



UCA

PONTIFICIA
UNIVERSIDAD CATÓLICA
ARGENTINA
Santa María de los Buenos

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS

1- PROYECTO

1.1 Título:

**PRESERVACIÓN DEL RECURSO GENÉTICO:
VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES EQUINOS CON UN SISTEMA NOVEDOSO DE
PUNCIÓN MANUAL EN MICROPOCILLOS Y SEXADO MEDIANTE
AMPLIFICACIÓN POR PCR DE ADN EXTRACELULAR**

1.2 Área Temática

Disciplina: Producción Animal

Especialidad: Biotecnología de la Reproducción –

PRESERVACIÓN DEL RECURSO GENÉTICO

1.3 Área Prioritaria: Producción Animal

1.4 Tipo de Proyecto: Ciencias aplicadas

1.5 Lugar de Trabajo: Laboratorio de Biotecnología y Reproducción Animal, Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, UCA.

2- RESPONSABLES

2.1 Director

Apellido y nombre: Sansiñena, Marina Julia

Cargo Docente: Profesor Titular Ordinario

Dedicación: 4 hs docente (Producción Equina / Biotecnología).

Actualmente sin horas rentadas de investigación UCA. Se solicitan 20 hs semanales de investigación rentada para dirección de proyecto, lavajes de embriones y transferencias de embriones experimentales en haras.

Títulos académicos obtenidos:

Ing. Prod. Agrop., UCA

MSc. Nutrición Animal, Louisiana State University, USA

PhD. Reproducción Animal, Louisiana State University, USA

Postdoc. Biotecnología, Louisiana State University, USA

3. PLAN DE INVESTIGACIÓN

3.1 Resumen

En nuestro país existe un fuerte lazo emocional con el caballo y la actividad ecuestre, desde el trabajo agropecuario y la actividad deportiva hasta la exportación de animales de valor genético e incluso de carne. La industria del caballo representa casi el 9% del PBI agropecuario, y se estima que por cada caballo se generan entre 8 a 10 puestos efectivos de trabajo. En esta especie, la criopreservación de embriones es un complemento importante a la técnica de transferencia embrionaria y una pieza fundamental en la preservación sistemática del recurso genético y su comercialización. Hacia el final de la época reproductiva (entre septiembre y junio para nuestro hemisferio), la mayoría de las yeguas donantes de embriones suelen continuar ciclando y generando embriones de buena calidad; la mayor limitante es que las mejores receptoras de los embriones (yeguas sin valor genético ni comercial) normalmente ya se encuentran preñadas y las remanentes normalmente poseen fertilidad comprometida. La criopreservación posibilitará producir embriones al final de la estación reproductiva y preservarlos hasta el inicio de la nueva estación, permitiendo seleccionar las mejores receptoras para su transferencia. También permitiría simplificar la comercialización de embriones producidos en un haras, y su transporte a otras regiones lejanas, inclusive su exportación. Básicamente, la posibilidad de criopreservar embriones $>500 \mu\text{m}$ eficientemente permitirá disociar las actividades de recolección de embriones y de transferencia. Otra ventaja que presenta la técnica de colapso es la posibilidad de realizar diagnósticos de enfermedades genéticas o el sexado del embrión previo a su implantación aprovechando el ADN presente en el líquido blastocélico. En algunas razas y disciplinas (por ejemplo el polo), el sexado del embrión representa un importante valor agregado, dado que existe en la industria una preferencia hacia la yegua en términos de su performance competitiva. El objetivo general de este trabajo es desarrollar una técnica que permita el colapso manual de embriones equinos día 8 *in situ* conservando su viabilidad luego de la vitrificación. Se propone además, utilizar el líquido blastocélico obtenido para detectar ADN y llevar a cabo el sexado del embrión mediante la técnica de PCR previo a su transferencia a una yegua receptora.

3.2 Palabras claves

Equino, blastocisto, vitrificación, sexado

3.3 Estado actual del conocimiento sobre el tema

En la especie equina, la técnica de transferencia embrionaria incluye el seguimiento ecográfico de las yeguas donantes para determinar el momento de la ovulación, la inseminación (por lo general artificial) y la recuperación del embrión normalmente 7-8 días post-ovulación (Vanderwall et al., 2007). La tasa de recuperación embrionaria varía de acuerdo al día en que se realiza el lavaje uterino en la yegua donante. Los lavajes realizados en los días 7 y 8 permiten tasas de recuperación similares (60-65%), aunque muchas veces dependen de la edad de la yegua con que se trabaje (Jacob et al., 2011); en yeguas de mayor edad normalmente se espera hasta el día 8, mientras que en yeguas más jóvenes puede realizarse en el día 7 (M.V. José Polola, Haras El Dok, comunicación personal). Los lavajes realizados en el día 6 post-ovulación normalmente permiten recuperar un embrión entre el 40-45% de las veces. Además de la tasa de recuperación, el día del lavaje influye sobre el tamaño de los embriones recuperados; desde su descenso al útero entre los días 5-6 post-ovulación, los embriones equinos aumentan exponencialmente su tamaño desde un promedio de 208 μ m en el día 6, a un promedio de 406 μ m en el día 7, hasta alcanzar 1.132 μ m promedio en el día 8 (Squires et al., 1985). En términos de tasas de preñez, la literatura indica que sería mayor en embriones colectados en día 7-8, y que no es recomendable planificar la recuperación a partir del día 9 (Squires et al., 1995)

Debido principalmente a su elevado tamaño, la criopreservación de embriones equinos producidos in vivo recuperados entre los días 7-8 post-ovulación presenta mayores dificultades que en otras especies (Hochi et al 1995; Hinrichs, 2012). Al igual que los ovocitos, los embriones son estructuras relativamente grandes con alto contenido de agua. Cuanto mayor es el contenido de agua, mayor será la probabilidad de que ésta forme estructuras cristalinas de hielo al solidificarse y mayor será la probabilidad de daño celular. Por ello, una de las claves de la criopreservación es evitar la formación de los cristales de hielo, ya que cuando estos superan el límite tolerado para cada tipo celular, causan un daño letal e irreversible (Mazur, 1984).

Otra particularidad de los embriones equinos es la presencia de la “cápsula” embrionaria. Esta cobertura acelular secretada por células del trofotodermo, permanece cubriendo al embrión hasta alrededor del día 21 de gestación (Betteridge, 1989; Oriol et al., 1993). Por su estructura, sería responsable de disminuir la permeabilidad a los crioprotectores durante la criopreservación. Estos compuestos son necesarios para inducir la deshidratación del embrión y, mediante reemplazo del agua, protegerlos de daños por enfriamiento. Trabajos realizados con el objetivo de criopreservar embriones mediante congelamiento lento o vitrificación, concluyeron que para conservar la viabilidad en aquellos superiores a 300 μ m de diámetro, es necesario colapsarlos mecánicamente (Choi et al., 2010; Hinrichs et al., 2018). A su vez, el colapso supone la ruptura de la cápsula durante el proceso; dicha ruptura demostró no afectar la viabilidad de los embriones biopsiados luego de ser criopreservados (Choi et al., 2011). Por el contrario, la abertura generada sería beneficiosa para permitir el ingreso de crioprotectores al interior del embrión, mejorando el proceso de criopreservación.

Hasta la fecha, se han reportado varias preñeces a partir de embriones colapsados y criopreservados (Choi. et al 2010, 2011 y 2017; Diaz et al 2016 y 2018; Sanchez et al. 2017). El método de colapso tradicional se basa en la utilización de un microscopio invertido con sistema de micromanipulación; para el colapso, el embrión es inmovilizado con una pipeta de holding, y se atraviesa la cápsula y el

trofoectodermo utilizando una micropipeta de biopsia (9µm de diámetro interno) o de inyección (5-7µm de diámetro interno). Luego se extrae el líquido blastocélico hasta lograr un 80 a 90% de colapso respecto de su volumen inicial, y finalmente se continúa con la criopreservación con el protocolo seleccionado. Las principales desventajas de este método residen en que requiere de equipamiento costoso y de alta complejidad (dentro de un laboratorio de producción *in vitro* de embriones), con personal altamente especializado y, por consecuencia, el traslado de los embriones desde el centro de reproducción hasta el laboratorio.

En este proyecto se propone desarrollar un protocolo factible de implementar a campo (prescindiendo del uso de un micromanipulador) para el colapso manual de embriones equinos *in vivo* recuperados en el día 8 post-ovulación. El primer desafío supone la necesidad de inmovilizar los embriones para el colapso; se propone evaluar diferentes estrategias de anclaje y se seleccionará aquella que permita una mejor manipulación. Para la punción de la cápsula se propone la utilización de nanoagujas de 5 puntas desarrolladas para minimizar el dolor durante la aplicación de insulina. Se evaluará la viabilidad de los embriones mediante observación de la recuperación del volumen post-calentamiento y la tasa de preñez luego de transferirlos a receptoras sincronizadas.

Para realizar análisis genéticos de pre-implantación, analizar la presencia de marcadores moleculares asociados a características de interés para el mejoramiento genético o cualquier determinación directa de la presencia de una característica genética, es necesario contar con material genómico del embrión sin provocar daños que resulten en una reducción de su viabilidad. Para ello existen varios métodos para obtener material genético del embrión, la mayoría de los cuales reside en la extracción de algunas células mediante biopsia mecánica o el uso de láser para perforar la cápsula y escindir algunas células de manera precisa. Sin embargo, todos estos procedimientos provocan distintos niveles de daño en el embrión que pueden afectar su tasa de preñez (Huhtinen et al. 1997). Como alternativa, ha sido reportado que el líquido blastocélico obtenido mediante biopsia de laboratorio de embriones equinos recuperados *in vivo* contiene ADN genómico libre factible de utilizar en distintos análisis (Palini et al. 2013, Capalbo et al. 2018), entre ellos la determinación del sexo mediante la técnica de PCR (Herrera et al, 2014 y 2015). Esta determinación es particularmente importante en reproducción de equinos deportivos, donde muchas veces un sexo es preferido por sobre el otro.

En el presente proyecto se propone como segundo objetivo, evaluar la presencia de ADN libre en el líquido recuperado luego de realizar el colapso manual de los embriones. Además, en caso de detectar presencia de ADN suficiente, se buscará realizar el sexado de los embriones mediante PCR.

3.4 Objetivos e hipótesis de la investigación

1.1. Hipótesis de trabajo: El método novedoso de colapso manual podría no afectar la tasa de preñez respecto a la punción asistida con micromanipulador.

Objetivo específico: Comprobar si el método de punción novedoso afecta la viabilidad de los embriones respecto del uso de la técnica de colapso asistido con micromanipulador.

1.2. Hipótesis de trabajo: El fluido blastocélico colectado durante el colapso podría ser utilizado para determinar el sexo del embrión.

Objetivo específico: Detectar la presencia o ausencia de ADN perteneciente al cromosoma Y en las muestras de líquido blastocélico recolectado durante el colapso.

3.5 Metodología

Obtención de embriones equinos: Se utilizarán hembras raza polo para la recuperación de embriones *in vivo* durante la estación reproductiva del hemisferio Sur. Las yeguas serán inseminadas usando semen de un único padrillo de comprobada fertilidad inmediatamente luego de detectada la ovulación mediante seguimiento ecográfico. Los embriones serán recuperados 8 días después de la ovulación mediante lavaje uterino con 3 L de solución de Ringer-Lactato (Baxter Corporation, USA). Cada lavaje será pasado a través de un filtro de recolección de embriones de 75 μm (Agtech Inc., USA) y su contenido será volcado en placas de petri con grilla de búsqueda de 100 mm.

Los embriones serán lavados y transferidos en medio de holding (Syngro Holding, Bioniche, USA) donde serán evaluados y categorizados según una escala de 5 grados (grado-1, excelente a grado-5, degenerado) (McCue PM et al. 2009). Luego serán cargados individualmente en microtubos de centrífuga de 1,5 ml con medio de holding y transportados a 15°C al laboratorio para su criopreservación (tiempo de viaje aproximadamente 3h). Una vez en el laboratorio, los embriones serán re-evaluados en una lupa estereoscópica a 50X de magnificación y clasificados en un microscopio invertido marca Nikon Ti-U provisto con óptica de modulación de contraste Nikon a 200X. Se registrará evidencia de encogimiento, color (opacidad) y daño en la cápsula. El diámetro se medirá utilizando un micrómetro de platina y para el colapso del blastocele antes de la vitrificación, los embriones se asignarán al azar en uno de dos técnicas: 1) Punción asistida por micromanipulador y succión del fluido blastocélico (MA); o 2) Punción mediada por nanoaguja seguida de pipeteo forzado (MN-FP). El fluido blastocélico o el medio de punción con el presunto ADN libre extracelular será recolectado en microtubos de 200 μl y almacenados a -80°C hasta la PCR para determinación del sexo.

Prueba preliminar para determinación de un sistema efectivo de inmovilización/anclaje de los embriones:

- 1) Anclaje en DPBS utilizando placas de petri de 35 mm con el fondo rayado
- 2) Anclaje en DPBS (sin suero fetal) con agregado de 5% de alginato de polilisina utilizando placas de petri de 35 mm con fondo rayado.
- 3) Anclaje en DPBS en micropocillos realizados dentro de placas de petri de 35 mm. Los mismos se harán utilizando vidrios capilares de extremo romo (Corning, USA) calentados en la llama de un mechero. Se buscará que el tamaño del pocillo sea lo más ajustado posible al diámetro del embrión.

Colapso de los blastocistos mediante microaguja y pipeteado forzoso (MN-FP):

El colapso de los blastocistos se desarrollará (previa inmovilización con el sistema seleccionado) en dos etapas:

- 1) Punción con nano aguja: Los embriones serán lavados con medio de holding y luego transferidos a placas con DPBS. Luego serán inmovilizados y, para evitar daños al macizo celular, éste será orientado de tal manera que la punción se realice a 180° de su posición. La punción se llevará a cabo procurando perforar solamente la cápsula, mediante uso de una nano aguja 32-G de pared ultra delgada y tecnología “penta point” (BD Nano^(R), Becton Dickinson, Canadá) unida a una jeringa vacía de epinefrina. Una vez realizada la punción, la aguja se retirará y se observará el grado de colapso (% aproximado) a distintos tiempos.

- 2) Forzado mediante pipeteo: Una vez que el colapso del blastocisto expandido se estabilice, se forzará la salida de más fluido blastocélico mediante la acción de una micropipeta de denudación de ovocitos (Stripper pipette). Los embriones serán forzados a pasar 5 veces por la pipeta correspondiente dentro de la misma microgota de DPBS. La microgota será fraccionada y almacenada en freezer a -86°C para ser utilizadas en la etapa de identificación de ADN genómico libre y sexado.

Colapso de los blastocistos asistida por micromanipulador (MA): Este procedimiento se realizará en la platina de un microscopio invertido marca Nikon Ti-U provisto de micromanipuladores y microinyectores marca Narishige (Narishige International, USA), la manipulación de los embriones será realizada con un aumento de 200X. Los blastocistos serán mantenidos mediante succión con una pipeta de manipulación de borosilicato de 90 μm de diámetro y rotados cuidadosamente hasta que el macizo celular quede posicionado en foco y a 180° del sitio de punción. Dicha punción se llevará a cabo atravesando la cápsula con una pipeta de inyección de 5-7 μm de diámetro interno (Origio, Dinamarca) y se aspirará el fluido de la cavidad del blastocele. Dicho fluido se transferirá a microtubos de 200 μl y serán almacenados a -86°C para ser utilizado en la etapa identificación de ADN y sexado. Se registrará el % de colapso y el tiempo necesario para lograr el máximo colapso.

Vitrificación y calentamiento: La vitrificación se llevará a cabo bajo lupa estereoscópica con una magnificación de 50X a temperatura ambiente (22°C). Se utilizará el kit de vitrificación comercial de Cryotec® de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los embriones colapsados serán incubados en las soluciones de vitrificación durante los tiempos que indica el protocolo, al finalizar serán cargados en una micropipeta de denudación (EZ Range®, Origio, Denmark), depositados con el mínimo de volumen posible en un soporte para vitrificación McGill Cryoleaf™ (Origio, Dinamarca) e inmediatamente sumergidos en nitrógeno líquido (LN_2) con el objeto de minimizar el efecto Leidenfrost (Katkov et al. 2012). Los embriones serán almacenados en tanques de LN_2 hasta su calentamiento y posterior transferencia.

El calentamiento también se realizará de acuerdo con las indicaciones del fabricante, teniendo especial cuidado de retirar el soporte Cryoleaf™ directamente del LN_2 y sumergirlo en el medio de calentamiento del kit para evitar la formación de cristales de hielo debido a una tasa de calentamiento lenta.

Transferencia a yeguas receptoras: Los embriones calentados serán lavados en medio M199 con sales de Earls (Thermo Fisher, cat No. 11150059) con 10% SFB y 0,1% de gentamicina e incubados en una incubadora con atmósfera húmeda, 6% CO_2 a $38,5^{\circ}\text{C}$; a los 5 y 20 min se registrará el % de re-expansión respecto del volumen inicial. Luego se lavarán en medio de holding (Syngro holding, Bioniche, USA Syngro), serán cargados en pajuelas de 0,5 ml y se transportarán al haras para ser transferidos a las yeguas receptoras de 5 a 7 días post-ovulación. Las preñeces se confirmarán mediante ecografía transrectal.

Sexado mediante PCR: El sexado se realizará mediante la amplificación de genes específicos que indican la presencia del cromosoma Y equino en el líquido blastocélico. Para ello, se utilizará la técnica de PCR anidada para lo cual se utilizarán los cebadores de los genes SRY o PCR simple con los cebadores ZFx/y, amelogenin y TSPY (Tabla 1). Como control de amplificación se utilizará material genético de macho equino obtenido a partir de muestras de semen o de material tisular de frigorífico. Los productos de amplificación serán estudiados mediante el análisis de imágenes de electroforesis en gel de agarosa 1,5 %.

Autor/año	Cebador	secuencia	Gen blanco	Largo (bases)	Producto pb
Cullingford, 2010	ZFx/y F	5'-ATA ATC ACA TGG AGA GCC ACA AGC T-3'	ZFx/y	25	445 hembra y macho
	ZFx/y R	5'- GCA CTT CTT TGG TAT CTG AGA AAG T -3'		25	
Crisan, 2015	SRY-1F	5'-ACA AAC GGG AGG AGC GGT TA-3'	SRY	20	217 macho
	SRY-1R	5'-CAG GGA CTC TGA AGC CAC CA-3'.		20	
Crisan, 2015	SRY-2F	5'- CCA TTC GGG TAA CGT TGG CTA-3'	SRY	21	121 macho
	SRY-2R	5'- CAG GGA CTC TGA AGC CAC CA-3'.		20	
Herrera 2015 (Hasegawa 2000)	AMEL-F	5'-CCA ACC CAA CAC CAC CAG CCA AAC CTC CCT-3'	Amelogenin	30	184 (hembra) 160/200(macho)
	AMEL-R	5'-AGC ATA GGG GGC AAG GGC TGC AAG GGG AAT-3'		30	
Herrera 2015	TSPY-F	5'-GAA GTC AGG CAC ACC AGT GA-3'	Testis specific protein linked to Y	20	280 (macho)
	TSPY-R	5'-TAA GGC TGC AGT TGT CAT GC-3'		20	

Análisis estadístico

Los resultados serán analizados mediante análisis de varianza para medidas repetidas en el tiempo utilizando el procedimiento MIXED del SAS®, test de Chi cuadrado o ANOVA según corresponda, considerándose diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

3.6 Desarrollo del Trabajo



3.7 Bibliografía

Assou S, Aït-Ahmed O, El Messaoudi S, Thierry AR, Hamamah S. Non-invasive pre-implantation genetic diagnosis of X-linked disorders. *Med Hypotheses*. 2014 Oct;83(4):506-8. doi: 10.1016/j.mehy.2014.08.019. Epub 2014 Aug 23. PMID: 25182520.

Betteridge KJ. The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. *Equine Vet J* 1989;(Suppl 8):92e100.

Capalbo A, Romanelli V, Patassini C, Poli M, Girardi L, Giancani A, Stoppa M, Cimadomo D, Ubaldi FM, Rienzi L. Diagnostic efficacy of blastocoel fluid and spent media as sources of DNA for preimplantation genetic testing in standard clinical conditions. *Fertil Steril*. 2018 Oct;110(5):870-

879.e5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.05.031. Erratum in: *Fertil Steril*. 2019 Jan;111(1):194. PMID: 30316433.

Choi YH, Gustafson-Seabury A, Velez IC, Hartman DL, Bliss S, Riera FL, Roldán JE, Chowdhary B, Hinrichs K. Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Reproduction*. 2010 Dec;140(6):893-902. doi: 10.1530/REP-10-0141. Epub 2010 Sep 15. PMID: 20843896..

Choi, Y. H., & Hinrichs, K. (2017). Vitrification of in vitro-produced and in vivo-recovered equine blastocysts in a clinical program. *Theriogenology*, 87, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.005>

Choi, Y. H., Velez, I. C., Riera, F. L., Roldán, J. E., Hartman, D. L., Bliss, S. B., ... Hinrichs, K. (2011). Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. *Theriogenology*, 76(1), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.01.028>

Crisan, M. I., Morar, I. A., Cenariu, M., Damian, A., Crecan, C., Pall, E., ... Groza, I. S. . Equine Embryo Sexing - a Case Study of its Applicability in Romania. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*. 2015, 72(2). doi:10.15835/buasvmcn-vm:11462

Cullingford E (2010): Preimplantation genetic diagnosis of equine embryos. Tesis de Maestría. Colorado State University

Diaz FA, Gutierrez EJ, Cramer E, Paccamonti D, Gentry G, Bondioli K. Pregnancy rates following low-temperature storage of large equine embryos prior to vitrification. *J Equine Vet Sci*. 2018;64: 12-16. DOI:10.1016/j.jevs.2018.01.009

Diaz, F., Bondioli, K., Paccamonti, D., & Gentry, G. T. (2016). Cryopreservation of Day 8 equine embryos after blastocyst micromanipulation and vitrification. *Theriogenology*, 85(5), 894–903. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.039>

Freeman DA, Weber JA, Geary RT, et al: Time of embryo transport through the mare oviduct. *Theriogenology* 1991; 36:823–830.

Hasegaw T, Sato F, Ishida N, Fukushima Y, Mukoyama H. Sex determination by simultaneous amplification of equine SRY and amelogenin genes. *J Vet Med Sci*. 2000 Oct;62(10):1109-10. doi: 10.1292/jvms.62.1109. PMID: 11073085.

Herrera C, Morikawa MI, Castex CB, Pinto MR, Ortega N, Fanti T, Garaguso R, Franco MJ, Castañares M, Castañeira C, Losinno L, Miragaya MH, Mutto AA. Blastocoele fluid from in vitro- and in vivo-produced equine embryos contains nuclear DNA. *Theriogenology*. 2015 Feb;83(3):415-20. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.10.006. Epub 2014 Oct 13. PMID: 25459423.

Herrera, Carolina & Morikawa, M & Baca Castex, Clara & Pinto, Marcelo & Ortega, Nicolás & Fanti, T & Garaguso, R & Franco, Maria & Castañares, M & Castañeira, C & Losinno, Luis & Miragaya, Marcelo & Mutto, A. 317 sex determination of equine embryos by PCR using blastocoele fluid.. *Reproduction, fertility, and development*. 2014. 27. 247-8. 10.1071/RDv27n1Ab317.

Hinrichs, K., 2012. Assisted reproduction techniques in the horse. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(1), pp.80-93. <https://doi.org/10.1071/RD12263>

- Hochi, S., Fujimoto, T., & Oguri, N. (1995). Large equine blastocysts are damaged by vitrification procedures. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(1), 113–117. <https://doi.org/10.1071/RD9950113>
- Huhtinen M, Peippo J, Bredbacka P. Successful transfer of biopsied equine embryos. *Theriogenology*. 1997 Aug;48(3):361-7. doi: 10.1016/s0093-691x(97)00247-1. PMID: 16728134.
- Katkov, I. I., Bolyukh, V. F., Chernetsov, O. A., Dudin, P. I., Grigoriev, A. Y., Isachenko, V., ... Yakhnenko, I. (2012). Kinetic Vitrification of Spermatozoa of Vertebrates: What Can We Learn from Nature? In *Current Frontiers in Cryobiology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/34784>
- Krzyminska UB, Lutjen J, O'Neill C. Assessment of the viability and pregnancy potential of mouse embryos biopsied at different preimplantation stages of development. *Hum Reprod*. 1990 Feb;5(2):203-8. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137070. PMID: 2324262.
- Mazur, P. (1984, September). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>
- McCue PM, DeLuca CA, Ferris RA, Wall JJ. How to evaluate equine embryos. *AAEP Proceedings* 2009; 55:252-256.
- Oriol JG, Betteridge KJ, Clarke AJ, Sharom FJ. Mucin-like glycoproteins in the equine embryonic capsule. *Mol Reprod Biol* 1993;34:255e65.
- Palini, S., Galluzzi, L., De Stefani, S., Bianchi, M., Wells, D., Magnani, M., & Bulletti, C. (2013). Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reproductive BioMedicine Online*, 26(6), 603–610. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.02.012>
- Sanchez, R., Blanco, M., Weiss, J., Rosati, I., Herrera, C., Bollwein, H., ... Sieme, H. (2017). Influence of Embryonic Size and Manipulation on Pregnancy Rates of Mares After Transfer of Cryopreserved Equine Embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 49, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.10.004>
- Squires EL, Cook VM, Voss JL: Collection and transfer of equine embryos. Bull 1, Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory, Fort Collins, CO, 1985.
- Squires EL, Seidel GE Jr: Collection and transfer of equine embryos. Bull 8, Colorado State University, Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Fort Collins, CO, 1995.
- Wu H, Ding C, Shen X, Wang J, Li R, Cai B, Xu Y, Zhong Y, Zhou C. Medium-based noninvasive preimplantation genetic diagnosis for human α -thalassemias-SEA. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Mar;94(12):e669. doi: 10.1097/MD.0000000000000669. PMID: 25816038; PMCID: PMC4554004.

4. DESARROLLO DEL PROYECTO

4.1 Cronograma de Actividades

Actividad	Año	
	1	2
Etapas de Desarrollo del Trabajo	1	2
Experimento 1: Desarrollo método de sujeción/punción, criopresevación y transferencia	X	X
Experimento 2: Determinación de presencia de ADN en el medio post punción y PCR para determinación del sexo	X	X
Experimento 2: Evaluación de tasas de preñez y comprobación de sexo determinado por PCR		X
Análisis de resultados y preparación de manuscritos		X

4.2 Actividades de Transferencia

Se realizarán actividades de transferencia a través de trabajos prácticos de cátedra, dictado de cursos, jornadas, congresos y capacitaciones en haras.

4.3 Vinculación del proyecto con la actividad docente desarrollada en UCA

El proyecto se encuentra directamente relacionado con las cátedras de Equinos, Reproducción y Biotecnología de las carreras de Ingeniería Agronómica y cátedra de Equinos en la carrera de Técnico Universitario en Producción Agropecuaria

4.4 Vinculación del proyecto con problemas de la Comunidad

En nuestro país existe un fuerte lazo emocional con el caballo y la actividad ecuestre, desde el trabajo agropecuario y la actividad deportiva hasta la exportación de animales de valor genético e incluso de carne. La presencia de caballos en las explotaciones agropecuarias sigue siendo importante y representa un factor de arraigo cultural. Las existencias equinas promedian de 2,6 millones de cabezas registradas, repartidas en 301.000 unidades productivas de todo el país. Nuestro país es el 3er productor mundial de embriones equinos y el cuarto de animales de Carrera. La actividad, en su conjunto, representa el 8,7% del PBI agropecuario. Si bien tiende a considerar al equino como un producto agropecuario de élite, se estima que cada equino que ingresa al sistema productivo representa, en promedio, 8 a 10 puestos de trabajo efectivo.

5. PERSONAL ASIGNADO AL PROYECTO

5.1 Completar la tabla de datos para cada uno de los integrantes en el siguiente orden: Director, Codirector, Investigadores e Investigadores en formación.

5.1.1. Por la UCA

Función:	Director de Proyecto		
Apellido y Nombre:	Sansiñena, Marina Julia		
Tipo y No. Documento:	21441057		
No. de Legajo en UCA:	484240		
Lugar y Fecha de Nacimiento:	Buenos Aires, 5 de marzo, 1970		
Nacionalidad:	Argentina		
Domicilio:	Los Lagartos F 2 L22, Pilar.		
TE Particular/celular:	02304666483		
E -mail:	msansinena@uca.edu.ar		
Título de Grado:	Ingeniera en Producción Agropecuaria		
Máximo Título Obtenido:	Doctor, Ph.D.		
Cargo Docente:	Profesor Protitular Ordinario		
Si reviste como investigador en otra Institución (Ej.: CONICET, etc.), consignar:	Institución CONICET	Cargo Independiente	Dedicación 40 hs (en licencia desde 2020 – sin goce de sueldo)

Función:	Becario Doctoral CONICET		
Apellido y Nombre:	Gabriel J Clérico		
Tipo y No. Documento:	35580027		
No. de Legajo en UCA:			
Lugar y Fecha de Nacimiento:			
Nacionalidad:	Argentino		
Domicilio:			
TE Particular/celular:			

E -mail:	gabrieljclerico@gmail.com		
Título de Grado:	Ingeniero en Producción Agropecuaria		
Máximo Título Obtenido:	Ingeniero en Producción Agropecuaria		
Cargo Docente:	Profesor Adjunto		
Si reviste como investigador en otra Institución (Ej.: CONICET, etc.), consignar:	Institución CONICET	Cargo Becario	Dedicación 40 hs

Función:	Investigador		
Apellido y Nombre:	Taminelli, Guillermo Luis		
Tipo y No. Documento:			
No. de Legajo en UCA:			
Lugar y Fecha de Nacimiento:			
Nacionalidad:	Argentino		
Domicilio:			
TE Particular/celular:			
E -mail:	guillermo_taminelli@uca.edu.ar		
Título de Grado:	Licenciado en Ciencias Biológicas		
Máximo Título Obtenido:	Doctor de la Universidad de Buenos Aires		
Cargo Docente:	Profesor Adjunto		
Si reviste como investigador en otra Institución (Ej.: CONICET, etc.), consignar:	Institución	Cargo	Dedicación

6. ALUMNOS COLABORADORES

6.1 Por la UCA

El proyecto ha contado y cuenta con la participación de alumnos realizando su Trabajo Final de Graduación. Finalizados:

- Justina Seco
- Marina Bouhier
- Mía Leeson
- María Paolini

En curso:

- Samanta Jones
- Segundo Bellocq
- Eduardo Urriti
- Tomas Barberis
- Valentina Escalada
- Federico Cirigliani
- Felipe Medan
- Franco Cingolani