GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

INFORME TECNICO FINAL

I. ANTECEDENTES GENERALES

NOMBRE DEL PROYECTO:

Producción de mellizos de carne en rebaños Holstein Friesian por medio de la transferencia de embriones económicos obtenidos por tecnología in vitro.

CODIGO y REGIÓN:

BID-PI-C-2001-I-P-74; Octava Región

FECHA DE APROBACIÓN:

Concurso de Biotecnología, 12 de Noviembre de 2001.

EJECUTOR:

Universidad de Concepción, Campus Chillán

ENTIDAD ASOCIADA:

Faenadora de Carnes Ñuble SA

NOMBRE Y FIRMA COORDINADOR PROYECTO

José Francisco Cox Ureta
Nombre

..... Firma

COSTO TOTAL DEL PROYECTO:

APORTE DEL FIA

OFICINA DE PARTES - FIA
RECEPCIONADO
Fecha 19 ENE. 2006
Hora 11:15
Nº Ingreso 440

PERIODO DE EJECUCIÓN

1 de Marzo de 2002 al 30 de Noviembre de 2005.

II. RESUMEN EJECUTIVO

El presente proyecto, presentado en conjunto por la Universidad de Concepción y Faenadora de Carnes Ñuble S.A. respondió a la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías e implementar su práctica en los procesos normales de la industria de producción bovina que permitiera aumentar los niveles de eficiencia y competitividad neta del rubro productivo, enfrentando las demandas de volumen, calidad y costos del sector industrial exportador.

El objetivo general del proyecto fue establecer una tecnología de producción *in vitro* de embriones de bovinos a partir de ovarios de matadero que fuera sanitariamente segura, y que a su vez permitiera establecer un modelo productivo que condujera a un aumento de rentabilidad de la ganadería bovina de leche. Los objetivos específicos que se plantearon fueron: (1) estandarizar un procedimiento de producción de embriones compatible con la producción de mellizos a partir de ovarios de matadero obtenidos de hembras de razas aptas para la producción de carne; (2) estandarizar un procedimiento de obtención de embriones sexados de bajo costo, a partir de donantes vivas de alta calidad genética; (3) estandarizar un procedimiento de prevención y control precoz de contaminación bacteriana y viral de cultivos de tejidos, aplicable a la producción de embriones *in vitro*; (4) establecer y evaluar técnica y económicamente a nivel piloto un modelo de crianza rentable de terneros de carne en planteles lecheros, basado en la aplicación de las tecnologías estandarizadas, como una alternativa para la producción de terneros de carne en planteles de lechería; y (5) estructurar un mecanismo de transferencia de los resultados obtenidos hacia el sector productivo beneficiario, para posibilitar la generación del impacto esperado.

La metodología desarrollada para la producción de embriones económicos y sanitariamente seguros estuvo basada en la punción folicular de ovarios obtenidos de hembras faenadas en matadero, los cuales eran trasladados rápidamente al laboratorio en termos de alimento y seleccionados por normalidad morfológica (fueron descartados los ovarios con señales clínicas de inflamación o adherencias de algún tipo). Los complejo cúmulo-oocitos (COCs) fueron seleccionados por conformación y lavados en medio 199 con 25 mM de Hepes como buffer. Posteriormente, los COCs fueron suspendidos en medio de maduración (199 suplementado con suero fetal, FSH, LH, estradiol y eGF) y cultivados por 24 h a 38,5°C y 5% de CO_2. Paralelamente, el sedimento celular fue incubado 24 hrs en medio 199 y luego fijado para la evaluación microbiológica de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina y Diarrea Viral Bovina, ambos viruses caracterizados por su tropismo por el ovario.

Los oocitos maduros fueron fecundados *in vitro* con semen comercial de raza Aberdeen Angus, con alta confiabilidad para el carácter de tamaño de peso al nacimiento, para asegurar crías chicas al parto. Los espermatozoides fueron separados del diluyente por medio de una centrifugación en una gradiente discontínua de Percoll (45% y 90%). Posteriormente los espermatozoides fueron lavados con medio Talp de lavado espermático y ajustada la concentración resuspendiéndolos en medio de fecundación (Talp de fecundación suplementado con heparina y la mezcla estimulatoria espermática hipotaurina, penicilamina y epinefrina). La suspensión espermática fue depositada en placas multipocillos a la espera de la incubación de los oocitos. Los oocitos fueron resuspendidos en medio Talp de lavado y agitados

mecánicamente para eliminar las células granulósicas en exceso y luego fueron co-incubados con la preparación espermática a 38.5°C, 5% de CO_2, 5% de O_2 y 90% de N_2 por unas 18 horas.

Para cultivar los embriones, los oocitos co-incubados fueron denudados mecánicamente de células granulósicas y resuspendidos en microgotas de 50ul de medio SOF con aminoácidos y una mezcla de factores de crecimiento (IGF y eGF) e incubados a 39°C y la mezcla gaseosa antes mencionada. Luego de 24 hrs, los ova segmentados fueron transferidos quirúrgicamente a oviductos de ovejas y otra fracción fue dejada en cultivo como control de calidad del desarrollo y funcionalidad de los embriones. Cinco días después, los embriones fueron colectados de los oviductos y las mórulas compactas y blastocistos grado 1 fueron suspendidos en medio Dulbecco con 10% de glicerol y almacenados en pajuelas de 0.25 ml y luego fueron congelados en nitrógeno líquido, utilizando glicerol como crioprotector. La tasa de desarrollo a blastocisto a los 8 días y la tasa de eclosión de los blastocistos en cultivo fueron usados como marcadores de funcionalidad de los embriones en desarrollo.

La producción de mellizos se efectuó sincronizando vacas clínicamente sanas y con un intervalo desde el parto de al menos 60 días. La sincronización de estros se efectuó con una combinación de progesterona y prostaglandina $F_2\alpha$ y la transferencia se efectuó 7 días después del estro diagnosticado. Los embriones fueron descongelados en un baño maría a 30°C y el crioprotector fue removido en etapas usando Dulbecco y sucrosa. Dos embriones de calidad transferibles fueron cargados en pajuelas de 0.25 ml y transferidos al tercio basal del cuerno uterino adyacente al del ovario con el cuerpo lúteo utilizando la técnica transcervical. Muestras de sangre entera se utilizaron para establecer antes y después de la transferencia el estatus sanitario para las enfermedades virales diagnosticadas. El diagnóstico de gestación y de supervivencia embrionaria se efectuó a los 35 días del estro por ecografía transrectal y confirmada posteriormente a los 45 días.

Se evaluaron las características del parto, el tamaño de los terneros al nacimiento y la fertilidad subsiguiente de las madres para determinar el impacto de la gestación de mellizos de razas chicas de carne en la reproducción de las receptoras y definir la viabilidad técnica del modelo.

Los resultados mostraron que los procedimientos de producción de embriones son eficientes y económicos (el costo de producción de mellizos desde ovarios de matadero es de US$ 20.7 y de embriones finos es de US$ 79.9), los parámetros de funcionalidad embrionaria muestran que se produce una tasa de desarrollo a blastocistos de un 50.3% desde ovarios de matadero y de un 63.2% desde donantes vivas; que sobre el 80% de esos embriones eclosionan hasta el día 10 y que es posible efectuar un diagnóstico temprano de infección viral (IBR y DVB) de los cultivos. Las tasas de preñez global del presente proyecto fueron de un 46.5% con un 70.4% de mellizos a los 35 días. Los principales factores que influyen en los resultados son la alimentación de las receptoras y la sincronía entre la receptora y el estado de desarrollo embrionario. No fue posible detectar infecciones virales en vacas receptoras en el período considerado en el estudio. La tasa de parición de las hembras diagnosticadas gestantes fue de un 66.7% y la tasa de parición de mellizos fue de sólo un 33.3%. La tasa de mortalidad perinatal de los terneros fue de un 87.5%, con el nivel de atención de parto como el principal factor afectando la supervivencia de los terneros. No se presentaron problemas de distocias, sin

embargo la tracción simple y el apoyo para el consumo de calostro fueron maniobras usuales para este tipo de partos. La eficiencia reproductiva pos parto de las vacas que parieron mellizos fue similar que para las vacas con partos simples.

Las pérdidas tardías de gestaciones y de embriones en desarrollo y el bajo peso al nacimiento de los terneros dobles sugiere que existe un nivel de insuficiencia uterina en bovinos que no permite que la transferencia unilateral de 2 embriones sea una alternativa tecnológica para la inducción de mellizos. Asimismo, la adecuada eficiencia de desarrollo embrionario y la ausencia de problemas al parto o en la reproducción subsiguiente de las receptoras, sugiere que la reducción de la competencia física entre embriones en desarrollo, mediante una mejor ubicación de los embriones en el útero, constituye una opción para optimizar la supervivencia embrionaria, y facilitar la adopción de la tecnología de embriones como mecanismo de producción de mellizos en ganado de leche y carne.

III. TEXTO PRINCIPAL

1. Cumplimiento de los objetivos del proyecto: descripción del cumplimiento de los objetivos en función de los resultados e impactos obtenidos.

En el cuadro 1.1 se observan los objetivos del proyecto y el nivel de cumplimiento de los mismos. En el cuadro 1.2. se observa el nivel de cumplimiento de los indicadores asociados.

Cuadro 1.1. Descripción de los objetivos del proyecto y del nivel de cumplimiento de los mismos (en función del impacto sectorial buscado).

1	**Estandarización de procedimientos de producción de embriones in vitro para mellizos.**		**Nivel de Cumplimiento**
	6	Ajuste de condiciones de fecundación para toros seleccionados por potencial de producción de mellizos.	**100%**
	7	Comparación de toros seleccionados por potencial de producción de blastocistos.	**100%**
	8	Optimización del uso del semen seleccionado.	**100%**
		Evaluación funcional de los embriones producidos in vitro a partir de donantes y de ovarios de matadero.	**100%**
		Evaluación del costo de producción de los embriones.	**100%**
3	**Estandarización de procedimientos de control de calidad microbiológica de embriones y cultivos.**		**100%**
2	**Estandarización de procedimiento de producción de embriones segura a partir de vacas y ovarios de matadero.**		
	11	Selección de donantes por estatus microbiológico.	**100%**
	12	Establecimiento de medidas cuarentenarias de prevención de enfermedades.	**100%**
		Producción segura de embriones de leche para implementación del sexaje de embriones.	**Cambiado para objetivo 4**

		Producción segura de embriones de carne para ser usados en la estandarización de los procedimientos de transferencia de embriones de mellizos en ganado Holstein.	**Cambiado para objetivo 4**
		Optimización de procedimientos asociados a la transferencia de embriones producidos in vitro sexados y mellizos.	**Cambiado para objetivo 4**
		Producción segura y congelación de embriones de carne desde ovarios de matadero para la producción de mellizos en ganado Holstein.	**Cambiado para objetivo 4**
		Control del manejo de la reproducción de los rebaños experimentales.	**Cambiado para objetivo 4**
		Sincronización de estros para transferencia de embriones en rebaños experimentales.	**Cambiado para objetivo 4**
		Evaluación técnica y clínica de la transferencia de embriones sexados y de mellizos en rebaños experimentales.	**Cambiado para objetivo 4**
		Análisis de resultados y preparación de documento técnico.	**Cambiado para objetivo 4**
4	**Evaluación técnica y económica de un modelo de un modelo rentable de producción de terneros de carne basado en la tecnología de embriones estandarizada**		
	13	Establecimiento del modelo productivo a seguir.	**100%**
	14	Capacitación del personal técnico de los planteles.	**100%**
	15	Control de los programas de nutrición, reproducción y de crianza de terneros.	**60%**
	16	Producción segura de embriones de leche para implementación del sexaje de embriones.	**50%**
	17	Producción segura de embriones de carne para ser usados en la estandarización de los procedimientos de transferencia de embriones de mellizos en ganado Holstein.	**100%**
	18	Sincronización y control de estros en rebaños pilotos.	**100%**
	19	Transferencia de embriones sexados y de mellizos de acuerdo al protocolo establecido.	**80%**
	20	Optimización de procedimientos asociados a la transferencia de embriones producidos in vitro sexados y mellizos.	**100%**
	21	Diagnóstico temprano de gestación y de tasas de mellizaje.	**100%**
	22	Evaluación funcional de los embriones producidos in vitro a partir de donantes y ovarios.	**80%**
	23	Evaluación del costo de producción de los embriones producidos in vitro a partir de donantes y ovarios.	**100%**

	24	Monitoreo y registro de variables productivas y reproductivas del rebaño.	**70%**
	25	Análisis y elaboración de informe técnico-económico.	**40%**

Cuadro 1.2. Descripción de los resultados reales obtenidos en el proyecto en función de los indicadores de resultados planificados.

Obj. Esp. Nº	**Resultado**	**Indicador**	**Metas**	
			Plamificada	**Obtenida**
1	Procedimiento de producción de embriones in vitro a partir de ovarios obtenidos en animales de carne sacrificados en matadero	Segmentación > 4 céls (de oocitos incubados):	> 65%	64.9
		Desarrollo a blastocisto (de ova segmentados):	> 35%	50.3
	Procedimiento de transferencia de embriones producidos in vitro en condiciones de campo	Procedimiento	1	1
	Supervivencia de embriones producidos in vitro (preñez confirmada por ecografía) transferidos en condiciones de campo	Tasa de preñez	50%	46.7
		% de partos (= que en inseminación)	≥ 85% ≥ 50%	66.7 44.3 (Superior)
		% de partos dobles esperables	30%	33.3
	Costo de set de mellizos producidos de ovarios colectados de matadero de vacas de carne	US$ dólares/unidad	30	20.7
2	Procedimiento de producción de embriones in vitro a partir de hembras de alta calidad genética para características productivas	Segmentación > 4 céls (de oocitos incubados):	> 70%	83.3
		Desarrollo a blastocisto (de ova segmentados):	> 45%	63.2
	Proporción de supervivencia de embriones y preñez confirmada por palpación (= a Inseminación Artificial)	Tasa de preñez	50%	46.7
	Costo de embriones sexados producidos de vacas de alta calidad genética	US$ dólares/unidad	100	79.9

			Metas	
3	Procedimiento de diagnóstico de enfermedades virales (IBR,DV) en cultivos celulares	Procedimiento	Disponible	Disponible
	Procedimiento de diagnóstico de enfermedades virales (IBR,DV) en embriones	Procedimiento	Disponible	Disponible
	Procedimiento de diagnóstico de enfermedades bacterianas (Brucelosis) en cultivos celulares	Procedimiento	Disponible	No evaluado
	Procedimiento de diagnóstico de enfermedades bacterianas (Brucelosis) en embriones	Procedimiento	Disponible	No evaluado
4	Modelo de Producción bovina basado en tecnología de producción de embriones in vitro para obtención de mellizos y/o animales de elite genética	Modelo	Disponible	Pendiente
	Parámetros de operación a escala piloto comercial determinados	Varios (Ver metodología)	Disponibles Todos	Pendiente
5	Generación de información base para transferencia de modelo a sector productivo	Resultado de evaluación técnico económica	Disponible Toda	Pendiente
	Días de Campo	Número	3	Pendientes
	Manual de producción de mellizos en vacas Holstein Friesian	Número	1	Pendiente
	Seminario de difusión	Número	1	Pendiente

2. Aspectos metodológicos del proyecto:

• 2.1. DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA

2.1.1 Obtención de Oocitos para Maduración in Vitro

Los oocitos rodeados por células del cúmulus oophorus (COC) fueron obtenidos por punción de folículos de ovarios colectados en matadero y por punción de folículos de ovarios de donantes vivas.

a. Producción de oocitos de ovarios provenientes de matadero.

Los ovarios fueron obtenidos seccionando el ligamento ovárico al momento de la faena de las hembras. Rápidamente fueron almacenados en termos con suero fisiológico a 35°C hasta el término de la faena. Posteriormente fueron despachados al laboratorio, lavados nuevamente en suero fisiológico y almacenados en vasos de precipitado hasta la operación de punción. Los COC fueron colectados por punción folicular y aspiración del contenido, utilizando agujas de

21 G fijas a jeringas de 10 ml. El contenido de la jeringa es posteriormente depositado en un tubo de colección y dejado decantar hasta el término del procedimiento. Posteriormente el sobrenadante es desechado y el pellet celular es explorado para la identificación de los COC colectados, bajo lupa diascópica. En la figura 1 se observan ovarios de vaca con folículos en su superficie y un esquema de punción folicular y extracción de COC.

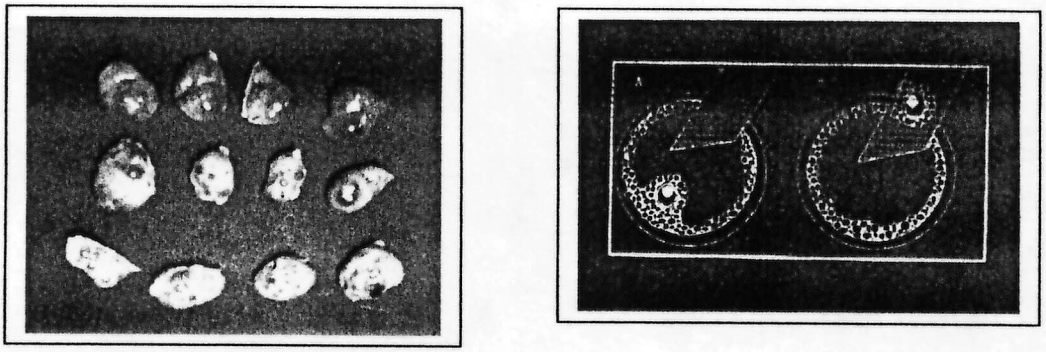


Figura 1. A la izquierda imágenes de ovarios y folículos ováricos en su superficie. En la derecha, se observa un esquema de colección de COC desde un folículo ovárico.

b. Producción de oocitos de donantes vivas.

La producción de oocitos a partir de hembras donantes se basa en la estimulación ovárica con un régimen de FSH. El control de la dinámica folicular se efectúa por punción transvaginal de folículos dominantes y la estimulación hormonal se efectúa a partir de las 36-48 hrs después. administrando en dosis decreciente, dos veces al día por 3 días la FSH. Doce horas después de la última inyección, los oocitos son aspirados por punción transvaginal de folículos mayores de 4 mm. La punción transvaginal se efectúa con la donante bajo efectos sedantes y bajo anestesia epidural para facilitar la manipulación transrectal del los ovarios. El vestíbulo vaginal es limpiado y desinfectado y la sonda tranvaginal de 5 MHz, a tiempo real y de tipo sectorial es introducida hasta el fondo de la vagina, para establecer un contacto directo con el ovario a través de la pared vaginal. La imagen ecográfica de los folículos ováricos y de la aguja de punción de 40 cm, dirigida por una guía fija al transductor, son captadas en el ecógrafo, de manera que la operación de punción puede ser seguida a tiempo real. El contenido folicular es aspirado hacia tubos de colección y posteriormente es filtrado para retener los COC y posteriormente localizarlos bajo lupa diascópica. La presión de vacío utilizada es de 70 a 80 mm Hg. En la figura 2 se observa imágenes de las constituyentes del sistema de aspiración folicular asistido por ecografía. En la figura 3 se observan las imágenes ecográficas de folículos de hembras estimuladas para desarrollo folicular.

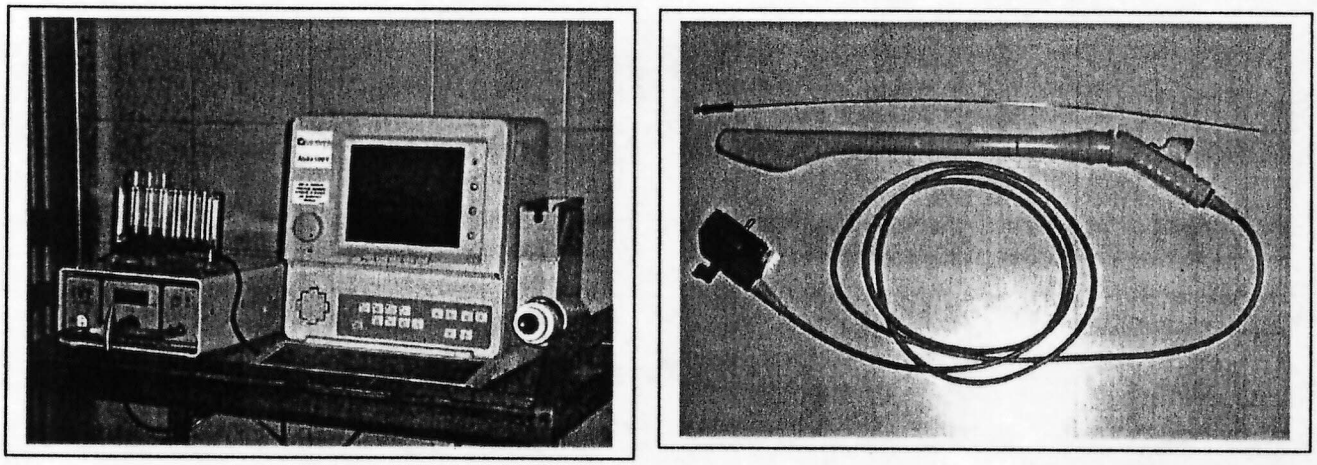


Figura 2. Imágenes del sistema de colección de COC por punción folicular asistido por ecografía (OPU). En la izquierda se observa el ecógrafo y el sistema de porta tubo y de generación de presión de vacío controlado. En la derecha se observan el transductor transvaginal y la aguja de punción.

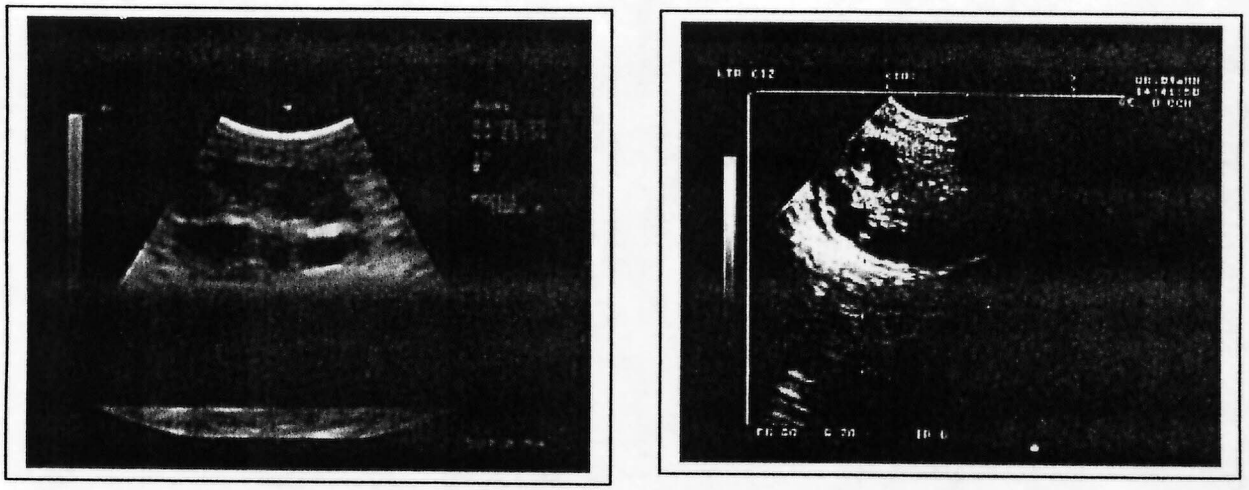


Figura 3. Imágenes ecográficas de folículos ováricos para punción transvaginal.

Manejo general del rebaño de vacas donantes:

Las vacas donantes se mantienen en praderas artificiales, con acceso libre a agua potable. Están mantenidos en un programa de medicina preventiva basada en vacunación contra enterotoxemia y desparasitaciones contra fasciola hepática, parásitos gastrointestinales y mosca de los cuernos en la temporada. El programa de alimentación del rebaño se basa en heno de alfalfa, grano de avena, concentrado y sales minerales de manera de satisfacer sus requerimientos nutricionales.

2.1.2 Maduración in vitro

Los COC colectados fueron seleccionados por la presencia de células del cúmulus rodenado completamente al oocito, por la compactación y color de las células del cúmulus y

por la homogeneidad del citoplasma. Los oocitos fueron lavados en medio 199 suplementado con 10% v/v de suero fetal y antibióticos e incubados 22-26 hrs en 350 µl de medio 199 (suplementado con 10% de suero fetal (o suero inactivado de vaca en estro), FSH, LH, estradiol, IGF-1 y antibióticos) a 38,5°C y 5% de CO2 en aire en una atmósfera humedecida. En la figura 4 se observa la búsqueda de COC bajo lupa diascópica y en campanas de flujo laminar horizontal. En la Figura 5 se observan COC colectados por punción folicular e incubables para producción in vitro de embriones.

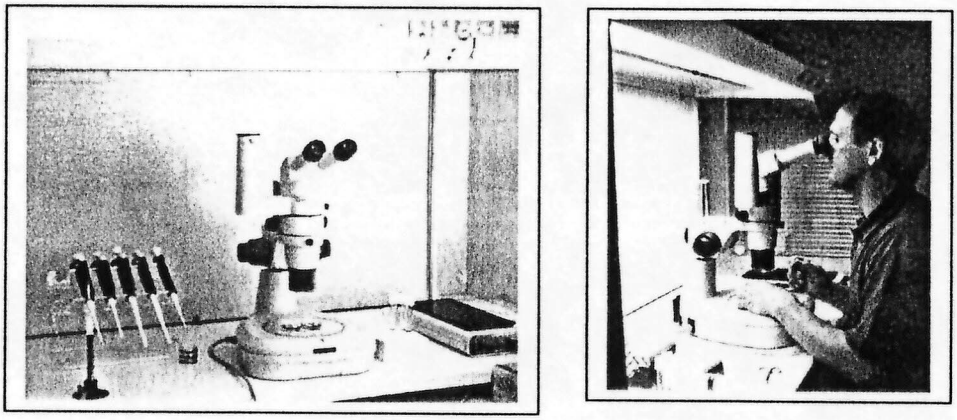


Figura 4. A la izquierda se observa la imagen de una campana de flujo laminar y a la derecha la operación de búsqueda de COC baja la campana.

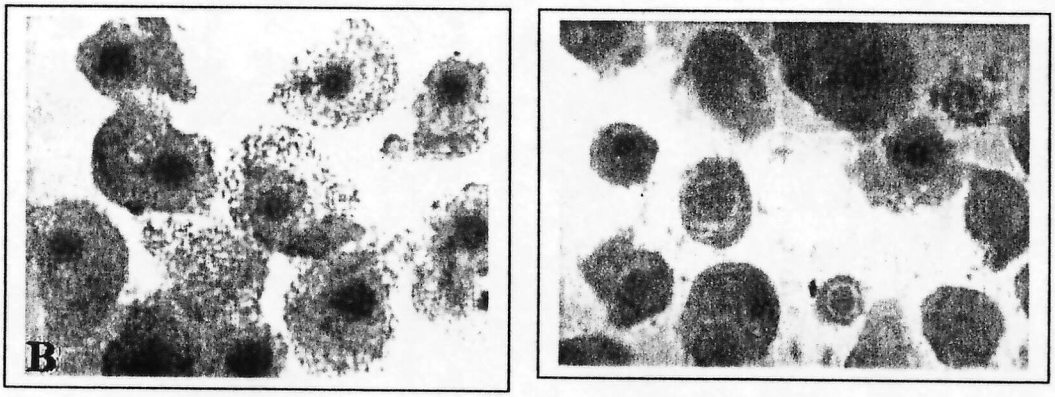


Figura 5. Complejos cúmulus.oocitos que caracterizan los gametos a ser incubados para maduración in vitro.

2.1.3 Capacitación espermática y fecundación in vitro.

Para la capacitación espermática y la fecundación in vitro, semen congelado comercial es separado de los diluyentes por medio de una gradiente discontinua de Percoll (45% y 90%) y el pellet espermático es lavado 2 veces en medio Talp sin calcio. El lavado se efectúa suspendiendo el pellet espermático en el medio mencionado y centrifugándolo a 400 x g por 12 minutos. Luego del lavado, la concentración espermática es ajustada de acuerdo a los requerimientos específicos del macho a utilizar, resuspendiendo los espermatozoides en medio Talp de fecundación (Talp FIV con 10 µg/ml de heparina y epinefrina, hipotaurina y penicilamina como mezcla estimulante). La fecundación es llevada a cabo co-incubando los

gametos a 39 °C y 5% de CO_2, 5% de O_2 y 90% de N_2 en una atmósfera de 90% de HR. En la figura 6 se muestra el esquema de separación espermática para capacitación in vitro y oocitos teñidos para destacar los pronúcleos y cola espermática usadas como indicador de fecundación.

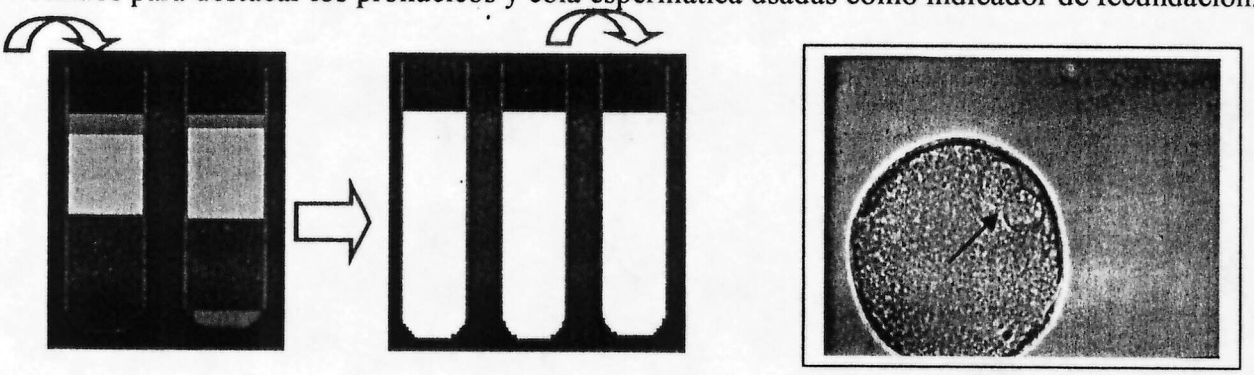


Figura 6. En la izquierda un esquema de la separación espermática usando gradientes de Percoll. El pellet espermático obtenido (naranja) después de la centrifigación es lavado convencionalmente, suspendiendo el pellet en medio de lavado y centrifugándolo. El pellet final obtenido es cuantificado para definir la concentración espermática. A la derecha un oocito fecundado en que se aprecia claramente los pronúcleos masculino y femenino flecha).

2.1.4 Cultivo de embriones

Los ova co-incubados con espermatozoides son limpiados mecánicamente de las células del cúmulus y luego son transferidos a gotas de 300 µl de medio SOF suplementado con un 10% de suero fetal, amino ácidos esenciales y no escenciales e IGF y luego cubiertas en aceite mineral para impedir la deshidratación y contaminación de los medios. La limpieza mecánica se efectúa pasando los embriones por pipetas de vidrio con punta elongada a unos 120 µm para raspar la superficie de la zona pelúcida. En la figura 7 se observan ova antes y después de ser limpiados de células del cúmulus.

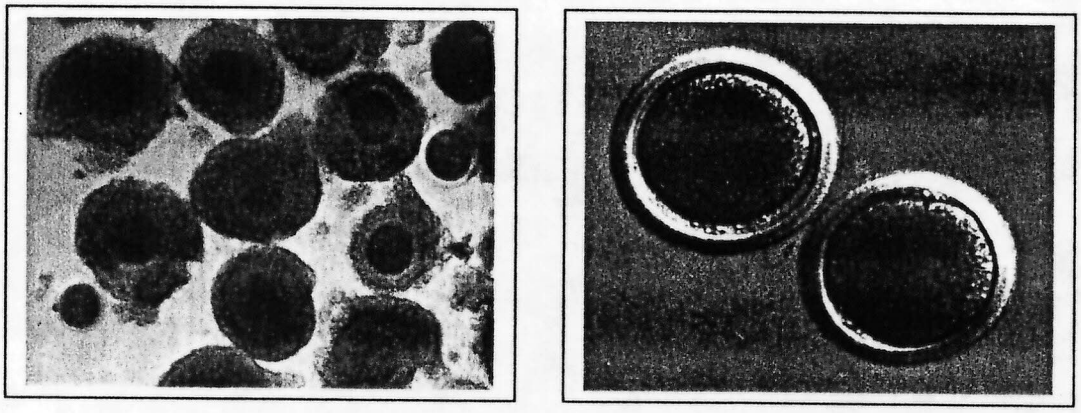


Figura 7. Imágenes de COC después de la co-incubación con espermatozoides y después de habérseles removido las células del cúmulus usando pipetas de vidrio elongadas.

a. Cultivo completamente in vitro

Cuando los ova son cultivados completamente in vitro, estos son transferidos a las gotas de medio SOF e incubados a 39°C y 5% de CO_2, 5% de O_2 y 90% de N_2 en una atmósfera humedecida por 5 días, renovando el medio cada 48 hrs. La evaluación del desarrollo se produce a los 5 días (7 días desde el inicio de la maduración) en función de la tasa de desarrollo a mórulas compactas y blastocistos, o sólo de blastocistos si la evaluación se hace 24 h después.

b. Cultivo en oviductos de ovejas.

Cuando los ova son cultivados en oviductos de ovejas, los ova son dejados segmentar en medio SOF y luego los embriones son transferidos a oviductos de ovejas en fase luteal o con dispositivos de progesterona Eazy Breed (Matthei y Cía) en animales en anestro. La transferencia es efectuada quirúrgicamente exponiendo el aparato genital por la línea media ventral en animales bajo anestesia general convencional.

Los embriones son transferidos directamente al infundíbulo del oviducto usando catéteres Tom de 3,5 F y son recuperados 4 días después, extrayendo el genital por la línea de incisión anterior, para lavar el útero y el oviducto con 100 ml de medio Dulbecco. Con ese fin, se introduce una aguja roma de 19 G conectada a jeringas de 50 ml y se lava el útero en dirección al oviducto, el que es nuevamente intubado con el catéter antes mencionado. Los embriones son recuperados en tubos centrífugas de 50 ml, y son localizados y calificados usando lupa diascópica y aumento de 20x. Sólo se utilizan mórulas compactas y blastocistos grados 1 y 2. En la figura 8 se observan mórulas compactas y blastocistos grados 1 y 2 en la escala de calificación morfológica de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. En la figura 9 se observa un típico cuadro de producción de embriones desde ovarios de matadero.

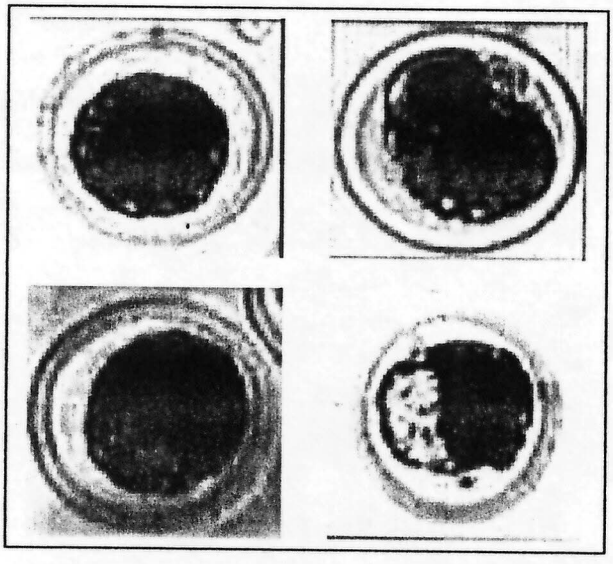


Figura 8. Imágenes de mórulas compactas y blastocistos grado 1 (izquierda) y grado 2 (derecha). Los embriones grado 2 sólo son transferidos en fresco, mientras que los grado 1 son transferidos en fresco y descongelados.

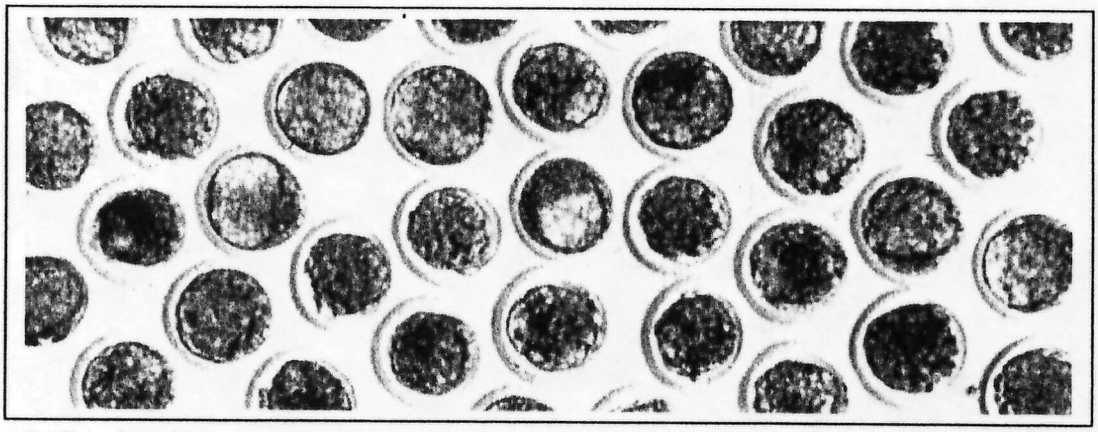


Figura 9. Producción *in vitro* de embriones en escala. Los oocitos originales provienen de ovarios de matadero.

Manejo general del rebaño de ovejas receptoras intermedias:

Los animales Están mantenidos en corrales con cama de paja seca, espacio y ventilación suficientes y agua ad libitum. Están mantenidos en un programa de medicina preventiva basada en vacunación contra enterotoxemia y desparasitaciones contra fasciola hepática, gastrointestinales y parásitos externos. El programa de alimentación del rebaño se basa en heno de alfalfa, grano de avena, concentrado y sales minerales de manera de satisfacer sus requerimientos nutricionales.

2.1.5 Congelación de embriones

Los embriones grado 1 fueron congelados en medio Dulbecco con un 10% de glicerol como crioprotector. Con ese objetivo, los embriones fueron colectados de oviductos y mantenidos en medio Dulbecco con un 20% de suero fetal (v/v). La incorporación del crioprotector se hizo en 3 etapas (Dulbecco + sucrosa; Dulbeco-sucrosa + 5% de glicerol y Dulbecco-sucrosa y 10% de glicerol) a temperatura de laboratorio (aprox.20°C). Posteriormente los embriones fueron cargados en pajuelas de 0.25 ml estériles y fueron enfriadas a –7°C para efectuar el "seeding" y subsiguientemente se enfrió a 0.1°C/min hasta los –35 °C para depositar las pajuelas directamente en nitrógeno líquido (-196°C).

La descongelación se efectúa en baño maría a 30°C por 30 seg. Luego los embriones son recolectados de las pajuelas, suspendidos en medio Dulbecco con 5% de glicerol y sucrosa, luego en medio Dulbecco con sucrosa y finalmente, los embriones son resuspendidos en medio Dulbecco con 20% v/v de suero fetal bovino. Los embriones son calificados bajo lupa diascópica (100 x) y mantenidos en medio Dulbecco a temperatura ambiente hasta su utilización. En la figura 9 se observa un congelador de embriones programable.

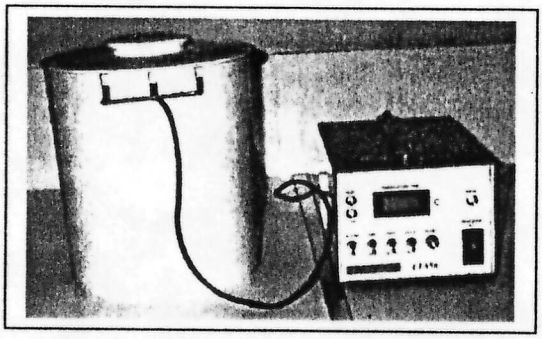


Figura 9. Congelador de embriones programable. El control del descenso de temperatura debe ser muy controlado para asegurar una tasa de supervivencia pos desconcongelación aceptable.

2.1.6 Identificación precoz de patologías ováricas

La identificación de patologías ováricas en forma precoz es requerida por la vulnerabilidad de la zona pelúcida de los embriones producidos in vitro a alojar estos microorganismos en las cavidades de la zona. Los lavados y tratamientos enzimáticos, que corrientemente remueven los microorganismos de embriones convencionales, no lo hacen con los producidos in vitro, por lo que pueden quedar alojados en la zona. Sin embargo no se ha reportado a nivel internacional alguna contaminación bacteriano o viral producida por estos embriones (Wrathall et al., 2006).

El control de la contaminación microbiana se efectúa seleccionando ovarios sin expresiones de inflamación en su superficie y diagnosticando la contaminación viral de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) y Diarrea Viral Bovina (DVB) que presentan tropismo por el ovario y pueden contaminar las células de la granulosa y el líquido folicular, aunque no atraviesan la zona pelúcida.

Con ese objetivo, los COC, células de la granulosa y líquido folicular remanente de la búsqueda de COC para incubación es suspendido en medio 199 y dejado decantar por 4 hrs. El sedimento es cultivado a 37°C a 5% de CO2 en aire y utilizado posteriormente para preparar las improntas para las pruebas de Inmunofluorescencia indirecta para el virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) y para el virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (vIBR).

Para la prueba de inmunofluorescencia indirecta desde células de granulosa y embriones, se realizaron improntas de las células colectadas. Para ello los portaobjetos con las improntas se fijaron por 15 minutos en acetona a 0° C, luego se lavaron por 5 minutos en PBS pH 7,2 0,01 M y se dejarán escurrir. Posteriormente se incubó la muestra con el anticuerpo monoclonal primario utilizando la dilución de trabajo para vDVB y vIBR (obtenida por titulación) por 30 minutos a 37° C en cámara húmeda. Después de la incubación, las muestras se lavaron en PBS 3 veces por 10 minutos. Luego, la muestra se incubó con el anti-mouse-FITC secundario utilizando la dilución de trabajo por 30 minutos a 37° C en cámara húmeda. Se realizó una contratinción con Azul de Evans al 0,01% entre 30 a 60 segundos. Finalmente las muestras se lavaron en PBS y después en agua bidestilada, para luego secarlas a temperatura ambiente, y realizar el montaje con glicerina al 50%, y su observación en el microscopio de fluorescencia (aumento 400x).

2.1.7 Transferencia de embriones

a. Preparación de receptoras.

Las receptoras corresponden a vacas de más de un parto (hasta 5 partos), clínica y ginecológicamente sanas y con un intervalo desde el parto de al menos 60 días. En algunos casos las vacas presentaron hasta 2 inseminaciones antes de ser utilizadas como receptoras.

Las vacas son sincronizadas introduciendo un dispositivo de liberación de progesterona intravaginal (CIDR B; Eazi Breed) por 7 días y al día 6 se administró una dosis luteolítica del análogo de prostaglandina F2a, tiaprost (Iliren). Al momento del retiro del dispositivo, se aplica en la base de la cola un detector de monta (Estrus Alert) que bajo la presión del esternón de otras vacas al momento de la monta, cambia de tonalidad a rojo brillante (ver figura 10).

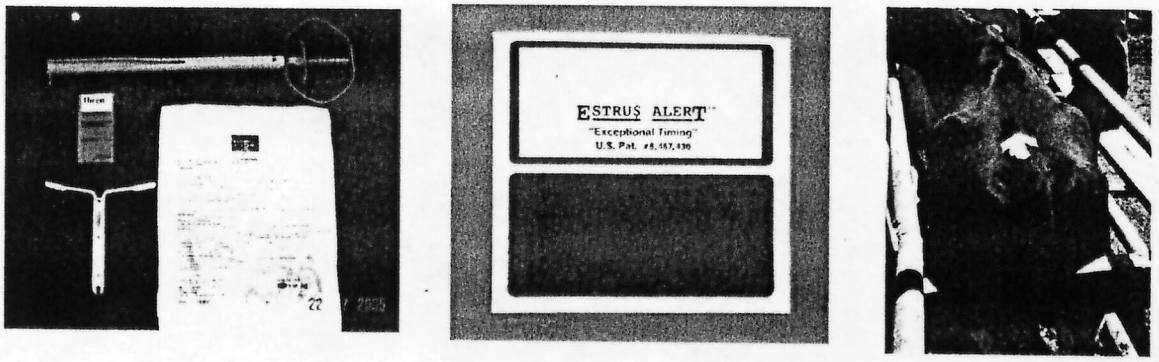


Figura 10. Sistema de sincronización y detección de estros en vacas Holstein. La sincronización fue basada en progesterona y prostaglandina y la detección basado en el detector de montas Estrus Alert. La presión sobre la superficie de color metálico permite que la pintura se desprenda y quede expuesto un color rojo o verde brillante muy contrastante. En el centro el sistema inactivado (a) y activado (b). Además se pueden ver una imagen con el dispositivo unicado en la base de la cola.

Transferencia de embriones

Los embriones son transferidos directamente al cuerno uterino adyacente al ovario con el cuerpo lúteo, 7 días después del estro (estro= día 0). Con ese objetivo, las vacas son introducidas a una manga de palpación, son sedadas con acepromazina (Pacifor) y se les aplica una anestesia epidural baja (Mepivacaina, Vetacaina) para controlar la musculatura rectal y facilitar la manipulación uterina. La zona perineal es limpiada con toallas de papel desechables y el vestíbulo vaginal es desinfectado con alcohol yodado. Los embriones son cargados en una pajuela de 0,25 ml y la pipeta de transferencia, protegida por una camisa sanitaria, es localizada en el útero a través del cérvix utilizando una manipulación recto-vaginal. Los embriones son depositados en el tercio basal del cuerno uterino presionando suavemente el émbolo del inyector. En la figura 11 se observan imágenes de las transferencias.

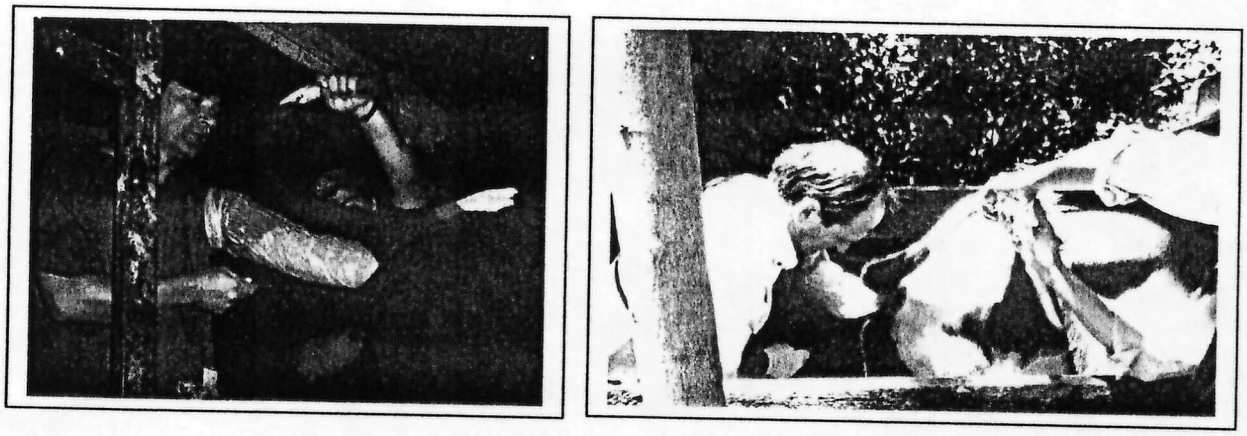


Figura 11. Imágenes de transferencia de embriones en terreno. En la izquierda se puede observar aún el detector de monta Estrus Alert activado.

2.1.8 Diagnóstico de gestación.

El diagnóstico de gestación se efectúa a los 35 días después de la transferencia por ecografía transrectal a tiempo real, utilizando una sonda de tipo lineal de 5 MHz. Para la definición de la supervivencia embrionaria se utiliza la identificación de ambos fetos en sus sacos amnióticos. En la figura 12 se observan gestaciones de mellizos identificadas por ecografía.

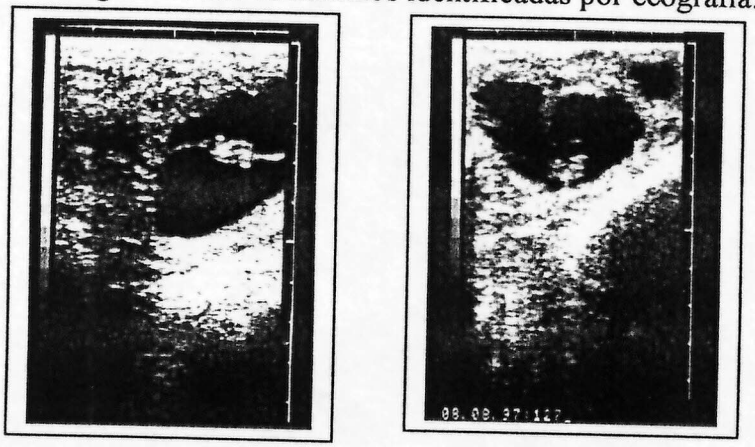


Figura 12. Imágenes ecográficas de gestaciones de 35 días en bovinos. Se observa la imagen embrionaria y el saco amniótico).

2.1.9 Evaluación del parto y de la reproducción subsiguiente de las receptoras

El parto es evaluado en función del nivel de asistencia externa (manipulación de terneros y tracción), del tiempo de eliminación de las membranas fetales y de la involución uterina. El intervalo al primer servicio, el intervalo a la preñez y la tasa de preñez son otros marcadores de normalidad de la involución uterina post parto, particularmente si se compara contra controles con parto único y sometidas a programas de inseminación artificial.

2.1.10 Evaluación del crecimiento de terneros

El crecimiento de los terneros es evaluado quincenalmente mediante el control de peso usando balanzas digitales individuales.

2.2 PRINCIPALES PROBLEMAS METODOLÓGICOS ENFRENTADOS

2.2.1 Congelación de embriones producidos in vitro.

La viabilidad del procedimiento de transferencia de embriones como estrategia de producción de mellizos en escala comercial demanda que estos sean transferidos descongelados (separar la producción de la transferencia) y de una manera simple (transferencia directa). En ese sentido, es conveniente desarrollar un modelo animal que permita una evaluación inmediata de la funcionalidad del procedimiento desarrollado. La supervivencia pos descongelación convencional de embriones producidos *in vitro* es escasa por lo que se han desarrollado procedimientos alternativos como la vitrificación. Aún así, las tasas de gestación pos descongelación en el mejor de los sistemas es aproximadamente 35%, considerada baja para nuestros intereses.

2.2.2 Sincronización de estros poco precisa en el modelo previsto (GnRH+PGF2α) y detección electrónica de estros con pérdidas de dispositivos en rebaños en pastoreo.

La inducción de sincronización de estros entre donantes de oocitos (ya sea desde ovarios de mataderos o donantes) y receptoras de los embriones finales es fundamental para concentrar la operación en terreno. En ese sentido, es importante la presentación de los estros y la concentración de los mismos. La presentación de los estros sólo es posible dimensionarla con un buen programa de detección, lo cual es difícil en patios de confinamiento. En estudios anteriores se pudo observar que el esquema de sincronización de estros planificado para el presente proyecto era efectivo en patios pero vulnerable a los patrones de alimentación (Cox et al., 2001). En las lecherías usadas (tamaño pequeño) la alimentación estable constituye efectivamente un problema, por lo que la falta de presentación de estros y la dispersión de los mismos afectó nuestra operación. Asimismo, el sistema electrónico de detección de estros también fue un problema, ya que las unidades, con un costo individual elevado, se perdían con facilidad, por lo que fue necesario su reemplazo por sistemas de detección alternativos.

2.2.3 Velocidad de operación de transferencia incompatible con la transferencia de números elevados de embriones.

Para que la operación de transferencia de embriones pueda ser incorporada a la rutina productiva en planteles de lechería, es importante que el número de transferencias por unidad de tiempo sea elevado, de manera que la movilización de animales y el costo asociado a la operación misma, incluidos los técnicos especializados y la movilización, sea prorrateado por los embriones transferidos. En los sistemas vigentes la operación tiene una velocidad de 6 vacas/hora y debería duplicarse.

2.2.4 Problema de calibración y manutención de incubadores.

La maduración oocitaria, fecundación y cultivo de embriones in vitro demandan fases gaseosas específicas para sustentar las demandas metabólicas de gametos y embriones. Los incubadores deben proveer una atmósfera controlable, pero la fijación de los niveles de CO_2, O_2 y N_2 requiere que los sensores que controlan tales niveles estén calibrados y que los dispositivos que homogenizan los gases dentro de los incubadores estén operativos. La

calibración y la revisión de la operación se efectúa por servicios técnicos asociados a las empresas que comercializan en el mercado interno. La falla en la calibración de sensores en incubadores recién adquiridos y en la operación de accesorios para la homogenización de la fase gaseosa, cada una en su oportunidad afectaron seriamente la eficiencia de producción de embriones *in vitro* y la operación de todo el proyecto.

2.2.5 Incapacidad uterina para la manutención de gestación unilateral de mellizos.

La producción de mellizos planificada consideró el depósito de dos embriones en el tercio basal del cuerno uterino adyacente al ovario con el cuerpo luteo, con los objetivos de generar una señal adecuada para la conservación del cuerpo luteo de gestación y para permitir el crecimiento de los embriones en ambos cuernos. Los resultados de gestación y supervivencia de embriones hasta los 40 días confirmó que el enfoque parecía adecuado. Sin embargo la tasa de partos y el número de mellizos nacidos fue muy inferior al diagnosticado. Asimismo, el tamaño de los terneros mellizos al nacimiento era excesivamente pequeño. Una reciente publicación (López-Gatius y Hunter, 2005) que estudió el efecto de las gestaciones de mellizos unilaterales y bilaterales, comparadas con las gestaciones de únicos producidas todas en forma natural después de inseminación artificial de vacas Holstein Friesian, mostró que la gestación de mellizos unilateral generaba pérdidas de gestaciones y de embriones en tasas similares a las obtenidas en nuestro trabajo. El problema fue definido como una reducción espontánea de las gestaciones que se produce después del día 45. El fenómeno no ocurre en gestaciones de únicos ni en gestaciones de mellizos bilaterales. La hipótesis de trabajo que se maneja en la unidad, es que la causa del problema puede ser una insuficiencia placentaria derivada de la competencia de embriones que se mantienen en el lugar de la transferencia y que deriva en pérdidas como las mencionadas pero también en reducción de tamaño de los terneros.

Desde una perspectiva económica, este problema es extremadamente serio porque el momento de las pérdidas (intervalo parto preñez de la vaca) y la baja tasa de nacimientos de mellizos afecta decisivamente la viabilidad práctica de este enfoque de producción de mellizos en ganado Holstein Friesian. Lo anterior demanda que esta limitación sea superada para siquiera evaluar económicamente la alternativa tecnológica desarrollada.

2.2.6 Problemas de gestión asociado a la resistencia de productores al uso de embriones de carne en periodos de saneamiento y reposición del rebaño, por un ciclo económico positivo para lecherías.

Los mellizos en ganado de leche son considerados un problema tanto por la experiencia de distocias y pérdidas perinatales asociadas como por problemas reproductivos colaterales que afectan la lactancia subsiguiente. Sumado a lo anterior, el crecimiento sostenido de las exportaciones de leche al exterior generan una demanda por producción de leche que se refleja en precios bases y premios por producción y calidad de leche que son atractivos para los productores. Este escenario ha generado una tendencia hacia el aumento de los tamaños de rebaño y en el énfasis por el saneamiento de los mismos. Las tasas de eliminación de la Holstein siguen siendo del 35%, sin considerar el saneamiento y crecimiento, por lo que es simplemente inviable aspirar a incorporar la tecnología de mellizos de carne en la medida que no se aborde paralelamente el problema de la reposición y crecimiento. Por lo anterior no ha sido posible generar atracción en rebaños comerciales de leche por incorporarlos al proyecto.

2.3. ADAPTACIONES Y MODIFICACIONES INTRODUCIDAS EN EL PROYECTO

2.3.1 Congelación de embriones producidos in vitro.

Mientras se perfeccionan los sistemas alternativos a la congelación convencional, en el presente estudio se utilizó la transferencia de embriones in vitro a receptoras intermedias para mejorar el potencial de congelación de estos embriones. Los oviductos de ovejas han mostrado soportar el desarrollo de embriones de bovinos y caprinos hasta estados de blastocistos independiente del estado del ciclo estral. El ambiente físico-químico existente permite simular el ambiente uterino in vivo, es muy uniforme entre animales y es posible transferir varios embriones a un oviducto, por lo mismo, es posible establecer comparaciones entre grupos experimentales transferidos a cada oviducto y a oviductos de otras hembras. Esto permitiría un avance metodológico considerable para definir cuales deberían ser las condiciones óptimas de congelación de los embriones producidos.

2.3.2 Sincronización de estros poco precisa en el modelo previsto (GnRH+PGF2α) y detección electrónica de estros con pérdidas de dispositivos en rebaños en pastoreo.

Se incorporó un esquema basado en progesterona (Eazy-Breed, Cooprinsem Ltda) y PGF2α que es menos vulnerable a condiciones de alimentación del rebaño y se encargó un nuevo sistema de detección basado en la marcación de hembras en calor para rebaños en pastoreo. El uso de dispositivos de liberación de progesterona intravaginal por un período corto tiene el atractivo de que utiliza las acciones promotoras de la fertilidad de la progesterona en el estro subsiguiente (predispone al útero a una reacción luteolítica adecuada, mejora la migración de gametos y la capacidad uterina de respuesta a señales embrionarias subsiguientes) y concentra la presentación de los estros cuando es combinado con una dosis luteolítica de PGF2α un día antes del retiro. La limitación es el riesgo de infecciones ascendentes en el tracto genital por el dispositivo de remoción del CIDR. El cambio aumentó la presentación y concentración de los estros en vacas Holstein.

El sistema de detección de estro implementado fue el Heat Mount Detector que corresponde a una cinta autoadhesiva que se coloca en la base de la cola y que experimenta un cambio en la coloración al momento de ser montada. Aún cuando este sistema demanda la observación sistemática de calores, la identificación de las vacas se facilita sustancialmente (ver metodología) a un costo muy inferior al sistema electrónico ($1.000 vs $95.000 pesos respectivamente).

2.3.3 Velocidad de operación de transferencia incompatible con la transferencia de números elevados de embriones.

Se diseñó una pipeta de conducción de acero inoxidable (ver figura 12) que se introduce a través del cérvix y que tiene un tope que impide una canalización extrema de la pipeta. Esta pipeta tiene una parte central que se remueve una vez posicionada y permite la canalización de las pipetas de transferencias directamente al útero sin manipulación cervical adicional.

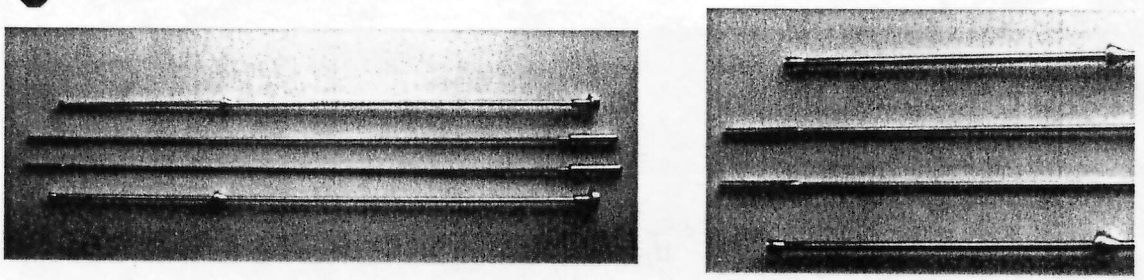


Figura 12. Pipeta de conducción transcervical. La parte central de la pipeta se remueve una vez localizada en posición correcta la que es facilitada por el tope en el extremo anterior.

2.3.4 Problema de calibración y manutención de incubadores.

Se trabajó con servicios técnicos más experimentados aún siendo más caros y se definió una manutención anual de todos los equipos determinantes en los resultados.

2.3.5 Incapacidad uterina para la manutención de gestación unilateral de mellizos.

El útero es incapaz de soportar gestaciones de mellizos basadas en un cuerno, pero si lo es cuando las gestación es bilateral. Como no existe migración transuterina en bovinos (como en ovinos y caprinos) el problema debe resolverse ubicando los embriones en ambos cuernos. La ubicación en ambos cuernos demanda la transferencia de ambos embriones con pipetas de transferencia diferentes, lo cual pone en riesgo la sanidad genital de las vacas por infecciones ascendentes, En este contexto la pipeta de conducción antes mencionada es un instrumento que puede reducir el riesgo de contaminación al aislar las pipetas de transferencia de contaminación en el tracto genital tubular posterior.

La validación de la hipótesis de insuficiencia placentaria es difícil en rebaños lecheros en ausencia del uso paralelo de semen sexado, como se describe mas adelante. Sin embargo se inició una evaluación en ganado de carne, debido a que el problema de insuficiencia debería ser propia de la especie y no debería constituir un problema racial. Se tiene contemplado, mientras se gestionan rebaños lecheros 50 transferencias bilaterales en rebaños Overo Colorado.

2.3.6 Problemas de gestión asociado a la resistencia de productores al uso de embriones de carne en periodos de saneamiento y reposición del rebaño, por un ciclo económico positivo para lecherías.

El problema de crecimiento y saneamiento de los rebaños lecheros Holstein Friesian hace poco atractivo la evaluación de alternativas de negocios como la inducción de mellizos de carne, particularmente con los riesgos asociados a pérdidas gestacionales tardías, muy negativas desde una perspectiva económica. Por lo anterior se espera la disponibilidad de semen sexado para producir paralelamente gestaciones hembras Holstein Friesian y dejar el tercio inferior del rebaño para explorar la posibilidad de la carne. Paralelamente se gestionará en lecherías de Osorno (alto número de animales sin las tasas de eliminación de la zona Centro-Sur) la producción de mellizos de carne hembras y de embriones hembras de la élite productiva. Cyagra Chile acaba de iniciar sus operaciones en Freire, Novena Región (el

proyecto sufrió un retraso de más de 6 meses) y se espera disponer de semen para comercializar en Marzo-Abril del 2006.

2.4 PROTOCOLOS USADOS EN EL TRANSCURSO DEL PROYECTO

2.4.1. Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta.

No hubo adaptaciones o modificaciones significativas en los procedimientos.

2.1.2 Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad.

2.4.2.1 Protocolo de Colección de COC

(a) Desde ovarios de matadero.

- Ovarios son colectados desde el ligamento ovárico y depositados en termos con suero fisiológico a 35°C.
- Termo es vaciado en receptáculo estéril y los ovarios son seleccionados para punción (ovarios con patologías evidentes y sin folículos > 2 mm en números mínimos son eliminados).
- Los ovarios son almacenados en un vaso de precipitado, desinfectados con alcohol de 70° y lavados con suero fisiológico temperado.
- Folículos > 2 mm son puncionados y el contenido aspirado a jeringas de 10 ml conectadas a agujas de 21G de 2,5 cm. El contenido es depositado en tubos estériles para la decantación del contenido celular.
- Sobrenadante de los tubos es eliminado y el contenido de los tubos es depositado en placas de petri estériles de 90 mm de diámetro.
- Los COC son identificados bajo lupa diascópica (20 x) y separados en una placa de petri estéril con medio H-199. Al terminar la búsqueda, el contenido de las placas de 90 mm es usado para la evaluación microbiológica de IBR y DVB. Los COC contenidos en las placas de 35 mm son seleccionados por compactación del cúmulus y color y homogeneidad del citoplasma oocitario.
- Los COC seleccionados son incubados para maduración.

Medio H-199.

Medio 199 con 25 mM de Hepes	100 ml
Heparina	5 ug/ml
Albúmina Sérica Bovina Fracción V	500 mg/100ml
Alcohol polivinílico	500 mg/100 ml
Kanamicina	15 mg/100 ml
PH	7.4
Esterilización	Filtración 0,22 µ
Almacenaje	Refrigeración

(b) Desde donantes vivas (colección quincenal).

Estimulación de desarrollo folicular

- Punción de folículos dominantes para control de la dinámica folicular

- A las 48 hrs después, aplicación de dosis superovulatoria de FSH repartida en 6 inyecciones administrada i.m. cada 12 hrs. Eliminación del cuerpo lúteo a la 5ª inyección de FSH con una dosis luteolítica de prostaglandina F2α.
- 12 hrs después de última inyección se efectúa la punción folicular de las donantes.

Punción folicular de donantes

- Sedación i.v. con acepromazina
- Limpieza y desinfección de región perineal y vestibular (con alcohol yodado)
- Inyección epidural baja de mepivacaina
- Introducción higiénica de sonda transvaginal con guía de orientación de aguja de punción estéril.
- Conexión de aguja de punción estéril con el sistema de vacío para aspiración de contenido folicular hacia tubos de colección (19 G; 60-80 mm Hg). La aguja es lavada con medio H-199 para cebar el lumen.
- Los ovarios son fijados por manipulación transrectal y la sonda transvaginal es presionada cranealmente de manera de oponerla contra la superficie ovárica a través de la pared vaginal. Se introduce la aguja de punción y se punciona cada uno de los folículos > de 3 mm y se aspira su contenido. La operación se repite en el otro ovario.
- Terminada la operación el lumen vaginal se lava con una solución antiséptica y la operación se repite con una nueva donante.

Identificación y aislamiento de los COC

- El contenido de los tubos es depositado en filtros de 70μ y el filtro es lavado con medio PBS suplementado con 5% de suero fetal bovino.
- El filtro es depositado en placas de petri estériles de 60 mm de diámetro con medio H-199 y el contenido es aspirado con micropipetas de 1 ml y depositado en el H-199.
- La suspensión es examinada bajo lupa diascópica y los COC son depositados en placas de 35 mm para su evaluación. Al igual que lo antes mencionado, los COC son calificados por morfología del cúmulus y el color y homogeneidad del citoplasma oocitario.
- Los COC seleccionados son incubados para maduración.

Medio PBS

2.4.2.2 Protocolo de Maduración de Oocitos

- Preparación de medio de maduración. Al medio de maduración se le adiciona 10% de suero fetal, FSH, LH, estradiol e IGF-1.
- Se agregan 200 μl de medio de maduración a placas de petri de 35 mm y se cubre con aceite mineral. Alternativamente se pueden utilizar placas de 4 pocillos sin aceite mineral pero con PBS en el espacio entre pocillos para evitar la deshidratación. Se deja incubar al menos 30 min.
- Se adicionan los COC una concentración de hasta 30 COC por gota.
- Se dejan incubar por 22-26 hrs a 5% de CO_2 en aire.

Medio de maduración oocitaria

Medio 199	100 ml
Glutamina	10 mg
Kanamicina	10 mg
FSH	0.1 UI/ml
LH	0.1 UI/ml
Estradiol	1 µg/ml
IGF-1	10 ng/ml
PH	7.4
Esterilización	Filtración 0.22 µm
Almacenaje	Refrigeración

2.4.2.3 Protocolo de Capacitación Espermática y Fecundación

Preparación del semen para capacitación

- Se prepara una gradiente discontinua de Percoll agregando 3 ml de una solución de 90% de Percoll en medio de lavado espermático (Talp spw) en el fondo de un tubo centrífuga estéril de 15 ml y otros 3 ml de una solución de Percoll de 45% del medio anterior (gradiente de 90 y 45%) de manera que se forme una gradiente que debe quedar separada por una línea notoria.
- Se deja incubando la gradiente a 35°C mientras se descongela el semen.
- El semen comercial (debe ser semen probado genéticamente) es descongelado en baños tibios (en función de las recomendaciones del centro de inseminación).
- Se seca y desinfecta la pajuela y se elimina el extremo sellado por ultasonido. Con un inyector se deposita suavemente el semen al tope de la gradiente, de manera que se forman 3 gradientes (semen, Percoll 45% y Percoll 90% en el fondo del tubo).
- Se centrífuga la suspensión por 30 min a 300 x g.
- Se elimina el sobrenadante y el pellet espermático se resuspende en 10 ml de medio Talp spw y se agita para homogenizar la suspensión. La preparación se vuelve a centrifugar a 250 x g por 10 minutos y el sobrenadante se elimina. Como el Percoll es tóxico para los embriones, puede repetirse la operación de lavado espermático.
- Finalmente el sobrenadante se elimina y los espermatozoides del pellet son cuantificados usando placas de Neubauer.

Preparación de la suspensión espermática para capacitación y fecundación

- Se incuba medio Talp de fecundación (Talp fiv) a 38.5°C y 5% de CO2 en aire por 20 min.
- Se ajusta la concentración de espermatozoides para los toros que van a ser usados usando tubos de ensayo de estériles de 5 ml y se deja incubar.
- Se sacan los COC en incubación y se suspenden en medio Talp spw preincubado.
- Se remueven mecánicamente las células del cúmulus en exceso pasándolos por pipetas pasteur de vidrio con punta elongada con temperatura.
- Los COC se lavan una vez más con medio Talp spw y se mantienen hasta completar la preparación espermática.

- Se adicionan 300 ul de la suspensión espermática en cada uno de los pocillos de placas de 4 pocillos y luego se depositan los oocitos en una concentración de hasta 30 COC por pocillo.
- Se incuba la preparación a 38.5°C y 5% de CO_2, 5% de O_2 y 90% de N_2 por 18 hrs.

Medio Talp Spw (Parrish et al., 1988)		Medio Talp Fiv	
NaCL	100 mM	NaCL	114 mM
KCl	3.1 mM	KCl	3.2 mM
$NaHCO_3$	25 mM	$NaHCO_3$	25 mM
NaH_2PO_4	0.3 mM	NaH_2PO_4	0.3 mM
Lactato de sodio	21.6 mM	Lactato de sodio	10 mM
$CaCl_2$	2.0 mM	$CaCl_2$	2.0 mM
$MgCl_2$	0.4 mM	$MgCl_2$	0.5 mM
Hepes	10 mM	Piruvato de sodio	1.0 mM
Piruvato de sodio	1.0 mM	BSA libre de á grasos	6.0 mg/ml
BSA Fracción V	6.0 mg/ml	Kanamicina	0.075 mg/ml
Kanamicina	0.075 mg/ml		

2.4.2.3 Protocolo de Cultivo de Embriones

(a) Cultivo completamente in vitro

- Preparación de medio SOF e incubación a 38.5°C y 5% de CO_2 en aire por al menos 20 minutos.
- Adición de 300 µl de medio en cada pocillo de una placa de 4 pocillos de cultivo e incubación hasta la adición de ova fecundados.
- A las 18-24 hrs pos inseminación, los ova son liberados mecánicamente de células del cúmulus pasándolos por pipetas pasteur con punta aguzada por temperatura.
- Los ova son adicionados a los medios de cultivo a una concentración de hasta 50 ova por pocillo y se incuban a 38.5°C y 5% de CO2, 5% de O2 y 90% de N2 por 5 días. A las 48 hrs los ova no segmentados son eliminados.
- Al quinto día los embriones son transferidos a medio Dulbecco para ser calificados morfológicamente bajo lupa diascópica (100x). Loe embriones grado 1 y 2 son transferidos en fresco.

(b) Cultivo en oviductos de ovejas

- Preparación de medio SOF e incubación a 38.5°C y 5% de CO_2 en aire por al menos 20 minutos.
- Adición de 2 ml de medio en una placa estéril de 35 mm y se deja en incubación por al menos 30 min.
- A las 18-24 hrs pos inseminación, los ova son liberados mecánicamente de células del cúmulus pasándolos por pipetas pasteur con punta aguzada por temperatura y se almacenan en la placa de 35 mm hasta su transferencia.
- Ovejas sexualmente maduras son dejadas en ayuno por 24 hrs y luego son sedadas con acepromazina e.v. La zona abdominal es depilada y la oveja es inducida a anestesia general con ketamina e.v. Una vez en la mesa quirúrgica, la oveja es intubada con un tubo endotraqueal y la oveja se conecta para anestesia

con halotano. Con la oveja bajo anestesia, el campo quirúrgico es desinfectado con alcohol yodado y aislado con un paño de campo.

- La transferencia de ova fecundados se hace directamente a oviductos ligados por un punto, utilizando catgut crómico 0, por lo que el tracto genital es expuesto a través de una incisión en la mitad de la línea media abdominal, iniciándose justa antes de la glándula mamaria. Los ova suspendidos en 10 µl de medio SOF son introducidos al oviducto a través del infundíbulo utilizando un catéter Tom Cat de 3.5 Fr y son dejados en el oviducto por 5 días. La herida es cerrada convencionalmente y la oveja recibe un dispositivo de liberación de progesterona intravaginal (Eazy Breed G) al momento del término de la operación.
- La recuperación de los embriones se hace al 5° día, accediendo al oviducto de la misma manera descrita y con la oveja bajo anestesia general. La sutura es removida y el infundíbulo es cateterizado con un tubo de 3 mm de diámetro asociado a tubos de colección de medio. El extremo anterior del cuerno uterino se punciona con una aguja roma y se inyectan hacia el oviducto 50 ml de medio Dulbecco que es recuperado por el tubo oviductal con los embriones suspendidos en el medio.
- La identificación y calificación de los embriones es hecha bajo lupa diascópica en medio Dulbecco de manipulación de embriones para su transferencia en fresco o su congelación.

Medio SOF

$CaCl_2$	25 mg
$MgCl_2$	10 mg
NaCl	580 mg
KCl	53.4 mg
KH_2PO_4	16.2 mg
$NaHCO_3$	220 mg
Piruvato	3.6 mg
Hepes	476 mg
Penicilina	6.3 mg
Estreptomicina	5.0 mg
Lactato de sodio	47 µl
Glutamina	14.6 mg
BSA libre de ácidos grasos	800 mg
Amino ácidos no esenciales	1 ml
Aminoácidos esenciales	2 ml
IGF-1	10 ng/ml
Agua milliq	100 ml
PH	7.4

Medio Dulbecco

$CaCl_2$	132.6 mg
$MgCl_2$	100.0 mg
KCl	200.0 mg
KH_2PO_4	200.0 mg
NaCl	7.600.0 mg
$Na\ H_2PO_4$	1.150.0 mg
D-glucosa	1.000.0 mg
Piruvato	36.0 mg
Penicilina	63.0 mg
Estreptomicina	50.0 mg
BSA Fracción V	3.840.0 mg
Agua milliQ	1.000.0 ml
pH	7.3

2.4.2.4 Protocolo de congelación y descongelación de embriones

- Los embriones colectados de oviductos de ovejas son lavados en forma seriada en gotas de 100 ml de medio Dulbecco y mantenidos a temperatura de laboratorio.

- Se adicionan los embriones en medio Dulbecco suplementado con 0.3M de sacarosa y 5% de glicerol y se deja equilibrar por 5 min.
- Los embriones son transferidos a Dulbecco suplementado con 0.3 M de sacarosa y 10% de glicerol.
- Se cargan las pajuelas de 0.25 ml de la siguiente manera: 1.5 cm de medio, burbuja de aire, 0.5 cm de medio, burbuja de aire, 0.5 cm de medio incluidos los embriones, burbuja de aire, 0.5 cm de medio, burbuja de aire, 1.0 cm de medio y sello de la pajuela.
- Las pajuelas son puestas en el porta pajuelas de los congeladores programados y se deja equilibrar 5 min a –7°C. Se efectúa el seeding presionando con una pinza metálica enfriada en nitrógeno líquido la gota de medio sobre el medio que porta los embriones. Se deja equilibrar otros 5 min y se inicia el enfriamiento a 0.5°C/min hasta los –35°C. Posteriormente las pajuelas se depositan directamente en nitrógeno líquido. Finalmente las pajuelas se almacenan en elos canastillos de los termos de almacenaje.
- Para descongelar los embriones, se prepara un baño maría a 25°C. Se remueve la pajuela y se mantiene 8 seg en el aire y luego se deposita en el baño por 30 seg.
- La pajuela es cortada en el área de sellado y los embriones son depositados por s min en medio Dulbecco suplementado con 0.3M de sacarosa y 5% de glicerol. Posteriormente el procedimiento se repite por otros 5 min en medio Dulbecco suplementado sólo con 0.3M de sacarosa. Finalmente los embriones son transferidos a medio Dulbecco base para ser evaluados y transferidos. En el procedimiento son muy útiles las placas de 4 pocillos.

2.4.2.5 Protocolo de transferencia de embriones

- Las vacas receptoras son introducidas a mangas de palpación y sedadas con acepromazina e.v., el cuerpo luteo es identificado y el recto es vaciado.
- La región perineal y vulvar es limpiada y desinfectada con toallas desechables y alcohol yodado.
- Se aplica una anestesia epidural baja usando mepivacaina.
- Se carga el embrión en pajuelas de 0.25 ml estériles y se prepara la pipeta de transferencia cubriéndola con una camisa sanitaria.
- Se abren los labios vulvares y se introduce la pipeta protegida hasta el fondo vaginal.
- Mediante manipulación transrectal la pipeta es introducida a través del cerviz y canalizada hacia el cuerno uterino adyacente al ovario con el cuerpo lúteo. La pipeta se introduce hacia tan profundamente como sea cómodo y el embrión es depositado.
- Cuando se utiliza la pipeta de conducción, la pipeta es protegida con una camisa sanitaria y es introducida de la manera descrita hacia el útero. Una vez alcanzada la cavidad uterina, la parte central es removida y una pipeta de transferencia es introducida hacia la mitad del cuerno uterino y los embriones son depositados (en el presente se busca hacerlo en ambos cuernos). Posteriormente ambas pipetas son removidas y la vaca es dejada descansar.

3. Protocolos de diagnóstico microbiológico de células somáticas y embriones.

3.1 Cultivo de células de la granulosa

Una vez recibido el tubo con células de la granulosa se agitó para dispersar las células en el medio. Dentro de la campana de flujo laminar se vaciaron aproximadamente 2 ml del medio de cultivo con células de la granulosa en un tubo estéril. Luego se identificó con el día y mes al que correspondía la muestra. Y se colocó en la estufa a 37°C incubándolo durante 48 hrs. observando el tubo diariamente al microscopio invertido para determinar el desarrollo del cultivo. Cuando el sistema de cultivo quedó montado se procedió a realizar la impronta de las células que sobraron para realizar la IFD que se compararía estadísticamente con las células cultivadas.

3.2 Inmunofluorescencia directa

3.2.1 Estandarización de la técnica de inmunofluorescencia para VHB-1.

Previo a cualquier uso de la técnica esta debió se estandarizada como se describe a continuación.

Se utilizaron 6 tubos con cultivo celular primario inoculado con 10^5 $DICT_{50}$(dosis infectante de cultivo de tejido 50) de VHB-1 Cepa Los Ángeles (1979) (Controles positivos) y 6 tubos con cultivo celular primario sin inocular (Controles negativos); donados gentilmente por el Laboratorio de Virología de la Universidad de Chile. Los controles fueron sometidos al protocolo de inmunofluorescencia directa descrito por Quezada *et al.* (1990), sometiendo los cultivos a distintas diluciones del anticuerpo marcado con fluorocromo (1:20, 1:40, 1:60, 1:80, 1:100 y 1:120) después se observó cada tubo en el Microscopio de Fluorescencia y se seleccionó la dilución más alta que diera el resultado como positivo. Esta dilución correspondió a 1:80.

3.2.2 Estandarización de la IFI para el diagnóstico de VDVB.

Para la estandarización se utilizaron laminillas de cultivos celulares de pulmón fetal bovino inoculadas con cepa NADL (donada por la Universidad de Chile, Dra. Celedón) y se estableció el siguiente protocolo. El anticuerpo primario se diluyó en diferentes concentraciones; 1/20; 1/60; 1/80; 1/100, y el anticuerpo secundario en iguales condiciones que el anticuerpo primario. Luego, en estas muestras de laminillas de cultivos pulmonares de bovino positivas y negativas a VDVB, se colocaron las diferentes concentraciones de anticuerpo primario y secundario siguiendo el siguiente orden para realizar la IFI: anticuerpo primario diluido a 1/20 con anticuerpo secundario diluido 1/20, luego el anticuerpo primario diluido 1/20 con el anticuerpo secundario diluido a 1/60 y se continuo de la misma forma hasta probar todas las concentraciones de anticuerpo primario y secundario. Se llevaron las muestras a observar al laboratorio de Bacteriología bajo el microscopio de fluorescencia (Marca NIKON) y se evaluó la mayor dilución en que se obtuvo una mejor resolución de la fluorescencia en muestras positivas y el menor ruido de fondo (background) en controles negativos.

3.4.3 Protocolo de Inmunofluorescencia para VHB-1.

La técnica de IFD que se realizó sobre células de la granulosa, consistió en tomar dos alícuotas (50 µl cada una) desde el tubo que contenía las células de la granulosa dispersas en el medio y colocar ambas alícuotas separadas (quedando dos frotis) en un mismo portaobjetos previamente identificado con el día y mes al que corresponde el pool. El portaobjetos con los frotis se secó en estufa a 37°C durante 1 hora para luego ser fijado en acetona fría durante 20 minutos, lavándolo luego en PBS pH 7.6 por 10 minutos. Luego se incubaron ambos frotis, durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda, con 20 µl de una solución que contenía PBS pH 7.6 y un conjugado de Inmunoglobulinas bovinas y Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (la dilución del anticuerpo fue previamente estandarizada). Después de la incubación se lavó la muestra en PBS pH 7.6 durante 15 minutos. Luego se realizó una contra - tinción con azul de Evans al 0.01% durante 1 min. Después se lavó la muestra dos veces en PBS pH 7.6 por 5 min. El exceso de liquido se dejó escurrir para finalmente realizar el montaje de las muestras colocando una gota de glicerina bufferada sobre la impronta, se cubrió con un cubreobjetos y se observó a través del Microscopio de Fluorescencia (Marca Nikon Mod. 218551) (Quezada *et al.*, 1990).

3.2.4 Inmunofluorescencia Indirecta para VDVB.

Los portaobjetos con las muestras fueron puestos en canastillos de vidrio y colocados en acetona fría para fijarlos, por 10 a 15 minutos. Se hicieron muestras de control positivo y negativo por cada muestra. Luego, fueron lavados con PBS (solución buffer fosfatada) pH 7,6 0,01M, durante 5 minutos. Para iniciar la IFI las muestras se confrontaron con un anticuerpo primario (Monoclonal Antibody WB162, Lab. Veterinary Agency, Reino Unido. Antimaus, Production in Rabbit) en un volumen de 20ul por muestra diluido según la concentración obtenida en la estandarización. Después se incubaron la muestra dentro de una estufa de cultivo a 37° C en cámara húmeda por 30 minutos, para que este anticuerpo reaccione con el antígeno del virus (Collen et al., 2002). Luego de la incubación la muestra se secó y lavó con PBS durante 5 minutos. Finalizado este paso se secó el portaobjeto y se confrontó con el anticuerpo secundario (Mouse Inmunoglobuline FITC código FO26T, DAKO / Dinamarca), aplicándose 20ul por muestra según la dilución obtenidas en la estandarización. Luego el portaobjeto se incubó en la estufa a 37° C por 30 minutos (Celedón *et al.*, 1998). Para que actúe el anticuerpo secundario sobre el complejo anticuerpo primario y antígeno. Transcurrido este tiempo se sacó la muestra y se lavó dos veces con PBS por 5 minutos, para luego teñirla con una solución azul de Evans al 0,01% por 60 segundos y posteriormente fue lavada con PBS por 5 minutos. Finalmente, las improntas se montaron con glicerina tamponada con PBS y se llevaron al Laboratorio de Bacteriología para observar en microscopio de fluorescencia a un aumento de 400X.

3.2.5 Cosecha de las células cultivadas

Después de 48 hrs. de cultivo se extrajo el tubo, se sustituyó el sobrenadante del medio de cultivo por PBS y con un asa fría, previamente esterilizada a calor directo en el mechero, se raspó el fondo del tubo donde estaban adheridas las células para luego realizar el mismo proceso de I.F.D. para VHB- 1 e I.F.I. para VDVB descrito previamente.

3.2.6 Observación del frotis

Desde cada pool de células se preparó un portaobjetos con dos frotis en él, para tener más seguridad al diagnosticar una muestra como positiva o negativa. Cada frotis fue observado al microscopio de fluorescencia en su totalidad; primero con aumento 10x y luego con aumento 40x, partiendo desde los bordes hacia el centro de cada frotis. Un frotis fue catalogado como negativo a la presencia del VHB-1 si, en el, no existió ninguna célula emitiera fluorescencia. Un frotis fue catalogado como positivo a l a presencia del VHB-1 si, en el, existía al menos una célula que emitiera fluorescencia. A su vez, basados en la cantidad de celulas positivas existentes en cada frotis se creó una escala de positividad, la cual graduaba cada frotis como levemente positivo (+), medianamente positivo (++) o altamente positivo (+++).

4. Descripción de las actividades y tareas ejecutadas para la consecución de los objetivos, comparación con las programadas, y razones que explican las discrepancias.

Línea de trabajo N° 1: Estandarización de un procedimiento de producción in vitro de embriones desde ovarios de mataderos, compatible con la inducción de mellizos en ganado lechero.

Actividad 1.1. Ajuste de condiciones óptimas de fecundación in vitro para los toros seleccionados por su potencial de producción de mellizos.

Se ajustaron las concentraciones adecuadas de heparina y de espermatozoides para los toros a utilizar en el programa de fecundación. Es una rutina que se incorporó por cada toro adquirido para el proyecto. La actividad se ajustó bien a las tareas programadas. La descripción detallada de la actividad se efectúa a continuación.

Experimento 1. Efecto de la heparina en la eficiencia de capacitación espermática in vitro de toros usados comercialmente.

Semen Aberdeen Angus Rojo y Holstein Friesian fue descongelado convencionalmente y separado del plasma seminal usando gradientes de Percoll y lavado. La concentración espermática fue evaluada y los espermatozoides fueron resuspendidos en una concentración de 0,2 x 10^6 esp/ml en medio FIV con 1.0, 2,5 y 5.0 µg/ml de heparina. Se prepararon gotas de 200 µl cubiertas por aceite mineral y se mantuvieron a 38,5°C y 5% de CO_2 en aire hasta la incubación de los oocitos. Se incubaron 10-12 oocitos por repetición y se usaron 3- 4 repeticiones dependiendo si las evaluaciones anteriores ameritaban una evaluación estadística de las diferencias. El criterio utilizado para definir la concentración de espermatozoides fue el de permitir tasas de fecundación subóptimas, de manera de facilitar la expresión del efecto de la heparina. La definición de la concentración de heparina a usar para cada toro fue la mínima concentración que permitía una máxima eficiencia de fecundación, medida como porcentaje de oocitos fecundados con relación a los oocitos incubados para fecundación.

Experimento 2. Efecto de la concentración espermática en la eficiencia de fecundación in vitro de toros usados comercialmente.

El semen utilizado anteriormente fue descongelado, separado del plasma seminal y resuspendido en medio FIV ajustando la concentración espermática a 0,35 y 0,7 x 10^6 esp/ml (concentración baja y alta respectivamente). Se prepararon gotas de 200 µl cubiertas por aceite mineral y se mantuvieron a 38,5°C y 5% de CO_2 en aire hasta la incubación de los oocitos. Se incubaron 10-12 oocitos por repetición y se usaron 3-4 repeticiones para verificar diferencias estadísticas. La eficiencia de fecundación se evaluó en términos de tasas de fecundación (porcentaje de oocitos fecundados con relación a los oocitos incubados para fecundación) y de segmentación (porcentaje de oocitos segmentados a > de 3 blastómeras a las 60-72 h de incubación, con relación a los oocitos incubados con espermatozoides).

La maduración oocitaria y la fecundación fueron evaluadas fijando los oocitos desnudos de células del cúmulus con aceto-alcohol por al menos 24 h (Gordon, 1994) y tiñiendo con aceto-lacmoid para observar directamente en el microscopio de contraste de fase las placas metafásicas y/o la presencia de pronúcleos y cola espermática respectivamente. La segmentación fue evaluada contando directamente las blastómeras segmentadas, bajo lupa diascópica (aumento de 64x).

Actividad 1.2. Comparación de los toros seleccionados por potencial de inducción de desarrollo embrionario in vitro.

Se compararon los toros en términos de eficiencia de fecundación y desarrollo embrionario (tasas de segmentación y de desarrollo a blastocistos). También estas tareas se incorporaron como rutina para cada toro adquirido en el marco del proyecto. La actividad se ajustó bien a las tareas programadas y se describe detalladamente a continuación.

Debido a que la eficiencia de fecundación para cada toro excedió el 90%, todos los toros entraron a evaluación para desarrollo embrionario. Con ese objetivo, los oocitos en contacto con espermatozoides fueron limpiados mecánicamente de espermatozoides y de células del cúmulus asociadas y fueron transferidos a gotas de medio SOF con aminoácidos por otros 6 días, a 38.5°C y 5% de CO_2 y 5% de O_2 como fase gaseosa. La evaluación del desarrollo embrionario fue efectuada cada 2-3 días al tiempo en que se renueva el medio de cultivo, para eliminar desechos metabólicos. La tasa de desarrollo a blastocisto fue calculada como el porcentaje de blastocistos obtenido con relación a los embriones segmentados a > de 3 células a las 60-72h en cultivo).

El desarrollo embrionario fue evaluado de acuerdo a parámetros morfológicos (Grados 1-4; Lindner y Wright, 1983) relacionándolos con la edad cronológica. Los blastocistos serán evaluados además funcionalmente de acuerdo a la capacidad de eclosionar in vitro luego de 10 días en cultivo (Gordon, 1994). Los toros a usar serán los que estén sobre la media del desarrollo embrionario de la raza.

Actividad 1.3. Optimización del uso de semen congelado comercial envasado en pajuelas.

Se fraccionaron dosis de semen y se compararon en términos de tasas de fecundación resultantes. Separar la dosis de semen en 4 fracciones es operativamente difícil y

muy arriesgado sanitariamente y el efecto económico que se obtiene es muy marginal para insistir en ese punto. Por lo mismo se compararon fracciones descongeladas convencionalmente vs las descongeladas en seco. La actividad se ajustó razonablemente al programa comprometido, pero a la largo mostró que este punto es irrelevante para el manejo de los costos cuando se trabaja con números grandes de oocitos (el valor del semen termina siendo un costo marginal). A continuación la descripción detallada de la actividad.

Semen comercial fue descongelado de manera convencional (37°C x 30" en baño maría) o cortado en dos fracciones, una de las cuales se mantuvo en nitrógeno líquido, y fue descongelado en seco a 30°C. El semen fue posteriormente procesado de la manera antes descrita y utilizado para inseminar oocitos madurados in vitro. Al semen descongelado sobóptimamente, se le incorporó una concentración adicional de espermatozoides a la incubación con oocitos de 20%, por la mayor mortalidad esperada. Se comparó las tasas de segmentación usando ambas partidas, con el objetivo de evaluar esta posibilidad de maximizar el uso del semen adquirido. Los datos fueron transformados por la técnica de Bliss y comparados por una prueba de t.

Actividad 1.4. Evaluación del costo de producción de embriones a partir de oocitos obtenidos de ovarios de mataderos.

Se calculó el costo de producción de embriones provenientes de ovarios de matadero en función de los insumos utilizados. La actividad se ajustó bien a las tareas programadas. Para el cálculo de costo se produjeron embriones in vitro utilizando machos seleccionados y a lo menos 3 partidas de medios de cultivo y 3 repeticiones por cada partida de medios de cultivo (ver Cuadro 5). El valor promedio de los embriones producidos se calcularon en base a los insumos utilizados.

Actividad 1.5. Evaluación funcional de los embriones producidos in vitro a partir de ovarios de matadero.

Se evaluaron funcionalmente los embriones en términos de tasa de eclosión a los 10 días desde la incubación de los oocitos para maduración y en términos de tasas de preñez. La actividad se ajustó bien a las tareas programadas.

Actividad 1.6. Evaluación del uso de la transferencia de embriones dobles para la producción de mellizos de carne en rebaños lecheros.

Se evaluó técnicamente la alternativa del uso de embriones económicos para la inducción de mellizos. Hubo ajustes metodológicos en la sincronización de estros y de gestión por la reticencia de la mayoría de los productores de leche a usar sus vientres básicamente por razones económicas. Se obtuvo información relevante para la actividad, por lo que puede considerarse que la actividad fue ejecutada con apego razonable al programa establecido. De cualquier forma suficiente para sacar conclusiones válidas.

Objetivo específico N°2. Estandarizar un procedimiento de obtención de embriones sexados de bajo costo, a partir de donantes vivas de alta calidad genética.

Línea de trabajo N° 2. Estandarización de procedimientos de producción segura de embriones sexados de donantes de alto mérito genético.

Se estandarizaron procedimientos para la producción segura de embriones desde donantes controlables microbiológicamente, sin embargo el semen sexado estará disponible en marzo-abril del presente año. Actividad pendiente de finalización.

Objetivo específico N°3. Estandarizar un procedimiento de prevención y control precoz de contaminación bacteriana y viral de cultivos de tejidos, aplicable a la producción de embriones in vitro.

Línea de trabajo N° 3. Estandarización de procedimientos de control de calidad microbiológica de los cultivos celulares.

Se estandarizaron los procedimientos de diagnóstico para los agentes más relevantes. La actividad se ajustó bien a las tareas programadas.

Objetivo específico N°4. Establecer y evaluar técnica y económicamente a nivel piloto un modelo de crianza rentable de terneros de carne en planteles lecheros, basado en la aplicación de las tecnologías estandarizadas, como una alternativa para la producción de terneros de carne en planteles de lechería.

Línea de Trabajo N° 4: Evaluación técnica y económica a nivel piloto de un modelo de crianza rentable de terneros de carne en planteles lecheros, basado en la aplicación de las tecnologías estandarizadas, como una alternativa para la producción de terneros de carne en planteles de lechería.

La información disponible es concluyente en el sentido que el modelo implementado en el presente proyecto no es viable económicamente utilizando la metodología de transferencia de embriones unilateral. La incapacidad uterina de soportar gestaciones de mellizos en los términos de inducción por transferencia de embriones unilaterales induce dos eventos que afectan decisivamente la alternativa tecnológica: (1) pérdidas tardías de gestaciones y embriones, afectando seriamente el intervalo parto-preñez y la productividad de terneros del modelo; y (2) tamaño reducido de los terneros al nacimiento, afectando los pesos al destete. Existen opciones tecnológicas que deben ser evaluadas para superar el problema. Actividad no finalizada.

5. Resultados del proyecto: descripción detallada de los principales resultados del proyecto.

Línea de trabajo N° 1: Estandarización de un procedimiento de producción in vitro de embriones desde ovarios de mataderos, compatible con la inducción de mellizos en ganado lechero.

Actividad 1.1. Ajuste de condiciones óptimas de fecundación in vitro para los toros seleccionados por su potencial de producción de mellizos.

La producción de embriones de bajo costo demanda la fecundación oportuna de una alta proporción de los oocitos inducidos a madurar y de una tasa de desarrollo embrionario eficiente. Una buena parte de este proceso se debe a los toros utilizados y por lo mismo la

selección de toros es una primera etapa para ajustar los procedimientos de producción de embriones in vitro. En los cuadros 1.1 y 1.2 se observan los resultados del ajuste de condiciones de fecundación para diversos toros modificando las concentraciones de heparina y del número de espermatozoides por dosis inseminante.

Cuadro 1.1. Efecto de la concentración de heparina en la eficiencia de fecundación de toros de uso comercial.

Toros	Repet[1]	Eficiencia de fecundación	
		Oocitos maduros Tasa (%)	Zonas pelúcidas intactas Tasa (%; espermatozoides en EPV)
Hobo			
1,0	4	33/45 (73.3)[a]	25/42 (59.5; 0.83 spz)[a]
2,5	4	23/46 (50.0)[ab]	13/42 (31.0; 0.36 spz)[ab]
5,0	4	17/46 (37.0)[b]	8/42 (19.0; 0.24 spz)[b]
Basin			
1,0	3	26/35 (74.3)	25/36 (69.4; 1.7 spz)
2,5	3	28/36 (77.8)	22/34 (64.7; 1.6 spz)
5,0	3	20/36 (55.6)	20/33 (60.6; 0.9 spz)
Drifter			
1,0	3	30/36 (83.3)	28/33 (84.8; 3.7 spz)
2,5	3	30/36 (83.3)	29/33 (87.9; 2.0 spz)
5,0	3	24/34 (70.6)	24/33 (72,7; 3.3 spz)
No Equal			
1,0	3	21/36 (58.3)	
2,5	3	22/35 (62.9)	
5,0	3	19/36 (52.8)	
Logan			
1,0	3	22/34 (64.7)	
2,5	3	20/33 (60.6)	
5,0	3	15/34 (44.1)	
Venture			
1,0	3	23/34 (67.6)	
2,5	3	22/36 (61.1)	
5,0	3	21/36 (58.3)	
Magic			
1,0	3	17/36 (47.2)	
2,5	3	18/36 (50.0)	
5,0	3	13/36 (36.1)	
Mysterius			
1,0	3	24/36 (66.7)	
2,5	3	24/36 (66.7)	
5,0	3	22/35 (62.9)	
Lantz			
1,0	3	32/38 (84.2)	

2,5	3	33/38 (86.8)	
5,0	3	29/37 (78.4)	
Copper			
1,0	3	21/35 (60.0)	
2,5	3	16/36 (44.4)	
5,0	3	15/36 (41.7)	
Emperor			
1,0	3	29/36 (80.5)	
2,5	3	30/36 (83.3)	
5,0	3	26/35 (74.3)	
Convincer			
1,0	3	24/34 (70.6)	
2,5	3	22/34 (64.7)	
5,0	3	25/34 (73.5)	

[1] Cada repetición equivalió a una partida de oocitos y una dosis de semen diferente.
Superíndices diferentes por dosis de heparina, indican diferencias significativas ($P< 0.05$)

Cuadro 1.2. Efecto de la concentración espermática en las tasas de fecundación y segmentación in vitro de toros de uso comercial.

Toros	Repetic (n)	Eficiencia de fecundación			
		Concentración baja[1]		Concentración alta	
		Fecundación (%)	Segmentación (%)[2]	Fecundación (%)	Segmentación (%)
Basin	3	27/36 (75.0)	40/62 (64.5)	32/36 (88.9)	76/109 (69.7)
No Equal	3	37/50 (74.0)	39/62 (62.9)	48/50 (96.0)	50/64 (78.1)
Lantz	3	34/34 (100)	36/79 (45.6)	31/32 (96.9)	38/80 (47.5)
Convincer	3	27/35 (77.1)	43/78 (55.1)	26/31 (83.9)	43/82 (52.4)
Venture	3	20/31 (64.5)	66/106 (62.3)	24/30 (80.0)	74/107 (69.2)
Logan	3	25/34 (73.5)	60/118 (50.8)	28/34 (82.4)	65/114 (57.0)
Magic	3	28/42 (66.7)	27/48 (56.3)	41/44 (93.2)	74/111 (66.7)
Copper	3	22/34 (64.7)	27/51 (52.9)	40/42 (95.2)	67/113 (59.3)
Mysterius	3	21/30 (70.0)	56/111 (50.5)	42/46 (91.3)	61/72 (84.7)
Hobo	3	23/30 (76.7)	25/45 (55.6)	41/48 (85.4)	50/80 (62.5)
Emperor	3	31/36 (86.1)	31/46 (67.4)	42/42 (100)	35/60 (58.3)
Drifter	3	37/42 (88.1)	37/59 (62.7)	35/36 (97.2)	30/51 (58.8)
Total					

[1] Concentración baja = 0.35×10^6 esp/ml; concentración alta = 0.7×10^6 esp/ml.
[2] > 4 células a las 60-72 hrs de incubación.

Como se observa en ambos cuadros, los toros pueden responder de manera diferencial en función de los parámetros considerados, sin embargo los niveles de heparina en el medio de fecundación pareció no influir de manera significativa y por lo mismo, en el resto del estudio sólo se consideró la concentración baja de esta molécula.

Actividad 1.2. Comparación de los toros seleccionados por potencial de inducción de desarrollo embrionario in vitro.

Ajustada las condiciones de fecundación para cada toro, el siguiente paso fue comparar directamente los toros por capacidad de fecundación y desarrollo de los mismos. De esta manera se puede seleccionar los toros a seguir utilizando en el programa de producción de embriones económico. En los cuadros 1.3, 1.4 y 1.5 se muestran los resultados de comparaciones efectuadas entre toros para diversas razas de interés.

Cuadro 1.3. Comparación entre machos con relación a la eficiencia de obtención de blastocistos in vitro.

Toros	Réplicas n	Eficiencia de fecundación	
		Tasa de segmentación[1] (%)	Tasa de desarrollo a blastocistos[2] (%)
No Equal	4	64/93 (68.8)	29/51 (56.9)
Logan	3	65/117 (55.6)	19/56 (33.9)
Venture	3	70/106 (66.0)	35/76 (46.1)
Basin	4	111/171 (64.9)	55/121 (45.5)
Magic	4	101/151 (66.9)	43/95 (45.3)
Mysterius	6	149/220 (67.7)	33/119 (27.7)
Lantz	3	78/169 (46.2)	17/58 (29.3)
Copper	5	117/226 (51.8)	46/141 (32.6)
Convincer	3	119/219 (54.3)	21/119 (17.6)
TOTAL	35	874/1.472 (59.4)	298/836 (35.6)

[1] > 4 células a las 60-72 hrs de incubación.
[2] Embriones transferibles a los 8 días en cultivo.

Cuadro 1.4. Otros toros seleccionados por fecundación y desarrollo para el estudio.

Razas Nombre del toro	Número de sesiones	Tasa de fecundación (%)	Tasa de segmentación (%)	Tasa de desarrollo[1] (%)
Overo Colorados				
Page	3	54/58 (93,1%)	138/152 (90,8%)	36/99 (36,4%)
Pate	2	62/75 (82,7%)	77/95 (81,1%)	n.a.
Squash	2	58/83 (69,9%)	61/81 (75,3%)	n.a.
Josult	2	80/88 (90,9%)	128/141 (90,8%)	52/128 (40,6%)
Mister A	2	106/130 (81,5%)	66/102 (64,7%)	n.a.
Renoolf	2	122/136 (89,7%)	74/117 (63,2%)	n.a.
Angus Rojo				
Drifter	3	117/125 (93,6%)	100/129 (77,5%)	44/87 (50,6%)
Basin	3	86/91 (94,5%)	65/77 (84,4%)	14/22 (63,6%)
Above y Beyond	3	75/79 (94,9%)	81/87 (93,1%)	n.a.

n.a.: no analizado

Cuadro 1.5. Resultados obtenidos por toro utilizado en sesiones de punción folicular de donantes.

Razas Nombre del toro	Número de sesiones de OPU	Tasa de segmentación (%)	Eficiencia de recuperación (%)[1]	Tasa de desarrollo[2] (%)
Overo Colorados				
Page	5	154/172 (89,5%)	80/154 (51,9%)	31/80 (38,8%)
Josult	8	200/228 (87,7%)	62/127 (63,5%)	62/127 (48,8%)
Angus Rojo				
Drifter	6	267/279 (95,7%)	199/267 (74,5%)	30/199 (15,1%)
Basin	5	165/192 (85,9%)	72/165 (43,6%)	31/72 (43,1%)
Above y Beyond	8	337/379 (88,9%)	244/337 (72,4%)	82/244 (33,6%)

[1] Recuperación promedio de oviductos de oveja.
[2] Desarrollo a mórulas compacta y blastocistos transferibles (grados 1 y 2).

Como se puede observar, existe una variación significativa en el potencial de fecundación y desarrollo que exhiben los toros a condiciones estandarizadas de producción de embriones. Esta capacidad se reconoce desde hace un tiempo (Gordon, 1994) y por lo mismo debe haber una etapa selectiva antes del uso de toros específicos para programas de producción.

Actividad 1.3. Optimización del uso de semen congelado comercial envasado en pajuelas.

En teoría, es posible reducir los costos del semen comercial usado, especialmente al usar toros de élite, fraccionando la dosis comercial. Lo anterior demanda la descongelación de la dosis en condiciones subóptima, lo cual podría no ser relevante considerando las concentraciones espermáticas usadas en fecundación in vitro. En el cuadro 1.6 se muestran los resultados al fraccionar la dosis en dos y descongelar la fracción a utilizar al aire tibio.

Cuadro 1.6. Comparación de la eficiencia de fecundación[1] de oocitos maduros, incubados con semen descongelado convencionalmente o una fracción de semen descongelado a temperatura de laboratorio.

Toros	Repeticiones (n)	Tasa de segmentación (%)	
		1 dosis	1/2 dosis
Drifter	3	51/87 (58,6)^{a2}	21/87 (24,1)^{b}
Basin	3	66/106 (73,3)^{d}	3/75 (4,0)^{e}
Magic	3	42/105 (40,0)^{f}	5/87 (5,7)^{g}
Total	9	159/298 (53,4)	29/249 (11,6)

[1] Tasa de segmentación > 4 células a las 72 hrs de incubación.
[2] Superíndices diferentes en líneas indican diferencias significativas ($P< 0,05$).

Los resultados muestran que para cada toro utilizado se produjo una caída significativa en las tasas de segmentación a las 72 hrs. La descongelación subóptima genera una menor supervivencia espermática pos descongelación y además, aumenta la liberación de moléculas especie-reactiva de los espermatozoides dañados (Holt, 2000, Gillan et al., 2004).

Estos fenómenos pudieron afectar las tasas de fecundación y desarrollo subsiguiente. Finalmente, como la eficiencia de fecundación fue muy alta, el valor comercial de las dosis pasó a ser un factor de costo muy poco relevante, por lo que se desechó el fraccionamiento de semen como rutina operacional.

Actividad 1.5. Evaluación funcional de los embriones producidos *in vitro* a partir de ovarios de matadero.

Definida las condiciones de fecundación *in vitro* y los toros a ser utilizados, la próxima etapa fue establecer el potencial de producción de embriones por esta tecnología. En el cuadro 1.7 se observan los resultados durante el estudio de la producción de embriones a partir de oocitos colectados desde ovarios de matadero y semen comercial seleccionado.

Cuadro 1.7. Resultados obtenidos con la producción de embriones in vitro a partir de punción folicular de ovarios de matadero.

	Resultado obtenido durante el estudio[1]	Meta operacional
Número de sesiones	52	
Número de ovarios utilizados	1023	
Número de oocitos promedio[2]	8.045/1023 (7,9/ovario)	8
Tasa de maduración	> 90 %	> 90%
Tasa de segmentación 2-C	4505/5160 (87.3)	> 75%
Tasa de segmentación 8-C	1330/2678 (49.7)	> 60%
Tasa de desarrollo embrionario (%)[3]	643/1810 (35.5)	> 35 %
Tasa de desarrollo embrionario (%)[4]	590/1218 (48.4)	> 35%

[1] Resultados acumulados informes 5,6 y 7.
[2] Principalmente vaquillas.
[3] Desarrollo a mórulas compacta y blastocistos transferibles con relación a 2 células.
[4] Con relación al desarrollo a 8 células.

Los resultados muestran que los procedimientos de producción de embriones *in vitro* superaron los indicadores en las que se basó la evaluación económica original. De acuerdo al estudio, por cada 100 oocitos incubados, se obtenían 14 embriones transferibles, mientras que en el presente estudio, considerando todo el periodo, se logró producir 15.4 embriones y más de 20 con el mejor manejo de las condiciones de incubación in vitro obtenidos hacia el final del estudio. Estos resultados se comparar favorablemente con las revisiones recientes del potencial de las tecnologías reproductivas avanzadas (Bousquet et al., 1999; Galli et al., 2003; Wheeler et al., 2006).

Objetivo específico N°2. Estandarizar un procedimiento de obtención de embriones sexados de bajo costo, a partir de donantes vivas de alta calidad genética.

La producción de embriones de donantes vivas fue relevante en el contexto del proyecto tanto por la seguridad sanitaria como porque el modelo en vacas Holstein debiera considerar la producción de embriones Holstein sexados para asegurar los reemplazos. Debido

a que el sexaje de semen para la producción moderna de embriones sexados sólo se inició el mes de diciembre, y se espera semen comercial en marzo-abril, en el marco del proyecto se puso énfasis en la producción de embriones desde donantes de carne para estandarizar los procedimientos que se usarán posteriormente.

2.1 Selección de donantes por estatus microbiológico.

En una primera fase se estableció el estatus microbiológico de las donantes de embriones para las enfermedades mas relevantes, usando los test mas sensibles. Así se usó Elisa para Brucelosis y Leucosis, tuberculina para TBC bovina e inmunodifusión para IBR y DVB. Los resultados se muestran en el cuadro 2.1.

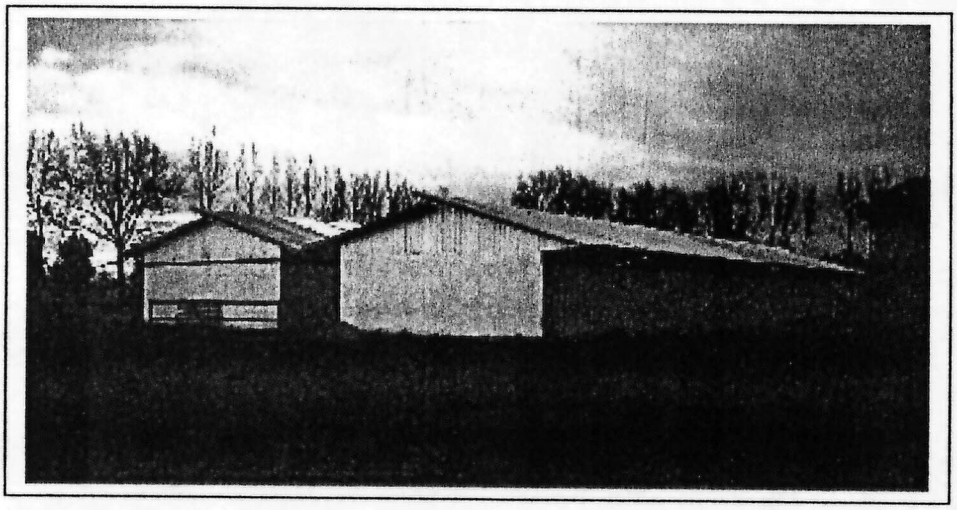
Cuadro 2.1. Resultado de los exámenes microbiológicos[1] de las donantes utilizada durante el presente estudio.

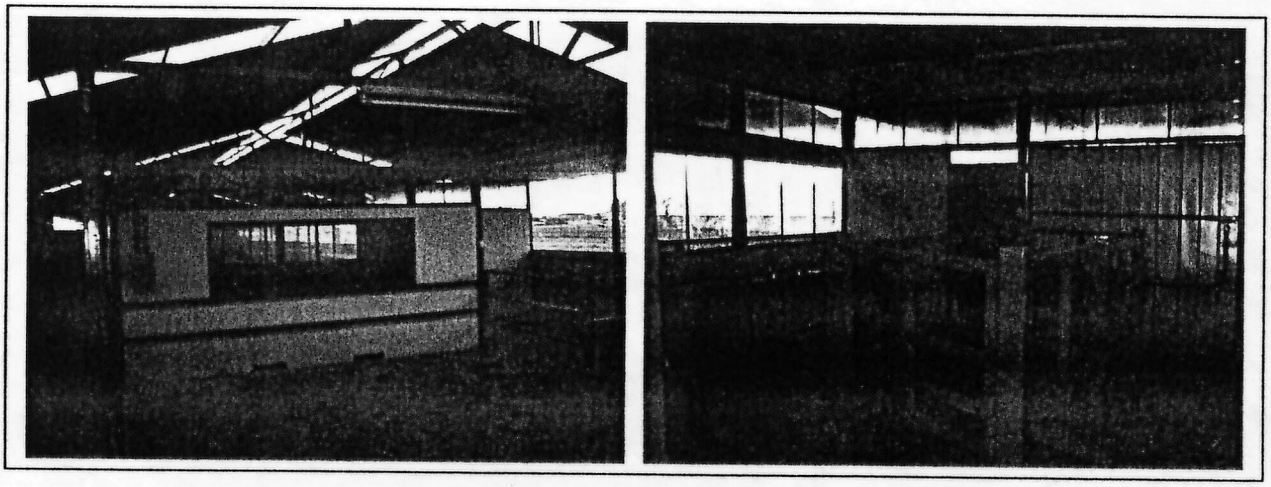
Donantes de oocitos	Enfermedades				
Raza y Número	Brucelosis	Tuberculosis	Leucosis	Diarrea Viral	IBR
Holstein Friesian					
1	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N
Murray Grey					
1	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N
Overo Colorado					
1	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N
Angus Rojo					
1	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N

Como se puede observar, todas las donantes fueron libres de enfermedades infecciosas relevantes y de hecho, se utilizaron como controles negativos para algunas pruebas microbiológicas de diagnóstico. Se preservó el estatus de los animales restringiendo el movimiento de personas y animales a las diferentes áreas de la Facultad.

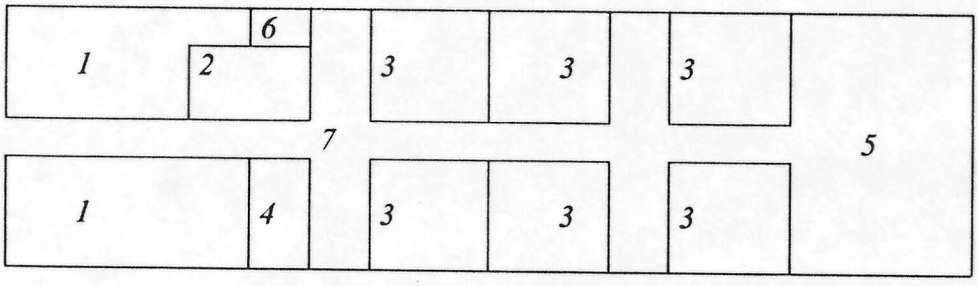
2.2. Establecimiento de medidas cuarentenarias de prevención de enfermedades.

El control de la contaminación de los animales se efectuó limitando el movimiento de vacas y ovejas entre áreas de riesgo y restringiendo el movimiento de personal en esas áreas. Componentes importantes de esta operación fue la construcción de un galpón de almacenaje de animales y forraje dotado de una unidad de punción folicular (financiada por el FIA) y el cierre de los potreros con mallas de seguridad. En las imágenes siguientes se muestran tanto el galpón y su unidad de punción como el área de seguridad implementada.





Galpón de almacenaje de animales y forraje



1.Pabellón de vacas
2.Módulo de punción (OPU)
3.Corrales de ovejas
4. Corrales de aislamiento de infecciosos
5.Almacenaje de forraje
6. Oficina
7. Pasillos
Escala: 1 cuadrado = 9 mt²

Ubicación geográfica en la Facultad de Medicina Veterinaria

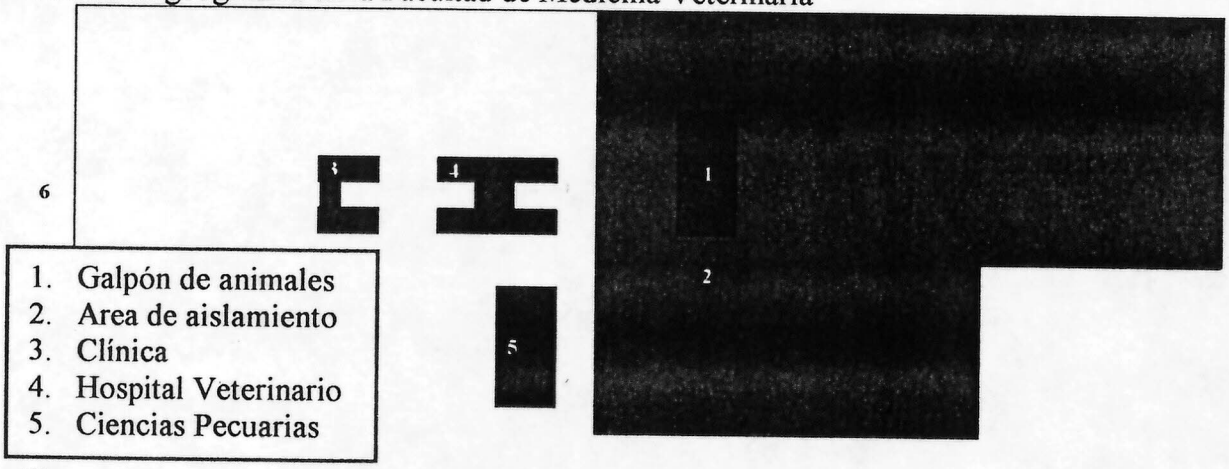


Figura 2.1. Imágenes y esquemas del área de cuarentena implementada en la Facultad de Medicina Veterinaria para la operación del proyecto.

2.3 Producción segura de embriones de carne para ser usados en la estandarización de los procedimientos de transferencia de embriones de mellizos en ganado Holstein.

Los procedimientos de producción de embriones in vitro desde donantes vivas se basó en la colección de oocitos por punción folicular asistida por ecografía (OPU). Los resultados obtenidos durante el estudio se muestran en el cuadro 2.2.

Cuadro 2.2. Resultados obtenidos con la producción de embriones *in vitro* a partir de punción folicular asistida por ecografía en donantes vivas.

	Resultados obtenidos durante el estudio[1]	Meta operacional
Número de sesiones de OPU	77	
Eficiencia de colección OPU (%)	4015/6751 (59.5)	> 50%
Tasa de maduración (%)	> 90	> 90%
Tasa de fecundación (%)	395/436 (90.6)	> 85%
Tasa de segmentación 2-c (%)	3378/3777 (89.4)	> 75%
Desarrollo a blastocistos (%)	796/1797 (44.3)	> 35%

[1] Resultados acumulados informes 3,4,5,6 y 7.

Al igual que para los embriones obtenidos desde ovarios de matadero, los procedimientos implementados permitieron una producción eficiente de embriones, que satisficieron las metas operacionales, aún considerando que durante un tiempo significativo del estudio se trabajó en condiciones subóptimas de incubación. Los resultados globales pueden comparares con los usados para definir los costos de los embriones producidos desde donantes y podrá apreciarse el impacto de los problemas de incubación.

3. Estandarización de procedimientos de control de calidad microbiológica de embriones y cultivos

Implementación de sistemas de diagnóstico de enfermedades virales y bacterianas en líquido folicular, cultivos celulares y embriones.

Resultados de la estandarización de protocolos para diagnóstico VHB-1

La técnica de IFD para ser aplicada sobre células de la granulosa queda estandarizada, principalmente debido a que los controles positivos resultaron positivos y los controles negativos resultaron negativos; esto implica que el anticuerpo funciona al ser aplicado sobre células de la granulosa. En la estandarización, la máxima dilución que otorgó resultados positivos evidentes es 1:80. En el cuadro 3.1 se muestran los resultados obtenidos al diagnosticar VHB-1 mediante IFD sola y asociada a cultivo, dispuestos en una tabla de contingencia de 2x2.

Cuadro 3.1. Resultados obtenidos al diagnosticar VHB-1 en células de la granulosa mediante IFD e IFD asociada a cultivo celular.

Tipo de diagnóstico		IFD		
		Positivos	Negativos	Total
Cultivo + IFD	Positivos	1	4	5
	Negativos	0	35	35
	Total	1	39	40

Del total de pools (40) solo uno resultó positivo a ambos métodos de diagnostico, 4 de los 40 pools resultaron negativos a la I.F.D. sin cultivo y positivas a Cultivo asociado a I.F.D. No hubo pools positivos a I.F.D. sin cultivo y negativos a la asociación de cultivo e I.F.D. y 35 resultaron negativos a ambos métodos. En la figura 3.1 se describen los resultados del cuadro anterior.

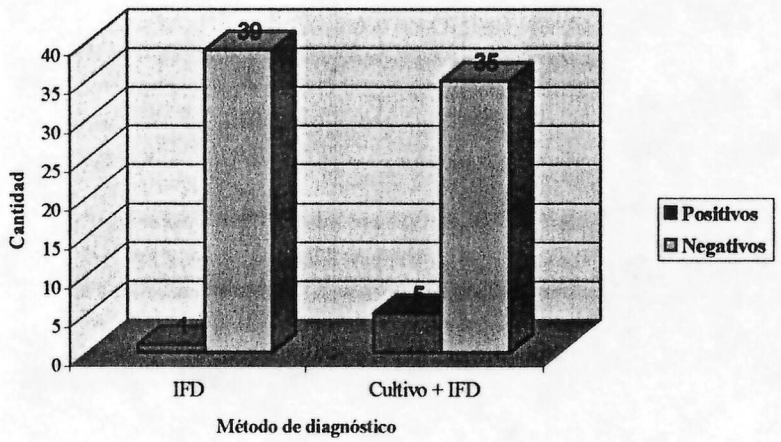


Figura 3.1. Cantidad de pools positivos y negativos al aplicar la técnica de I.F.D. ycultivo más I.F.D. en células de la granulosa para diagnosticar VHB-1.

La prueba de I.F.D fue aplicada sobre 40 (100%) pools de células de la granulosa sin cultivar; de los cuales 39 pools (97,5%) resultaron negativos a la presencia de VHB-1 y 1 pool (2,5%) resultó positivo a VHB-1. Sin embargo al aplicar la I.F.D sobre estos mismos 40 pools de células de la granulosa pero después de 48 horas de cultivo, 35 pools (87,5%) resultaron negativos al VHB-1 y 5 pools (12,5%) resultaron positivos a la presencia del VHB-1.

Resultados diagnóstico VDVB por IFI

La técnica de IFI para ser aplicada sobre células de la granulosa queda estandarizada, principalmente debido a que los controles positivos resultaron positivos a la técnica de IFI y los controles negativos resultaron negativos a la técnica de IFI; esto implica que los anticuerpos utilizados, reaccionan con los antígenos de superficie de las células de la granulosa produciendo la fluorescencia en casos positivos o no en casos negativos. En la

estandarización, la máxima dilución que otorgó resultados positivos evidentes es de 1:80. En el cuadro 3.2 se muestran los resultados obtenidos al diagnosticar VDVB mediante IFI sobre muestras de células de granulosa cultivadas y no cultivadas, ordenados en una tabla de contingencia de 2x2.

Cuadro 3.2. Resultados obtenidos a través de IFI aplicada sobre células de granulosa cultivadas y no cultivadas en el diagnóstico del VDVB.

Tipo de diagnóstico		IFI + No cultivo		
		Positivos	Negativos	Totales
	Positivos	1	4	5
Cultivo + IFI	Negativos	0	51	51
	Totales	1	55	56

Los resultados muestran que del total de pools (56), sólo uno resulto positivo a ambos métodos de diagnostico, cuatro de los cincuenta y seis pools resultaron negativos a la IFI sobre células no cultivadas y positivas a células previamente cultivadas aplicando la misma técnica. No se encontraron pools positivos a IFI sin cultivar y negativos a muestras que fueron previamente cultivadas. Del total de muestras cincuenta y uno fueron negativas a las dos técnicas utilizadas. Según estos resultados, uno de los dos métodos ha logrado detectar como positivo al VDVB en células de granulosa que el otro método detecta como negativo. La variación entre la aplicación de la técnica de IFI sobre células no cultivadas 1,78% (1/56) y cultivadas 8,92% (5/56) corresponde a un 7,14%, es decir, que al utilizar células cultivadas mejora el diagnostico, a través de IFI del VDVB.

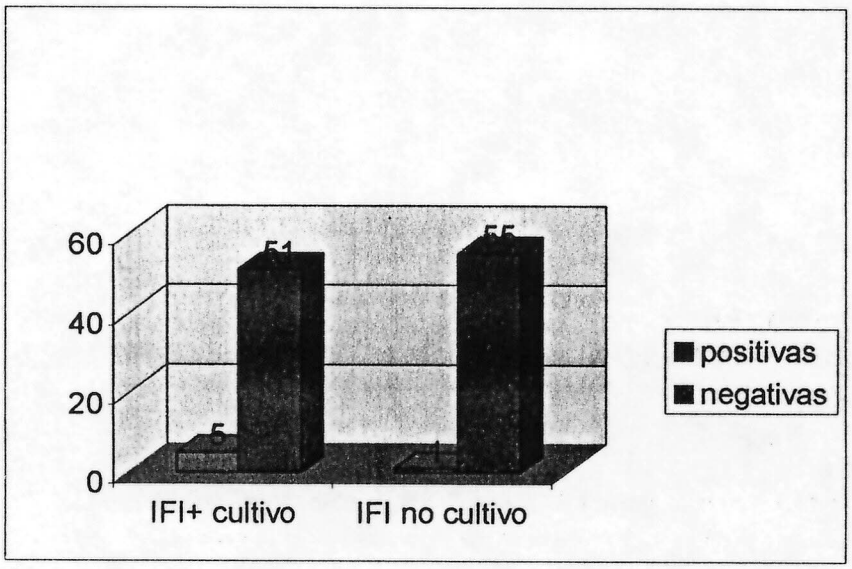


Figura 3.2. Comparación de muestras positivas y negativas, aplicando IFI en cultivo y no cultivo de células de granulosa para el diagnóstico del VDVB.

En la figura 3.2 se observa la comparación de muestras positivas y negativas, obtenidas por aplicación de IFI sobre células de granulosa cultivadas y no cultivadas para el diagnostico del VDVB.

La técnica de IFI fue aplicada sobre 56(100%) pools de células de granulosa no cultivados obteniéndose 1 pools (1,78%) de muestras positivos y 55 pools (98%) de muestras negativas al VDVB. Sin embargo, al aplicar la IFI sobre células de granulosa cultivadas durante 48hrs. se obtuvieron 5 pools (8.9%) de muestras positivas y 51 pools (91%) de muestras negativas. En la Figura 3.2 se observa células de granulosa positivas a IFI para VDVB.

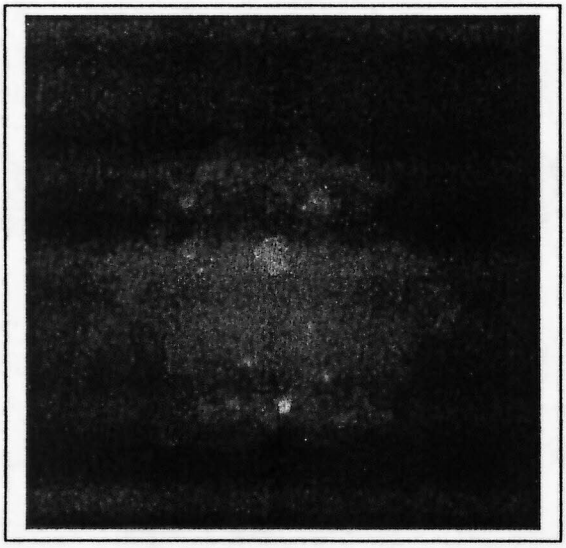


Figura 3.2 Imagen de células de granulosa positivas a IFI para VDVB

Resultados en el diagnóstico de células somáticas y embriones utilizados en el programa *in vitro* con ovarios provenientes de matadero.

La implementación de los procedimientos de diagnóstico precoz permitió tener un nivel de control de los cultivos destinados a la producción de embriones que evitó la posibilidad de propagación de las virosis, aún cuando varios de los predios ya presentaron nivels de prevalencia (ver cuadro 3.4). Sin embargo los animales receptoras eran libres y persistieron libres a IBR y DVB.

Cuadro 3.3. Estatus de IBR y DVD en cultivos y embriones derivados de los sistemas de producción in vitro

Presencia Viral	Resultados
Sólo IBR	6/52 (11,5%)
Sólo DVD	10/52 (19,2 %)
IBR y DVD	2/52 (3,9 %)
Total de cultivos contaminados	14/52 (26,9 %)

Cuadro 3.4. Estatus de IBR y DVD en rebaños participantes del proyecto FIA

Predio	DVD	IBR	DVD + IBR
San Bernardo	6/65 (10.8 %)	No	No
La Serena	6/43 (14.0 %)	4/43 (9.3 %)	3/43 (7.0 %)
El Tranque	11/56[1] (19,6 %)	4/56 (7,1 %)	No
Arauco	9/76 (11,8%)	6/76 (7.9%)	No
Total evaluado	32/ 240 (13.3%)	14/175 (8.0%)	

4. Producción segura de embriones de carne para ser usados en la estandarización de los procedimientos de transferencia de embriones de mellizos en ganado Holstein.

4.2 Sincronización y control de estros en rebaños pilotos.

La concentración de estros permite la operación de transferencia en un número programado de animales, lo que reduce los costos. Es importante por lo mismo disponer de esquemas de sincronización efectivos en términos de inducción y distribución de estros. En el cuadro 4.1 se observa los resultados de la comparación del esquema originalmente propuesto y el esquema alternativo a base de progesterona.

Cuadro 4.1. Resultados transitorios de esquemas de sincronización de estros

Tratamiento	Vacas tratadas n	Vacas en estro (%)	Vacas en estro en 24 hrs
GnRH (día0) + PGF2α (día 7)	22	14/22 (63.6)	8/14 (57.1 %)
Progesterona (7 días) + PGF2α (día 6)	18	16/18 (88.9)	12/16 (75.0 %)

Las diferencias observadas en el estudio sugirió la implementación del esquema a base de progesterona que mostró mayor eficiencia. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios recientes en vacas Holstein (Thatcher et al., 2006), que presenta menos vulnerabilidad a la alimentación que el a base de GnRH y PGF2α (Cox et al., 2000).

4.3 Optimización de procedimientos asociados a la transferencia de embriones producidos in vitro sexados y mellizos.

No existe información de la importancia relativa de la sincronización entre donantes y receptoras en las tasas de gestación obtenidas en programas de embriones in vitro. En el cuadro 4.3 se muestran los resultados obtenidos en el presente proyecto.

Cuadro 4.2. Efecto de la sincronía entre donante de embriones y la receptora en las tasas de gestación en vacas Holstein.

Grado de sincronía donante-receptora	Número de receptoras	Tasa de preñez	Tasa de mellizos
+ 2 días	11	3/11 (27,3%)	2/3
+ 1 día	33	17/33 (51.5%)	11/17
0 día	55	24/55(43.6%)	18/24
- 1 día	25	10/25 (40.0%)	6/10
Total	**124**	**54/124 (43.5%)**	**37/54 (68.5%)**

Los resultados muestran que a medida que los embriones se alejan de una sincronía 0, las tasas de preñez empiezan a decaer. Esto se conoce desde hace tiempo en los programas de embriones (Gordon, 1994) por lo que los esquemas de sincronización debieran ser implementados para que la presentación de los estros sigan este patrón.

El otro elemento importante de considerar es el balance energético de las vacas lecheras. La demanda energética generada por la lactancia afecta en forma relevante la eficiencia reproductiva (Thatcher et al., 2006; Vascocelos et al., 2006), por lo mismo una suplementación en periodos deficitarios mejora la supervivencia embrionaria pos transferencia. El cuadro 4.3 muestra los resultados de la suplementación en las tasas de preñez obtenidas con embriones *in vitro*.

Cuadro 4.3. Efecto de la suplementación energética y proteica de las receptoras en las tasas de supervivencia de embriones producidos *in vitro*.

Parámetros evaluados	Tipo de alimentación	
	Sin suplementación	Con suplementación
Número de vacas	20	20
Tasa de preñez	5/20 (25.0%) [a1]	13/20 (65.0%) [b]
Tasa de partos	4/5 (80.0%)	11/13 (92.3%)
Tasa de partos de mellizos	1/5 (20.0%)	4/11 (36.4%)

[1] Superíndices diferentes indican diferencias significativas.

Los resultados muestran un mejoramiento significativo en las tasas de supervivencia embrionaria una vez implementada la suplementación energética y proteica, reflejando la importancia del balance nutricional en los resultados de programas reproductivos. Es interesante considerar que en ausencia de suplementación, los resultados reproductivos son similares a los obtenidos en programas de inseminación artificial (ver cuadro 4.8) y podría ser la base de la mejor eficiencia reproductiva de los programas de embriones en términos de tasas de gestación a los 35 días que la inseminación artificial.

En los cuadros 4.4 y 4.5 se muestran los resultados de la producción in vitro de embriones a partir de ovarios de matadero y de donantes vivas respectivamente. Estos resultados sirvieron de base para la estimación de los precios de embriones para mellizos y para crías finas (cuadros 4.6 y 4.7).

4.5 Evaluación funcional de los embriones producidos in vitro a partir de donantes y ovarios.

No basta tener una buena eficiencia de producción de embriones, además los embriones tienen que mantener su potencial de desarrollo. La manera de evaluar ese potencial *in vitro* e *in vivo* es mediante las tasas de eclosión y las de preñez respectivamente. En ambos casos los eventos pasan por disponer de embriones activos tanto en la lisis de la zona pelúcida como en lo mismo más en la actividad sintética que permita preservar el cuerpo lúteo de gestación. Las tablas 4.4 y 4.5 muestran la eficiencia de los procedimientos de producción y la funcionalidad de los embriones producidos.

Cuadro 4.4. Resultados de producción de embriones obtenidos de ovarios de matadero. Comparación con el informe anterior y con la meta operacional.

	Resultados obtenidos en el periodo	Resultados del Informe N° 6	Meta operacional
Número de sesiones	9	27	
Número de ovarios usados	253	534	
Número de oocitos obtenidos (promedio)	1833/253 (7,2/ovario)	4291/534 (8.0/ovario)	8,0/ovario (vaquillas)
Tasa de maduración	> 90%	> 90%	> 90%
Tasa de segmentación 2-c (%)	1360/1488 (91.4)	2355/2741 (85.9)	> 75%
Desarrollo embrionario (%)[2]	444/1360 (32,6)	448/1318 (34.0)	> 35%
Tasa de preñez pos transferencia de embriones. Resultados acumulados[1]	71/152 (46.7)	53/114 (46.5%)	> 50%
Tasa de eclosión (%)	386/444 (86.9)	No analizado	> 80%

[1] Considera gestaciones de embriones de donantes y de ovarios de matadero.

Cuadro 4.5. Resultados de la producción de embriones in vitro a partir de punción folicular asistida por ecografía de donantes.

	Resultados informe del periodo	Resultados informes 5 y 6	Meta operacional
Número de sesiones OPU (donantes)	6	39	
Eficiencia de colección OPU (%)	360/627 (57.4)	1376/2197 (62.6)	> 50%
Tasa de segmentación 2-c (%)	313/342 (91.5)	1114/1228 (90.7)	> 75%
Desarrollo a blastocistos (%)	180/313 (57.5)[a1]	200/704 (28.4)[b]	> 35%
Tasa de preñez pos transferencia de embriones. Resultados acumulados[2]	71/152 (46.7)	53/114 (46.5%)[3]	> 50%
Tasa de eclosión a los 10 días (%)	105/129 (81.4)	No analizado	> 80%

[1] Superíndices diferentes indican diferencias significativas.
[2] Considera gestaciones de embriones de donantes y de ovarios de matadero.
[3] Resultados acumulados a septiembre del 2004.

Los resultados obtenidos son de alta eficiencia y permiten reducir los costos en forma significativa con relación a embriones convencionales. En este estudio, los indicadores de normalidad funcional en maduración, fecundación y desarrollo embrionario son de alto nivel comparado con los parámetros que se manejan en países desarrollados (Galli et al., 2003) y

ponen en evidencia la importancia de la buena calibración de equipos, además de los buenos procedimientos implementados.

En los cuadros 4.6 y 4.7 se describe los supuestos utilizados y los costos calculados para embriones producidos *in vitro* a partir de oocitos obtenidos desde ovarios de matadero y de donantes vivas. El enfoque fue conservador y considerando que existen variaciones entre partidas de oocitos, pero no considera los errores de manutención de equipos que definieron los resultados promedios del estudio.

4.6 Evaluación del costo de producción de los embriones producidos in vitro a partir de donantes y ovarios.

a. Costos de producción de embriones desde donantes.

Supuestos utilizados:

Promedio de oocitos obtenidos por vaca: 20
Tasa de segmentación: 85%
Tasa de desarrollo embrionario: 50%
Promedio de embriones/donante/sesión: 8.0
N° vacas por sesión: 6

Cuadro 4.6. Planilla de cálculo de costo para embriones de matadero.

Personal

Tipo de personal	N° horas requeridas	Valor unitario hora ($)	Valor total ($)
Médico Veterinario 1	6	15.000	90.000
Médico Veterinario 2	4	10.000	40.000
Técnico 1	12	3.000	36.000
Técnico 2	6	3.000	18.000
Total			184.000

Insumos

Tipo de insumo	Cantidad	Valor unitario ($)	Valor total ($)
Ovejas	1	35.000	17.500
Alimentación y manejo ovinos	120 días	200	12.000
Cirugía abdominal	2	12.500	12.500
Maduración oocitaria	1	16.400	4.100
Alimentación y manejo de vacas	15	500	7.500
Control dinámica y estimulación hormonal	1	33.960	33.960
Punción folicular	1	31.980	31.980
Fecundación	1	17.200	8.600
Cultivo de embriones	1	9.750	9.150
Congelación	1	10.500	10.500
Amortización y manutención de equipos	1	Manutención anual Amortización 5 años	18.750
Gastos generales	1	Aseo, agua, luz y gas	2.500

Total			169.040

Total de la operación: $ 353.040 pesos
Total por embrión: 41.534 US$ 79.87

b. Costos de producción de embriones desde ovarios de matadero.
Supuestos utilizados:
N° de ovarios por sesión: 60
Promedio de oocitos incubados/ovario: 8
Tasa de segmentación (2-C): 85%
Tasa de recuperación desde oviductos de ovejas: 75%
Tasa de desarrollo a blastocistos transferibles: 30%
N° final de embriones por sesión: 92 (46 set de mellizos)

Cuadro 4.7. Planilla de cálculo de costo para embriones de donantes.
Personal

Tipo de personal	N° horas requeridas	Valor unitario hora ($)	Valor total ($)
Médico Veterinario 1	10	15.000	150.000
Médico Veterinario 2	4	15.000	60.000
Técnico 1	12	4.000	48.000
Técnico 2	6	4.000	24.000
Total			274.000

Insumos

Tipo de insumo	Cantidad	Valor unitario ($)	Valor total ($)
Ovejas	1	35.000	35.000
Alimentación y manejo	120 días	200	24.000
Cirugía abdominal	2	12.500	25.000
Maduración oocitaria	1	16.400	16.400
Fecundación	1	17.200	17.200
Cultivo de embriones	1	9.750	9.150
Congelación	1	10.500	10.500
Amortización y manutención de equipos	1	Manutención anual Amortización 5 años	75.000
Gastos generales	1	Aseo, agua, luz y gas	10.000
Total			222.250

Costo total de la operación: $ 496.250 pesos
Costo total del set de mellizos (congelados): $ 10.788 pesos (US$ 20.7 dólares)

4.7 Monitoreo y registro de variables productivas y reproductivas del rebaño.

En el cuadro 4.8 se muestran los resultados productivos de la tecnología de embriones inserta en un sistema productivo comercial. Estos resultados están sujetos a la realidad operacional y financiera de la explotación. Asimismo, la resistencia a la producción de mellizos de carne en vacas fue evidente tanto desde la perspectiva productiva de las vacas como de la coyuntura económica del sector lácteo.

Cuadro 4.8. Comparación de la eficiencia reproductiva de la transferencia de embriones producidos *in vitro* con relación al uso de inseminación artificial.

	Tipo de Reproducción		
Parámetros evaluados	**Inseminación Artificial**	**Transferencia de Embriones**	
Supervivencia embrionaria			
Numero total de hembras	56	61	
Tasa de gestación servicio (%)[1]	15/56 (26.8)[a]	27/61 (44.3)[b]	
Tasa de gestación de mellizos(%)	0/11 (0.0)	19/27 (70.4)	
Tasa de supervivencia fetal a los 35-40 días (%)	No evaluada	46/122 (37.7)	
Número de embriones perdidos posterior a los 35 días (%)	1/15 (6.7)[a2]	21/46 (45.7)[b]	
Número de gestaciones a término	14/15 (93.3)[a]	18/27 (66.7)[b]	
Tipo de Gestaciones	**Simples**	**Simples**	**Dobles**
N° de gestaciones a término	14	12/18 (67.7%)	6/18 (33.3%)
Duración de gestación (Promedio ± DE)	280±3.0[a]	276.2±9.4[a]	271.6±7.4[a]
Tasa de partos normales (%)	14/14 (100)	12/13 (92.3)	6/6 (100)
Peso de los terneros, Kgs (Promedio ± DE)	No evaluado	42.1±6.8[a]	28.3±4.8[b]
Supervivencia perinatal (%)	14/14 (100)	12/12 (100)	9/12 (75,0)
Pesos de los terneros a los 90 días (Promedio ± DE)	No evaluado	83.8±6.0[a]	65.0±12.6[b]
Fertilidad post parto			
Tasa de preñez total (%)	50/56 (89.3)	6/7 (85.7)	2/3 (66.7)
Tasa de preñez 1[er] servicio (%)[1]	11/56 (19.6)	3/6 (50.0)	2/2 (100)
Lapso parto primer servicio (Promedio ± DE)[1]	120.2±84.3	112.5±49.8	161.0±144.2
Lapso parto preñez (Promedio ± DE)	184.8±108.0	144.5±56.0	161.0±144.2
Índice coital (Promedio ± DE)	2.6±1.8	1.6±0.7	1,0
Eliminación por reproducción (%)	4/58 (6.9)	0/12 (0.0)	1/6 (16.7)
Eliminación por economía (%)[3]	29/81 (35.8)	5/12 (41.7)	2/6 (33.3)

[1] Fertilidad al servicio entre los 60 y 120 días pos parto.
[2] Letras distintas en una fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$).
[3] Eliminación por razones económicas (requerimientos de caja).

Los resultados muestran que desde la perspectiva de la eficiencia reproductiva del rebaño se está en un sistema con problemas. Los indicadores de tasas de preñez y de lapsos parto primer servicio y parto preñez reflejan infertilidad de base nutricional. Si bien lo razonable era que se suplementara a todo el rebaño, la capacidad financiera del proyecto no lo permitió, por lo que se decidió hacerlo sólo con las vacas transferidas y por un periodo de 40 días. Las respuestas reproductivas fueron obvias, pero no queda claro el efecto del término de la suplementación en la manutención de la gestación. El principal déficit del proyecto es la

pérdida excesiva de gestaciones avanzadas en las transferencias unilaterales. Este fenómeno fue recientemente descrito en vacas con gestaciones de mellizos unilaterales (López-Gatius y Hunter, 2005). Los resultados de ese estudio, el primero en el tema, son virtualmente similares a los obtenidos en el presente proyecto, tanto en términos de pérdidas de gestaciones como de embriones, sin embargo no se evaluó las gestaciones a término. Es interesante observar en ese estudio que cuando las gestaciones de mellizos fue bilateral (en feto en cada cuerno), la manutención de la gestación fue similar a la gestación única, reflejando que la estrategia de posicionamiento de los embriones fue errada y percibida como tal sólo al momento de los partos. El propósito de esa estrategia era aumentar las señales embrionarias para la manutención de la gestación, lo cual fue correcto, pero no se estimó importante la competencia por espacio de desarrollo en esta especia que carece de migración transuterina (Vasconcelos et al., 2006; Farin et al., 2006).

Aún cuando no puede descartarse problemas de desarrollo de los embriones per sé, los resultados de López-Gatius y Hunter (2005) muestra que en las gestaciones naturales, donde los embriones producidos son normales funcionalmente, las pérdidas gestacionales igual se producen, por lo que la base de este problema parece estar centrado específicamente en la capacidad uterina de soportar el desarrollo de dos fetos. Por lo mismo, la posibilidad de corrección del problema transfiriendo embriones a ambos cuernos es cierta en base al mismo estudio y debiera intentarse antes de definir la viabilidad práctica de esta tecnología, particularmente con la importancia que tiene la producción de vientres en el país y con el arribo del semen sexado.

Es interesante destacar que no se observaron problemas de parto ni de fertilidad subsiguiente, aun cuando la muestra fue algo reducida y más aún, afectada por los problemas financieros de la empresa que significó una alta tasa de eliminación aprovechando el alto precio de mercado de la vaca de desecho. El peso de los terneros al nacimiento fue significativamente menor en gestaciones de mellizos, pero nuevamente, el bajo número de partos impidió tener información concluyente.

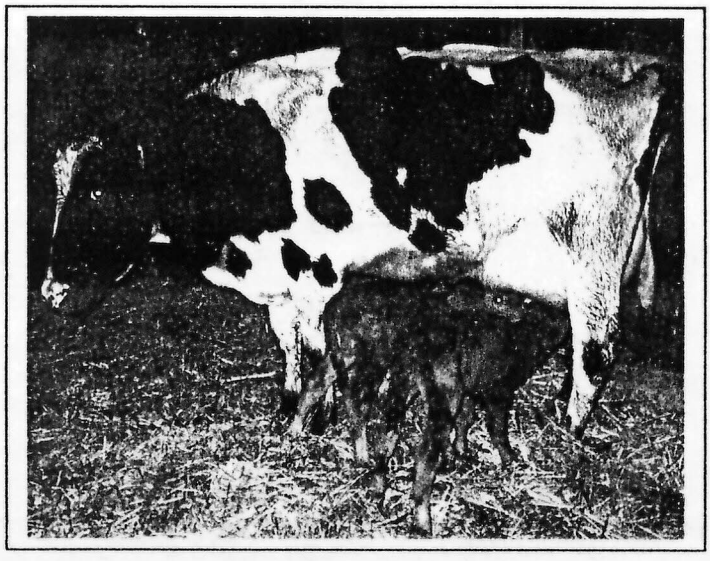


Figura 4.1. Imágenes de terneros obtenidos por transferencia de embriones producidos in vitro en vacas Holstein Friesian.

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Los procedimientos utilizados para producir embriones in vitro tanto a partir de oocitos provenientes de ovarios de matadero como de donantes vivos son eficientes y permiten la producción de embriones funcionales en términos de tasas de eclosión *in vitro* y de gestaciones *in vivo*.

5.2 El costo de producción de los embriones permite su utilización práctica en sistemas de producción comerciales.

5.3 La tecnología de la transferencia de embriones, soportada por esquemas de sincronización de estros a base de progesterona y prostaglandina, puede ser integrada a una operación productiva sin inversiones adicionales.

5.4 La producción de mellizos por tecnología unilateral de embriones permite tasas de gestación adecuadas y una alta tasa de supervivencia de mellizos, sin embargo tanto embriones como gestaciones se pierden en el transcurso de la gestación, resultando en un 65% de partos y 33 % de mellizos.

5.5 Las pérdidas fetales se producen con gestaciones avanzadas, lo que tiene implicancias económicas serias un sistemas lecheros, en los que le eficiencia reproductiva es esencial en la gestión económica de las explotaciones.

5.6 Los partos fueron normales en términos de asistencia y eliminación de placentas, sin embargo la supervivencia de los terneros demanda un nivel de atención al momento del parto.

5.7 Los terneros fueron normales y crecieron razonablemente en condiciones de crianza artificial, considerando el nivel de restricciones económicas de la empresa evaluada.

5.8 La eficiencia global del sistema es afectada por el plano nutricional del rebaño, por lo que un control del mismo es básico para implementar un sistema de producción de mellizos eficiente.

5.9 El sistema de producción de mellizos por transferencia unilateral (en un cuerno uterino) de embriones no es viable comercialmente por la alta tasa de pérdidas avanzadas de gestaciones. Los resultados recientes muestran que la estrategia a implementar debe ser basada en la transferencia bilateral de los mismos. Es necesario definir además cuál será la ubicación más eficiente de los embriones en función de la emisión de señales bioquímicas para la preservación del cuerpo lúteo de gestación.

5.10 Definida la viabilidad práctica de la estrategia de producción de mellizos, es posible implementar un programa de difusión para la transferencia de la tecnología al sector productivo.

6. Otros aspectos de interés

6.1 Equipo técnico responsable de la ejecución del proyecto.

Nombre Completo	RUT	Profesión	Especialidad	Financiamiento	Dedicación al Proyecto (%/año)
José Francisco Cox Ureta		Médico Veterinario	Reproducción Animal	U de C; FIA	30%
Eduardo Valdés Salinas		Ingeniero Comercial	Finanzas	Carnes Ñuble	10%
Fernando Saravia Ramos		Médico Veterinario	Reproducción Animal	U de C; FIA	30%
René Ortega Vásquez		Médico Veterinario	Virología	U de C; FIA	20%
Jorge Avila Stagno		Médico Veterinario	Nutrición Animal	U de C	20%
Víctor Alfaro Zapata		Médico Veterinario		FIA	50%
Marianela Caballero Valero		Médico Veterinario (egresada)		FIA	50%
José Garcés Valenzuela		Obrero Especializado		U de C	40%

Resumen de rebaños participantes:

Nombre del Productor	Nombre del Predio	Dirección Postal
Josefa Benavente Benavente	Fundo San Bernardo, Comuna de Chillán	Parcelas San Bernardo Norte, Chillán (T: 271077)
Agríc. Romero Godoy Hnos. Raúl Romero Godoy	La Serena, Comuna de San Carlos	Matta 435, San Carlos
David Guiñez	Parcela Santa Sara, Comuna de San Carlos	
Luis Valentín Urzúa	Comuna de Arauco	

7. Referencias

Bousquet, D, H. Twagiramungu, N. Morin, C. Brisson, G. Carboneau and J. Durocher. 1999. In vitro embryo production in the cow: An effective alternative to the conventional embryo production approach. Theriogenology, 51:59.

Cox JF, F Saravia, O Torrealba, A Zavala, S Recabarren. 2001. Field assessment of GnRH-PGF2a oestrous synchronisation in confined Holstein cows. En: MG Diskin (ed) Fertility in the high producing dairy cow. BSAS Publication 26(2): 461.

Farin, P, Jorge A. Piedrahita and Charlotte E. Farin. 2006. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. Theriogenology, 65:178.

Galli, C, R. Duchi, G. Crotti, P. Turini, N. Ponderato, S. Colleoni, I. Lagutina and G. Lazzari. 2003. Bovine embryo technologies. Theriogenology, 59:585.

López-Gatius F, RHF Hunter. 2005. Spontaneous reduction of advanced twin embryos: its ocurrence and clinical relevance in dairy cattle. Theriogenology 63:118.

Parrish JJ, J Susko-Parrish, MA Winer, NL First. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol Reprod 38:1171.

Thatcher, T.R. Bilby, J.A. Bartolome, F. Silvestre, C.R. Staples and J.E.P. Santos. 2006. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. Theriogenology, 65:30

Vasconcelos, JLM, D.G.B. Demétrio, R.M. Santos, J.R. Chiari, C.A. Rodrigues and O.G. Sá Filho.2006. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. Theriogenology, 65:192.

Wheeler, M, Jack J. Rutledge, Amy Fischer-Brown, Tara VanEtten, Samantha Malusky and David J. Beebe. 2006. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. Theriogenology, 65:219.

Wrathall AE, H.A. Simmons and A. Van Soom. 2006. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen Theriogenology, 65:247.