

## Evaluación de la fertilidad y caracterización molecular de los procesos inflamatorios endometriales en burras utilizando inseminación artificial con semen congelado.

Losinno, L.<sup>1</sup>; Rossetto, L.<sup>2</sup>; Chapero, L.A.<sup>2,3</sup>; Bilbao, M.G.<sup>2,3</sup>; Franco, G.<sup>2</sup>; Sánchez, J.<sup>2</sup>; Barth, J.<sup>2</sup>; Torres, P.<sup>2</sup> y Briozzo, E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, General Pico, Argentina.

<sup>3</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva.

luisinachapero@gmail.com

### RESUMEN

La producción de burros (*Equus asinus*) está generando interés científico y tecnológico como animales productores de leche para consumo humano. Los resultados *in vitro* obtenidos congelando semen de burro han sido satisfactorios, pero al momento de inseminar burras, las tasas de preñez son significativamente más bajas (0-36%) que cuando se utiliza para inseminar yeguas (33-53%). El objetivo de este proyecto es estudiar las causas de subfertilidad en burras inseminadas con semen congelado, mediante la caracterización de los procesos inflamatorios del endometrio con técnicas de diagnóstico molecular. La hipótesis de trabajo es que la inseminación con semen congelado produce una endometritis persistente en las burras debido a un desbalance entre los mecanismos de respuesta inflamatoria frente a los espermatozoides dañados por la criopreservación en ausencia de plasma seminal (PS), lo que conduce a la subfertilidad. Se utilizarán eyaculados provenientes de 4 burros de raza Catalana, adultos, sanos y de fertilidad probada, que se encuentran alojados en las instalaciones del Campo Escuela Unidad Didáctica Experimental y Productiva (UDEP) Dr. Hugo Roberto Alvarez, de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa (FCV UNLPam). El semen se centrifugará, se descartará el sobrenadante y el pellet se diluirá a una concentración de  $200 \times 10^6$  espermatozoides viables/ml en un medio con Equiplus (Minitube), 5% de dimetilformamida y 2% de yema de huevo. Se identificarán los siguientes tratamientos: 1) Control, sin agregado de PS homólogo (0% PS); 2) Grupo 10: con agregado de 10% PS homólogo; y 3) Grupo 20: con agregado de 20% de PS homólogo. Se empaquetará en pajuelas de 0,5 ml que se someterán a una curva de refrigeración y congelación, y se conservarán en nitrógeno líquido (-196 °C) hasta su uso. Se tomarán datos del semen posdescongelado como motilidad total y progresiva mediante sistema CASA (computer asisted sperm analysis), evaluación de la integridad de la membrana plasmática mediante el test hipoosmótico y relación de vivos/muertos con tinción de eosina/nigrosina. Para evaluar el efecto sobre la inflamación en el endometrio, se inseminarán burras post ovulación en el fondo del



cuerno uterino, y se tomarán muestras del endometrio mediante pinza Wittner a las 24 horas post inseminación. Estas muestras se conservarán a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. A su vez, se diagnosticará la presencia de vesícula embrionaria a los 14 días post inseminación mediante ecografía transrectal para determinar fertilidad. Hasta el momento, se encuentran almacenadas las muestras de semen congelado y de endometrio. El siguiente paso será analizar los parámetros del semen pos descongelado y analizar la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias (interleuquinas  $1\beta$ , 6, 8, 10 y factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ), mediante qPCR. Este proyecto pretende clarificar determinados eventos reproductivos que generan infertilidad o baja eficiencia reproductiva al momento de utilizar semen congelado.

Palabras clave: burros, semen congelado, plasma seminal, endometrio, qPCR.

## Evaluation of fertility and molecular characterization of endometrial inflammatory processes in female donkeys using artificial insemination with frozen semen

### ABSTRACT

The production of donkeys (*Equus asinus*) is generating scientific and technological interest as milk-producing animals for human consumption. The *in vitro* results obtained by freezing donkey semen have been satisfactory, but when inseminating jennets, pregnancy rates are significantly lower (0-36%) than when it is used to inseminate mares (33-53%). The aim of this project is to study the causes of subfertility in jennets inseminated with frozen semen, by characterizing the inflammatory processes of the endometrium with molecular diagnostic techniques. The working hypothesis is that insemination with frozen semen produces persistent endometritis in jennets due to an imbalance between the inflammatory response mechanisms against spermatozoa damaged by cryopreservation in the absence of seminal plasma (SP), which leads to subfertility. Ejaculates from 4 healthy, adult Catalan donkeys with proven fertility will be used. They are housed at the Campo Escuela Unidad Didáctica Experimental y Productiva (UDEP) Dr. Hugo Roberto Alvarez, of the Faculty of Veterinary Sciences, Universidad Nacional de La Pampa (FCV UNLPam). The semen will be centrifuged, the supernatant will be discarded, and the pellet will be diluted to a concentration of  $200 \times 10$  viable sperm/ml in a medium with Equiplus (Minitube), 5% dimethylformamide and 2% egg yolk. The following treatments will be identified: 1) Control, without addition of homologous PS (0% PS); 2) Group 10: with addition of 10% homologous PS; and 3) Group 20: with addition of 20% homologous PS. It will be packaged in 0.5 ml straws that will be subjected to a cooling and freezing curve and will be stored in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) until use. Data will be taken from the post-thawed semen such as total and progressive motility using the CASA system (computer assisted sperm analysis), evaluation of the integrity of the plasma membrane using the hypoosmotic test and live/dead ratio with eosin/nigrosin staining. To evaluate the effect on inflammation in the endometrium, post-ovulation jennets will be inseminated at the bottom of the uterine horn, and samples of the endometrium will be taken using



Wittner forceps 24 hours after insemination. These samples will be stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. In turn, the presence of embryonic vesicle will be diagnosed 14 days after insemination by transrectal ultrasound to determine fertility. So far, frozen semen and endometrium samples have been stored. The next step will be to analyze the parameters of the post-thawed semen and analyze the expression of pro- and anti-inflammatory cytokines (interleukin  $1\beta$ , 6, 8, 10 and tumor necrosis factor  $\alpha$ ) using qPCR. This project aims to clarify certain reproductive events that generate infertility or low reproductive efficiency when using frozen semen.

Keywords: donkeys, frozen semen, seminal plasma, endometrium, qPCR.

