



UCA

PONTIFICIA
UNIVERSIDAD CATÓLICA
ARGENTINA
Santa María de los Buenos Aires

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS

1- PROYECTO

1.1 Título:

Producción de embriones intra e interespecíficos en el modelo ICSI en équidos

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

Solicitud de Dedicación: 10 hs, categoría docente titular (cátedras Producción Equina IPA (1C) y TUPA (2C) / Biotecnología (2C) + dirección de proyecto (Anual).

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

2.2 Equipo de trabajo

Apellido y nombre: Clérico, Gabriel José

Cargo Docente: Profesor Asistente

Solicitud de Dedicación: dedicación especial perfil investigación 20 hs

Títulos académicos obtenidos:

Ing. Prod. Agrop., UCA

Doctorado en finalización, 3er informe de avance (por extensión de beca doctoral) presentado a la escuela de graduados FVET-BA en Agosto 2023.

Apellido y nombre: Taminelli, Guillermo

Cargo Docente: Profesor Adjunto

Solicitud de Dedicación: dedicación especial perfil investigación 10 hs

Títulos académicos obtenidos:

Biólogo, Dr. Química Biológica, FCEyN, UBA

—

Tesistas de grado participando del proyecto, carrera Ingeniería Agronómica

Apellido y nombre: Gulland, Trinidad. **Director:** M. Sansiñena, **Co-director:** G. Taminelli

Apellido y nombre: Catalina Jamardo. **Director:** G. Clérico, **Co-director:** G. Taminelli

3. PLAN DE INVESTIGACIÓN

3.1 Resumen

En nuestro país existe un fuerte lazo emocional con los équidos 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. Los asnos son parte de la familia *Equidae* y comprenden varias especies, siendo el asno doméstico (*Equus africanus asinus*) la más comúnmente conocida. Otras especies incluyen el asno salvaje asiático (*Equus hemionus*), el asno salvaje africano (*Equus africanus*), y algunas subespecies. Los asnos tienen importancia cultural en muchas regiones y han sido utilizados en la agricultura y el transporte durante siglos. Algunas poblaciones de asnos silvestres se consideran en peligro de extinción debido a la pérdida de hábitat, la caza furtiva y la competencia con el ganado doméstico. Siete de las 28 razas domésticas europeas de asnos se encuentran en estado crítico y 20 están en peligro de extinción, mientras que las especies de burros salvajes también se encuentran amenazadas. La reproducción asistida en burros, al igual que en otras especies equinas, se ha desarrollado para superar problemas de fertilidad o para lograr la reproducción controlada de estos animales. Existen problemas asociados con la endogamia cuando se trata de aumentar la población de una especie, para lo cual se recurre a técnicas de reproducción asistida tales como la inseminación artificial, la transferencia de embriones y más recientemente la fecundación in vitro (Gambini y col., 2022).

Los híbridos de asnos, como las mulas (producto de cruzar un asno con una yegua) y los burdéganos (producto de cruzar una yegua con un burro), también son apreciados en algunas áreas por sus características particulares, como la resistencia y la docilidad. La cría sistemática de mulares se inició en nuestro país por iniciativa del general José de San Martín, siendo principalmente utilizadas para el cruce de en las campañas hacia Chile y Perú. Desde entonces, existen sectores de nuestra cordillera que continúan demandando al mular como asistencia de paso y movimiento de materiales a sitios remotos y de difícil acceso. Es por ello que existe actualmente un marcado interés de la comunidad científica en avanzar en el conocimiento en el manejo reproductivo y en la aplicación de biotecnologías reproductivas para la preservación de la diversidad, tanto en el mular como en el asno.

3.2 Palabras claves

Equidos, fecundación in vitro, ICSI

3.3 Estado actual del conocimiento sobre el tema

Los caballos, burros y cebras pertenecen al único género *Equus* de la familia Equidae. La existencia de híbridos de yeguas con burros machos, conocidos como mulas, está documentada desde hace al menos 3000 años. Los caballos domésticos, burros y sus híbridos se utilizan en todo el mundo como animales de trabajo o carga, para actividades de ocio o deportivas, para la producción de carne y leche, y como animales de compañía. El rápido desarrollo de tecnologías asistidas en los últimos 10 años, como la obtención de óvulos (OPU), la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y la transferencia nuclear de células somáticas en la industria equina, ha permitido su aplicación reciente a otros miembros del género.

La ICSI (Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides) se refiere a una técnica reproductiva utilizada para ayudar en el desarrollo de embriones de mulas. Esta técnica implica la inyección de espermatozoides de burro en los óvulos de una yegua, creando así un embrión de mula. Las mulas suelen ser estériles porque son un híbrido de caballo y burro, y sus cromosomas no se emparejan bien durante la meiosis. La ICSI es un método interesante para explorar esta limitación. Hasta la fecha, existen unos pocos reportes de blastocistos híbridos entre caballos y cebras, y, según nuestro conocimiento, no se han publicado progenie de ICSI in vitro a partir de burros o sus híbridos relacionados. Existen muy pocos antecedentes de obtención de embriones híbridos en equidos por ICSI. En mula (asno= semen, yegua= ovocito), el único reporte a la fecha es de Villareal et al. 2022 aunque dicho trabajo presenta limitaciones en el origen del semen utilizado (un único padrillo, semen congelado).

En numerosas especies domésticas (bovino: Decuadr-Hansen, 2004, equino: Crowe et al., 2008; Gaspardy et al., 2020; Huerta et al., 2020; caprino: Barbas et al. 2006; Arrebola et al., 2013) se ha demostrado que existen diferencias entre el estado de conservación del semen al momento de su utilización en una inseminación artificial (congelado versus refrigerado) con respecto a su capacidad fecundante, indicando que la capacidad fecundante del semen congelado se encuentra disminuía respecto al refrigerado a 5 grados Celsius.. Esta diferencia ha sido también descrita en el asno (Santos et al., 1995; de Olivera et al., 2016) cuando el semen es utilizado para inseminación artificial, aunque no existe información sobre su performance en fecundación in vitro por ICSI.

Este proyecto tiene como objetivo comparar la competencia de desarrollo después de la ICSI de óvulos de yegua inyectados con espermatozoides de burro. Se analizará, además, si el estado del estado de conservación del semen utilizado (refrigerado versus congelado) posee incidencia sobre la tasa de desarrollo y calidad de los embriones obtenidos. Por último, se criopreservarán los embriones (calidad grado 1) utilizando la técnica de vitrificación previamente desarrollada en nuestro laboratorio para transferir a yeguas receptoras sincronizadas. Esta porción del experimento se encuentra sujeta a disponibilidad de receptoras en un establecimiento comercial.

3.4 Objetivos e hipótesis de la investigación

a) **Objetivo Especifico**

- Producir embriones viables de mula y de burro in vitro mediante la técnica de ICSI.

b) **Objetivos Generales**

- Evaluar la capacidad del ovocito de yegua en la reprogramación y desarrollo embrionario de híbridos mulares.
- Evaluar si existen diferencias en el desarrollo embrionario al utilizar semen de burro congelado versus refrigerado.
- Analizar el modelo híbrido in vitro como un método de evaluación de competencia fecundante de distintos padrillos de burro.

3.5 Metodología

Colecta y procesamiento semen de asno

La colecta y el procesamiento de semen de asno se llevará a cabo en la Universidad Nacional de Río Cuarto, pcia de Córdoba. Se utilizarán 4 padrillos asnares de fertilidad comprobada para los experimentos. Para el congelamiento, se realizará inicialmente una serie de colectas diarias durante siete días para el agotamiento extragonadal de las reservas seminales, con el fin de mejorar la resistencia de los espermatozoides al proceso de criopreservación. La colecta de semen se realizará en una vagina artificial tipo Hannoveriana a una temperatura de 52 °C, con filtro estéril para separar la fracción en gel del eyaculado de la porción rica en espermatozoides.

Congelamiento (-196 grados Celsius)

Se realizará una evaluación de las características macroscópicas y microscópicas de cada eyaculado y se procederá a la predilución proporción 1:1 con el diluyente Kenney® (Exodus Breeders Coop, EEUU) sin crioprotector, temperado a 37.5 °C. El semen diluido se centrifugará a 600 g durante 12 min para luego resuspender en diluyente INRA82® (IMV Technologies, Francia) con 2% de yema de huevo. Las pajuelas serán sometidas a vapores de nitrógeno líquido por 15 min y a 6 cm de la superficie, para luego ser sumergidas en nitrógeno líquido por 20 s y almacenadas. Las muestras serán enviadas por vía encomienda terrestre en termo de nitrógeno líquido rotulado.

Refrigeración (5 grados Celsius)

Para la refrigeración, fraccionará el semen obtenido por vagina artificial para congelamiento. Luego de la evaluación y dilución, el semen será enfriado hasta 5 °C con una tasa de enfriamiento de 0.5 grados Celsius/ min.

Maduración in vitro de COCs equinos: Los complejo cumulus-ovocitarios equinos (COCs) obtenidos del raspado post-mortem de ovarios equinos de matadero (Lamar S.A., Mercedes, pcia. de Bueno Aires) serán obtenidos según procedimiento standard del laboratorio UCA (Clerico et al., 2021) y se colocarán en gotas de 100 µl de M199 suplementado con 10% de FBS, 1 µL/mL de insulina-transferrina-selenio, 1 mM de piruvato de sodio, 100 mM de cisteamina, 0.1 mg/mL de FSH y 25 µg/mL de gentamicina (Clérico et al., 2021). Las mismas serán cubiertas de aceite mineral y se cultivarán por 28 hs a 38.2°C en atmosfera humidificada y 6% de Co2.

ICSI: El procedimiento de ICSI se llevará a cabo de acuerdo a los procedimientos descriptos por Sansinena, 2020 y Clérico et al., 2021. Entre 20 y 24 horas posteriores a la ICSI, sub-grupos de ovocitos de cada tratamiento serán fijados, teñidos con Hoechst (H-33258, Sigma) para evaluar la tasa de fecundación mediante microscopía de fluorescencia. Los ovocitos fecundados mediante ICSI restantes serán lavados y cultivados en medio DMEM/F12 suplementado, con recambio de medio 48 horas después (determinación de tasa de clivaje) y observación de desarrollo embrionario hasta día 7-9.

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% CO₂ a 38,5°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.

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 $p < 0.05$.

3.7 Bibliografía

de Oliveira, J. V., Oliveira, P. V. D. L. F., e Oña, C. M. M., Guasti, P. N., Monteiro, G. A., da Silva, Y. F. R. S., ... & Papa, F. O. (2016). Strategies to improve the fertility of fresh and frozen donkey semen. *Theriogenology*, 85(7), 1267-1273.

Santos, G. F., Henry, M., Sampaio, I. B. M., & Gastal, E. L. (1995). Effect of cooling system and rate of cooling on sperm quality of donkey semen preserved at 5° C. *Biology of Reproduction*, 52(monograph_series1), 761-767.

Decuadro-Hansen, G. (2004). Chilled and frozen semen: the animal experience. *Gynécologie, Obstétrique & Fertilité*, 32(10), 887-893.

Huerta, L. G., Álvarez, C., & Lázaro, V. L. (2020). Equine Semen Preservation: Current and Future Trends. *Biotechnologies Applied to Animal Reproduction: Current Trends and Practical Applications for Reproductive Management*, 227.

Barbas, J. P., Marques, C. C., Baptista, M. C., Vasques, M. I., Pereira, R. M., Cavaco-Gonçalves, S., & Horta, A. E. M. (2006). Reproduction in the goat Serrana breed: seasonal and individual factors affecting fresh and frozen semen performance, in vivo and in vitro fertility. *Animal products from the Mediterranean area*, 119, 337-342.

Arrebola, F., González, O., Torres, R., & Abecia, J. A. (2013). Artificial insemination in Payoya goats: factors affecting fertility. *Animal production science*, 54(3), 356-362.

Villareal, M. Y. C., Vargas, A. N., Restrepo, J. F., Briski, O., Grajales, J. H., Vargas, D. V., ... & Gambini, A. (2022). In vitro development of mule ICSI embryos. *Anim Reprod*, 19(2), e22131.

Sansinena, M. (2020). Assisted reproductive biotechnologies in the horse. In *Reproductive Technologies in Animals* (pp. 13-30). Academic Press.

Sansinena, M., Paccamonti, D., Cochran, R., Meintjes, M., Reggio, B., Denniston, R. S., ... & Godke, R. A. (2003). DEVELOPING THE INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI) PROCEDURE FOR THE HORSE. FROM EPIDIDYMIS TO EMBRYO, 69.

Clérico, G., Taminelli, G., Veronesi, J. C., Polola, J., Pagura, N., Pinto, C., & Sansinena, M. (2021). Mitochondrial function, blastocyst development and live foals born after ICSI of immature vitrified/warmed equine oocytes matured with or without melatonin. *Theriogenology*, 160, 40-49.

4. DESARROLLO DEL PROYECTO

4.1 Cronograma de Actividades

Actividad	Año	
	1	2
Etapas de Desarrollo del Trabajo	1	2
Obtención y evaluación de parámetros pre ICSI semen asnar de 4 reproductores	X	X
Producción de embriones inter específicos (mulares) e intraespecíficos (equino y asno) por fecundación in vitro	X	X
Vitrificación de embriones intra e interespecíficos, evaluación nuclear y transferencias a receptoras d		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 seminarios y capacitaciones en haras. Se procurará establecer actividad COIL en el marco de cátedra de Producción equina (UCA), cátedra de Producción Equina (UNRC) y Universidad de Queensland.

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 carrera 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:	Docente Investigador / 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

Función:	Docente Investigador		
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	Cargo	Dedicación

Función:	Docente Investigador		
Apellido y Nombre:	Taminelli, Guillermo Luis		
Tipo y No. Documento:	21787710		
No. de Legajo en UCA:	426312		

Lugar y Fecha de Nacimiento:	CABA 24-09-1970		
Nacionalidad:	Argentino		
Domicilio:	Virrey Olaguer y Feliú 4245		
TE Particular/celular:	1159969508		
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 cuenta con la participación de alumnos realizando su Trabajo Final de Graduación.

Apellido y nombre: Gulland, Trinidad. **Director y co-director:** M. Sansiñena, G. Taminelli

Apellido y nombre: Catalina Jamardo. **Director y co-director:** G. Clérico, G. Taminelli