts the capacity of the immature oocyte to develop and fertilize. There is no information about these parameters in alpacas; therefore, the aim of this study was to describe the mitochondrial distribution and activity in immature oocytes. Ovaries were obtained from the local slaughterhouse of Huancavelica city and transported in saline solution (0.9%) at 4 °C to the laboratory of reproductive biotechnologies of Universidad Científica del Sur (Lima). Follicle aspiration was used for oocyte retrieval considering only follicles with a diameter between 3-4 mm. The obtained oocytes (n=40) were evaluated using fluorescent microscopy and MitoTracker Red CMXRos (100 nM), samples were exposed to fluorochrome in total darkness for 20 minutes at 28 ° C. Mitochondrial activity was determined by the intensity of the fluorescent emission, separated in 3 categories: high (> 60 px), medium (30-60 px) and low (< 30px). Mitochondrial distribution was described based on the cytoplasm pattern distribution (homogeneous or heterogeneous) and the presence of mitochondrial aggregation (smooth and granulated). Mitochondrial activity in 50% of the oocytes was considered high ($\bar{x} = 85.3$), 45% medium ($\bar{x} = 47.7$) and 5% low ($\bar{x} = 28.6$). Finally, the mitochondrial distribution of the oocytes was classified as: homogeneous and smooth (45%), homogeneous and granulated (45%), heterogeneous and smooth (5%) and heterogeneous and granulated (5%). In conclusion, this study allows the establishment of mitochondrial distribution and activity parameters in immature alpaca oocytes from alpaca, generating key information for further research related to oocytes maturation and evaluation. Financed by Universidad Científica del Sur.

Keywords: Alpaca, oocyte, fluorescent microscopy.

RESUMEN

La calidad ovocitaria se determina subjetivamente mediante la evaluación de la homogeneidad del citoplasma, la compactación y cantidad de células de cumulus. Sin embargo, estas evaluaciones morfológicas no son suficientes para estimar una adecuada maduración y fecundación del ovocito. En estudios realizados en diversas especies, se ha establecido que la evaluación de la distribución y actividad mitocondrial, pueden darnos una idea de la capacidad de maduración y fecundación del ovocito inmaduro. En alpacas, no existe información sobre estos parámetros de evaluación mitocondrial, motivo por el cual el objetivo del presente estudio fue describirla distribución y actividad mitocondrial en ovocitos inmaduros. Para ello se emplearon ovarios recuperados del Camal Municipal de Huancavelica, los cuales fueron transportados en cloruro de sodio (0.9%) a 4 °C al laboratorio de biotecnologías reproductivas de la Universidad Científica del Sur (Lima). La recuperación de ovocitos, se realizó mediante la aspiración de folículos entre 3-4 mm de diámetro. Los ovocitos obtenidos (n=40) fueron evaluados empleando microscopía de fluorescencia, para ello se incubó las muestras con el fluorocromo MitoTracker Red CMXRos(100 nM) en total oscuridad por 20 minutos a 28 ° C. La actividad mitocondrial se determinó en base a la intensidad de emisión de fluorescencia, siendo catalogada en: alta (>60px), media(60-30px) y baja(<30px), mientras que la distribución mitocondrial fue catalogada a través del patrón de distribución citoplasmática (homogéneo y heterogéneo) y presencia de agregados mitocondriales (liso y granulado).El 50% de los ovocitos evaluados presentaron actividad mitocondrial alta ($\bar{x} = 85.3$), mientras que el 45% ($\bar{x} = 47.7$) y el 5% ($\bar{x} = 28.6$) presentaron actividad mitocondrial media y baja. Por otro lado, la distribución mitocondrial homogénea lisa y homogénea granulosa fue de 45% cada una, mientras que la distribución mitocondrial heterogénea granulosa y lisa fue de 5% cada una. En conclusión, el presente trabajo permite establecer los patrones de distribución y actividad mitocondrial en ovocitos inmaduros de alpaca, generando información de suma importancia para futuros trabajos relacionados a evaluación y maduración ovocitaria. Proyecto financiado por Universidad Científica del Sur.

Palabras claves: Alpaca, ovocito, microscopía de fluorescencia.

#1830 PRELIMINARY STUDY: DETERMINATION OF BASAL PERCENTAGE OF DNA FRAGMENTATION IN EPIDIDYMAL ALPACA SPERM**Estudio preliminar de determinación del porcentaje de fragmentación del ADN en espermatozoides epididimarios de alpaca****A. Ugarelli^{1*}, B. Medranda¹, A. Santiani^{1,2}, S. Evangelista-Vargas¹**¹ Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú² Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

* Corresponding author: ale.ugarelli@gmail.com

ABSTRACT

High viscosity in alpaca's semen has led to the implementation of different methods that allow to eliminate this characteristic from plasma for its evaluation. Sadly, there is no study that describes the impact of these methods in sperm parameters. The evaluation of sperm retrieved from epididymis has become an alternative that allows to obtain basal results in sperm quality. Therefore, the aim of this study was to determine the basal percentage of DNA fragmentation in epididymal sperm in alpacas. Samples (n=9) were obtained from the local slaughterhouse in Huancavelica city. Samples were transported to Lima, where the sperm retrieval was made through parallel cuts. Retrieved sperms were aliquoted in 10×10^6 esp./mL and fixed in 2% formaldehyde and permeabilized in 0.2% Triton x-100. After washing, all samples were incubated with "In Situ Cell Death Detection" (TUNEL) following manufacturer's instructions. Then 5 µg/mL of PI was added to the samples for viability control. For each sample, 10,000 events were acquired. TUNEL and PI were excited by a 488 nm laser. Detection of TUNEL was made in channel 2 (Ch02: 505-560 nm), and for PI in channel 5 (Ch05: 642-740 nm) for PI. All the sperm that had green (TUNEL) and red (PI) fluorescence in the head zone, was considered permeabilized and with DNA fragmentation. Values obtained for DNA fragmentation were $1.73 \pm 1.03\%$. This is the first report that has determined percentage of DNA fragmentation in epididymal sperm by using imaging flow cytometry. Project financed by Cienciactiva convenio 118-2016

Keywords: epididymal alpaca sperm, DNA fragmentation, flow cytometry.

RESUMEN

La viscosidad y filancia del semen de alpaca ha llevado a que se empleen métodos químicos o físicos que permitan eliminar estas características del plasma para realizar la evaluación seminal. Lamentablemente, aún no se conoce el impacto que tienen estos métodos sobre el espermatozoide. La evaluación de los espermatozoides recuperados de epidídimo se ha convertido en una alternativa que permite obtener resultados de la calidad espermática sin los problemas del plasma. Por lo tanto, el objetivo del trabajo fue determinar el porcentaje de fragmentación del ADN en espermatozoides epididimarios de alpaca. Se trabajaron con 9 muestras provenientes del Camal Municipal de Huancavelica. En Lima, se recuperaron los espermatozoides mediante cortes seriados y se formaron alícuotas de 10×10^6 esp./mL. Luego, cada alícuota fue fijada en solución de formaldehído al 2% y permeabilizada empleando una dilución de Tritón x-100 al 0.2%, para poder agregarle el mix del *In Situ Cell Death Detection* (TUNEL) según recomendaciones del fabricante. A esta nueva alícuota, se le agregó Yoduro de propidio (PI) (5 µg/mL) como contraste de viabilidad. Se adquirieron 10 mil eventos compatibles con espermatozoides. Para la excitación de los fluorocromos se empleó el láser de 488 nm y la emisión de fluorescencia fue detectada empleando los canales Ch02 (505-560 nm) para TUNEL y Ch05 (642-740 nm) para PI. Se consideraron permeabilizados y con fragmentación de ADN a todos los espermatozoides que presentaban fluorescencia verde (TUNEL) y roja (PI) en la zona de la cabeza. Los valores obtenidos para fragmentación del ADN fueron de $1.73 \pm 1.03\%$. Este es el primer reporte que se tiene de la determinación del porcentaje de fragmentación del ADN en espermatozoides epididimarios de alpaca empleando citometría de flujo con analizador de imágenes. Proyecto financiado con Cienciactiva convenio 118-2016.

Palabras claves: Espermatozoides epididimarios de alpaca, fragmentación de ADN, citometría de flujo.

#1835. EFFECT OF ALPACA SEMEN STORAGE AT 5 °C AND POST OVULATORY INSEMINATION ON THE PREGNANCY RATE DURING THE NON-BREEDING SEASON

Efecto del tiempo de refrigeración del semen de alpaca a 5 °C e inseminación post-ovulación en la tasa de preñez fuera de estación reproductiva

A. Nina¹, T. Huanca¹, L. Pahuara¹

¹Instituto Nacional de Innovación Agraria, Estación Experimental Agraria Illpa, Puno - Perú.

* Corresponding author: thuanca@inia.gob.pe

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effect of the storage of alpaca semen at 5 °C and follicular size on the pregnancy rates of alpacas served by artificial insemination during the non-breeding season. The study was carried out at the Quimsachata Research and Production Center - INIA at an altitude of 4200 masl, located in the department of Puno, Peru in the dry puna agro-ecological zone. We used 42 non-lactating alpacas, which were inseminated with semen collected by artificial vagina and manikin methods, diluted in AndroMed® in a ratio of 1: 1 with an average motility of 45% and refrigerated at 5 °C in times of 1, 2, 4 and 6 hours. Alpacas were previously subjected to ultrasound tracking of their follicular wave; in a first ultrasound, animals with follicles greater than 7 mm were selected, discarding those presenting luteal bodies or follicular cysts. Two days later a second ultrasound was performed, in which animals with growing follicles were selected and got 1 mL (0.042mg) of Buserelin Acetate applied by deep intramuscular administration, to later be separated into two groups: alpacas with follicles greater than and less than 10 mm. Around 28-30 hours later, a third ultrasound was performed to determine the ovulation rate and perform artificial insemination; 21 days after this procedure a gestational diagnosis was performed by ultrasound. For the statistical analysis, the statistical package SAS 9.4 and statistical test of Chi square were used. The pregnancy rates obtained with the refrigerated semen at 1, 2, 4 and 6 hours were of 25, 33, 18, and 20%, respectively. No statistically significant differences were found ($P \geq 0.05$) in the semen fertility among the different cooling times. Pregnancy rate in alpacas with follicles greater than 10 mm was 30.43%, while in alpacas with follicles smaller than 10 mm was 15.79%. No significant differences ($P \geq 0.05$) between alpacas inseminated with follicles greater than and less than 10 mm were found. Semen cooling and follicle size are not associated with fertility in inseminated alpacas.

Keywords: Follicle, artificial insemination, storage semen, pregnancy, alpacas

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del tiempo de refrigeración de semen y tamaño folicular sobre la tasa de preñez de alpacas servidas por inseminación artificial en época no reproductiva. El estudio se ejecutó en el Centro de Investigación y Producción Quimsachata – INIA a una altitud de 4200 msnm, ubicado en el departamento de Puno, Perú en la zona agroecológica de puna seca. Se utilizaron 42 alpacas no lactantes a las cuales se inseminó con semen colectado mediante vagina artificial y maniquí, diluido en AndroMed® en una proporción de 1 en 1 con una motilidad promedio de 45% y refrigerado a 5 °C en tiempos de 1, 2, 4 y 6 horas, previamente las alpacas fueron sometidas al seguimiento ecográfico de su onda folicular, en una primera ecografía se seleccionaron animales con folículos mayores a 7 mm, descartándose aquellos que presentaron cuerpos lúteos o quistes foliculares, dos días después se realizó una segunda ecografía, donde se seleccionaron animales con folículos en crecimiento a los que aplicó 1 mL (0.042mg) de Acetato de Buserelina por vía intramuscular profunda, se separaron en dos grupos, alpacas con folículos mayores y menores a 10 mm. A las 28 a 30 horas se realizó una tercera ecografía para determinar la tasa de ovulación y realizar la inseminación artificial, posteriormente se realizó el diagnóstico de gestación mediante ecografía 21 días post inseminación artificial. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico SAS 9.4 y una prueba estadística de Chi cuadrado, Las tasas de preñez encontradas con el semen refrigerado a 1, 2, 4 y 6 horas fueron de 25, 33, 18, y 20 % respectivamente, no se encontró diferencia estadística significativa ($P \geq 0.05$) en la fertilidad del semen con distintos tiempos de refrigeración, La tasa de preñez en alpacas con folículos mayores a 10 mm fue de 30.43% mientras alpacas con folículos menores a 10 mm fue de 15.79% respectivamente, no existiendo diferencia significativa ($P \geq 0.05$) entre alpacas inseminadas con folículos mayores y menores de 10 mm. El tiempo de refrigeración del semen y el tamaño folicular no están asociados con la fertilidad en alpacas inseminadas.

Palabras Clave: Folículo, Inseminación artificial, semen refrigerado, preñez, alpacas

#1841. EFFECT OF THREE TREATMENTS ON THE SEMINAL VISCOSITY, MOTILITY AND VIABILITY SPERM IN ALPACAS (*Vicugna pacos*).

Efecto de tres tratamientos sobre la filancia seminal, motilidad y viabilidad espermática en alpacas (*Vicugna pacos*)

A. Ramírez¹, F. Olaguivel¹, M. Naveros², M. Contreras¹, E. Mendoza²

¹Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho-Perú.

²Estación Experimental Agraria -CANAAN-INIA, Ayacucho- Perú.

*Corresponding author: micohu948@hotmail.com

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of three chemical treatments (collagenase at 5%), mechanical (pipetting) and physical (incubation for 10 minutes) on the seminal viscosity, motility and sperm viability in alpacas (*Vicugna pacos*). Semen obtained by artificial vagina of seven sexually mature males was used. Fresh semen was macroscopically and microscopically evaluated, to later be distributed for each treatment (T1: Collagenase 5%, 0.25ul for 5ml dilutor, T2: Pipetting (10 times) and T3: incubation for 10 minutes. Samples were diluted in a 1:1 ratio with Adromed® commercial dilutor and evaluated afterwards in fresh, diluted and refrigeration conditions at 60 and 120 minutes. 28 ejaculates were obtained and distributed for the 3 treatments, obtaining an average copula time of 19 ± 0.06 min, 1.5 ± 0.52 ml of volume, 1.5 ± 2.39 cm of foam, ≈ 7.3 pH on average and 1.8 ± 1.49 cm, $52.5 \pm 22.67\%$, $70.6 \pm 8.80\%$ of filament, motility and vitality characteristics, respectively. The average sperm concentration was of 100×10^6 million sperms / ml per ejaculate. In the filament evaluation of fresh semen, the average was 1.8 ± 1.49 for the three treatments and 1.0 ± 1.04 cm, 0.9 ± 0.95 cm, 0.9 ± 0.89 cm in diluted semen for the collagenase, pipetting and incubation treatments, respectively. At Regarding filament evaluation, at 60 min it was obtained 0.5 ± 0.70 cm, 0.4 ± 0.56 cm, 0.5 ± 0.61 cm of filament, decreasing at 120 min at 0.3 ± 0.45 cm, 0.3 ± 0.47 cm, 0.3 ± 0.67 cm filament for collagenase, pipetting and incubation treatments, respectively; no statistically significant differences between treatments ($p > 0.05$) were found for the tukey test. Regarding sperm motility evaluation in fresh semen, it had an average of $52.5 \pm 22.67\%$ for the three treatments, meanwhile diluted semen had a motility of $38.0 \pm 18.82\%$, $35.4 \pm 19.62\%$, $35.5 \pm 19.31\%$; at 60 minutes the percentage of motility was: $35.2 \pm 19.84\%$, $33.4 \pm 16.05\%$ and $33.9 \pm 19.17\%$, and at 120 minutes $33.2 \pm 18.92\%$, $31.3 \pm 18.49\%$ and $31.3 \pm 19.51\%$ for the collagenase, pipetting and incubation treatments, respectively. No statistically significant differences were found ($p > 0.05$) for the tukey test, but statistically significant differences were found between incubation times ($p > 0.05$), where at 120 minutes motility decreased to 31.93% . Regarding sperm vitality in diluted semen: $72.6 \pm 6.98\%$, $72.0 \pm 10.16\%$ and $72.2 \pm 7.53\%$; showing at 60 minutes $69.6 \pm 9.26\%$, $70.0 \pm 9.27\%$, $70.3 \pm 8.88\%$ and at 120 minutes $67.5 \pm 10.91\%$, $69.1 \pm 8.96\%$, $65.4 \pm 11.59\%$ for the collagenase, pipetting and incubation treatments respectively; No statistically significant differences were found between treatments ($p > 0.05$). It is concluded that collagenase, pipetting and incubation markedly decreased the alpaca seminal filament without statistically significant differences, although differences were found between times showing a decrease in sperm motility at 120 minutes. FUNDING: National Program for Agrarian Innovation PNIA Project 061_PI "Application of biotechnology of insemination with fresh and frozen semen collected by artificial vagina in alpacas"

Keywords: Extender, sperm, motility, viscosity, viability.

RESUMEN

El presente trabajo tiene por objetivo evaluar el efecto de tres tratamientos químico (colagenasa al 5%), mecánico (pipeteo) y físico (incubación por 10 minutos) sobre la filancia seminal, motilidad y viabilidad espermática en alpacas (*Vicugna pacos*), para lo cual se utilizó semen obtenido mediante vagina artificial de sietemachos sexualmente maduros. El semen fresco fue evaluado macroscópica y microscópicamente, luego la muestra fue distribuida para cada tratamiento (T1: Colagenasa al 5%, 0.25ul para 5ml de dilutor, T2: Pipeteo (10 veces) y T3: incubación durante 10 min. Posteriormente fueron disuelto en proporción 1:1 con dilutor comercial Adromed®. Se evaluó en semen fresco, diluido en refrigeración, 60 y 120 min. Se obtuvieron 28 eyaculados los cuales se distribuyeron para los 3 tratamientos; obteniendo un tiempo promedio de copula de 19 ± 0.06 minutos, 1.5 ± 0.52 ml de volumen, 1.5 ± 2.39 (cm) de espuma, pH de 7.3 en promedio, 1.8 ± 1.49 cm, $52.5 \pm 22.67\%$, $70.6 \pm 8.80\%$ de filancia, motilidad y vitalidad respectivamente, la concentración espermática promedio fue 100×10^6 millones/ml por eyaculado. En la evaluación de filancia en semen fresco tuvo un promedio 1.8 ± 1.49 para los tres tratamientos y de 1.0 ± 1.04 cm, 0.9 ± 0.95 cm, 0.9 ± 0.89 cm en semen disuelto para los tratamientos de colagenasa, pipeteo e incubación respectivamente, a los 60 min se obtuvo 0.5 ± 0.70 cm, 0.4 ± 0.56 cm, 0.5 ± 0.61 cm de filancia, disminuyendo a los 120 minutos a 0.3 ± 0.45 cm, 0.3 ± 0.47 cm, 0.3 ± 0.67 cm de filancia para los tratamientos de colagenasa, pipeteo e incubación respectivamente, no habiendo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p > 0.05$) para la prueba de tukey; con respecto a la motilidad espermática en semen fresco tuvo un promedio de $52.5 \pm 22.67\%$ para los tres tratamientos, a la dilución tuvo una motilidad de $38.0 \pm 18.82\%$, $35.4 \pm 19.62\%$, $35.5 \pm 19.31\%$, a los 60 min el porcentaje de motilidad fue: $35.2 \pm 19.84\%$, $33.4 \pm 16.05\%$ y $33.9 \pm 19.17\%$, y los 120 min se obtuvo $33.2 \pm 18.92\%$, $31.3 \pm 18.49\%$ y $31.3 \pm 19.51\%$ de motilidad respectivamente, para el tratamientos de colagenasa, pipeteo e incubación respectivamente; no habiendo diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) para la prueba de tukey, pero presentaron diferencias estadísticas significativas entre tiempos de incubación ($p > 0.05$), donde a los 120 minutos la motilidad disminuye a 31.93% , la vitalidad espermática en semen diluido fue: $72.6 \pm 6.98\%$, $72.0 \pm 10.16\%$ y $72.2 \pm 7.53\%$, a los 60 min fue $69.6 \pm 9.26\%$, $70.0 \pm 9.27\%$, $70.3 \pm 8.88\%$, a los 120 min se obtuvo $67.5 \pm 10.91\%$, $69.1 \pm 8.96\%$, $65.4 \pm 11.59\%$ respectivamente, para el tratamiento de colagenasa, pipeteo e incubación respectivamente, no se encontró diferencias estadísticas significativas entre tratamiento ($p > 0.05$), se concluye que tanto la colagenasa, pipeteo e incubación disminuyen notablemente la filancia seminal de alpacas sin diferencias estadísticas significativas pero si se encontró diferencias entre los tiempos disminuyendo la motilidad espermática a los 120 min. FINANCIAMIENTO: Programa Nacional de Innovación Agraria PNIA Proyecto 061_PI "Aplicación de la biotecnología de la inseminación con semen fresco y congelado colectados por vagina artificial en alpacas"

Palabras clave: Dilutor, espermatozoide, motility, viscosidad, viabilidad.

#1846. EVALUATION OF HEPES-TALP PERFORMANCE IN THE INDUCTION OF PROGRESSIVE SPERM MOTILITY OF ALPACA SEMEN (*Vicugna pacos*)

Evaluación de la efectividad de HEPES-TALP en la inducción de la motilidad espermática progresiva de semen de alpaca (*Vicugna pacos*)

M. Contreras^{*1}, M.L Naveros¹, E. Linares¹, C.Y. Guillén¹, R. Robles¹

¹Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria -CANAAN-INIA (Ayacucho- Perú)

*Corresponding author: micohu948@hotmail.com

ABSTRACT

Progressive sperm motility in alpaca semen is remarkably low and when it is intended to include these in artificial insemination programs with refrigerated semen, it may turn out to be a factor that prevents successful pregnancy. Therefore, the urging need to increase this motility is progressively increasing more and more; In this sense, some researches have used enzymes to break the filament, a parameter to which the low progressive sperm motility is attributed or, by increasing them using medium such as HEPES-TALP. Therefore, the objective of this research was to evaluate the effectiveness of HEPES-TALP supplemented in the induction of progressive sperm motility in alpaca semen (*Vicugna pacos*). Semen samples were collected from 8 males between 5 to 7 years of age in good body condition using artificial vagina. We worked with 28 collected semen samples, which were processed in the Reproductive Biotechnology Laboratory of the Canaán-INIA-Ayacucho Agrarian Experimental Station. The macroscopic (color, volume and viscosity) and microscopic (motility and concentration) evaluations were performed, selecting only the samples with a motility greater than 50%. The samples were distributed in two treatments and diluted in a 1:1 ratio being T1: semen plus commercial dilutor (AndroMed®) and T2: semen plus HEPES-TALP supplemented with 2% collagenase, 78% HEPES-TALP, 20% commercial dilutor (AndroMed®). Both diluents were placed in a water bath at 37 °C before being diluted with the samples; Once diluted these were kept for 10 minutes at room temperature, then diluted samples were incubated at a temperature of 4 °C for two hours and evaluated at different time intervals, in order to observe the resistance to the medium for later freezing (10, 30, 60, 90 and 120 minutes). The following results were found: at 10 minutes there was an average motility of $53.5 \pm 17.97\%$ and $50.9 \pm 22.33\%$, at 30 minutes $53.8 \pm 18.90\%$ and $54.2 \pm 20.36\%$, at 60 minutes $51.7 \pm 17.54\%$ and $52.7 \pm 20.59\%$, at 90 minutes 50.0 ± 19.53 and 49.4 ± 21.38 , at 120 minutes $47.9 \pm 21.04\%$ and $47.3 \pm 22.79\%$ for the commercial dilutor (AndroMed®) and HEPES-TALP supplemented respectively, there being no statistical differences significant ($P > 0.05$) in both treatments; however, it was found that during the incubation of the semen with supplemented HEPES-TALP (T2), it shows an increase in progressive motility at 30 minutes $9.3 \pm 16.35\%$ and $10.9 \pm 17.82\%$, at 60 minutes $9.5 \pm 16.42\%$ and $11.4 \pm 17.97\%$, at 120 minutes $8.9 \pm 16.49\%$ and $10.0 \pm 17.23\%$ for the commercial dilutor and HEPES-TALP supplemented respectively, there being no significant statistical differences ($P > 0.05$). In conclusion, the incubation of alpaca semen with supplemented HEPES-TALP increases the motility and progressive motility at 30, 60 and 120 minutes. FUNDING: National Agricultural Innovation Program PNIA Project 061_PI "Application of the biotechnology of insemination with fresh and frozen semen collected by artificial vagina in alpacas"

Keywords: alpaca, semen, extender, HEPES-TALP, progressive motility.

RESUMEN

La motilidad espermática progresiva en semen de alpaca es notablemente baja y cuando se pretende incluir estos en programas de inseminación artificial con semen refrigerado, puede resultar ser un factor que impida lograr con éxito la preñez; por tanto, la necesidad que existe por incrementar esta motilidad se acrecienta cada vez más; en tal sentido, algunas investigaciones han utilizado enzimas para romper la filancia, parámetro a la que se atribuye la baja motilidad espermática progresiva, o incrementarlos utilizando medios como el HEPES-TALP. Por ello, el objetivo de esta investigación fue evaluar la efectividad de HEPES-TALP suplementado en la inducción de la motilidad espermática progresiva en semen de alpaca (*Vicugna pacos*). Las muestras de semen fueron colectadas de 8 machos entre 5 a 7 años de edad en buen estado corporal utilizando vagina artificial. Se trabajó con 28 muestras de semen colectado, los cuales fueron procesados en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán-INIA-Ayacucho. Se realizó la evaluación macroscópica (color, volumen y filancia) y microscópica (motilidad y concentración), seleccionando solo las muestras con una mayor al 50%. Las muestras se distribuyeron en dos tratamientos y se diluyeron en una proporción de 1:1. T1: semen más dilutor comercial (AndroMed®), T2: semen más HEPES-TALP suplementado con 2% collagenasa, 78% HEPES-TALP, 20% dilutor comercial (AndroMed®). Ambos dilutores se colocaron en baño María a 37°C antes de ser diluidas con las muestras; una vez diluidas estos se mantuvieron durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguidamente las muestras diluidas fueron incubadas a una temperatura de 4°C durante dos horas y se evaluaron en distintos intervalos de tiempo, con la finalidad de observar la resistencia al medio para su posterior congelación (10, 30, 60, 90 y 120 minutos). Se encontró los siguientes resultados: a los 10 minutos se tuvo una motilidad promedio de $53.5 \pm 17.97\%$ y $50.9 \pm 22.33\%$, a los 30 minutos $53.8 \pm 18.90\%$ y $54.2 \pm 20.36\%$, a los 60 minutos $51.7 \pm 17.54\%$ y $52.7 \pm 20.59\%$, a los 90 minutos 50.0 ± 19.53 y 49.4 ± 21.38 , a los 120 minutos $47.9 \pm 21.04\%$ y $47.3 \pm 22.79\%$ para el dilutor comercial (AndroMed®) y HEPES-TALP suplementado respectivamente, no habiendo diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$) para la prueba de tukey en ambos tratamientos; sin embargo, se encontró que durante la incubación del semen con HEPES-TALP suplementado (T2), muestra un incremento en la motilidad progresiva a los 30 minutos $9.3 \pm 16.35\%$ y $10.9 \pm 17.82\%$, a los 60 minutos $9.5 \pm 16.42\%$ y $11.4 \pm 17.97\%$, a los 120 minutos $8.9 \pm 16.49\%$ y $10.0 \pm 17.23\%$ para el dilutor comercial y HEPES-TALP suplementado respectivamente, no habiendo diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$). En conclusión, la incubación de semen de alpaca con HEPES-TALP suplementado incrementa la motilidad y motilidad progresiva a los 30, 60 y 120 minutos. FINANCIAMIENTO: Programa Nacional de Innovación Agraria PNIA Proyecto 061_PI "Aplicación de la biotecnología de la inseminación con semen fresco y congelado colectados por vagina artificial en alpacas".

Palabras claves: Alpaca, semen, extender, HEPES-TALP, motilidad progresiva.

#1852. SEMINAL CHARACTERISTICS OF THREE BREEDS OF OVINES OF THE PERUVIAN ALTIPLANE**Características seminales de tres razas de ovinos del altiplano peruano****U.H. Perez G.¹, Y.M. Quispe B.⁵, R.G. Alencastre D.², N. Luque M.², E.A. Condori C.², S. Espinoza M.⁴, M.G. Pérez D.³**¹ Laboratorio de Reproducción Animal, Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.² Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Altiplano.³ Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Altiplano.⁴ Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional del Centro del Perú.⁵ Práctica privada* Corresponding author: harguer19@hotmail.com**ABSTRACT**

The crossing with new breeds as an alternative of genetic improvement should include the evaluation of the same ones to determine if the offspring will have an adequate performance in conditions of altitude therefore the objective was to evaluate the seminal characteristics during the process of freezing and thawing of three breeds (Merino donhe [MD] PPC [pure by crossing], Merino precoz [MP] PPC and Texel [TX] 3rd generation) of sheep adapted to the Peruvian Altiplano. The study was carried out in the CIP Chuquibambilla of the UNA - Puno, 6 males were used (2 of each breed) from 3 to 5 years old, with a BCS of 3.4, obtaining 8 ejaculates per animal (twice a week) during the reproductive season, the collection was made by artificial vagina using for the processing the dilutor (Tris, citric acid, glucose, egg yolk and glycerol) the processing started with the dilution and followed by cooling to 5 ° C (maintaining for 1.5 hours [equilibrium phase]) later the cryopreservation of semen was performed (to -20 ° C / min until reaching -120 ° C) immediately placed the straws (0.25 ml) to the Liquid Nitrogen and its storage. The results to the vitality collection were 84.76 ± 4.63, 85.73 ± 2.74 and 84.53 ± 3.45 (p≥0.05) for MD, MP and TX respectively; Hiposmotic test (HOST) was for MD, MP and TX of 85.08 ± 3.22, 83.13 ± 4.64 and 83.07 ± 5.32 (p≥0.05) respectively; during the equilibrium phase the vitality for MD was 79.52 ± 7.03, MP of 83.09 ± 3.60 and TX of 83.16 ± 3.27 (p≥0.05), while for HOST it was 77.33 ± 4.19, 77.16 ± 5.55 and 75.59 ± 6.15 (p≥ 0.05) for MD, MP and TX respectively; finally at thawing the vitality was for MD, MP and TX of 51.88 ± 10.23, 60.93 ± 4.41 and 50.76 ± 6.38 (p≤0.05) respectively; for HOST it was in MD of 57.41 ± 3.85, MP of 61.32 ± 9.23 and TX of 51.86 ± 6.43 (p≤0.05). The cryopreservation of semen in sheep of different breeds shows acceptable percentages in conditions of the Peruvian Altiplano.

Keywords: semen, artificial vagina, temperature, glycerol**RESUMEN**

El cruzamiento con nuevas razas como alternativa de mejoramiento genético debe incluir la evaluación de las mismas para determinar si la descendencia tendrá un performance adecuado en condiciones de altura por tanto el objetivo fue evaluar las características seminales durante el proceso de congelación y descongelación de tres razas (Merino donhe [MD], Merino precoz [MP] PPC [puro por cruce] y Texel [TX] 3° generación) de ovinos adaptados al Altiplano Peruano. El estudio fue llevado en el CIP Chuquibambilla de la UNA - Puno, se utilizaron 6 machos (2 de cada raza) de 3 a 5 años, con un CC de 3.4, obteniendo 8 eyaculados por animal (2 veces por semana) durante la época reproductiva, la colección se realizó mediante vagina artificial utilizando para el procesamiento el dilutor (Tris, ácido cítrico, glucosa, yema de huevo y glicerol) se inició con la dilución seguida del enfriamiento hasta 5°C (manteniendo por 1.5 horas [fase de equilibrio]) posteriormente se realizó la criopreservación de semen (a -20°C/min hasta llegar a -120°C) enseguida se colocó las pajillas (0.25 ml) al Nitrógeno Líquido. Los resultados a la colección de vitalidad fue 84.76±4.63, 85.73±2.74 y 84.53 ± 3.45 (p≥0.05) para MD, MP y TX respectivamente; Test Hiposmótico (HOST) fue para MD, MP y TX de 85.08±3.22, 83.13±4.64 y 83.07±5.32 (p≥0.05) respectivamente; durante la fase de equilibrio la vitalidad para MD fue 79.52±7.03, MP de 83.09±3.60 y TX de 83.16±3.27 (p≥0.05), mientras que HOST fue 77.33±4.19, 77.16±5.55 y 75.59±6.15 (p≥0.05) para MD, MP y TX respectivamente; finalmente a la descongelación la vitalidad fue para MD, MP y TX de 51.88±10.23, 60.93±4.41 y 50.76±6.38 (p≤0.05) respectivamente; para HOST fue en MD de 57.41±3.85, MP de 61.32±9.23 y TX de 51.86±6.43 (p≤0.05). La criopreservación de semen en ovinos de diferentes razas muestra porcentajes aceptables en condiciones del Altiplano Peruano.

Palabras clave: semen, vagina artificial, temperatura, glicerol

#1854. EFFECT OF FEEDING SYSTEM ON SPERM QUALITY OF MALE HUACAYA ALPACAS**Efecto de sistema de alimentación en la calidad espermática de alpacas huacaya macho****M.L.González^{1*}; R.H. Mamani-Cato¹; T. Huanca¹**¹Instituto Nacional de Innovación Agraria - Programa Nacional de Investigación en Camélidos - Estación Experimental Agraria Illpa – INIA. Puno – Perú

* Corresponding author: mariolinogonzales@gmail.com

ABSTRACT

Alpaca breeding in high Andean areas is developed extensively in meadows of limited production in both quantity and quality, affecting the species productive and reproductive indexes, especially regarding the quality of the semen used for artificial insemination. The present study was carried out at the Quimsachata Research and Production Center at 4,200 masl in the agroecological zone of the dry puna at the Puno region, during the rainy season from January to April, with the objective of evaluating the effect of a feeding system on the quality of Huacaya alpaca sperm. 08 male alpaca breeders of 05 years of age were used, with an average weight of 58.75 ± 2.71 kg and approximately a body condition of three, being previously duly prepared and trained as semen donors through a mannequin provided with an artificial vagina. Alpacas were randomly distributed into two groups; T1: alpacas fed on natural grass and T2: alpacas fed on natural pasture supplemented with hay and oat grain. The data was taken sixty days before the first collection and analyzed using a completely random design on the statistical program SAS, version 9.4. Five ejaculates were collected and evaluated per animal, with four days intervals, an average collection time of 22.4 ± 4.6 min, with volume, concentration and motility for: T1 1.3 ± 0.64 mL, $70.9 \pm 32.2 \times 10^6$ sperm / mL, $49.65 \pm 20.8\%$ and T2 1.13 ± 0.46 mL, $82.5 \pm 46.2 \times 10^6$ sperm / mL, $57.65 \pm 18.6\%$, respectively. In the statistical analysis, T2 was superior to T1 for concentration and sperm motility variables ($p < 0.05$). However, volume showed no differences ($p \geq 0.05$). It is concluded that it is viable to improve seminal quality in male alpacas through better nutrition and feeding.

Keywords: Alpaca, concentration, sperm, motility, semen.**RESUMEN**

La crianza de alpacas en zonas altoandinas se desarrolla en forma extensiva en praderas de limitada producción en cantidad y calidad, la que repercute en los índices productivos y reproductivos de la especie, en especial en la calidad de semen del macho para uso en inseminación artificial. El presente estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Producción Quimsachata a 4,200 msnm en zona agroecológica de puna seca de la región Puno, en época de lluvia, durante los meses de enero a abril con el objetivo de evaluar el efecto de un sistema de alimentación en la calidad espermática de alpacas Huacayo macho, se utilizaron 08 alpacas machos reproductores de 05 años de edad, con peso promedio de 58.75 ± 2.71 kg y condición corporal tres aproximadamente, debidamente preparados y entrenados como donadores de semen a través de maniquí proveído de una vagina artificial. Las alpacas fueron distribuidas al azar en dos grupos: T1 alpacas alimentadas en pasto natural y T2 las alpacas fueron alimentadas en pasto natural con suplemento a base de heno y grano de avena, sesenta días antes de la primera colecta, los datos fueron analizados en un diseño completamente al azar con el programa estadístico SAS versión 9.4. Se colectaron y evaluaron 5 eyaculados por animal, con intervalos de cuatro días, con un tiempo de colección promedio de 22.4 ± 4.6 minutos, con un volumen, concentración y motilidad para: T1, 1.3 ± 0.64 mL, $70.9 \pm 32.2 \times 10^6$ de espermatozoides/mL, $49.65 \pm 20.8\%$ y T2, 1.13 ± 0.46 mL, $82.5 \pm 46.2 \times 10^6$ de espermatozoides/mL, $57.65 \pm 18.6\%$ respectivamente. Al análisis estadístico el T2 fue superior al T1 para las variables concentración y motilidad espermática ($p < 0.05$); sin embargo, no sucede para el volumen siendo estadísticamente similares ($p \geq 0.05$). Se concluye que es viable mejorar la calidad seminal en alpacas machos a través de una mejor nutrición y alimentación.

Palabras clave: Alpaca, concentración, espermatozoides, motilidad, semen.

#1856. EFFECT OF LOW DENSITY LIPOPROTEINS (LDL) AND TREHALOSE ON CRYOPRESERVED BOVINE SEMEN QUALITY

Efecto de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la trehalosa en la calidad del semen bovino criopreservado

Jorge Gómez Oquendo*¹, Elizabeth Varela Giraldo¹, Alexandra Úsuga Suárez², Juan Esteban Duque Cortés¹, Giovanni Restrepo Betancur³

¹ Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA), Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín, Colombia.

² Grupo de Investigación INCA-CES, Universidad CES, Medellín, Colombia.

³ Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA), Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Medellín, Colombia.

* Corresponding author: jgomez@elpoli.edu.co

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the post-thaw quality of cryopreserved bovine semen with different sources of low density lipoproteins (LDL) and trehalose. Ten ejaculates from five bulls were cryopreserved under the treatments: low density lipoproteins (LDL, 8%, v/v), trehalose (T, 100 mM), trehalose and LDL (TLDL, 100 mM and 8%, m/v LDL), centrifuged chicken egg yolk (CCEY 20%, v/v) and chicken egg yolk (CEY, 20%, v/v). A base medium composed of tris-citrate and glycerol (6%) was used. Several attributes such as: total motility (TM), progressive motility (PM), curvilinear velocity (VCL), straight-line velocity (VSL) and average path velocity (VAP) were evaluated utilizing a computerized SCA[®] system. The functional integrity of the membrane (FMI) was determined by HOS test. The sperm vitality (SV) and abnormal morphology (AM) were tested by means of eosin-nigrosin staining. Structural membrane integrity (SMI) was evaluated using SYBR/PI staining. A completely random model was used. The normality of the variables was validated through the Kolmogórov-Smirnov test. The variation sources were evaluated through a generalized linear model. The comparison of the adjusted means between the treatments was carried out using the Tukey test. CCEY and LDL had a similar effect on sperm protection, being superior to CEY for MT (55.3 ± 16.8 , 44.9 ± 11.0 and 36.7 ± 11.1 %), VCL (49.9 ± 11.0 , 45.2 ± 14.0 and 32.4 ± 5.7 $\mu\text{m/s}$), VSL (25.8 ± 9.3 , 20.0 ± 12.9 and 11.9 ± 3.4 $\mu\text{m/s}$), VAP (35.2 ± 10.9 , 29.4 ± 16.0 , 19.7 ± 4.7 $\mu\text{m/s}$), SV (51.1 ± 15.1 , 45.3 ± 18.3 and 40.0 ± 10.7 %), FMI (49.7 ± 12.1 , 47.8 ± 14.9 and 40.3 ± 8.7 %), AM (16.6 ± 4.7 , 17.3 ± 4.5 and 18.1 ± 2.6 %) and SMI (55.4 ± 12.8 , 42.6 ± 10.6 and 36.1 ± 9.3 %) ($p < 0.05$). The cryoprotective action of LDL was similar to TLDL in terms of TM, PM, VCL, VSL, VAP, AM, SV and SMI ($p < 0.05$). The CEY and T had the lowest values of seminal quality ($p < 0.05$). It was concluded that CCEY and LDL have greater protective effect on the integrity of frozen bovine spermatozoa, than CEY, T or TLDL.

Keywords: semen cryopreservation, cryoprotectant, extensor.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad post-descongelación del semen bovino criopreservado con diferentes fuentes de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y trehalosa (T). Diez eyaculados de cinco toros fueron criopreservados bajo los tratamientos: lipoproteínas de baja densidad (LDL, 8%, v/v), trehalosa (T, 100 mM), trehalosa y LDL (TLDL, 100 mM y 8%, m/v LDL), yema de huevo de gallina centrifugada (CCEY (20%, v/v) y yema de huevo de gallina (CEY, 20%, v/v). Se utilizó un medio base compuesto por tris-citrato y glicerol (6%). Varios atributos como: la motilidad total (MT), motilidad progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL), velocidad de lineal (VSL) y velocidad media (VAP) se evaluaron utilizando un sistema computarizado SCA[®]. La integridad funcional de la membrana (IFM) se determinó mediante la prueba HOS. La vitalidad espermática (VE) y la morfología anormal (MA) de los espermatozoides se analizaron mediante la tinción con eosina nigrosina. La integridad estructural de la membrana (IEM) se evaluó mediante tinción con SYBR / PI. Se utilizó un modelo completamente al azar. La normalidad de las variables se validó mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Las fuentes de variación se evaluaron a través de un modelo lineal generalizado (GLM). La comparación de las medias ajustadas entre los tratamientos se llevó a cabo utilizando la prueba de Tukey. La CCEY y LDL tuvieron un efecto similar en la protección de los espermatozoides, siendo superiores a CEY para MT (55.3 ± 16.8 , 44.9 ± 11.0 y 36.7 ± 11.1 %), VCL (49.9 ± 11.0 , 45.2 ± 14.0 y 32.4 ± 5.7 $\mu\text{m/s}$), VSL (25.8 ± 9.3 , 20.0 ± 12.9 y 11.9 ± 3.4 $\mu\text{m/s}$), VAP (35.2 ± 10.9 , 29.4 ± 16.0 , 19.7 ± 4.7 $\mu\text{m/s}$), VE (51.1 ± 15.1 , 45.3 ± 18.3 y 40.0 ± 10.7 %), IFM (49.7 ± 12.1 , 47.8 ± 14.9 y 40.3 ± 8.7 %), MA (16.6 ± 4.7 , 17.3 ± 4.5 y 18.1 ± 2.6 %) y IEM (55.4 ± 12.8 , 42.6 ± 10.6 y 36.1 ± 9.3 %) ($p < 0.05$). La acción crioprotectora de LDL fue similar a TLDL en términos de MT, MP, VCL, VSL, VAP, MA, VE y IEM ($p < 0.05$). CEY y T tuvieron los valores más bajos de calidad seminal ($p < 0.05$). Se concluye que CCEY y LDL tienen mayor efecto protector de la integridad de los espermatozoides bovinos congelados, que CEY, T o TLDL.

Palabras clave: criopreservación de semen, crioprotector, diluyente.

3. Oocyte function

#1826. ENDOMETRIAL CYTOLOGY IN RELATION TO THE OVARIAN PHASE OF THE ESTRAL CYCLE IN FEMALE DOGS

Citología endometrial en relación con la fase ovárica del ciclo estral en perras

Alfonso Sánchez R.^{1*}, Felipe Díaz P.², Tamara Melo A.²¹Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de Las Américas, Viña del Mar, Chile.²Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Santiago, Chile.

* Corresponding author: asanchez@udla.cl

ABSTRACT

Endometrial cytology is a diagnostic tool with poor development in canine reproduction. The aim of the present study was to describe the cytological findings in the endometrium of domestic dogs, according to the ovarian activity status. The genital tracts of 18 females without reproductive alterations, between 1 and 3 years of age and undergoing selective ovariohysterectomy in a sterilization program were used. By observation of ovarian structures (follicles and corpus luteum) and evaluation of vaginal cytology, the phase of the estrous cycle of the females was established, classifying them in follicular phase (follicles 2 - 10 mm) (n = 6), luteal phase (corpus luteum 2 - 6 mm) (n = 6) and anestrus phase (without structures) (n = 6). To obtain the endometrial samples, an incision was made in the middle region of each uterine horn, through which a 20 cm sterile swab was introduced, then spread on a slide and stained with hematoxylin-eosin stain. According to morphology and quantity, the cytological findings in the endometrium were classified into normal epithelial cells (NEC), degenerative epithelial cells (DEC), normal epithelial cell groups (NECG) and degenerative epithelial cell groups (DECG). The NEC and DEC counts were expressed as percentages and the NECG and DECG categories expressed qualitatively (absence, scarce, moderate and abundant). The percentage variables were transformed to angular values and a unilateral analysis of the variance was performed. The differences were estimated by Tukey's specific hypothesis test. In the follicular phase, a significant predominance was observed ($p < 0.05$) of CEN ($85.8 \pm 6.1\%$), abundant NECG and scarce presence of DEC ($14.2 \pm 7.3\%$) and DECG. In contrast, during the luteal phase there was a significant predominance ($p < 0.05$) of DEC ($85.8 \pm 6.5\%$) and DECG, with a low NEC count ($13.8 \pm 6.2\%$) and GCEN. In the anestrus phase, the general counts were lower, identifying similar proportions of NEC ($55.8 \pm 13.4\%$) and DEC ($42.2 \pm 12.7\%$) and scarce presence of NECG and DECG. The observed and analyzed findings allow us to conclude that the canine endometrial epithelium undergoes changes associated with the ovarian activity, highlighting the proliferation of normal epithelium during the follicular phase and the increase of cellular degeneration in the luteal phase.

Keywords: endometrial cytology, estral cycle, ovarian phase, dog.

RESUMEN

La citología endometrial es una herramienta diagnóstica con escaso desarrollo en la reproducción canina. El objetivo del presente estudio fue describir los hallazgos citológicos en el endometrio de perras domésticas, en relación con el estado de actividad ovárica. Se utilizaron los tractos genitales de 18 hembras, sin alteraciones reproductivas, de entre 1 y 3 años de edad, sometidas a ovario histerectomía selectiva en un programa de esterilización. Mediante la observación de estructuras ováricas (folículos y cuerpos lúteos) y evaluación de la citología vaginal, se estableció la fase ovárica del ciclo estral de las hembras, clasificándolas en fase folicular (folículos 2 -10 mm) (n=6), fase luteal (cuerpos lúteos 2 - 6 mm) (n=6) y fase de anestro (sin estructuras) (n=6). Para la obtención de las muestras endometriales, se realizó una incisión en la región media de cada cuerno uterino, a través de la cual se introdujo una tórula de 20 cm, luego se extendió sobre un portaobjetos y se tiñó con una tinción en base a eosina-hematoxilina. Según morfología y cantidad, los hallazgos citológicos en el endometrio fueron clasificados en: células epiteliales normales (CEN), células epiteliales degenerativas (CED), grupos de células epiteliales normales (GCEN) y grupos de células epiteliales degenerativas (GCED). Los recuentos de CEN y CED fueron expresados como porcentajes y las categorías GCEN y GCED expresaron cualitativamente (ausencia, escasa, moderada y abundante). Las variables porcentuales fueron transformada a valores angulares y se realizó un análisis unilateral de la varianza. Las diferencias se estimaron mediante la prueba de hipótesis específica de Tukey. En la fase folicular se observó un predominio significativo ($p \leq 0,05$) de CEN ($85,8 \pm 6,1\%$), abundantes GCEN y escasa presencia de CED ($14,2 \pm 7,3\%$) y GCED. En contraste, durante la fase luteal se registró predominio significativo ($p \leq 0,05$) de CED ($85,8 \pm 6,5\%$) y abundante cantidad de GCED, con bajo recuento de CEN ($13,8 \pm 6,2\%$) y de GCEN. En la fase de anestro los recuentos generales fueron menores, identificándose proporciones semejantes de CEN ($55,8 \pm 13,4\%$) y CED ($42,2 \pm 12,7\%$) y escasa presencia de GCEN y GCED. Los hallazgos observados y analizados permiten concluir que el epitelio endometrial canino experimenta cambios asociados a la actividad ovárica, destacando la proliferación de epitelio normal durante la fase folicular y el incremento de degeneración celular en la fase luteal.

Palabras clave: Citología endometrial, ciclo estral, fase ovárica, perra

#1836. COMPARISON OF RECOVERY RATES AND QUALITY OF OOCYTES OBTAINED FROM SUPERSTIMULATED ALPACAS WITH ECG AND SLAUGHTERHOUSE OVARIES.

Comparación de la tasa de recuperación y calidad de ovocitos de alpacas superestimuladas con eCG y ovarios de matadero.

J. Ccopa¹, L. Pahuara¹, T. Huanca¹.

¹ Instituto Nacional de Innovación Agraria, Estación Experimental Agraria Illpa, Puno.

* Corresponding author: thuanca@inia.gob.pe

ABSTRACT

The present research was carried out at the reproductive biotechnology laboratory of the Quimsachata Research and Production Center of the National Institute of Agrarian Innovation - Peru, during the months of April to May. The objective was to compare recovery rates and quality of oocytes obtained from alpaca superstimulation and slaughterhouse ovaries. For experiment 1 (E1), 9 adult alpaca females were used and subjected to an ovarian superstimulation treatment with 650 IU equine chorionic gonadotropin (eCG). For the recovery of COCs, an infra umbilical medial laparotomy was performed on the fourth day after eCG induction; follicles being 7.76 ± 2.06 mm in diameter were selected and aspiration was performed using a 20G x 1" needle attached to a 5mL syringe containing D-PBS + 0.03g of BSA + 400 IU / mL of heparin as a COCs collection medium. For experiment 2 (E2) alpaca ovaries were obtained from the Ayaviri slaughterhouse, where ovaries were separated from the reproductive tracts and placed in wide-mouth thermos containing saline (0.9% NaCl) solution with 50ug / mL of gentamicin from 30 to 35 °C; transportation time to the laboratory was of 4 hours and there the aspiration of 2 to 6 mm diameter follicles was performed. Data analysis was performed using the Chi-square test and Student's T-test with a significance level of 5% and processed with the SAS statistical software version 9.4. 8 out of 9 alpacas that entered the experiment responded to treatment with eCG (88.89%), being later used as oocyte donors. 44 COCs were recovered from 66 aspirated follicles (66.67%) for E1 and 310 COCs were recovered from 356 aspirated follicles (87.08%) for E2. The average of COCs recovered per ovary was 3.14 ± 1.70 and 3.36 ± 1.06 for experiments 1 and 2, respectively; no statistical differences were found ($p = 0.078$); The quality of recovered COCs according to categories was: Category A, 24 (54.55%) and 47 (15.16%); Category B, 13 (29.55%) and 148 (47.74%); Category C, 7 (15.91%) and 115 (37.10%) for experiments 1 and 2, respectively. Statistically significant differences were found between the recovery rates of category A and C oocytes of E1 compared to E2 ($p < 0.05$). The recovery rates of COCs from supersimulated alpacas has a better quality in relation to the COCs from ovaries obtained at the slaughterhouse due to the variability of their origin.

Keywords: Alpaca, follicular aspiration, laparotomy, slaughterhouse, oocytes

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología reproductiva del Centro de Investigación y Producción Quimsachata del Instituto Nacional de Innovación Agraria – Perú, durante los meses de abril - mayo; con el objetivo de comparar la tasa de recuperación y calidad de los complejo cúmulus ovocito (CCOs) de alpacas sometidas a superestimulación ovárica y ovarios de matadero. Para el experimento 1 (E1), se utilizaron 9 alpacas hembra, adultas que fueron sometidas a un tratamiento de superestimulación ovárica con 650 UI de Gonadotropina Coriónica equina (eCG). Para la recuperación de COCs se realizó una laparotomía medial infra umbilical al cuarto día después de la inducción de eCG encontrándose folículos con 7.76 ± 2.06 mm de diámetro; la aspiración fue realizada empleando una aguja 20G x 1" adosada a una jeringa de 5mL que contenía D-PBS+0.03g de BSA+400 UI/mL de heparina como medio de colección de COCs. Para el experimento 2 (E2) se obtuvieron ovarios de alpaca del camal de Ayaviri, luego del beneficio de los animales se separó los ovarios del tracto reproductivo y se colocó en termos de boca ancha que contenían solución salina (0.9% NaCl) con 50ug/mL de gentamicina de 30 a 35°C, el tiempo de transporte fue de 4 horas al laboratorio donde se realizó la aspiración de los folículos de 2 a 6 mm de diámetro. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Chi Cuadrada y T Student con un nivel de significancia del 5% y procesados con el programa estadístico SAS versión 9.4. De 9 alpacas que entraron al experimento, solo 8 respondieron al tratamiento con eCG (88.89%), las que fueron utilizadas como donadoras de ovocitos. Se recuperaron 44 COCs de 66 Folículos aspirados (66.67%) para el E1 y 310 COCs fueron recuperados de 356 folículos aspirados (87.08%) para el E2. El promedio de COCs recuperados por ovario fue de 3.14 ± 1.70 y 3.36 ± 1.06 para los experimentos 1 y 2 respectivamente, no encontrándose diferencia estadística ($p=0.078$); la calidad de COCs recuperados según categorías fue la siguiente: Categoría A, 24 (54.55%) y 47 (15.16%). Categoría B, 13 (29.55%) y 148 (47.74%). Categoría C, 7 (15.91%) y 115 (37.10%) para los experimentos 1 y 2 respectivamente, encontrándose diferencia estadística entre la tasa de recuperación de ovocitos de categoría A y C del E1 frente al E2 ($p < 0.05$). La tasa de recuperación de COCs provenientes de alpacas superestimuladas son de mejor calidad en relación a los COCs obtenido de ovarios de camal por la variabilidad de su procedencia.

Palabras Clave: Alpaca, aspiración folicular, laparotomía, matadero, ovocitos

#1838. EFFECT OF HEPES AND FOLLICULAR HOMOLOGOUS FLUID SUPPLEMENTATION IN THE MEDIA FOR OOCYTE MATURATION IN ALPACA. PRELIMINARY RESULTS

Efecto de la suplementación con Hepes y Fluido Folicular homólogo en los medios para maduración ovocitaria en Alpaca. Resultados preliminares

Patricia Mamani H.*; Tania Castro M.; Natalia Álvarez L.; Zezé Bravo G.; Martha Valdivia C.

Laboratory of Physiology of Reproduction. Biological Sciences Faculty. National University of San Marcos. Lima 01. Peru.

* Corresponding author: patricia.mamani@unmsm.edu.pe

ABSTRACT

Camelids are characterized by low reproductive rates. The objective of the project is to evaluate the effect of the follicular fluid (FF) homologous and / or Hepes as maturation medium supplements in relation to the in vitro oocyte maturation rates in alpacas. The tests were carried out in 2 times. The first stage did not use Hepes in the medium, while the second stage did and, additionally, 2 ripening media were compared (with and without FF). Methodology: The ovaries were collected in the Huancavelica municipal slaughterhouse and transported in 0.9% NaCl at 4°C for 22 hours. In the LFR, the ovaries were washed with PBS plus penicillin and streptomycin (0.075g / L) at 38.5°C. Follicles with a diameter between 2-8 mm were aspirated with a No. 20 needle attached to a syringe with Dulbecco solution plus antibiotics, the aspirated fluid was placed in a Petri dish and kept at 38.5 ° C. With a stereoscope, class I and II COCs (cumulus-oocyte complexes) were selected (De Loos, et al., 1989), and washed 3 times in TCM-199 with 0.9mM sodium pyruvate, gentamicin and with or without Hepes 25mM (washing medium). The selected COCs were placed in drops of 500 μ L of maturation medium (washing medium, FSH 1.5 μ L / mL, eCG 10UI / mL, estradiol 0.1 μ L / mL, EGF 10UI / mL, fetal serum Bovine 10%, gentamicin and or without FF 10%) in groups of 10-15 COCs per well. These were incubated at 38.5°C, 5% CO₂, 21% O₂ and high humidity in an incubator (BIONEX) for 32-35hs. Then, the COCs were denuded by pipetting and maturation was confirmed by the presence of the 1st polar body by using an inverted microscope and by Hoechst 33342 fluorescence staining using a UV excitation filter of 461 nm λ (emission). Significant differences were observed in the maturation rates when comparing Hepes supplemented medium (33%) to non supplemented medium (16%) (Student's T-test for independent samples-SPSS). When comparing means from non supplemented (33%) and supplemented (32%) medium with FF, no significant differences were observed ($p > 0.05$) in the maturation rates. There was no improvement in maturation rates when supplementing medium with FF, while Hepes usage was favorable. Transportation time exceeded 20hs post-harvest, the maturity rates obtained are corresponding to reports in other species such as camels (43%) after 12 hours of storage at room temperature. Financing: Vice-Rector for Research and Undergraduate. National University of San Marcos.

Keywords: alpacas, maturation, oocytes, follicular fluid, Hepes.

RESUMEN

Los camélidos se caracterizan por bajas tasas reproductivas. El objetivo del proyecto es evaluar el efecto del fluido folicular (FF) homólogo y/o Hepes como suplementos en el medio de maduración en relación a las tasas de maduración ovocitaria in vitro en alpaca. Los ensayos se realizaron en 2 tiempos. En un primer momento no se usó Hepes; en la segunda etapa se usó Hepes en los medios y, además, se compararon 2 medios de maduración (con y sin FF). Los ovarios se colectaron en el camal municipal Huancavelica y se transportaron en NaCl 0.9% a 4°C por 22hs. En el LFR los ovarios se lavaron con PBS más penicilina y estreptomycin (0.075g/L) a 38.5°C. Se aspiraron los folículos de entre 2-8mm de diámetro con una aguja N° 20 unida a una jeringa con solución Dulbecco más antibióticos, el fluido aspirado se colocó en una placa Petri y se mantuvo a 38.5 °C. Con un estereoscopio se seleccionaron los COCs (complejos cúmulus-ovocito) pertenecientes a las clases I y II (De Loos, et al., 1989), y se lavaron 3 veces en TCM-199 con piruvato sódico 0.9mM, gentamicina y con o sin Hepes 25mM (medio de lavado). Los COCs seleccionados se colocaron en gotas de 500 μ L de medio de maduración (medio de lavado, FSH 1.5 μ L/mL, eCG 10UI/mL, estradiol 0.1 μ L/mL, EGF 10UI/mL, suero fetal Bovino 10%, gentamicina y con o sin FF 10%) en grupos de 10-15 COCs por pocillo. Se incubó a 38.5°C, 5% de CO₂, 21% de O₂ y alta humedad en una incubadora (BIONEX) por 32-35hs. Luego, los COCs fueron desnudados por medio de pipeteo y la maduración se constató por la presencia del 1° cuerpo polar usando un microscopio invertido y por fluorescencia con Hoechst 33342 utilizando un filtro de excitación UV y λ de 461 nm (emisión). Se observó diferencias significativas en las tasas de maduración cuando el medio estuvo suplementado con Hepes (33%) en comparación con el medio no suplementados (16%) (T-Student para muestras independientes-SPSS). Al comparar los medios sin suplementar (33%) y suplementado (32%) con FF no se observó diferencia significativa ($p > 0,05$) en las tasas de maduración. No se observó mejora en las tasas de maduración al suplementar el medio con FF, mientras que el uso de Hepes mostró ser favorable. El tiempo de transporte superó las 20hs post-colecta, las tasas de maduración obtenidas son correspondientes a reportes en otras especies como dromedarios (43%) después de 12hs de almacenamiento a temperatura. Financiamiento: Vicerrectorado de Investigación y Pregrado. UNMSM.

Palabras clave: alpacas, maduración, ovocitos, fluido folicular, Hepes.

#1839. EFFECT OF TEMPERATURE AND TRANSPORT TIME OF ALPACA OVARIES (*Vicugna pacos*) ON THE QUANTITY AND QUALITY OF OOCYTES AND THEIR SUBSEQUENT EMBRYONIC DEVELOPMENT IN VITRO

Efecto de la temperatura y tiempo de transporte de ovarios de alpaca (*Vicugna pacos*) sobre la cantidad y calidad de ovocitos y posterior desarrollo embrionario *in vitro*

M.L. Naveros¹; M. Contreras¹; C.Y. Guillén¹; E. Mendoza¹

¹Estación Experimental Agraria-Canaán, INIA-Ayacucho

*Corresponding author: mnaveros@inia.gob.pe

ABSTRACT

The alpaca benefit centers are often far from the research laboratories, hence the transport time and temperature are two key factors that can contribute to detrimental effects on the oocyte quality, in terms of nuclear maturation and division rates after IVF (Klumpp, 2004). Therefore, it is important to evaluate whether the temperature and time of transport of ovaries influence collected oocytes quantity and quality and their subsequent embryonic development; in this sense, the objective of this research was to evaluate the effect of temperature and transport time of alpaca ovaries (*Vicugna pacos*) on the quality and quantity of recovered oocytes and subsequent embryonic development *in vitro*. The present research work was developed at the Laboratory of Reproductive Biotechnology of the Agrarian Experimental Station-INIA-Canaán, Ayacucho and the ovaries were obtained from the Municipal Slaughterhouse of Pilpichaca (Huaytará province) and transported in 0.9% SSF with gentamicin (1ml / 1L of solution) , at a temperature of 37 ° C using 2 thermos with incorporated thermometer for the ovaries transport and a temperature of 80 ° C was added each time the temperature dropped for a time of 6 h on average (C1). Another group of ovaries was obtained from the Municipal slaughterhouse of Huancavelica and transported in 0.9% SSF with gentamicin at a temperature of 4-9 ° C for 20 h on average, using an isothermal gel-box to keep the cold chain (C2). The oocytes were recovered by the slicing method in TCM-199 Hepes + 10% SFB and gentamicin medium; recovering a total of 1132 oocytes from 227 ovaries transported at 37 ° C / 6 hours, with a recovery average of 5.0 ± 0.42 oocytes / ovary and for the ovaries transported at a temperature of 4-9 ° C per 20 h on average, a total of 1372 oocytes were recovered from 280 ovaries with a mean recovery of 5.1 ± 1.2 oocytes / ovary. The oocytes were selected according to quality I, II and III parameters (Quality I with cumulus cells greater than 5 layers, clear and transparent compact, cytoplasm with fine and homogeneous granulation, Quality II: cumulus cells partially surrounded between 2 to 4 darker layers and less transparent, thicker granulation cytoplasm and Quality III: cumulus cells less than or equal to one layer as described by Ratto et al., 2005) using oocytes from all categories, obtaining 25.7 ± 3.4 ; 9 ± 9.56 and 37.41 ± 9.56 , respectively for ovaries of C1, and 20.7 ± 7.2 , 44.3 ± 8.36 and 35.1 ± 10.6 , respectively for ovaries of C2. Results indicate that there was no significant differences ($P > 0.05$) in the temperature and transport time of ovaries (C1 and C2) on the quantity and quality of recovered oocytes. Selected oocytes matured *in vitro* for 32 h and then were fertilized *in vitro* with epididymal semen for 18 h at a concentration of 1×10^6 thousand millions of spermatozoa / 0.5ml of medium / 25 oocytes. Presumed zygotes were cultured *in vitro* for 7 days at 38.5°C with CO₂ (5%), O₂ (5%), N₂ (5%) and 90% humidity. Regarding the number of embryos (morulae and blastocysts), no significant differences were found in the temperature and transport time C1 (ovaries transported at 37 ° C / 6 hours) = 32.70% of embryos and C2 (ovaries transported at a temperature of 4-9 ° C for 20 h on average) = 32.41 embryos in 12 runs for both transportation methods. In conclusion, temperature and time of transportation do not influence the quantity, quality and embryonic development in

in vitro under these conditions. **FUNDING:** National Program of Agrarian Innovation PNIA, Project 113_P1

Keywords: Temperature, time, slicing, quality, embryo.

RESUMEN

Los Centros de beneficio de alpacamuchas veces se encuentran alejados de los laboratorios de investigación por tanto el tiempo y la temperatura de transporte son dos factores claves que pueden contribuir a los efectos perjudiciales en la calidad del ovocito, en términos de maduración nuclear y tasas de división posterior a la FIV (Klumpp, 2004). Por ello, radica la importancia de evaluar si la temperatura y el tiempo de transporte de ovarios influyen en la cantidad y calidad de ovocitos y su posterior desarrollo embrionario; en tal sentido, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la temperatura y tiempo de transporte de ovarios de alpaca (*Vicugna pacos*) sobre la calidad y cantidad de ovocitos recuperados y posterior desarrollo embrionario *in vitro*, el presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria-INIA-Canaán, Ayacucho, los ovarios se obtuvieron del Matadero Municipal de Pilpichaca (Provincia de Huaytará) y se transportaron en SSF 0,9% con gentamicina (1ml/1L de solución), a una temperatura de 37°C para el transporte de ovario y 80°C para adicionar cada vez que desciende la temperatura por un tiempo de 6 h en promedio (C1), otro grupo de ovarios fueron obtenidos del Matadero Municipal de Huancavelica y se transportaron en SSF 0,9% con gentamicina a una temperatura de 4-9°C por 20 h en promedio los cuales fueron transportados en caja isotérmica con gel para mantener la cadena de frío (C2). Los ovocitos fueron recuperados por el método de desmenuzado (slicing) en medio de TCM-199 Hepes + SFB al 10% y gentamicina; recuperando un total de 1132 ovocitos de 227 ovarios transportados a 37°C/6 horas, con una media de recuperación de $5,0 \pm 0,42$ ovocitos/ovario y para los ovarios transportados a una temperatura de 4-9°C por 20 h en promedio, se recuperó un total de 1372 ovocitos de 280 ovarios con una media de recuperación de $5,1 \pm 1,2$ ovocitos/ovario. Los ovocitos se seleccionaron según calidad I, II y III (Calidad I con células del cúmulo mayor a 5 capas, compacto claro y transparente, citoplasma con granulación fina y homogénea, Calidad II: células del cúmulo parcialmente rodeados entre 2 a 4 capas más oscuros y menos transparentes, citoplasma de granulación más gruesa y calidad III células del cúmulo menor o igual a una capa (Ratto et al., 2005) utilizando los ovocitos de las categoría I, II y III, obteniéndose $25,7 \pm 3,4$; $36,9 \pm 9,56$ y $37,41 \pm 9,56$; respectivamente para ovarios de C1; y $20,7 \pm 7,2$; $44,3 \pm 8,36$ y $35,1 \pm 10,6$; respectivamente para ovarios de C2. Los resultados indican que no hubo diferencia significativa ($P > 0,05$) de la temperatura y tiempo de transporte de ovarios (C1 y C2) sobre la cantidad y calidad de ovocitos recuperados. Los ovocitos seleccionados fueron madurados *in vitro* durante 32 h y luego fecundados *in vitro* con semen de epidídimo durante 18 h a una concentración de 1×10^6 millones de espermatozoides/ 0.5ml de medio/25 ovocitos, los presuntos cigotos fueron cultivados *in vitro* durante 7 días a 38.5°C con

CO₂ (5%), O₂ (5%), N₂(5%) y 90% de humedad. En cuanto a la cantidad de embriones (mórulas y blastocistos) no se encontró diferencia significativa de la temperatura y tiempo de transporte C1 (ovarios transportados a 37°C/6 horas) =32.70% de embriones y C2 (ovarios transportados a una temperatura de 4-9°C por 20 h en promedio) =32.41 de embriones en 12 corridas en ambos métodos de transporte. En conclusión, la

temperatura y el tiempo de transporte no influyen sobre la cantidad, calidad y desarrollo embrionario *in vitro* bajo esas condiciones. **FINANCIAMIENTO:** Programa Nacional de Innovación Agraria PNIA, Proyecto 113_P1.

Palabras clave: Temperatura, tiempo, slicing, calidad, embrión.

#1842. EFFECT OF DIFFERENT PROTOCOLS OF OVARIAN HYPERSTIMULATION ON THE FOLLICULAR DEVELOPMENT IN BLANCO OREJINEGRO COWS

Efecto de diferentes protocolos de superestimulación ovárica sobre el desarrollo folicular en vacas Blanco Orejinegro

Leonardo Pérez-Sandoval^{1*}, María D.A Cortés-Escobar¹, Carlos E Méndez-Calderón¹, Aldemar Chavez-Rodríguez¹, Diego A Velasco-Acosta¹

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Mosquera, Colombia.

* Corresponding author:lperezs@corpoica.org.co

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of different protocols of ovarian hyperstimulation on the follicular response of Blanco Orejinegro (BON) oocyte donors. For this study, 20 dry cows were used, in a crossover design, randomly distributed in 5 experimental groups. For groups 1 to 4, day 0 was considered the moment of removal of all follicles ≥ 5 mm [follicular ablation (FA)], which was performed by ultrasound-guided transvaginal aspiration (UGTA). Groups were assigned as Group 1 (G1): cows received a dose of 60 IU of FSH-LH 24 hours (h) after FA, and 27 h later the oocytes collection was performed by UGTA; Group 2 (G2): 24 h after FA receiving 60 IU of FSH-LH and 48 h after the UGTA was performed; Groups 3 and 4 (G3 and G4) received 60 IU of FSH-LH divided into two doses at 24 and 48 h after FA, then UGTA was performed at 27 and 48 h later, respectively. Control group (G5), UGTA was performed at a random phase of the estrous cycle. Data was analyzed through a MIXED MODEL method in the statistic program SAS 9.1 and the means were compared using the Tukey test. A greater number ($P < 0.05$) of small follicles (2 to 5 mm in diameter) were found in cows of G5 (20.75 ± 2.26) when compared with G2 (12.90 ± 2.26), without significant differences ($P > 0.05$) for other comparisons. A smaller number of medium follicles (6 to 9 mm in diameter) was found on control group cows (2.85 ± 0.91 ; $P = 0.05$) in comparison with the other groups (G1: 6.68 ± 0.91 ; G2: 7.75 ± 0.89 ; G3: 6.20 ± 0.89 and G4: 6.44 ± 0.91). A greater number of large follicles (> 9 mm in diameter, $P < 0.05$) was observed in the cows of G4 (2.92 ± 0.33) when compared to groups 1 and 5 (1.48 ± 0.41 , 1.44 ± 0.32 respectively), no significant differences were found with the other groups in the follicular category ($P > 0.05$). For the total of aspirated follicles, recovered oocytes and viable oocytes, no significant differences were found between the groups ($P > 0.05$). The use of superstimulation protocols in BON oocyte donors does not increase the total number of ovarian follicles, however, it increases the number of medium-sized follicles, homogenizing adequately the available follicles to be used by *in vitro* embryo production programs. Future experiments should be conducted to evaluate their effects on oocyte quality and blastocyst production.

Key words: Ovarian stimulation, follicular aspiration, oocytes, *in vitro* fertilization

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes protocolos de superestimulación ovárica sobre la respuesta folicular en vacas Blanco-Orejinegro (BON). Se utilizaron 20 vacas secas, en un diseño cruzado, distribuidas aleatoriamente en 5 grupos experimentales. En los grupos 1 al 4 se consideró como día 0 el momento de la remoción de todos los folículos ≥ 5 mm [ablación folicular (AF)], la cual se realizó mediante aspiración transvaginal guiada por ultrasonografía (ATGU). Grupos experimentales: Grupo 1 (G1) las vacas recibieron una dosis de 60 UI de FSH-LH 24 horas (h) después de la AF, y 27 h más tarde se realizó la colecta de los ovocitos mediante ATGU; Grupo 2 (G2) 24 h después de la AF recibieron 60 UI de FSH-LH y 48 h después se realizó la ATGU; Grupos 3 y 4 (G3 y G4) recibieron 60 UI de FSH-LH divididas en dos dosis 24 y 48 h después de la AF, la ATGU se realizó 27 y 48 h más tarde, respectivamente. Grupo control (G5) la ATGU se realizó en una fase aleatoria del ciclo estral. Los datos fueron analizados usando MIXED MODELS en el programa estadístico SAS 9.1. Las medias fueron comparadas a través de la prueba Tukey. Se encontró un mayor número ($P < 0.05$) de folículos pequeños (2 a 5 mm de diámetro) en las vacas del G5 (20.75 ± 2.26) cuando fueron comparadas con el G2 (12.90 ± 2.26), sin diferencias significativas ($P > 0.05$) para los demás grupos. Se encontró una menor cantidad de folículos medianos (6 a 9 mm de diámetro) para los animales del grupo control (2.85 ± 0.91 ; $P < 0.05$) en comparación con los demás grupos (G1: 6.68 ± 0.91 , G2: 7.75 ± 0.89 , G3: 6.20 ± 0.89 y G4: 6.44 ± 0.91). Se evidenció un mayor número de folículos grandes (> 9 mm de diámetro; $P < 0.05$) en las vacas del G4 (2.92 ± 0.33) en comparación con los grupos 1 y 5 (1.48 ± 0.41 ; 1.44 ± 0.32 respectivamente), no se evidenciaron diferencias significativas para los demás grupos ($P > 0.05$). Para el total de folículos aspirados, total de ovocitos recuperados y total de ovocitos viables, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($P > 0.05$). El uso de protocolos de superestimulación en donadoras de la raza BON no aumenta el número total de folículos ováricos, sin embargo, aumenta el número de folículos de tamaño medio, homogenizando de manera adecuada los folículos disponibles para aspiración en programas de producción *in vitro* de embriones. Futuros experimentos deben ser realizados para evaluar sus efectos en la calidad de los ovocitos y la producción de blastocistos.

Palabras clave: Estimulación ovárica, aspiración folicular, ovocitos, fecundación *in vitro*.

#1848. EFFECT OF TWO RECOVERY METHODS ON ALPACAS (*VICUGNA PACOS*) *in vitro* EMBRYO QUALITY, QUANTITY AND DEVELOPMENT

Efecto de dos métodos de recuperación de ovocitos sobre la calidad, cantidad y desarrollo embrionario *in vitro* en alpacas (*Vicugna pacos*)

C.Y. Guillen¹; M.L. Naveros¹; M. Contreras¹; R. Robles¹

¹Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria-Canaán, INIA-Ayacucho

* Corresponding author: guillpalcris@hotmail.com

ABSTRACT

Post mortem ovarian collection is an abundant and low cost source of oocytes obtained for research purposes; therefore, the recovery and selection of oocytes is usually the initial stage of the *in vitro* process of embryo production; in this sense, the need to search for methods that allow the recovery of a greater quantity and quality of oocytes becomes relevant; Therefore, the objective of the present investigation was to evaluate the effect of two oocyte retrieval methods on the quality, quantity and *in vitro* embryonic development in alpacas. The research was carried out in the Reproductive Biotechnology Laboratory of the EEA-INIA-Canaán Ayacucho. The ovaries were collected from the Municipal Slaughterhouse of Pilpichaca (Huancavelica) and transported in 0.9% saline solution with gentamicin at 37°C. We performed 15 repetitions, collecting a total of 552 ovaries, which were randomly selected into two groups in each repetition, first group: recovery of oocytes by the aspiration method (with needle No. 21G and 3ml syringes; follicles 2-7 mm in diameter) and the second group: recovery of oocytes by the slicing method (cuts) with a scalpel blade. Oocytes of quality I, II and III were then selected according to the compactness of the cluster and its cytoplasmic appearance. In both groups the quantity and quality of recovered oocytes was determined. The selected oocytes were matured in a medium composed of: TCM-199 supplemented with SFB (5%), FSH (0.5mg/ml), LH (0.5mg / ml), 17β-Estradiol (22.2mg/ml), EGF (10ng/ml), sodium pyruvate (0.011g / ml) and gentamicin (80mg/ml) and incubated at a temperature of 38.5°C, 5% CO₂, 5% O₂ and 90% humidity for 32 h. Subsequently, the oocytes were fertilized *in vitro* for 18 h with selected sperm and trained by the Percoll Gradient method (22.5% /45%), with a concentration of 1-2x10⁶/ml; in a fertilization medium supplemented with heparin (0.001mg / ml). The suspected zygotes were transferred to the SOF culture medium and were cultured for 7 days at 38.5°C, 5% CO₂, 5% O₂, 5% N₂ and 90% humidity. Data was analyzed through ANOVA analysis and Duncan test was used to determine differences between groups. A total of 975 oocytes were recovered by the aspiration method and 1397 oocytes by the slicing method. Obtaining an average recovery of 3.62 ± 2.64 and 6.20 ± 0.68 oocytes / ovary, respectively. For quality I oocytes, similar results were obtained (46.29 ± 5.56% and 40.57 ± 7.77%), by the aspiration and slicing method, respectively (p > 0.05). In contrast, for quality II oocytes, 50.81 ± 8.92% were obtained by the aspiration method and 30.21 ± 7.34% by the slicing method (p < 0.05). Finally, the *in vitro* production of embryos from oocytes recovered by the slicing method was higher (p < 0.05) than by aspiration (32.25 ± 3.79% vs 17.72 ± 11.69%, respectively). In conclusion, the highest number of oocytes was recovered by the slicing method, finding no significant differences in quality I between both groups, but in quality II and rate of *in vitro* production of embryos. FINANCING: National Program of Agrarian Innovation PNIA, Project 113_PI.

Keywords: Alpaca, follicular aspiration, slicing, oocyte quality, IVF, embryos.

RESUMEN

La recolección de ovarios post mortem es una fuente abundante de ovocitos obtenidos a bajo costo con fines de investigación; por tanto, la recuperación y selección de ovocitos, constituye por lo general la etapa inicial del proceso de producción *in vitro* de embriones; en tal sentido, la necesidad de buscar un método que permita la recuperación de una mayor cantidad y calidad de ovocitos se vuelve relevante; por ello, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de dos métodos de recuperación de ovocitos sobre la calidad, cantidad y desarrollo embrionario *in vitro* en alpacas. La investigación se ejecutó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA-INIA-Canaán Ayacucho. Los ovarios se colectaron del Matadero Municipal de Pilpichaca (Huancavelica) y transportados en solución salina al 0,9% con gentamicina a 37°C. Se realizó 15 repeticiones, colectando un total de 552 ovarios, los cuales se distribuyeron al azar en dos grupos en cada repetición, primer grupo: recuperación de ovocitos por el método de aspiración (con aguja N° 21G y jeringas de 3ml; a partir de folículos de 2-7 mm de diámetro) y el segundo grupo: recuperación de ovocitos por el método de slicing (cortes) con una hoja de bisturí. Seguidamente se seleccionaron ovocitos de calidad I, II y III de acuerdo a la compactación del cúmulo y su aspecto citoplasmático. En ambos grupos se determinó la cantidad y calidad de los ovocitos recuperados. Los ovocitos seleccionados fueron madurados en un medio compuesto por: TCM-199 suplementados con SFB (5%), FSH (0.5mg/ml), LH (0.5mg/ml), 17β-Estradiol (22.2mg/ml), EGF (10ng/ml), piruvato de sodio (0.011g/ml) y gentamicina (80mg/ml) e incubados a una temperatura de 38,5° C, 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de humedad por 32 h. Posteriormente, los ovocitos fueron fecundados *in vitro* por 18 h con espermatozoides seleccionados y capacitados por el método de Gradiente de Percoll (22.5%:45%), con una concentración de 1-2x10⁶/ml; en un medio de fecundación suplementado con heparina (0.001mg/ml). Los presuntos cigotas se transfirieron al medio de cultivo SOF y fueron cultivados durante 7 días a 38,5°C, 5% de CO₂, 5% de O₂, 5% de N₂ y 90% de humedad. Los datos fueron analizados a través de un análisis de varianza (ANOVA) y para observar la diferencia entre grupos se utilizó la prueba de Duncan. Se recuperó un total de 975 ovocitos por el método de aspiración y 1397 ovocitos por el método de slicing. Obteniendo un promedio de recuperación de 3.62±2.64 y 6.20±0.68 ovocitos /ovario, respectivamente. Para ovocitos de calidad I se obtuvieron resultados similares (46.29±5.56% y 40.57±7.77%), por el método de aspiración y slicing, respectivamente (p>0.05). En cambio, para ovocitos de calidad II se obtuvieron 50.81±8.92% por el método de aspiración y 30.21±7.34% por el método de slicing (p<0.05). Finalmente, la producción de embriones *in vitro* a partir de ovocitos recuperados por el método de slicing fue superior (p<0.05) al de aspiración (32.25±3.79% vs 17.72±11.69%, respectivamente). En conclusión, la mayor cantidad de ovocitos fue recuperado por el método de slicing, no encontrándose diferencia significativa en calidad entre ambos grupos, pero sí en calidad II y tasa de producción *in vitro* de embriones. FINANCIAMIENTO: Programa Nacional de Innovación Agraria PNIA, Proyecto 113_PI.

Palabras clave: alpaca, aspiración follicular, slicing, calidad de ovocitos, FIV, embriones

#1849. EVALUATION OF FOLLICULAR FLUID IN THE *IN VITRO* MATURATION OF ALPACA OOCYTES (*Vicugna pacos*)

Evaluación del licor folicular en la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca (*Vicugna pacos*)

M. Contreras*¹, M.L. Naveros¹, C.Y. Guillén¹, R. Robles¹, E. Linares¹

¹Estación Experimental Agraria-Canaán, INIA-Ayacucho

* Corresponding author: micohu948@hotmail.com

ABSTRACT

Embryo *in vitro* maturation medium sin different species, are of high cost, likewise hormones and growth factors, adding to the increase of embryo production costs, which is why it is necessary to replace these components with mediums such as follicular liquor as *in vitro* maturation medium; for this reason, the objective of the present investigation was to evaluate the follicular liquor effects on the *in vitro* maturation of alpaca oocytes (*Vicugna pacos*). The present research work was developed at the Reproductive Biotechnology Laboratory of the Agricultural Experimental Station (Canaan) -Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Ayacucho. Ovaries were obtained from the Huancavelica Municipal slaughterhouse and transported in NaCl 0.9 % solution with antibiotic, at a temperature of 4-9 ° C for a time of 18-20 h. To obtain the follicular liquor, preovulatory follicles > 7mm in diameter were selected; follicular aspiration and centrifugation at 500G for 30 minutes were performed consequently. Supernatant fluid was decanted and inactivated in a water bath at 56 ° C to denature the fibrin and other factors that inhibit the maturation of the oocytes, obtaining aliquots of 200µl, stored at -20 ° C up until use (a month). We used 1672 cumulus-oocyte complexes (COCs) from 364 alpaca ovaries. COCs were recovered using the slicing technique and oocytes of quality I, II and III were selected, being quality I: with cells of the clusters greater than 5 layers, compact clear and transparent, cytoplasm with fine and homogeneous granulation, Quality II: cells of the partially enclosed clusters between 2 to 4 darker and less transparent layers, thicker granulation cytoplasm and quality III: cumulus cells less than or equal to one layer. Selected oocytes were deposited randomly in maturation medium composed of: 85% TCM-199, 10% follicular liquor, 0.011g / ml sodium pyruvate, 5% fetal bovine serum and antibiotic, no hormone or growth factor was used since this source was given by the follicular liquor, reducing the cost of *in vitro* production of embryos. These were placed then in an incubator at an atmosphere of 38.5 ° C, 5% CO₂, 5% O₂ and 90% relative humidity for 32 h. Later these were transferred to the fertilization medium, where *in vitro* fertilization was performed for 18 hours in the fertilization medium supplemented with heparin as a capacitating agent, with Percoll Gradient method (22.5%: 45%) selected and trained spermatozoa, showing a motility of 60% and a concentration of 1x10⁶ million sperm / ml / 100 oocytes. Then, the suspected zygotes were transferred to the SOF culture medium and incubated for 7 days at 38.5 ° C, 5% CO₂, 5% O₂, 5% N₂ and 90% relative humidity. The results indicate that an average percentage of 38.4% ± 7.65 morulas was obtained, 7.0% ± 3.46 blastocysts and 45.45% ± 8.48 of embryos between blastocysts and morulas (IETS standards). In conclusion, the use of follicular liquor in the maturation medium is favorable to achieve the *in vitro* maturation of oocytes and subsequent embryonic development, reducing the costs of the alpaca *in vitro* embryo production, not finding any differences with the routine protocols used in the laboratory data not yet published. FINANCING: National Program of Agrarian Innovation PNIA, Project 113_PI.

Key words: *Vicugna pacos*, follicular fluid, *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization.

RESUMEN

Los medios utilizados para la maduración de embriones *in vitro* en diferentes especies son de alto costo, como las hormonas y factores de crecimiento, incrementando así el costo de producción de embriones, razón por el cual se hace necesario reemplazar dichos componentes con medios como el licor folicular como medio de maduración *in vitro* por tal razón el objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el licor folicular en la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca (*Vicugna pacos*). el presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria (Canaán) -Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Ayacucho, los ovarios se obtuvieron del camal Municipal de Huancavelica y se transportaron en NaCl 0,9% con antibiótico, a una temperatura de 4-9°C por un tiempo de 18-20 h. Para la obtención del licor folicular se seleccionaron foliculos preovulatorios > a 7mm de diámetro, se realizó la aspiración folicular, centrifugación a 500G durante 30 minutos. Se decanta el líquido sobrenadante, se inactiva en baño maría a 56°C para desnaturalizar la fibrina y otros factores que inhiben la maduración de los ovocitos, se hizo alícuotas de 200µl y se almacenó en congelación a -20°C hasta su uso (un mes). Se utilizó 1672 complejos cúmulos-ovocitos (COCs) de 364 ovarios de alpacas. Los COCs se recuperaron utilizando la técnica de slicing y se seleccionaron ovocitos de calidad I, II y III, calidad I: con células del cúmulo mayor a 5 capas, compacto claro y transparente, citoplasma con granulación fina y homogénea, Calidad II: células del cúmulo parcialmente rodeados entre 2 a 4 capas más oscuros y menos transparentes, citoplasma de granulación más gruesa y calidad III: células del cúmulo menor o igual a una capa los ovocitos seleccionados se distribuyeron al azar y fueron depositados en medio de maduración compuesto por: 85% de TCM-199, 10% de licor folicular, 0.011g/ml de piruvato de sodio, 5% de suero fetal bovino y antibiótico, no se utilizó ninguna hormona ni factor de crecimiento ya que esta fuente fue dado por el licor folicular disminuyendo los costos de producción *in vitro* de embriones. Luego fueron colocados en una incubadora a una atmósfera de 38.5°C, 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de humedad relativa durante 32 h. Posteriormente se transfirió al medio de fertilización, donde se realizó la fecundación *in vitro* por 18 horas en medio de fertilización suplementado con heparina como agente capacitante, con espermatozoides que fueron seleccionados y capacitados por el método de Gradiente de Percoll (22.5%:45%) con una motilidad de 60% y una concentración de 1x10⁶ millones de espermatozoides/ml/100ovocitos. Seguidamente, los presuntos cigotos se transfirieron al medio de cultivo SOF y se incubaron durante 7 días a 38.5°C, 5% de CO₂, 5% de O₂, 5% de N₂ y 90% de humedad relativa. Los resultados indican que se obtuvo un porcentaje promedio de 38.4 % ± 7.65 mórulas, 7.0 % ± 3.46 blastocistos y 45.45 % ± 8.48 de embriones entre blastocistos y mórulas (normas IETS). En conclusión, el uso del licor folicular en el medio de maduración es favorable para lograr la maduración *in vitro* de ovocitos y posterior desarrollo embrionario, reduciendo los costos de la producción de embriones *in vitro* en alpacas no encontrando diferencias con los protocolos de rutina utilizados en el laboratorio datos aun no publicados. FINANCIAMIENTO: Programa Nacional de Innovación Agraria PNIA, Proyecto 113_PI.

Palabras claves: *Vicugna pacos*, licor folicular, maduración *in vitro*, fecundación *in vitro*.

#1957. COMPARISON OF COMMERCIAL RESULTS BETWEEN OVUM PICK-UP (OPU) IN ANGUS VS. LAPAROSCOPIC OVUM PICK-UP (LOPU) IN CALVES OF THE SAME BREED AND THEIR ZEBU CROSSES

Comparación de resultados comerciales entre Ovum Pick-Up (OPU) en vacas angus vs. Laparoscopic Ovum Pick-Up (LOPU) en terneras de la misma raza y sus cruza con cebú

Letícia Alecho Requena^{1*}, Pedro Nacib Jorge Neto², Rednilson Moreli Gois¹ and Hernan Baldassarre³

¹GenéticaBacurizinho (Potirendaba, SP), ²PPGRA-FMVZ/USP (São Paulo, SP), ³McGill University (Montreal, Canada).

* Corresponding author: pepovet@usp.br

ABSTRACT

To take full advantage of genetic marker selection, the production of embryos from calves of 2-4 months of age allows shortening the generation interval by one year, increasing the speed of genetic improvement in cattle. The objective of this study was to compare the average number of oocytes recovered by OPU in adult vs. LOPU in prepubertal cattle, to assess the suitability of using prepubertal donors in commercial in vitro embryo production programs. Three sessions were performed, totaling 18 LOPU in 9 angus and 7 angus x zebu cross aged 2 to 7 months (calves) and 31 OPU in 13 angus cows from 19 to 141 months old (adults). While cows were not stimulated with gonadotropins, calves were synchronized with a progestin intrauterine device for 5 days and received a total of 100 mg of FSH administered in 4 injections of 2, 1, 1 and 1 mL at 12h intervals starting ~ 72h and 500IU of eCG ~ 36h before LOPU. The calves were deprived of food (24h) and water (12h) in preparation for surgery. For LOPU, the donors were placed under general anesthesia with isoflurane. LOPU was conducted as previously described. Briefly, females were restrained on a laparoscopic table at a 45° angle and then, using laparoscope and atraumatic forceps to expose the ovaries, all follicles ≥ 2 mm in diameter were aspirated using a 20G needle mounted on a plastic pipette connected to a vacuum line. For OPU, cows were placed under low epidural anesthesia with 5 mL lidocaine 2%. OPU was conducted under ultrasound guidance, using a micro-convex transducer coupled to a trans-vaginal aspiration guide; all follicles ≥ 2 mm diameter were aspirated using a 20G needle mounted onto the aspiration guide and connected to a collection tube and a vacuum line. We found no statistical differences (t test, P>0.05) when comparing the results of prepubertal by age and neither between LOPU (prepubertal) vs OPU (adults). For 2-4 vs. 4-7 mo. calves there were no differences in the average number of aspirated follicles (11.3±11.2 vs. 14.9±8.6) and number of recovered oocytes (9.7±11.9 vs. 11.9±7.9). Similarly, no differences were found when comparing the results in recovered number of oocytes from LOPU (prepubertal) vs. OPU (adults) at the ages of 2-7 mo. (10.7±10.0), 2-4 yr. (13.9±11.2), 4-8 yr. (11.9±6.5) and >8 yr (8.3±3.4). Finally, we found statistical differences when comparing by breed in prepubertal angus vs. angus x zebu cross, in average follicles aspirated (8.5±5.9^a vs. 19.7±11.7^b, P<0.05) and oocytes recovered (5.5±2.3^a vs. 18.7±12.4^b, P<0.01). These results confirm that LOPU is an efficient, safe and reproducible tool for the recovery of oocytes from prepubertal females and can be applied to animals from 2 months of age in commercial work, allowing the shortening of the generation interval.

Key words: LOPU, calf, calves, OPU, cow

RESUMEN

Para aprovechar al máximo la selección demarcadores genético, la producción de embriones de terneros de 2 a 4 meses de edad permite reducir el intervalo entre generaciones en un año, lo que aumenta la velocidad de mejora genética en el bovino. El objetivo de este estudio fue comparar el número promedio de ovocitos recuperados por OPU en adultos versus a LOPU en hembras prepuberes, para evaluar la factibilidad de utilizar donantes prepuberes en programas comerciales de producción de embriones in vitro. Se realizaron tres sesiones, totalizando 18 LOPU en 9 angus y 7 angus x cebú cruzados con una edad de 2 a 7 meses (terneras) y 31 OPU en 13 vacas angus de 19 a 141 meses de edad (adultos). Mientras que las vacas no fueron estimuladas con gonadotropinas, las terneras se sincronizaron con un dispositivo intrauterino de progesterona durante 5 días y recibieron un total de 100 mg de FSH administrada en 4 inyecciones de 2, 1, 1 y 1 mL a intervalos de 12 h comenzando a las ~ 72 horas y 500 UI de eCG a las ~ 36h antes de LOPU. Las terneras fueron privados de alimento (24 h) y agua (12 h) en preparación para la cirugía. Para LOPU, los donantes fueron colocados bajo anestesia general con isoflurano. LOPU se llevó a cabo como se describió anteriormente. En pocas palabras, las hembras se contuvieron en una mesa laparoscópica en un ángulo de 45° y luego, utilizando un laparoscopio y pinzas atraumáticas para exponer los ovarios, se aspiraron todos los folículos ≥ 2 mm de diámetro con una aguja 20G montada en una pipeta de plástico conectada a un vacío línea. Para OPU, las vacas se colocaron bajo anestesia epidural con 5 ml de lidocaína al 2%. La OPU se realizó bajo guía ecográfica, utilizando un transductor microconvexo acoplado en una guía de aspiración transvaginal; todos los folículos ≥ 2 mm de diámetro fueron aspirados usando una aguja 20G montada en la guía de aspiración y conectada a un tubo de recolección y una línea de vacío. No se encontraron diferencias estadísticas (prueba t, P> 0.05) al comparar los resultados de hembras prepúberes por edad y LOPU (prepúberes) versus OPU (adultos). Para 2-4 vs. 4-7 meses los terneros de mayor edad no se observaron diferencias en el número promedio de folículos aspirados (11.3 ± 11.2 vs. 14.9 ± 8.6) y el número de ovocitos recuperados (9.7 ± 11.9 vs. 11.9 ± 7.9). Del mismo modo, no se encontraron diferencias al comparar los resultados en el número de ovocitos recuperados de LOPU (prepúberes) frente a OPU (adultos) a las edades de 2-7 meses. (10.7 ± 10.0), 2-4 años. (13.9 ± 11.2), 4-8 años. (11.9 ± 6.5) y > 8 años (8.3 ± 3.4). Finalmente, encontramos diferencias estadísticas al comparar por raza angus prepúberes versus angus x cebu cruzados, en folículos promedio aspirados (8.5 ± 5.9^a vs. 19.7 ± 11.7^b, P < 0.05) y ovocitos recuperados (5.5 ± 2.3^a vs. 18.7 ± 12.4^b, P < 0.01). Estos resultados confirman que LOPU es una herramienta eficiente, segura y repetible para la recuperación de ovocitos de hembras prepúberes, y puede aplicarse a animales a partir de los 2 meses de edad en trabajos comerciales, permitiendo el acortamiento del intervalo generacional.

Palabras clave: LOPU, becerra, terneras, OPU, vaca

4. General diversity

#1803. SEROPREVALENCE OF *Neospora caninum* AND ITS ASSOCIATION WITH EMBRYONIC LOSS, ABORTION AND MILK PRODUCTION IN DAIRY COWS MAINTAINED AT HIGH-ALTITUDE ENVIRONMENTS**Seroprevalencia de *Neospora caninum* y su asociación con pérdida embrionaria, aborto y producción lechera en vacas mantenidas en ambientes de altitud**M.A. Gutiérrez-Reinoso^{1,2}, M.E. Cajas-Morillo², M. García-Herreros^{3*}¹Universidad de Concepción (UDEC), Concepción, Chile.²Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC), Latacunga, Ecuador³Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, IP), Santarém, Portugal

*Corresponding author: herrerosg@gmail.com

ABSTRACT

Neosporosis is caused by infection with the parasite *Neospora caninum* and has been considered as one of the most important causes of embryonic loss and abortion in cattle between the 3rd and the 9th month of pregnancy. Moreover, neosporosis impact on dairy herd productivity may be considerable, and therefore, it deserves to be studied. The aim of the present study was to evaluate the seroprevalence of *Neospora caninum* using ELISA analyses in blood serum samples and its association with embryonic loss, abortion and milk production in dairy cows maintained under high altitude environments. Holstein Friesian cows (2nd and 3rd lactation, n = 200) were used to perform a serological analysis by using a competitive indirect ELISA kit (VMRD kit). Samples were obtained randomly from 20 different herds located in 10 different geographic points of the Andean highlands of Ecuador ($\geq 3,600$ m.a.s.l.). The used animals had never been immunised against *N. caninum* before. Ultrasonography was carried out to determine early embryonic loss and visual evidence to determine late-term abortions. Chi-Square test of independence was performed and ANOVA test was carried out after a preliminary examination of the data (SPSS software v.15 for Windows). Analysis of sera revealed circulating antibodies (seropositivity) against *N. caninum* in 26.50% (53/200) of samples, with ELISA values ranging between 11.10% and 35.00% respectively. The absence of circulating antibodies (seronegativity) against *N. caninum* was observed in 64.00% (128/200), with values ranging between 56.25% and 77.78%. The undetermined samples during serological analysis was just 9.50% (19/200) which would increase the total seropositivity to 28.29% (53/181) and total seronegativity to 71.71% (128/181). Taking into account the seropositive vs. seronegative serum samples, 11/53 (20.75%) vs. 21/128 (16.40%), were related to embryonic loss, meanwhile 16/53 (30.19%) vs. 9/128 (7.03%) were associated to abortion and 9/53 (16.98%) vs. 6/128 (4.68%) were related to both (embryonic loss + abortion) which account a total of 36/53 (67.92%) vs. 36/128 (28.12%) serum samples from animals with reproductive problems. Just 17/53 (32.08%) seropositive animals had no background related to embryonic loss and/or abortion compared to 92/128 (71.87%) of those seronegative. Milk production was affected by neosporosis infection (average milk yield = $1,759.8 \pm 99.4$ vs $1,919.0 \pm 112.2$ kg / 210 days lactation) when seropositive and seronegative animals were compared ($p=0.04$). In conclusion, the competitive indirect ELISA analysis allowed an efficient diagnosis in the detection of circulating antibodies against *N. caninum* in more than 90% of the analysed serum samples. The prevalence rates involved a significant association between seropositive individuals and embryonic loss / abortion cases. Finally, milk yield in seropositive cows was significantly lower, which would indicate a negative effect of neosporosis infection on dairy production at high altitude environments.

Keywords: *Neospora caninum*; embryonic loss; abortion; milk production; bovine

RESUMEN

La neosporosis es una patología causada por la infección del parásito *Neospora caninum* y es considerada como una de las causas más importantes de pérdida embrionaria y aborto en el ganado bovino entre el 3° y el 9° mes de gestación. El impacto de la neosporosis en la productividad del hato lechero puede ser considerable y por tanto, merece ser estudiada. El objetivo del presente estudio fue evaluar la seroprevalencia de *Neospora caninum* utilizando análisis ELISA en muestras de suero sanguíneo y determinar su asociación con la pérdida embrionaria, aborto y producción de leche en vacas mantenidas en ambientes de altitud. El trabajo se realizó con vacas Holstein (2ª y 3ª lactación, n = 200) llevando a cabo análisis serológicos mediante el uso de la técnica de ELISA competitivo indirecto (kit VMRD). Las muestras se obtuvieron aleatoriamente de 20 hatos ubicados en 10 puntos geográficos diferentes en la zona andina de Ecuador ($\geq 3,600$ m.s.n.m.). Los animales utilizados, nunca habían sido inmunizados antes contra *N. caninum*. La determinación de pérdida embrionaria temprana se realizó mediante ultrasonografía y el aborto tardío mediante evidencia visual. Se llevó a cabo un análisis de independencia Chi-cuadrado y tras realizar un examen preliminar de los datos obtenidos se llevó a cabo un análisis ANOVA con software SPSS v.15 para Windows. El análisis de los sueros reveló anticuerpos circulantes (seropositividad) contra *N. caninum* en el 26,50% (53/200) de las muestras, con valores de ELISA positivo entre el 11,10% y el 35,00%, respectivamente. La ausencia de anticuerpos circulantes (seronegatividad) frente a *N. caninum* se observó en el 64,00% (128/200) de las muestras, con valores que oscilaron entre el 56,25% y el 77,78%. Tras el análisis serológico, sólo el 9,50% (19/200) de las muestras fueron indeterminadas, lo que podría aumentar la seropositividad total hasta el 28,29% (53/181) y la seronegatividad total hasta un 71,71% (128/181). Tomando muestras de suero seropositivas vs. seronegativas 11/53 (20,75%) vs. 21/128 (16,40%) se relacionaron con pérdida embrionaria, 16/53 (30,19%) vs. 9/128 (7,03%) se asociaron a aborto y 9/53 (16,98%) vs. 6/128 (4,68%) se relacionaron con ambos (pérdida embrionaria + aborto) lo que representó un total de 36/53 (67,92%) vs. 36/128 (28,12%) muestras de suero de animales con problemas reproductivos. Tan sólo 17/53 (32,08%) animales seropositivos no tuvieron antecedentes de pérdida embrionaria y/o aborto comparado con 92/128 (71,87%) de los seronegativos. La producción de leche se vio afectada por la infección debido a neosporosis (producción de leche = $1.759,8 \pm 99,4$ frente a $1.919,0 \pm 112,2$ kg / 210 días de lactación) cuando se compararon animales seropositivos y seronegativos ($p=0,04$). En conclusión, el análisis ELISA competitivo indirecto permitió un diagnóstico eficiente en la detección de anticuerpos circulantes contra *N. caninum* en más

del 90% de las muestras de suero analizadas. Las tasas de prevalencia mostraron una importante asociación entre individuos seropositivos y casos de pérdida embrionaria y/o aborto. Finalmente, la producción de leche en vacas seropositivas fue significativamente menor, lo que indicaría un

efecto negativo de la infección por neosporosis en la producción lechera en ambientes de altitud.

Palabras clave: *Neospora caninum*; pérdida embrionaria; aborto; producción lechera; bovino

#1806. EFFECT OF PRE-PARTUM SELENIUM SUPPLEMENTATION IN POST-PARTUM BLOOD SERUM AND COLOSTRAL IMMUNOGLOBULIN G CONCENTRATIONS IN DAIRY COWS WITH DIFFERENT NUMBER OF PARTURITIONS

Efecto de la suplementación de selenio pre-parto en la concentración de inmunoglobulina G post-parto en suero sanguíneo y calostro en vacas lecheras con diferente número de partos

M.A. Gutiérrez-Reinoso^{1,2}, N.O. Peña-Muñoz¹, M. García-Herreros^{3*}

¹Universidad de Concepción (UDEC), Concepción, Chile

²Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC), Latacunga, Ecuador

³Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, IP), Santarém, Portugal

*Corresponding autor: herrerrosgm@gmail.com

ABSTRACT

Holstein Friesian cattle has been characterised by its poor colostrum quality with a very low immunoglobulin G (Ig G) concentration (<50 mg/mL). Moreover, the parturition number (calvings) has been considered as an important influencing factor of Ig G concentrations in blood serum and colostrum. Generally, the colostrum produced by first-calving animals (heifers) has lower Ig concentrations compared to cows with higher number of calvings, maybe due to heifers have been exposed to antigens for less time than older cows. However, the supplementation with trace minerals, such as Selenium (Se), may help to increase immune system efficiency. The goal of the present study was to evaluate the effects of pre-partum Se supplementation on post-partum blood serum and colostrum IgG concentrations in dairy cows with different number of calvings. Holstein Friesian cows (1st-2nd-3rd calving, n= 21) were used to perform a serological (5 mL blood samples pre- and post-partum) and colostrum (250 mL colostrum post-partum) analysis by using spectrophotometry (Shimadzu UV-160-A UV-VIS, Shimadzu Co., Kyoto, Japan), turbidimetry (Hitachi, Japan) and colostrometry methods for specific gravity (density). Animals were randomly divided into control groups (1st-2nd-3rd calving, non-treated; n= 3 each group) and Se-treated animals [1st-2nd-3rd calving + 1 mg/kg b.m. Se S.C. (BaSeO₄) 21 days before calving; n= 4 each group]. ANOVA, Brown-Forsythe and Welch tests were carried out after a preliminary examination of the data. Games-Howell test was performed as Post-hoc test (SPSS software v.15 for Windows). Analysis of blood serum revealed no statistical differences in IgG concentrations between control and Se-treated groups, irrespective of the number of calvings (p>0.05). In colostrum samples, despite higher IgG concentrations were observed in Se-treated groups, no significant differences were detected between control and Se-treated groups (p>0.05). The IgG concentrations detected in blood serum and colostrum samples from first-calving heifers (46.70 ± 4.22 mg/mL) were significantly lower compared to IgG concentrations obtained from samples derived from second- (58.62 ± 2.94 mg/mL) and third-calving cows (63.10 ± 3.46 mg/mL) (p<0.05). In conclusion, the spectrophotometric, turbidimetric and colostrometric analyses allowed an efficient diagnosis in the detection and quantitative determination of IgG concentrations in blood serum and colostrum samples. There was no relationship between Se supplementation and IgG concentrations in samples from dairy cows with the same number of calvings. Finally, the IgG concentration obtained was calving-dependent, being lower in first-calving heifers compared to second- and third-calving cows irrespective of the blood serum or colostrum samples analysed.

Keywords: Selenium; IgG concentration; blood serum; colostrum; parturition number; bovine

RESUMEN

El ganado bovino Holstein Friesian se caracteriza por poseer una baja calidad del calostro con bajas concentraciones (<50 mg/mL) de inmunoglobulina G (Ig G). Además, un factor importante que determina la concentración de Ig G en el suero sanguíneo y en el calostro es el número de partos. Generalmente, el calostro producido por animales de primer parto tiene una concentración de Igs inferior, probablemente debido al menor tiempo de exposición a antígenos comparado con animales de mayor edad. No obstante, la suplementación con minerales traza, tales como el Selenio (Se), puede ayudar a incrementar la eficiencia del sistema inmune. El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos de la suplementación de Se pre-parto en las concentraciones de IgG post-parto en suero sanguíneo y calostro en vacas lecheras con diferente número de partos. Se utilizaron vacas de la raza Holstein Friesian (1°-2°-3° parto, n= 21) para llevar a cabo los análisis de suero sanguíneo (muestras de 5 mL de sangre pre- y post-parto) y calostro (250 mL de calostro post-parto) las cuales fueron analizadas mediante espectrofotometría (Shimadzu UV-160-A UV-VIS, Shimadzu Co., Kyoto, Japón), turbidimetría (Hitachi, Japan) y métodos colostrométricos de gravedad específica (densidad). Los animales se dividieron aleatoriamente en tres grupos control (1°-2°-3° parto, no tratado con Se, n = 3 cada grupo) y tres grupos de animales tratados con Se [(1°-2°-3° parto + 1 mg / kg p. v. de Se S.C.; BaSeO₄) 21 días antes del parto (n= 4 cada grupo)]. Tras realizar un examen preliminar de los datos obtenidos, se llevó a cabo un análisis ANOVA, Brown-Forsythe and Welch de éstos. Además se llevó a cabo el test Games-Howell como test Post-hoc (software SPSS v.15 para Windows). Los análisis de suero sanguíneo no mostraron diferencias significativas respecto a las concentraciones de IgG entre los grupos control y los grupos tratados con Se, independientemente del número de partos (p>0,05). En las muestras de calostro, a pesar de que se observaron concentraciones de IgG superiores en los grupos tratados con Se, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos control y los grupos tratados con Se (p>0,05). Las concentraciones de IgG detectadas en suero sanguíneo y calostro en animales de primer parto (46,70 ± 4,22 mg/mL) fueron significativamente menores que aquellas observadas en muestras obtenidas de vacas de segundo (58,62 ± 2,94 mg/mL) y/o tercer parto (63,10 ± 3,46 mg/mL) (p<0,05). En conclusión, los análisis espectrofotométricos, turbidimétrico y colostrométrico permitieron un diagnóstico eficaz en la detección y determinación cuantitativa de las concentraciones de IgG en muestras de suero sanguíneo y calostro. No hubo relación entre la suplementación de Se y las concentraciones de IgG en muestras

sanguíneas y calostrales de vacas con el mismo número de partos. Por último, la concentración de IgG obtenida en las muestras analizadas de suero sanguíneo y de calostro fue parto-dependiente, siendo inferior en animales de primer parto en comparación con vacas de segundo y de tercer parto.

Palabras clave: Selenio; concentración de IgG; suero sanguíneo; calostro; número de partos; bovino

#1824. DESCRIPTION OF THE GESTATION RATE IN WILD VICUÑAS IN CUSCO REGION

Descripción de la tasa de gestación en vicuñas silvestres en la región cusco

Joel Iván Pacheco^{1*}; Víctor Velez¹; Danilo Pezo¹; José Angulo-Tisoc¹; Henry Castelo²

¹. IVITA Marangani Station, Faculty of Veterinary Medicine, National University of San Marcos, Lima, Peru.

². Project Vicuñas, Cusco Regional Government.

* Corresponding author: jpachecoc@unmsm.edu.pe

ABSTRACT

The vicuña is a polygamous species, forms family groups with a dominant male and several females and younglings. Sexual maturity is reached after the first year of life and at the age of two, they can have their first birth, presenting reproductive activity during the rainy season. Currently the population of vicuñas is recovered and used rationally, in the Cusco region there are more than 17 000 vicuñas, being important the monitoring of their reproductive parameters, however, this is difficult due to the silvestry condition they present, living in inaccessible areas. The study was conducted during the months from May to August 2017 in the different captures ("Chaccus") of vicuñas kept in silvestry in the Cusco Región. The pregnancy was determined by transrectal ultrasound (n = 75) using a 5 MHz veterinary ultrasound (Aloka® SSD 280); The present study has the Authorization of investigation through the Resolution of General Direction n° 180-2016-SERFOR / DGGSPFFS. The results showed 74.6% of pregnancies, where 29.3% corresponded to young females and 44.3% corresponded to adult females, which is similar to other findings reported in another wild camelid like the guanaco, where 60 to 86.4% of annual fertility is reported; It is also similar to the alpaca continuous breeding system, where 72.14% of fertility is reported. Family groups are throughout the year with the presence of a dominant male, which has the opportunity to perform the copula during the breeding season months. The wild vicuña shows good reproductive efficiency which ensures its population increase and therefore the survival of its species in wild conditions.

Key Words: Vicuña, pregnancy, ultrasound, wildest

RESUMEN

La vicuña es una especie polígama, forma grupos familiares con un macho dominante y varias hembras y crías, la madurez sexual se alcanza al año de edad y a los dos años pueden tener su primer parto, presentando actividad reproductiva durante la época lluviosa; actualmente la población de vicuñas esta recuperada y se utiliza racionalmente, en la región Cusco existen más de 17 000 vicuñas, siendo importante el monitoreo de sus parámetros reproductivos, sin embargo se hace difícil por la condición de silvestria que presentan, viviendo en zonas poco accesibles. El estudio se realizó durante los meses de mayo a agosto del 2017 en las diferentes capturas ("Chaccus") de vicuñas mantenidas en silvestria en la Región Cusco. La determinación de gestación se realizó mediante ecografía transrectal (n=75) utilizando un ecógrafo veterinario de 5 MHz (Aloka® SSD 280); El presente estudio cuenta con la Autorización de investigación mediante la Resolución de Dirección General n° 180-2016-SERFOR/DGGSPFFS. Los resultados muestran 74.6 % de gestaciones, donde el 29.3 % corresponde a hembras jóvenes y el 44.3% corresponde a hembras adultas, lo cual es similar a lo reportado en otro camélido silvestre como el guanaco, donde se reporta de 60 a 86.4 % de fertilidad anual; también es similar al sistema de empadre continuo en alpacas, donde se reporta 72.14 % de fertilidad. Los grupos familiares se encuentran todo el año con presencia de un macho dominante, el cual tiene la oportunidad de realizar la copula durante los meses de época reproductiva. La vicuña silvestre demuestra tener buena eficiencia reproductiva lo cual asegura su incremento poblacional y por ende la sobrevivencia de su especie en condiciones de silvestria.

Palabras clave: vicuña, gestación, ecografía, silvestria.

#1831. EXPRESSION AND PURIFICATION OF BOVINE RECOMBINANT α SFP USING BACTERIAL CELL FACTORIES**Expresión y purificación de la α SFP recombinante bovina usando fabricas celulares bacterianos.****Fabián L. Rueda^{1*}; Jesús A. Polo-Olivella¹⁻²; Jaime A. Cardozo Cerquera¹**

¹. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, AGROSAVIA. Grupo de Investigación en Reproducción Animal Tropical. C.I. Tibaitatá, Kilómetro 14, Vía a Mosquera, Cundinamarca – Colombia.

². Maestría en Biología, Universidad del Atlántico, Puerto Colombia, Atlántico – Colombia.

* Corresponding author: frueda@corpoica.org.co

ABSTRACT

Seminal plasma proteins (SPP) have an important role in the changes suffered by sperm cells since ejaculation, through the female genital and reproductive tract and even in the fertilization process. In bovines, structures and functions of SPP have been widely described and spermadhesines family has been highlighted as an important SPP group. Due to their structural features, spermadhesines have an important relevance in sperm motility and have also been related to sperm cells protection against oxidative stress. In this sense, several studies about the acidic seminal plasma protein (α SFP), as part of the spermadhesines family, have reported an important redox activity which can be responsible of spermatozoa protection from reactive oxygen species (ROS). This antioxidant activity can be harnessed to enhance seminal quality in the cryopreservation process. In this regard, the aim of this work was to evaluate the heterologous production of α SFP using a typical bacterial cell factory (*Escherichia coli*). To do this, the gene sequence, reported in international databases for α SFP, was synthesized and optimized to be cloned into an IPTG inducible pDaas plasmid. Then, the optimized α SFP gene containing vector was replicated through a DH5 α strain and purified using miniprep columns kits. The obtained construct was used to transform two different *E. coli* strains (DE3 and Clean coli). Once transformed, the expression trials were developed in three different temperatures (37°, 25° and 16°C) and two different concentrations of the inducer IPTG (0,5 and 1 mM). The produced recombinant α SFP was purified through affinity chromatography and the aminoacid sequence was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry. Results showed that, in all cases, recombinant proteins mainly tended to form aggregates rather than soluble and properly folded proteins. However, when the production was carried out at 16°C and 1mM IPTG, the amount of purified proteins was around 2.0 μ g/ml. Bearing in mind the structural and functional features of α SFP, a recombinant production could become an interesting alternative to enhance cryopreservation diluents that could also improve the in vivo and in vitro fertilization processes.

Keywords: Bovine reproduction, sperm freezing, seminal plasma proteins, bacterial cell factories

RESUMEN

Las proteínas del plasma seminal (PPS) juegan un papel fundamental en los cambios que sufre la célula espermática desde la eyaculación, durante su paso por el tracto genital de la hembra e incluso en la fecundación del ovocito. En los bovinos, la estructura y función de las PPS han sido descritas en múltiples trabajos y se ha destacado a las espermadhesinas como un grupo de PPS con gran importancia. Por sus características estructurales, las espermadhesinas están relacionadas con la motilidad espermática y con la protección del espermatozoide contra el estrés oxidativo. Se ha determinado que, dentro de la familia de las espermadhesinas, proteínas como la α SFP (acidic Seminal Plasma Protein) tienen una actividad redox importante que brinda protección al espermatozoide frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS) y que esta actividad puede ser aprovechada para mejorar la calidad seminal en procesos de criopreservación. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de α SFP de forma heteróloga en una fábrica celular bacteriana (*Escherichia coli*). Para esto, la secuencia genética reportada en las bases de datos para la α SFP fue sintetizada y optimizada para el uso de codón de *E. coli* (inserto). El inserto fue ligado a un plásmido inducible por IPTG y el plásmido conteniendo el inserto fue replicado en una cepa de *E. coli* DH5 α . El constructor resultante se purificó y se usó para transformar dos cepas de *E. coli* BL21 (DE3 y Cleancoli). Una vez transformadas, se realizaron pruebas de expresión usando tres temperaturas (37°, 25° y 16°C) y dos concentraciones diferentes de IPTG como inductor (0,5 y 1 mM). La proteína producida se purificó mediante cromatografía de afinidad en columnas de Níquel usando imidazol en gradiente de concentración 20-500 mM. La proteína purificada se sometió a espectrometría de masas MALDI-TOF y se confirmó la secuencia de aminoácidos del péptido con peso molecular de 14 kDa. Aunque los resultados obtenidos evidenciaron que en todos los casos la proteína tiende a producirse como agregados en mayor cantidad, se determinó que las mejores condiciones para producir α SFP de forma soluble fueron 16°C y 1mM de IPTG (alrededor de 2.0 μ g/ml). De esta manera, y teniendo en cuenta la estructura y función de la α SFP, su producción de forma recombinante podría convertirse en una alternativa para el mejoramiento de medios de criopreservación que puedan a su vez mejorar los procesos de fertilización in vivo e in vitro.

Palabras clave: Reproducción bovina, criopreservación espermática, proteínas del plasma seminal, fábricas celulares bacterianas

#1833. FECAL ANDROGEN METABOLITES AND ANTLER CYCLE ANNUAL VARIATIONS OF CAPTIVE BRAZILIAN DWARF BROCKET DEER (*Mazama nana*) AND AMAZONIAN BROWN BROCKET DEER (*Mazama nemorivaga*) IN SOUTHEAST BRAZIL.**Variaciones anuales de metabolitos de andrógenos fecales y ciclo de las astas de corzuela enana (*Mazama nana*) y maticán grisáceo (*Mazama nemorivaga*) mantenidos en cautiverio en el sudeste de Brasil****D. Galindo^{1,*}; L.D. Sponton^{1,2}; M. Roldan¹; E. Sandoval¹; J.M.B. Duarte¹**¹Deer Research and Conservation Center (NUPECCE), São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal, SP, 14884-900, Brazil; ²University of São Paulo (USP), School of Animal Science and Food Engineering, Pirassununga, SP, 13635-900, Brasil.

*Corresponding author: dgalindoh89@gmail.com

ABSTRACT

Mazama nana (Brazilian dwarf brocket deer) and *Mazama nemorivaga* (Amazonian brown brocket deer) are neotropical deer inhabiting South American forested areas. While species from temperate climates show a photoperiod effect on their antler cycle and reproductive seasonality, for some species of the neotropical region, an asynchrony of the antler cycle and a lack of reproductive seasonality have been suggested. Although basic knowledge of the reproductive parameters for other species of the same genus already exist (*M. americana* and *M. gouazoubira*), information of these two species is scarce. Thus, the aim of this study was to analyze annual variations in fecal androgen metabolites (FAM) using a competitive testosterone enzyme immunoassay (R156/7; California University; Davis, CA, USA) and their relations with the antler cycle in *M. nana* and *M. nemorivaga*, one buck of each species, which were kept in captivity. Animals were exposed to a natural photoperiod in southeast Brazil and data for FAM concentrations and antler status were collected weekly during a 1-year period. Both adult (4-8 years-old) and fertile (confirmed offspring) bucks carried a hard antler at the beginning of the study. The Brazilian dwarf brocket buck cast antlers in July 2017, shedding velvet in December 2017, whereas the Amazonian brown brocket buck cast antlers in September 2017, shedding velvet 4 weeks after study ended (February 2018). Both presented antler regrowth periods of 138 and 139 days, respectively. Comparisons between monthly means (\pm SEM) of FAM concentrations in the different antler stages showed that changes in the antler cycle of both bucks were associated with testosterone secretion oscillations. Thus, Brazilian dwarf brocket and Amazonian brown brocket bucks presented stages of hard antler (519.66 ± 38.77 and 736.70 ± 41.51 ng/g dry feces, respectively) and maturation process, involving antler calcification and velvet shedding (559.24 ± 64.18 ng/g dry feces, data only available for *M. nana*), with higher concentrations than the antler casting and growth stages (306.70 ± 34.56 and 397.13 ± 32.52 ng/g dry feces, $P < 0.05$, respectively). However, both bucks exhibited fertile matings even with velvet covered antlers, indicating that antler casting and growth are not connected to seasonal azoospermia, which has also been observed in *M. americana* and *M. gouazoubira*. In fact, many authors suggest that species of the genus *Mazama* exhibit total lack of reproductive seasonality and synchrony in antler cycle, shedding antlers at any time of the year and being able to carry them for periods longer than a year. These findings suggest that androgen secretion and changes throughout antler cycle present a direct association in *M. nana* and *M. nemorivaga*. Nonetheless, testosterone and antler cycles in these species are little or not affected by photoperiodic cues. Acknowledgements: 2017/21960-3, São Paulo Research Foundation (FAPESP).

Keywords: neotropical deer, androgen metabolites, enzyme immunoassay, antler cycle

RESUMEN

La corzuela enana (*Mazama nana*) y el maticán grisáceo (*Mazama nemorivaga*) son venados que habitan zonas boscosas de Sudamérica. Mientras especies de clima templado muestran un efecto del fotoperiodo sobre el ciclo de las astas y la estacionalidad reproductiva, en algunas especies de la región neotropical ha sido sugerida una asincronía del ciclo de las astas y falta de estacionalidad reproductiva. A pesar de la existencia de parámetros reproductivos para otras especies del mismo género (*M. americana* y *M. gouazoubira*), la información para estas dos especies es escasa. Por tanto, el objetivo de este estudio fue analizar las variaciones anuales de metabolitos de andrógenos fecales (MAF) usando un inmunoensayo enzimático competitivo para testosterona (R156/7; Universidad de California, Davis – CA – USA) y su relación con el ciclo de las astas de un macho de *M. nana* y *M. nemorivaga*, mantenidos en cautiverio. Los animales fueron expuestos a un fotoperiodo natural en el sudeste de Brasil y datos de las concentraciones de MAF y el estado de las astas se colectaron semanalmente por 1 año. Ambos machos, adultos (4-8 años) y fértiles (prole confirmada), llevaban unas astas limpias al inicio del estudio. El macho de *M. nana* perdió las astas en julio/2017, y se despojó de la felpa en diciembre/2017, mientras que el macho de *M. nemorivaga* perdió las astas en septiembre/2017 y se despojó de la felpa 28 días después de finalizado el estudio (febrero/2018). Los periodos de regeneración de las astas fueron de 138 y 139 días, respectivamente. Las comparaciones entre los promedios mensuales (\pm EEM) de las concentraciones de MAF en las diferentes fases del ciclo de las astas mostraron que los cambios en su ciclo tienen fuerte asociación con oscilaciones en la secreción de testosterona. Así, *M. nana* y *M. nemorivaga* presentaron astas limpias (519.66 ± 38.77 y 736.70 ± 41.51 ng/g heces secas, respectivamente) y un proceso de maduración de estas, implicando su calcificación y despojo de la felpa (559.24 ± 64.18 ng/g heces secas, datos solo disponibles para *M. nana*), con concentraciones mayores a las fases de caída y crecimiento (306.70 ± 34.56 y 397.13 ± 32.52 ng/g heces secas, $P < 0.05$, respectivamente). Sin embargo, ambos machos exhibieron cópulas fértiles incluso con astas en fase de felpa, indicando la ausencia azoospermia en esta fase, como ya fue observado en *M. americana* y *M. gouazoubira*. De hecho, varios autores sugieren que las especies del género *Mazama* muestran una falta total de estacionalidad reproductiva y sincronía en el ciclo de las astas, sufriendo su pérdida en cualquier época del año y pudiendo llevarlas por periodos mayores a un año. Estos hallazgos sugieren que la secreción de MAF y los cambios en el ciclo de las astas presentan una asociación directa en *M. nana* y *M. nemorivaga*. No obstante, los ciclos de testosterona y de las astas de estas especies son poco o nada afectados por el fotoperiodo. Agradecimientos: 2017/21960-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Palabras llave: cérvidos neotropicales, metabolitos androgénicos, inmunoensayo, ciclo de las astas

#1834. OPTIMIZATION STUDY ON FAECAL PROGESTERONE METABOLITES EXTRACTION TIME IN BROWN BROCKET DEER (*Mazama gouazoubira*)

Estudio para la optimización del tiempo de extracción de metabolitos de progesterona fecal en venado gris (*Mazamagouazoubira*)

M. Roldan^{1*}; D. Galindo¹; J.M.B. Duarte¹

¹. Deer Research and Conservation Center (NUPECCE), São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal, SP, 14884-900, Brazil.

* Corresponding author: roldan.romero.m@gmail.com

ABSTRACT

Faecal steroid hormone metabolites measurement is a commonly used technique in elusive species conservation for being a non-invasive and very valuable tool to obtain essential information about adrenocortical activity and reproductive status in animals without disturbing them. The extraction of the steroid hormones from faecal samples represents the first step before quantification can be performed and therefore, a suitable extraction procedure is required. In general, short extraction times are effective for steroid analysis in ruminants. However, steroid extraction procedures for neotropical deer species employ currently much longer times, around 12 hours. We tested the effectiveness of four different extraction times (1h, 2h, 4h and 12h) for faecal progesterone metabolites (FPM) analysis in five females of brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). For FPM extraction, faecal samples were first dried in an oven at 56°C for approximately 72 hours. After drying, 0.5 g of each sample were placed in a glass tube with 5 mL of 80% methanol and were homogenized using the different extraction times previously mentioned. The FPM quantification was performed by a competitive progesterone enzyme immunoassay (CL425; California University; Davis, USA). Five repetitions were carried out for each extraction time in all animals. The FPM obtained for every extraction time in every studied female were as follows: 833.7 - 908.4 - 851.8 and 985.1 ng/g dry faeces for F1; 497.6 - 559.2 - 641.4 and 595.6 ng/g dry faeces for F2; 459.7 - 588.7 - 613.9 and 751.5 ng/g dry faeces for F3; 185.1 - 234.4 - 243.7 and 273.8 ng/g dry faeces for F4; 752.9 - 806.3 - 819.6 and 825.5 ng/g dry faeces for F5. The shortest time used, 1h, was significantly less effective ($p < 0.05$) for FPM extraction compared with 12 hours of extraction in four of the five studied females. However, shaking times of 2, 4 and 12 hours presented a very similar FPM extraction efficiency in all the animals. These results suggest that an adequate FPM extraction could already be achieved in neotropical deer with 2 or 4 hours of shaking, what would allow a significant time saving when a large number of samples have to be analysed. Acknowledgements: 2016/12521-3, São Paulo Research Foundation (FAPESP)

Keywords: faecal progesterone metabolites, extraction time, enzyme immunoassay, neotropical deer.

RESUMEN

El análisis de los metabolitos de las hormonas esteroideas es una técnica comúnmente utilizada para la conservación de especies esquivas, ya que se trata de una herramienta no invasiva y altamente valiosa para la obtención de información sobre la actividad adrenocortical y el estado reproductivo de los animales sin la necesidad de incomodarlos. El momento de la extracción de las hormonas esteroideas a partir de muestras fecales representa el primer paso antes de su cuantificación, lo que exige la aplicación de un adecuado procedimiento de extracción previo. Tiempos de extracción cortos son generalmente efectivos para el análisis de hormonas esteroideas en ruminantes. Sin embargo, los procedimientos de extracción de esteroides empleados actualmente en las especies de ciervos neotropicales implican tiempos mucho más largos, alrededor de 12 horas. En este estudio analizamos la efectividad de cuatro tiempos de extracción diferentes (1h, 2h, 4h and 12h) para metabolitos de progesterona fecales (MPF) en cinco hembras de venado gris (*Mazama gouazoubira*). Para la extracción de los metabolitos fecales las muestras fueron inicialmente secadas en un horno a 56°C durante 72 horas aproximadamente. Las heces secas fueron trituradas, se pesaron 0,5 g de cada muestra y se añadieron 5 ml de metanol al 80%. Finalmente, las muestras se colocaron en un agitador durante las diferentes horas de extracción previamente mencionadas. La cuantificación de estos metabolitos fecales fue realizada usando un inmunoensayo enzimático competitivo para progesterona (CL425; Universidad de California; Davis, USA). Los MPF obtenidos para cada tiempo de extracción en cada una de las hembras estudiadas fueron: 833,7 - 908,4 - 851,8 y 985,1 ng/g heces secas para la H1; 497,6 - 559,2 - 641,4 y 595,6 ng/g heces secas para la H2; 459,7 - 588,7 - 613,9 y 751,5 ng/g heces secas para la H3; 185,1 - 234,4 - 243,7 y 273,8 ng/g heces secas para la H4; 752,9 - 806,3 - 819,6 y 825,5 ng/g heces secas para la H5. El tiempo de extracción más corto, 1 hora, fue significativamente mucho menos efectivo ($p < 0.05$) en comparación con 12 horas de extracción en cuatro de las cinco hembras estudiadas. Sin embargo, tiempos de agitación de 2, 4 y 12 horas presentaron una eficacia de extracción para los MPF muy similar en todas las hembras estudiadas. Estos resultados sugieren que una adecuada extracción de MPF en ciervos neotropicales podría lograrse ya con 2 o 4 horas de agitación, lo que permitiría un ahorro significativo de tiempo cuando es necesario analizar una gran cantidad de muestras. Agradecimientos: 2016/12521-3 - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Palabras clave: cérvidos neotropicales, metabolitos de progesterona fecales, inmunoensayo enzimático, tiempo de extracción.