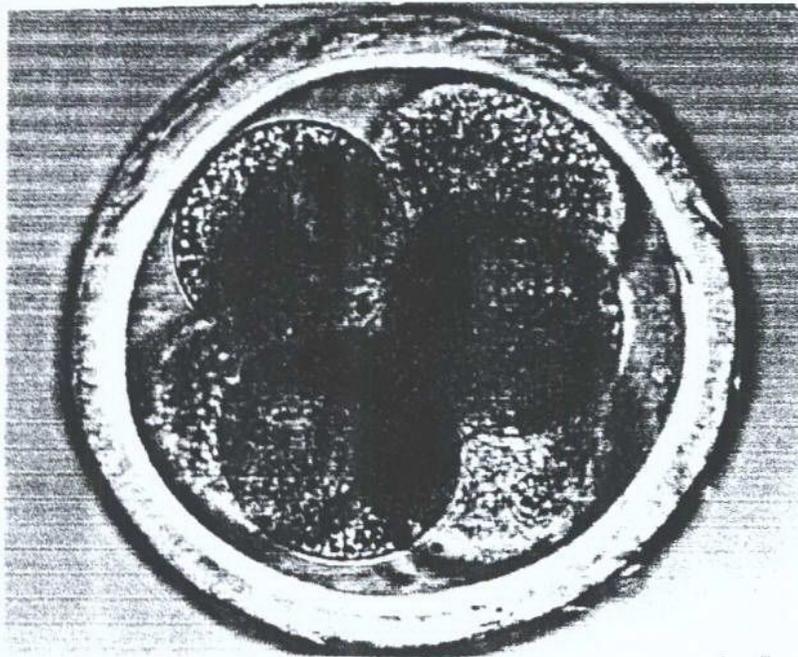


OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	2/5/05
Hora	8:45
Nº Ingreso	496

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO REPRODUCCION ANIMAL

PROYECTO FIA: BIOT - 01 - P - 063

INFORME FINAL TECNICO Y DE GESTION



VALDIVIA, ABRIL DE 2005

INFORME TECNICO Y DE GESTION FINAL

I. ANTECEDENTES GENERALES

NOMBRE DEL PROYECTO: "Desarrollo e implementación de Transferencia de Embriones y Producción *in vitro* de Embriones mediante Laparoscopia en Rumiantes"

CODIGO: BIOT- 01-P-063

REGION: **DECIMA**

EJECUTOR: Universidad Austral de Chile

COORDINADOR PROYECTO: Dr. Jorge E. Correa Soto.

COSTO TOTAL DEL PROYECTO (Valores Reajustados)	: S	<input type="text"/>	
FINANCIAMIENTO FIA (Valores Reajustados)	: S	<input type="text"/>	<input type="text" value="59.1 %"/>
APORTE DE UACH (Valores Reajustados)	: S	<input type="text"/>	<input type="text" value="40.9 %"/>

PERIODO DE EJECUCION: Desde Diciembre 2001 hasta Enero 2005

II. RESUMEN EJECUTIVO

Este informe presenta las actividades realizadas desde el 3 de Diciembre del 2001 hasta el 18 de Enero del 2005.

El proyecto permitió contratar un médico veterinario dedicado a desarrollar técnicas de laparoscopías, actividades de laboratorio, terreno y administrativas del proyecto. Este puesto fue ocupado por tres personas que fueron desarrollando diversas etapas del proyecto. En la primera etapa se desarrolló las técnicas de recuperación y transferencia de embriones (TE) mediante laparoscopia en las dependencias del Instituto de Reproducción Animal, UACH, Valdivia. En los primeros experimentos se aplicó y recuperó líquido desde el útero, repitiéndose 1 a 3 ensayos en un mismo animal dando un total de 42 animales intervenidos. La mayor dificultad fue la manipulación del útero con las pinzas de sujeción y problemas de anestesia. Estudios posteriores demostraron que no hubo alteraciones del tracto genital de los animales intervenidos por laparoscopia. Enseguida se realizó TE que concluyó con partos de tres ovejas receptoras y el nacimiento de 4 corderos.

En una segunda etapa, se hizo prueba de campo en Pumanque, (Sexta Región), Futrono, (Décima Región) y en una Cabaña de la Duodécima Región. La segunda prueba de campo se desarrolló en Marchigüe (Sexta Región), Chiloé (Décima Región) y en una estancia de la Duodécima Región, obteniéndose nacimiento de corderos en todos los lugares con excepción de la Estancia Santa Josefina. Estos ensayos demostraron que pudo realizarse TE en ovejas, incluso a nivel de pequeños productores, que involucró traslado de equipo y personas.

El trabajo de punción folicular se inició con ovarios obtenidos de ovejas muertas y ovarios bovinos de matadero como fase de adiestramiento en la búsqueda de Complejos Cúmulo Ovocito (COCs), maduración ovocitaria, fecundación in vitro y cultivo de embriones. Por otra parte, paralelamente se implementó el manejo de semen ovino que involucró entrenamiento de los carneros, evaluación, dilución y capacitación de semen.

Se realizó ensayos de punción folicular en ovejas mediante la implementación de la técnica laparoscópica incluyendo adaptación de equipamiento correspondiente. En estudios posteriores se logró fecundación in vitro y desarrollo de embriones hasta el estado de mórulas.

Se realizaron Seminarios en Valdivia, Marchigüe, Quellón y Puerto Montt; además se presentaron resultados del proyecto en un Día de Campo organizado por Estancia Josefina y FIA, en Magallanes. Se presentaron trabajos científicos en congresos de la Sociedad Chilena de Producción Animal, Medicina Veterinaria e International Congress on Animal Reproduction. La página Web www.embriones.cl fue desarrollada y puesta en ejecución por BTA.

Se realizaron dos tesis de grado para Médicos Veterinarios.

Conclusiones: se logró la capacitación de 5 médicos veterinarios en algunas de las técnicas desarrolladas. Se implementó técnicas laparoscópicas de recuperación y TE, lográndose nacimiento de corderos en diversos lugares de Chile. Se dio inicio a la producción de embriones ovinos in vitro y primeros pasos hacia un banco genético ovino

III. TEXTO PRINCIPAL

1. RESUMEN

Los problemas sanitarios que afectan a Europa y otras partes del mundo han limitado la importación continua de recursos genéticos valiosos, en los cuales se ha invertido esfuerzos financieros y productivos para establecerlos en nuestro país. A modo de ejemplo puede señalarse los casos de las razas ovinas East Friesian, Latxas y Texel, donde la permanencia de los rebaños en el tiempo se ve afectada por el bajo número de animales existentes en Chile.

El uso de herramientas biotecnológicas reproductivas en ovejas es muy limitado debido en primer lugar a su pequeño tamaño y en segundo lugar a las características del cervix uterino lo que impide la manipulación transrectal del sistema reproductivo como se usa en animales mayores tales como bovinos y equinos.

La laparoscopia es una cirugía menor que permite acceder directamente a los cuernos uterinos de animales pequeños, proveyendo una alternativa para la aplicación de estas biotecnologías reproductivas. Esta técnica no ha sido implementada en nuestro país, por lo que la transferencia de embriones (TE) en pequeños rumiantes se ha limitado a ensayos experimentales usando laparotomía, cirugía mayor, que muchas veces limita la aplicación repetitiva de la técnica y que puede causar problemas de fertilidad e incluso esterilidad de las ovejas donantes. Por otro lado, la producción *in vitro* de embriones hasta ahora se ha limitado a bovinos y no existían antecedentes de su uso en ovinos cuando fue planteado este proyecto.

Los objetivos de este proyecto fueron desarrollar e implementar en ovinos las técnicas de recuperación y TE por laparoscopia e iniciar estudios de fecundación y cultivo *in vitro* de embriones (incluyendo punción folicular por laparoscopia) para ser utilizadas como herramientas de preservación y multiplicación de recursos limitados de alto valor genético y social.

Para lograr estos objetivos el proyecto fue planteado en cuatro etapas. La primera correspondió a la calibración e implementación de la técnica laparoscópica en condiciones controladas, permitiendo la realización de TE y punción folicular *in vivo* en el laboratorio de la universidad. La segunda etapa, a continuación de la primera, fue la evaluación y validación en terreno de las técnicas implementadas en la etapa anterior. La tercera etapa, paralela a la segunda, buscó desarrollar e implementar en ovinos las técnicas de producción *in vitro* de embriones. Y por último, se planteó el inicio de la implementación de un banco genético a través de la aplicación de las técnicas biotecnológicas reproductivas desarrolladas y evaluadas en las etapas anteriores.

Respecto al beneficio económico asociado a la ejecución de este proyecto se mencionó la adquisición de herramientas reproductivas de punta que podrían ser aplicadas como alternativas a rumiantes menores. Este proyecto permitiría además la consolidación del "know how" del equipo de trabajo aumentando su experiencia en reproducción animal.

2. CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS

El proyecto permitió contratar un médico veterinario que tuvo que aprender a trabajar con embriones y desarrollar las técnicas de laparoscopia para recuperar y transferir embriones. Esto involucró aprendizaje de laparoscopia y su instrumental, uso de anestesia, actividades de laboratorio y terreno. Se logró el desarrollo de las técnicas y se recuperó embriones, transferencia de ellos y nacimiento de corderos en la universidad y en pruebas de campo cumpliendo así los objetivos de la primera y segunda etapa. La tercera etapa también cumplió con los objetivos de recuperación de ovocitos a través de punción ovárica mediante laparoscopia, maduración de ovocitos, capacitación espermática, fecundación y cultivo in vitro de embriones hasta el estado de mórulas. El inicio de un banco genético planteado en la cuarta etapa se cumplió con la traída de dos carneros y dos ovejas Texel aportados por FIA desde Punta Arenas. Es necesario destacar que la segunda parte del trabajo de terreno se realizó con animales comunes, y no de alto valor genético, como había sido planteado porque se privilegió el aspecto social y de esta manera, nuevamente se trabajó con un pequeño productor de la Sexta Región (socio de ARCO SA) y un pequeño productor de Chonchi, socio de AGRECOR, Chiloé, Décima Región. En la Duodécima Región se trabajó con ovejas comunes de un productor que tenía un proyecto FIA.

El proyecto permitió, gracias a FIA, poner en contacto a la universidad con dos agrupaciones importantes de pequeños productores ovinos de las Sexta y Décima Regiones y productores grandes de la Duodécima Región lo que abre enormes posibilidades de trabajo conjunto del mundo académico y productivo-social. Es probable que la TE, como técnica, no llegue a tener un uso masivo, pero asociada a otras técnicas como sincronización de estros, inseminación artificial puede provocar un alto impacto en programas de control reproductivo y mejoramiento genético ovino, especialmente a nivel de pequeños productores de las regiones mencionadas.

3. ASPECTOS METODOLOGICOS

Manejo de animales:

Ovejas compradas en la zona fueron mantenidas en las dependencias del Instituto de Reproducción Animal alimentadas en base a heno y concentrado. Se procedió a la individualización de cada oveja por medio de un arete plástico numerado; como medidas de manejo preventivo todos los animales fueron desparasitados regularmente y despalmados. La ración de heno y concentrado fue calculada de acuerdo al peso de los animales. Después de un período de adaptación, generalmente 2 a 3 semanas, las ovejas fueron usadas en forma experimental. Los controles de estro se realizaron, generalmente mañana y tarde, con carneros enteros protegidos con chaleco que impedían la cópula. Los animales fueron pesados regularmente obteniendo un promedio de 50 Kg. las hembras y 76.5 Kg. los machos ajustando la ración de heno y concentrado para satisfacer necesidades de mantención con 1,5 Kg. heno + 300g de concentrado /animal/día para las hembras y 2 Kg. de heno y 200 g de concentrado /animal/ día para los machos.

Los machos fueron sometidos a un proceso de acostumbramiento al manejo individual, para esto el operario les colocó diariamente una jáquima y realizó caminatas cortas como entrenamiento para la posterior recolección de semen.

En las pruebas de campo se trató de mantener el manejo rutinario de los animales incluyendo adaptaciones para un manejo mas intensivo (por ejemplo 2 inyecciones diarias, o controles de estros)

Anestesia:

Los animales fueron privados del forraje, alimento concentrado y agua 24 hrs. antes de la operación para evitar regurgitación del contenido ruminal y asfixia cuando el animal estaba bajo anestesia general.

Protocolo utilizado: Atropina como premedicación en dosis de 0.04 mg/Kg. administrado en forma im., 10 a 20 minutos antes del Tiopental Sódico

Tiopental Sódico como hipnótico y depresor general del sistema nervioso central en dosis de 10-15 mg/Kg. administrado en forma endovenosa (ev), la mitad de la dosis en bolo y el resto en forma lenta hasta lograr el efecto deseado. La marca comercial usada fue Tiopental Sódico 1 g. (Laboratorio Biosano).

En algunos casos se usó también Lidocaína como anestésico local infiltrado a nivel cutáneo en las tres zonas donde se introdujeron los trócares.

Este protocolo fue elegido después de analizar 5 protocolos de anestesia .

Sincronización de estros con Progesterona (P4)



Foto 1. Colocación de dispositivo vaginal

Se colocó un implante intravaginal (CIDR) de progesterona que fue mantenido por 12 días en todas las ovejas lográndose una buena sincronización ya que a las 36 horas de retirado el CIDR el 100% de los animales ya había iniciado el celo.

Superovulación con eCG y FSH

Para el tratamiento de superovulación se usó hormona Folículo Estimulante (FSH) y la gonadotropina Sérica de Yegua Preñada (eCG) de acuerdo al siguiente protocolo: seis inyecciones de FSH en dosis decrecientes cada 12 hrs. los días 10, 11 y 12 del tratamiento con el CIDR. Junto con la 6^o inyección de FSH se retiró el CIDR y se administró 160 UI de eCG.

Encaste

Para el encaste los carneros detectaron ovejas en estro con un chaleco que impedía la cópula, cada 12 horas en la mañana y tarde. Cuando fue necesario, los mismos carneros cubrieron las ovejas. En la cabaña de Punta Arenas, debió usarse inseminación artificial porque hubo problemas de monta.

Lavado uterino por laparoscopia:

El animal fue colocado sobre una camilla operatoria en posición decúbito dorsal, se depiló y lavó en la región medio ventral y luego fue desinfectado con alcohol al 70%. Se colocó la anestesia (ver protocolo de anestesia) y la camilla de sujeción se inclinó hasta un ángulo de 45° quedando el animal con la cabeza hacia abajo con el fin de desplazar las vísceras cranealmente.

Se indujo neumoperitoneo por insuflación de aire comprimido a través de una aguja Veres de 13 cm. por 2 mm. de diámetro (Ø), que en su interior tiene una aguja retráctil que sobresale a la del exterior encubriendo el bisel.

A la izquierda de la línea media se introdujo un trocar (Storz 26031GT) de 7 mm Ø, con el que se perforó la pared abdominal. Luego se retiró la parte central y en su lugar se introdujo la óptica (Storz Hopkins 26030B 30°), conectado a un proyector de luz fría a través de un cable de fibra óptica. Una vez ubicado el útero, se introdujo por la derecha un trocar (Storz 26172C) de 5 mm Ø, para el acceso del fórceps atraumático (Endo Grasp 5 mm) con el que se manipuló el útero. Una vez ubicado el cuerno y estando bien sujeto por el fórceps se introdujo por el centro un trocar (Storz 26031GT) de 7 mm Ø, a través del cual se introdujo un estilete de acero inoxidable de 1,6 mm con el que se perforó el cuerno a nivel de la curvatura mayor, lo mas cerca del cuerpo uterino. Posteriormente se introdujo por este último trocar un catéter Foley N° 10, guiado por un alambre acerado en su interior de 10 mm para darle rigidez. La punta del catéter se introdujo por la perforación del cuerno y se deslizó por el lumen uterino hasta que el balón del catéter penetró totalmente en el cuerno. El balón fue inflado con 1,5 a 2 ml de solución salina para asegurar el catéter al cuerno y se retiró entonces la guía de acero. Posteriormente usando una jeringa de 20 ml se infundió al cuerno Solución Ringer con 3% de suero ovino, complementado con antibióticos, penicilina 200.000 UI/l y estreptomycinina 100 mg/l., en cantidades variables entre 10 a 20 ml guiándose por una parte por el control visual que se tuvo sobre la dilatación de las paredes uterinas por la presión del líquido en su interior y por otra parte por la presión que se debió ejercer al infundir el líquido con la jeringa. Después se aspiró el

medio y se registró tanto el líquido infundido como recuperado. Este procedimiento se repitió 2 a 3 veces por cuerno.

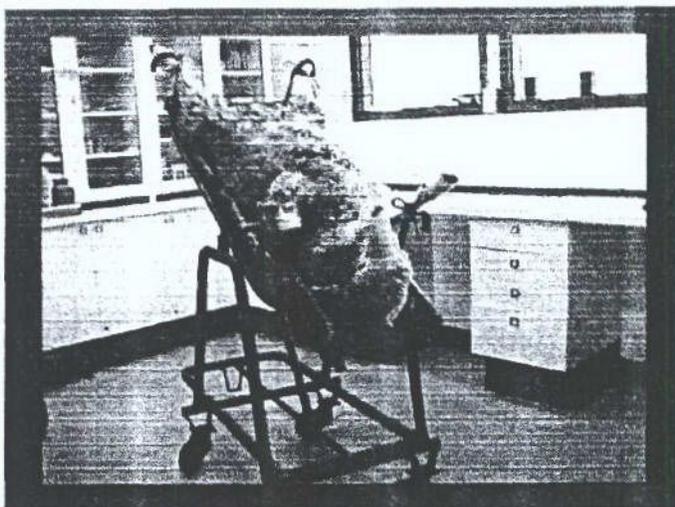


Foto 2. Oveja colocada en posición para iniciar laparoscopia

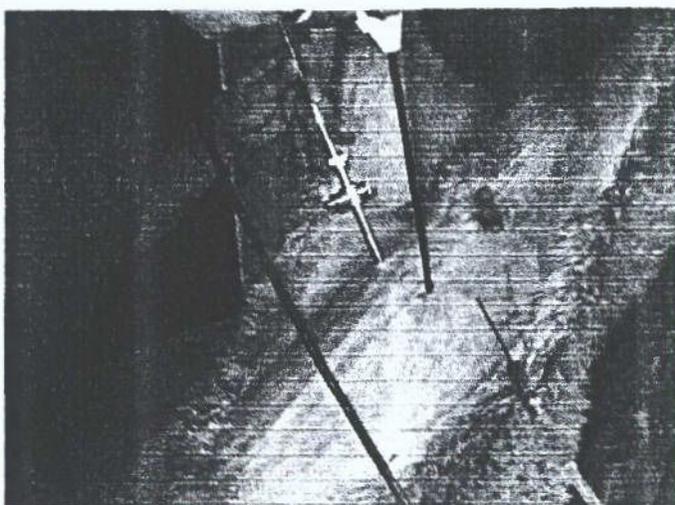
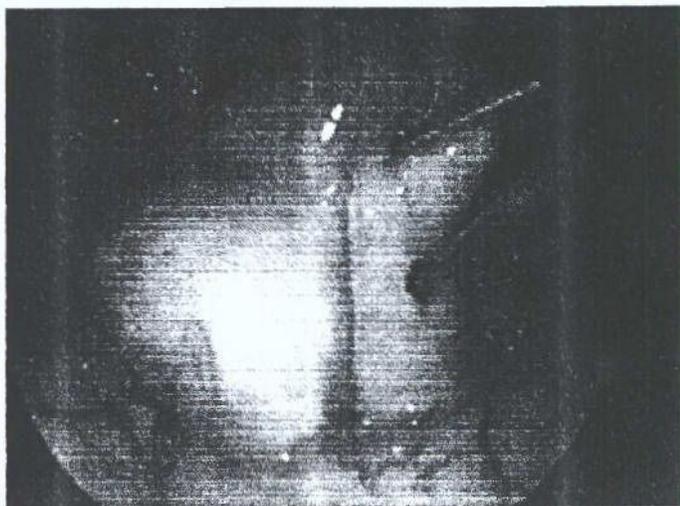
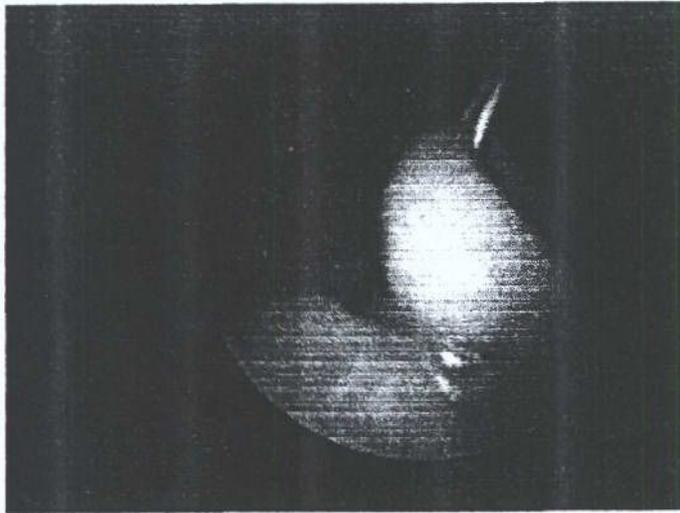
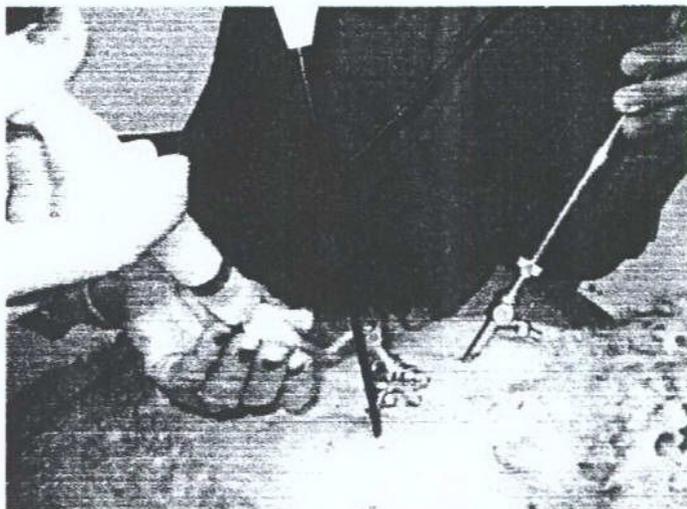
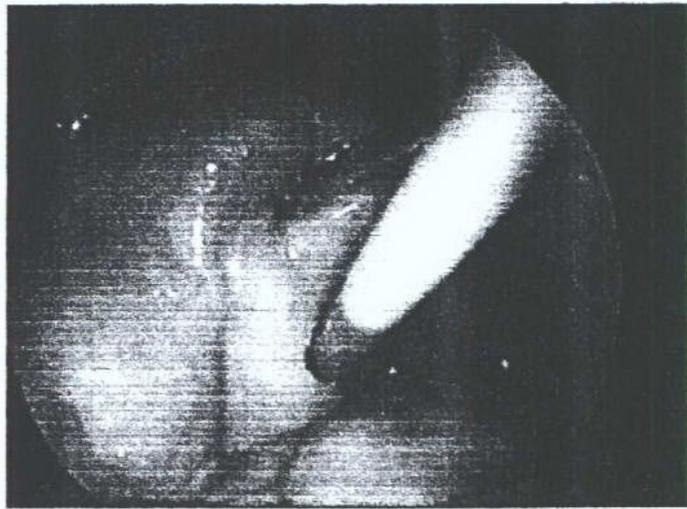
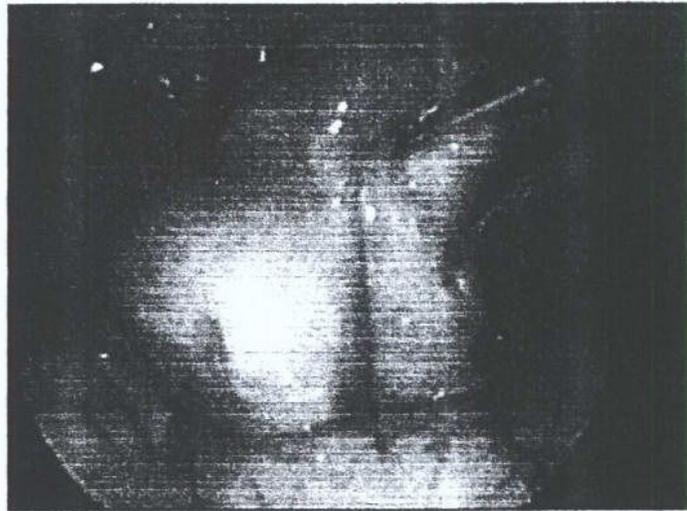


Foto 3. Laparoscopio puesto a la izquierda y pinza en posición central



Fotos 4, 5 y 6. Utero tomado por pinza y estilete listo para perforarlo



Fotos 7, 8 y 9 Cuerno uterino perforado, colocación de cateter e infusión de líquido



Foto 10. Útero repleto de líquido infundido a través de catéter

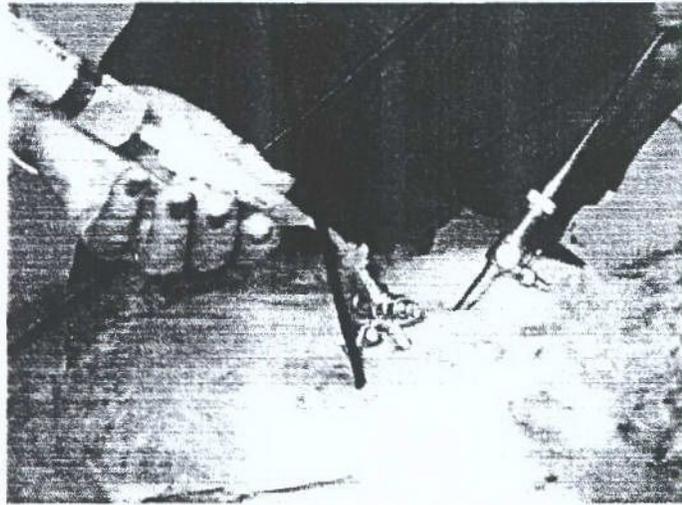


Foto 11. Succión de líquido desde el útero mediante una jeringa

Terminada la laparoscopia se retiraron los trócares y se oprimió el vientre del animal para ayudar a la salida del aire desde la cavidad abdominal. Posteriormente se retiró el último trocar y se aplicó un antibiótico local en spray en los tres puntos de incisión junto con una inyección de antibiótico de larga acción Oxitetraciclina al 20%, (20 mg/Kg. de peso intramuscular).

Búsqueda y examen de embriones

El medio recuperado desde el útero se colocó en placas Petri y fue examinado con un microscopio estereoscópico a 30X. Los embriones observados fueron colocados en placas Petri pequeñas con medio Dulbecco con 20% de suero ovino a 37°C.

Transferencia de embriones

La técnica empleada fue una combinación entre laparoscopia y laparotomía, ya que con ayuda del laparoscopio se determinó presencia de un cuerpo lúteo y su ubicación (ovario izquierdo o derecho). Luego a través de una incisión de 3 cm. en la línea media fue expuesto el cuerno ipsilateral al CL por medio de un fórceps. Los embriones fueron depositados en el lumen del cuerno uterino por medio de una cánula de transferencia.

La transferencia de embriones se realizó en ovejas receptoras, cuya sincronización del estro con las donantes fue de -24 hrs. a +24 hrs.



Foto 12. Ovario con CL

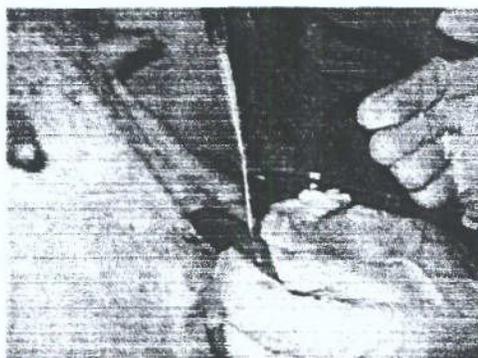


Foto 13. TE en un cuerno uterino

Recuperación y transferencia de embriones en terreno

El propósito de esta actividad fue:

- Estudiar las condiciones y facilidades disponibles a nivel de campo para aplicar esta biotecnología.
- Estimar un sistema de desplazamiento del equipo técnico, instrumentos y materiales de laboratorio desde Valdivia al predio.
- Definir las adaptaciones necesarias para implementar la Transferencia de Embriones a nivel predial.

Esta actividad implicó discusión y planificación del trabajo con los propietarios de los animales. Primero se visitó el predio con el fin de conocer el sistema de manejo de los animales, manejo reproductivo y sanitario, disponibilidad de personal profesional y técnico de apoyo a las actividades a realizarse previo, durante y después de la aplicación de esta biotecnología. Facilidades de infraestructura del predio, condiciones cercanas de alojamiento, alimentación, compra de insumos veterinarios, etc. También se conversó con el productor y su familia, de los alcances del estudio y se planificó el trabajo a realizar, junto con las responsabilidades de cada uno.

Se identificaron hembras donantes y receptoras desde el rebaño. Se indicó el manejo de estos animales confirmando la separación de los machos. Preventivamente se trataron todas las ovejas con prostaglandina con un intervalo de tres horas aproximadamente y se dejó indicada una tercera aplicación de prostaglandina nueve días después para asegurarse que ningún animal estuviese gestante.

Más tarde se procedió a la colocación de CIDR intra-vaginales a las ovejas (donantes y receptoras) y 10 días más tarde comenzó el tratamiento de inducción de superovulación con FSH y eCG. El día antes de la recuperación, el equipo visitó al agricultor para verificar ayuno de los animales, y ver lugar de trabajo, incluyendo habilitación y limpieza del lugar destinado para realizar las laparoscopias.

Al finalizar se dejaron claras instrucciones al propietario sobre cuidados y manejo tanto de las hembras receptoras como donantes, vigilancia de retorno al estro y probable fecha de diagnóstico de gestación.

Punción folicular laparoscópica

Las ovejas fueron sometidas a ayuno de 24 a 36 horas, luego fueron anestesiadas con Tiopental Sódico en dosis de 7 mg/kg de peso vivo; se preparó el abdomen en forma similar a la descrita para la recuperación y transferencia de embriones.

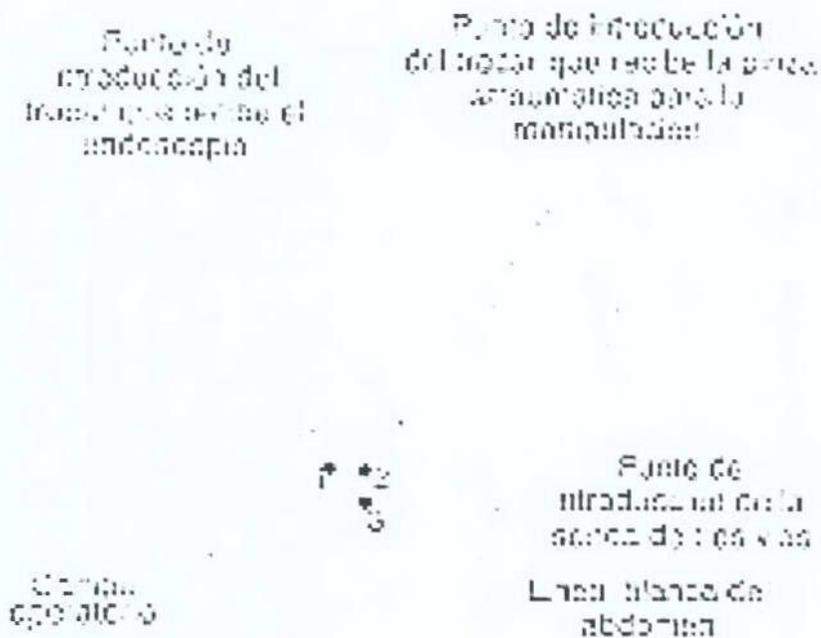


Foto 14. Aspiración folicular por laparoscopia en ovejas in vivo.

La oveja se situó en decúbito dorsal en la camilla con inclinación de 30 a 45°. Después de la inducción de neumoperitoneo se realizaron tres punciones con trocares en la cavidad abdominal siendo el de la izquierda para la óptica, el del lado derecho para introducir la pinza de sujeción y manipulación del tracto reproductivo, y finalmente el central para la aguja de punción folicular (esquema 1).

Esta aguja está unida mediante cánulas a un tubo Falcon con vacío producido por una bomba Cook (70-80 mm de Hg de mercurio). El ovario fue fijado con la pinza de tal manera que se observara y expusiera su superficie para puncionar y aspirar el licor folicular. Conviene comenzar por los folículos de menor tamaño y cada cierto rato enjuagar la aguja aspirando PBS al 3% con heparina para facilitar la colecta de los COCs en el tubo Falcon que también tiene un poco de PBS. Los tubos fueron mantenidos a una temperatura de 37°C y luego fueron llevados al laboratorio de FIV, donde se dejaron sedimentar por 20 minutos. El contenido de estos tubos fue colocado en placas Petri y observados a 30X en un microscopio estereoscópico para ubicar y clasificar los complejos cumulus-ovocitos (COC).

Esquema 1. Ubicación de los puntos de introducción de los trocares utilizados para punción folicular por laparoscopia.



Aspiración folicular bajo visión endoscópica

- Puntos de inserción de los instrumentos
- Inclinação postero-anterior 45°
- Vista abdominal – decúbito dorsal

Esquema de punción y aspiración folicular

AYUNO ↓	Se realiza 36 horas antes a la intervención laparoscópica, restringiendo alimento y agua.
PREPARACIÓN ↓	El animal, es colocado sobre la camilla, procediendo a la depilación del campo operatorio y desinfección de este. Además se aplica Atroveran ®, en dosis de 0,5 ml I.M. para evitar el reflujo.
SEDACION ↓	El animal es sedado completamente con Tiopental, en dosis de 7mg/kg PV.
PUNCION	Se ingresa el trocar para la óptica (trocar 1), con el cual también se insufla aire para realizar neumoperitoneo y lograr desplazar las vísceras. Luego se introduce el trocar 2, por el cual ingresa la pinza atraumática para fijar el ovario. Y luego ingresa el tercer trocar por el cual ingresará la aguja que aspira los COCs.

Maduración de ovocitos

Los COC encontrados fueron colocados en otra placa Petri mas pequeña (35 mm) con TMC 199 que es un medio de maduración.

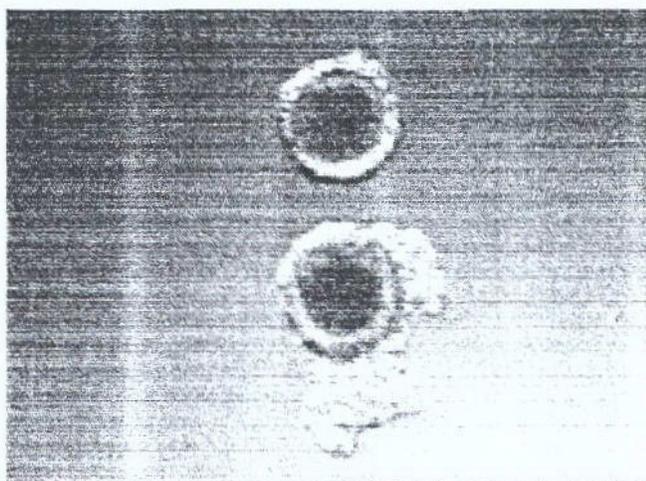


Foto 15. COCs aspirados de punción folicular por laparoscopia (superior grado 3, inferior grado 2)

Los COC encontrados fueron separados con una micropipeta de tamaño apropiado, cuidando de no lesionar el ovocito ni el cumulus oophorus. Los COC aspirados fueron lavados 3 veces con la solución de TCM 199.

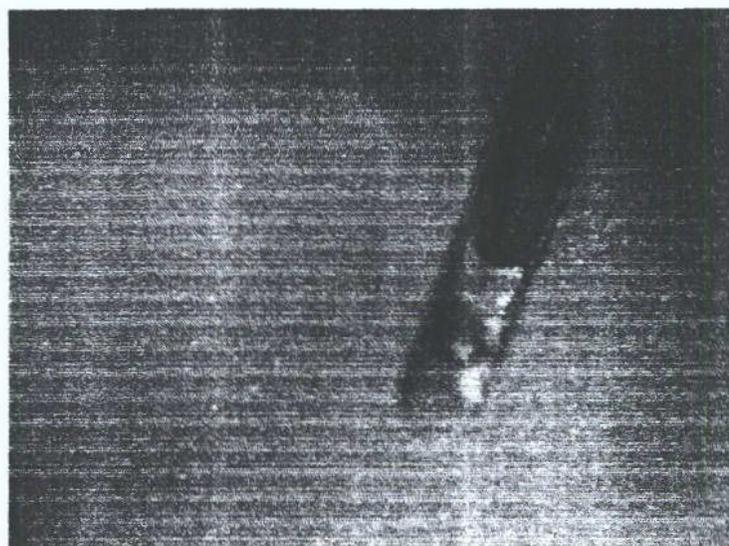


Foto 16. Micropipeta con los COC, para ser lavados en TCM 199.

Los COC examinados y clasificados como inmaduros fueron traspasados a microgotas preparadas en una placa Petri de 35 mm, cubiertos con parafina líquida. Toda esta etapa se trabajó sobre platina temperada. Los COCS fueron incubados en estufa de cultivo a un ambiente controlado de 90% humedad, 5% CO₂ y 38,5°C.

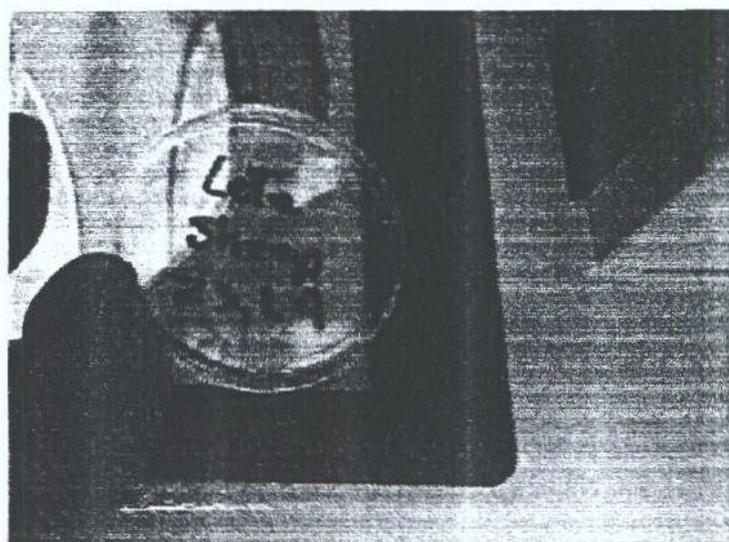


Foto 17. Placas petri de 35 mm identificadas y utilizadas en la maduración y cultivo de embriones.

El cultivo fue por 22 horas (20-24 horas), para luego pasar a la siguiente etapa de fecundación in vitro.

Capacitación espermática

Se utilizó semen congelado y semen fresco con los protocolos de capacitación espermática realizados rutinariamente en el laboratorio para el semen bovino, se usaron dos protocolos diferentes, que fueron los que arrojaron mejores resultados.



Foto 18. Campo visual bajo microscopio de espermatozoides capacitados

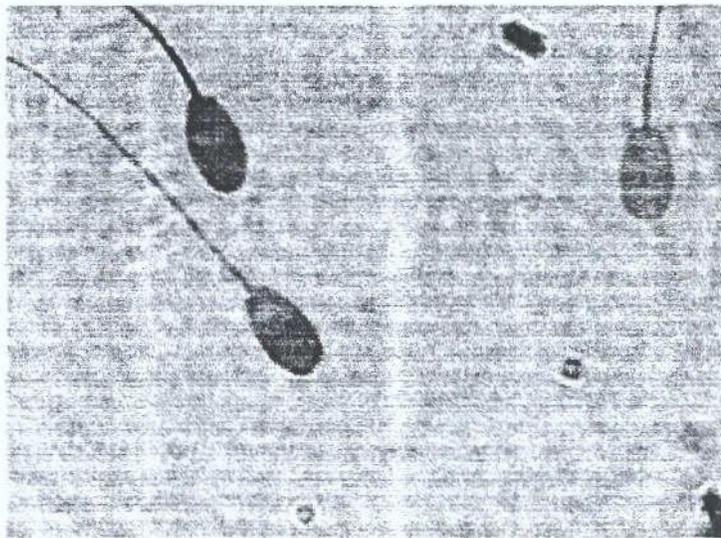


Foto 19. Espermatozoides teñidos para visualizar reacción de acrosoma

Se probaron dos técnicas de capacitación, entendiendo ésta como la condición fisiológica que deben cumplir los espermatozoides para adquirir su capacidad fecundante, lo cual se logra a través de la remoción de factores descapacitantes.

Técnica de zwim-up (SU) y técnica de Medio Brackett and Oliphant (BO) con heparina.

Fecundación in vitro

Una vez capacitado el semen, independiente de la técnica usada, se procedió a realizar el recuento espermático (solución con los espermatozoides capacitados (BO), 0,01 ml en 0,99 ml Cloruro de Sodio en un tubo Eppendorf, se agita para su distribución homogénea y se carga la cámara de recuento celular y se cuentan los espermatozoides bajo microscopio.



Foto 20. Ovocito con cúmulo expandido, al final de la maduración.

Una vez determinada la concentración espermática se dejó una concentración de 10×10^6 espermatozoides por ml. Los espermatozoides fueron colocados en una microgota de 100ul que fue cubierta con parafina líquida a la espera de los COCs madurados. Siempre se mantuvo la visualización de la motilidad espermática en las microgotas de fecundación.

Los COCs fueron retirados de la estufa y traspasados a una solución de lavado, en la cual se les redujo el número de células de la granulosa para facilitar el ingreso de los espermatozoides durante la fecundación. Los COCs fueron manejados con cuidado, lavados tres veces y traspasados a las microgotas de fecundación donde se encontraba el semen.

La placa Petri que contenía los espermatozoides con los COCs fue devuelta a la estufa de cultivo, con el mismo medio de la maduración, para permanecer por 16 horas aproximadamente.

Cultivo in vitro

Se estudiaron dos métodos de cultivo in vitro:

1. Sin co-cultivo
2. Con co-cultivo

Luego de las 16 horas de la etapa de fecundación in vitro, los ovocitos fueron retirados y colocados en una placa Petri con medio de cultivo para ser lavados y despojados de las células de la granulosa.

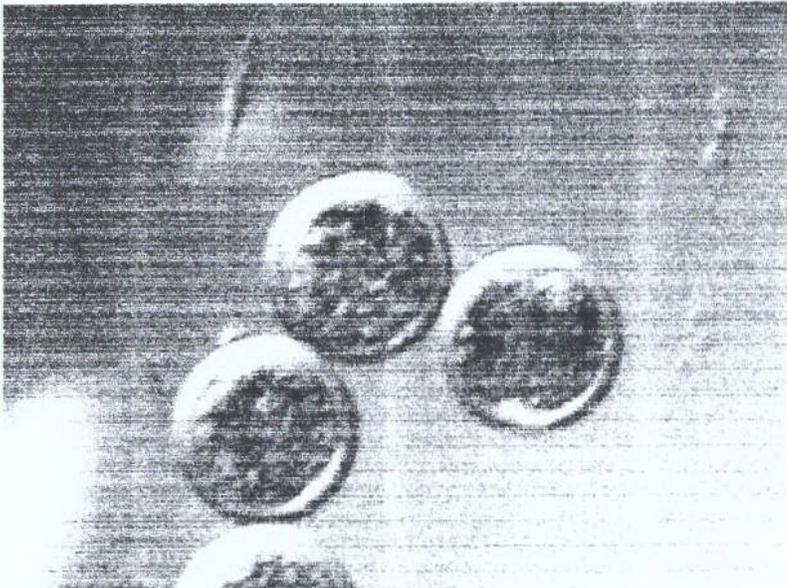


Foto 21. ovocitos completamente desnudos en sistema de co-cultivo con células de la granulosa.

1. Sistema sin co-cultivo, los ovocitos libres de células de la granulosa fueron lavados y cultivados en microgotas de 40 μ l, que contenían medio CR1aa durante 7 días a 39°C en atmósfera de 5% CO₂, 5% de O₂ y humedad de 90%, sin que el medio se cambiara.
2. Sistema con co-cultivo (con células de la granulosa), en este caso el co-cultivo comenzó el día de la maduración, donde se inició el cultivo de las células de la granulosa que se obtienen del despeje parcial de las células del cúmulo que rodean al ovocito maduro, se cultivaron por el mismo tiempo que los ovocitos se mantuvieron en contacto con el semen (FIV) y luego estas células de la granulosa fueron usadas para el co-cultivo que recibiría a los ovocitos en la etapa final. Los embriones son entonces, co-cultivados con aquellas células que se encontraban formando una monocapa adherida al fondo de la placa de cultivo. El medio de cultivo es reemplazado cada 36 a 48 horas. Los embriones fueron cultivados por 8 días post-inseminación y se evalúa su desarrollo a las 48, 96 horas y 8 días.

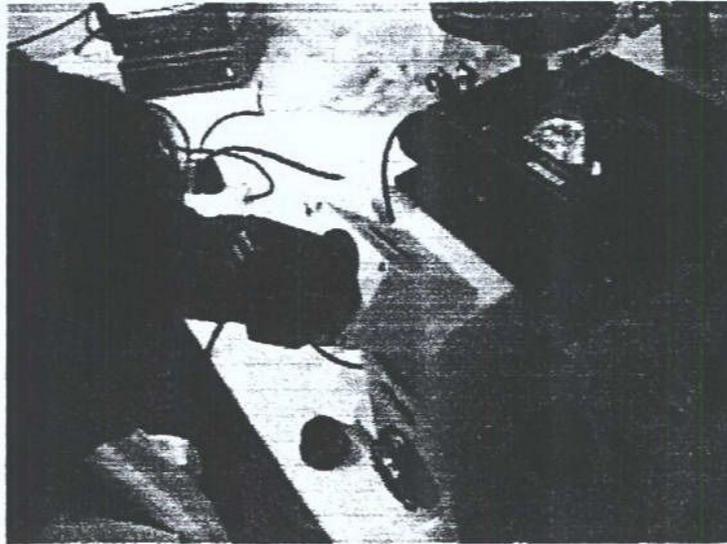


Foto 22. Observación bajo microscopio del desarrollo del cultivo in vitro de los embriones

La evaluación de la tasa de desarrollo se realizó por dos indicadores:

- Tasa de segmentación que se obtiene a las 48 horas post-inseminación. Esta permite evaluar la eficiencia de fecundación dentro del sistema de FIV.
- Estado de mórula, esta evaluación se realizó a los 6 días post-fecundación e indica el número de embriones que llegaron hasta este estado de desarrollo, eliminando los embriones de menos 8 células.
- Tasa de desarrollo de blastocisto (7-9 días post-inseminación), a esta altura los ovocitos fecundados deben haber alcanzado el estado de blastocisto).

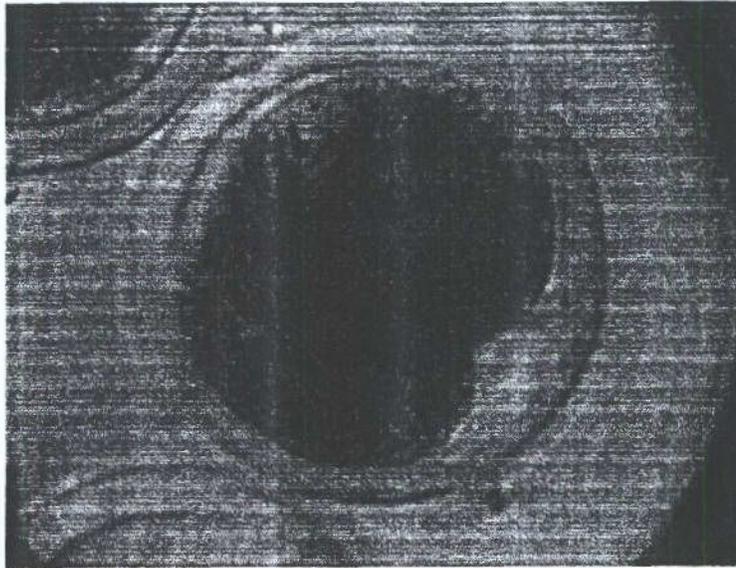


Foto 23. Embrión de 2 células.

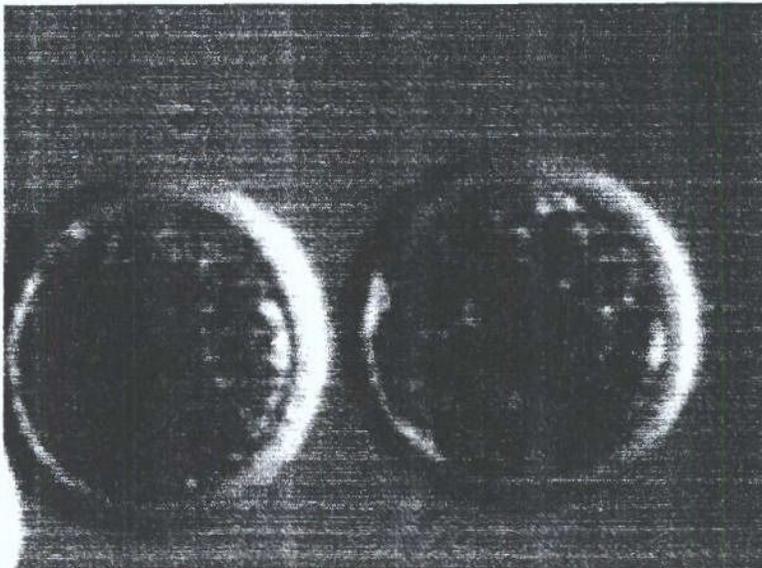


Foto 24. Ova sin fecundar (izquierda), ova fecundada de 16 células (derecha).

FIV en bovinos como apoyo al FIV ovino

Se continuó trabajando en FIV bovino, realizándose rutinariamente recolección de ovocitos de ovarios de matadero, los cuales fueron madurados, fecundados y cultivados in vitro.



Foto 25. Preparación y materiales para coleccionar COCs de ovarios bovinos post mortem.

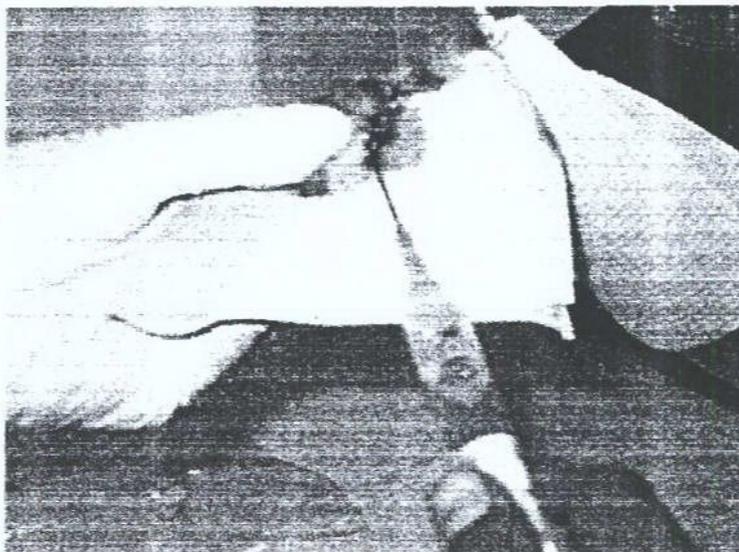


Foto 26. Colecta de COCs.

Los medios utilizados fueron los mismos utilizados para las experiencias con producción in vitro de ovinos, excepto el medio de cultivo que solo se utiliza con CR1aa sin co-cultivo.



Foto 27. Colocación de los COCs colectados sobre placa Petri de 90 mm para su búsqueda y clasificación.

4. ACTIVIDADES Y TAREAS EJECUTADAS

PRIMERA ETAPA

IMPLEMENTACION DE TÉCNICAS LAPAROSCOPICAS

Ensayos de Anestesia:

Se realizaron 5 protocolos distintos de anestesia elegidos según la literatura existente y en base a la experiencia de algunos profesionales del área. En el desarrollo de la actividad 3 animales murieron por paro cardio-respiratorio estando bajo el efecto anestésico cuyo factor común fue la Xilacina (Rompun), por lo que finalmente se escogió el uso de Tiopental Sódico.

El protocolo elegido fue el siguiente: Atropina como premedicación en dosis de 0.04 mg/Kg. administrado en forma im., 10 a 20 minutos antes del Tiopental Sódico. Tiopental Sódico como hipnótico y depresor general del sistema nervioso central en dosis de 10-15 mg/Kg. administrado en forma endovenosa (ev), la mitad de la dosis en bolo y el resto en forma lenta hasta lograr el efecto deseado. La marca comercial usada fue Tiopental Sódico 1 g. (Laboratorio Biosano).

En algunos casos se usó también Lidocaína como anestésico local infiltrado a nivel cutáneo en las tres zonas donde se introdujeron los trócares.

Los otros protocolos analizados fueron los siguientes:

Protocolo A: Acepromacina como premedicación sedativa, tranquilizante en dosis de 0,25 mg/Kg. intramuscular (im). Se usó la marca comercial Acedan inyectable (Laboratorio Holly-Vet Ltda.) 30 minutos antes de la operación.

Atropina como premedicación en dosis de 0.04 mg/Kg. administrado en forma im. Se usó la marca comercial Atroveran (Laboratorio Chile S.A.) que determina la relajación de la fibra muscular lisa con disminución de las secreciones.

Xilacina como sedante, relajante muscular y analgésico en dosis de 0,2 mg/Kg. administrado en forma im. Se usó la marca comercial Rompun (Laboratorio Bayer Chile S.A.).

Lidocaína como anestésico local infiltrado a nivel cutáneo en las tres zonas donde se introducirían los trocares. Se usó la marca comercial Lidocaína VQ (Laboratorio Veterquímica Ltda.) al 2% en dosis de 1,5-2 ml por sitio de infiltración.

Este protocolo se usó en 7 oportunidades, en dos de los cuales (28,6%) los animales murieron por paro cardio-respiratorio. Además la xilacina actuó sobre el útero aumentando el tono muscular de éste lo que dificultó su manipulación.

Protocolo B: Atropina como premedicación en dosis de 0.04 mg/Kg. administrado en forma ev.

Xilacina como sedante, relajante muscular y analgésico en dosis de 0,2 mg/Kg. administrado en forma ev.

Ketamina como anestésico en dosis de 4-6 mg/Kg. administrado en forma ev y en conjunto con los otros componentes de este protocolo. Se usó la marca comercial Ketostop (Laboratorio Drag Pharma Invetec S.A).

Este protocolo se usó en tres oportunidades, no se registraron muertes pero el tono aumentado del útero por efecto de la xilacina dificultó el procedimiento.

Protocolo C: Atropina como premedicación en dosis de 0.04 mg/Kg. administrado en forma im.

Tiopental Sódico como hipnótico y depresor general del sistema nervioso central en dosis de 10-15 mg/Kg. administrado en forma endovenosa (ev), la mitad de la dosis en bolo y el resto en forma lenta hasta lograr el efecto deseado.

Halotano-Oxido Nitroso (N₂O) como anestésico depresor del sistema nervioso central. El animal fue intubado bajo el efecto del anestésico sistémico y luego conectado a la máquina de anestesia. El flujo de gases fue de 1-1,5 lt de oxígeno por minuto y de 4 % Halotano y N₂O.

Se usó este protocolo en una oportunidad y se logró el efecto deseado como anestésico pero la intubación fue difícil y se requiere de una persona dedicada exclusivamente al manejo del equipo de anestesia mientras se realiza la intervención.

Protocolo D: Atropina como premedicación en dosis de 0.04 mg/Kg. administrado en forma ev.

Xilacina como sedante, relajante muscular y analgésico en dosis de 0,2 mg/Kg. administrado en forma ev.

Halotano-Oxido Nitroso (N₂O) como anestésico depresor del sistema nervioso central. El animal fue intubado bajo el efecto del anestésico sistémico y luego conectado a la máquina de anestesia. El flujo de gases fue de 1-1,5 lt de oxígeno por minuto y de 4 % de Halotano y N₂O.

Este protocolo se usó una vez y al igual que en el protocolo anterior, precisa de otra persona como anestésista. Además en este caso el animal tuvo un paro cardio-respiratorio y murió.

Entrenamiento en laparoscopia

En el Instituto de Reproducción Animal se había usado laparoscopia para visualizar cambios ováricos durante el ciclo estral y gestación temprana en ovejas (Pavez y Correa, 1988); sin embargo, no se había realizado lavado uterino mediante laparoscopia porque es una técnica compleja que requiere manejo del útero, perforación del cuerno uterino, introducción de un catéter, adaptación de sistemas de infusión y succión de líquidos, etc, por lo tanto es una técnica que requería entrenamiento especial. Además, el médico veterinario recién contratado no conocía la laparoscopia por lo que debía entrenarse en la técnica misma y luego desarrollar el lavado uterino. Para cumplir esta capacitación se decidió comprar un grupo de ovejas, extra-proyecto, para hacer pruebas preliminares y entrenamiento básico de laparoscopia en ovejas.

En un grupo inicial de 6 ovejas este médico veterinario se capacitó en manejo del instrumental laparoscópico (trocares, fuentes luminosas, catéteres Foley, forceps), procedimientos de anestesia. Primero, se realizaron laparoscopias demostrativas, compartidas y finalmente individuales ejecutadas por el propio profesional. Entre los problemas enfrentados puede destacarse dificultades para ubicar el útero, perforación de otros órganos y a medida que fue pasando el tiempo y hacía más laparoscopias fue adquiriendo más experiencia y confianza; todo su trabajo lo hizo con mayor facilidad. Entre las tareas desarrolladas hubo práctica para tomar un cuerno uterino con el forceps y luego maniobras para perforarlo e introducir un catéter al útero.

También se realizaron actividades de entrenamiento para el médico veterinario en el laboratorio teniendo actividades de preparación de medios de cultivos, filtros, y esterilización de materiales. Así como manejo de embriones, placas y cultivos.

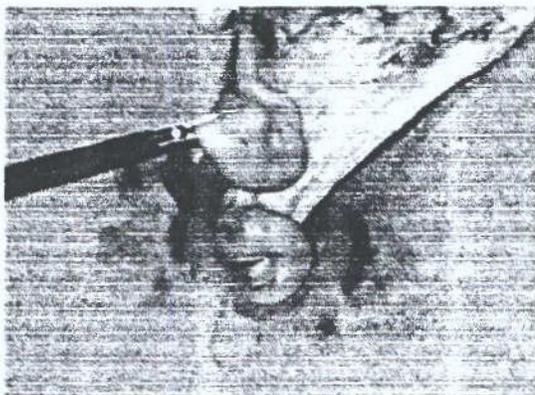


Foto 28. Toma de cuerno con pinza

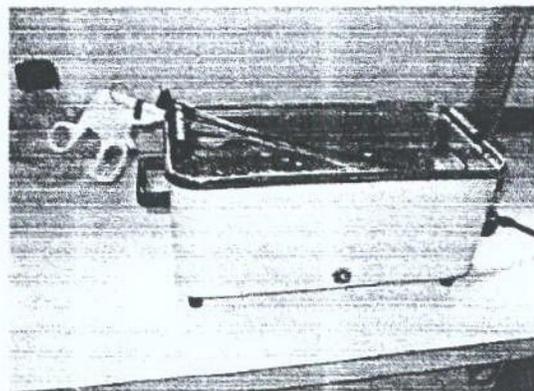


Foto 29. Materiales de laparoscopia



Foto 30. Entrenamiento en toma de embriones en el laboratorio

Desarrollo del protocolo de lavado y recuperación de embriones

Ensayos de lavado uterino

En veinte ovejas se realizó lavado uterino a través de laparoscopia. En esta oportunidad se midió cantidad de líquido infundido y recuperado desde el útero. Además se controló el tiempo empleado en cada laparoscopia.

Recuperación de embriones en ovejas superovuladas

En el Instituto de Reproducción Animal de la universidad en Valdivia se hizo dos pruebas de inducción de superovulación y recuperación de embriones.

Prueba 1:

Sincronización de estros con Progesterona (P4):

A comienzos del proyecto se inició la sincronización de estros en 20 animales que fueron distribuidos en tres grupos: al primer grupo de 8 ovejas se le colocó un implante intra-vaginal (CIDR) de progesterona. Un segundo grupo de 8 animales recibió el implante 7 días después y un día más tarde fue tratado el último grupo de 4 animales. El CIDR fue mantenido por 12 días en todas las ovejas. Con este método se logró una buena sincronización ya que a las 36 horas de retirado el CIDR el 100% de los animales ya había iniciado el celo.

Superovulación con FSH y eCG:

Para el tratamiento de superovulación se usaron las gonadotropinas Folículo Estimulante, FSH, (Folltropin-V, Lab. Vetrepharm, Canadá) y la gonadotropina Sérica de Yegua Preñada, eCG, (Folligon, Lab. Intervet, Holanda) que estimulan el desarrollo folicular induciendo ovulaciones múltiples.

El protocolo de tratamiento gonadotrófico usado correspondió básicamente al descrito por la empresa de Nueva Zelanda LambXL y por Australian Texel Corporation (ATC) que consiste en seis inyecciones de FSH en dosis decrecientes cada 12 hrs. los días 10, 11 y 12 del tratamiento con el CIDR. Junto con la 6° inyección de FSH se retiró el CIDR y se administró 160 UI de eCG. Se continuó la administración de FSH cada 12 h, en igual dosis que la 6° inyección, a las donantes hasta que fueron detectadas en estro.

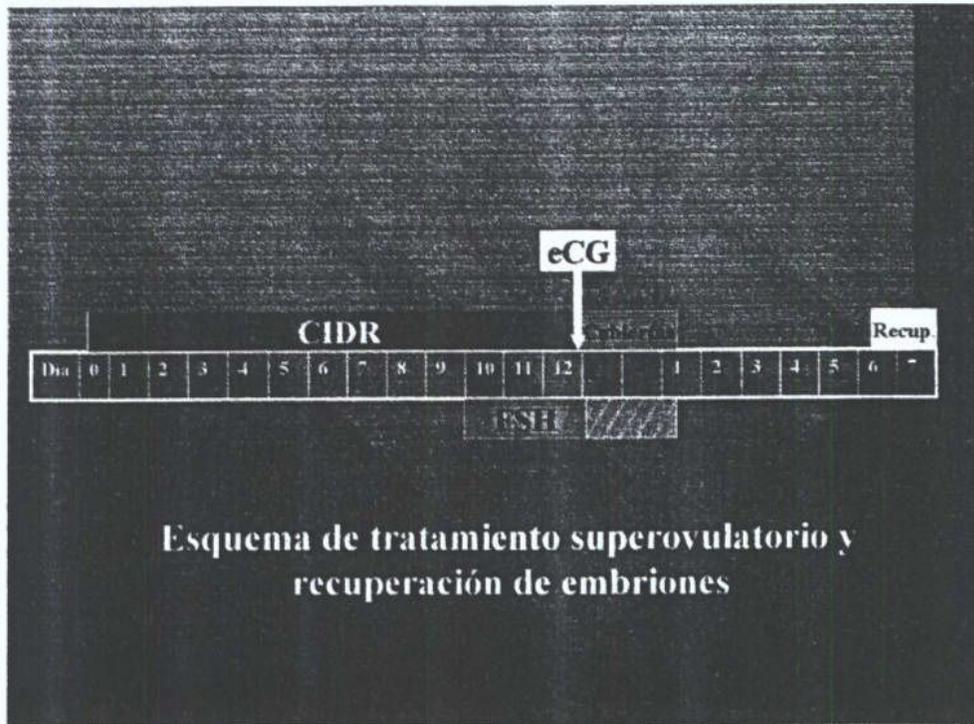


Foto 31. Esquema de inducción de superovulación, cubierta y lavado uterino



Foto 32. Respuesta superovulatoria en oveja tratada con FSH y eCG

Encaste:

Para el encaste se contó con tres carneros, perteneciente al Instituto de Reproducción Animal.

Los controles de celos comenzaron inmediatamente después del retiro del CIDR y continuaron cada 12 horas, mañana y tarde. Un carnero entró al corral de las hembras y se dejó que montara libremente a las ovejas en celo. Luego de 30 minutos se retiró este carnero y entró otro con el cual se repitió todo el procedimiento. Finalmente un tercer carnero tuvo la oportunidad de cubrir las ovejas. De esta manera, en algunos casos una oveja fue cubierta por los tres carneros.



Foto 33. Carnero celador con chaleco

Los controles de estros y cubiertas continuaron hasta que la última donante fue cubierta.

Recuperación de embriones

Para el lavado uterino se utilizó la laparoscopia descrita en Metodología, usándose solución Ringer Lactato al 1% de suero bovino para lavar el útero. El medio recuperado fue colocado en placas Petri y observado bajo la lupa (20-30X) para la identificación y conteo de ova recuperados.

Prueba 2

Se realizó en 8 ovejas una segunda prueba colocando CIDR durante 12 días y realizando tratamiento de superovulación similar al usado en la Prueba 1. Los encastes en

esta oportunidad se realizaron con monta dirigida, es decir, cada oveja fue cubierta por un solo un carnero. El lavado de útero en esta oportunidad se hizo por gravedad, es decir en lugar de usar jeringa para infundir líquido al útero se adaptó un sistema que permitía que el medio fluyera por gravedad, cerrando el paso con una llave cuando se estimaba que el útero estaba repleto.

Implementacion de TE

Entrenamiento de TE

Se realizó entrenamiento y práctica de TE usando un sistema mixto entre laparoscopia y laparotomía en los animales que la universidad dispuso para el entrenamiento del Médico Veterinario.

Transferencia de embriones por laparoscopia

Junto a las Pruebas (1 y 2) de recuperación de embriones se preparó un grupo de ovejas compradas para ser usadas como receptoras. En la primera prueba no se hizo sincronización de estros sino que se controló presentación natural de estros. Si una de estas ovejas estuvo en estro el mismo día que una donante fue usada como receptora de embriones.

En la Prueba 2 se prefirió administrar prostaglandina o implante de CIDR a las receptoras para aumentar el número de animales en celo coincidentes con las donantes (-24 hrs. a +24 hrs.).

Con ayuda del laparoscopio se determinó presencia de un cuerpo luteo y su ubicación (ovario izquierdo o derecho). Luego el cuerno uterino ipsilateral al CL fue tomado con una pinza y expuesto a través de una incisión de 3 cm. en la línea media. El cuerno fue perforado con una aguja roma 18g y a través de esta perforación, el embrión fue depositado en el lumen del cuerno uterino por medio de una cánula de transferencia.

En la Prueba 1 se efectuaron transferencias de 6 embriones a 3 ovejas receptoras y en la Prueba 2 se transfirieron 9 embriones a 5 ovejas receptoras.

Diagnóstico de preñez

Se realizó diagnóstico de preñez por ultrasonografía rectal alrededor de 30 días post-transferencia.

SEGUNDA ETAPA IMPLEMENTACION DE TE POR LAPAROSCOPIA A NIVEL PREDIAL

Aplicación de TE en la Zona Central

Discusión y planificación del trabajo

Con la ayuda de BTA se contactó un pequeño productor en la zona de Pumanque (VI Región), y en una primera visita al predio el equipo técnico del proyecto pudo conocer el sistema de manejo de los animales, manejo reproductivo y sanitario, disponibilidad de personal profesional y técnico de apoyo a las actividades a realizarse previo, durante y después de la TE. También se conoció las facilidades de infraestructura del predio, condiciones cercanas de alojamiento, alimentación, compra de insumos veterinarios, etc.

Además se conversó con el productor y su familia sobre los alcances del estudio y se planificó el trabajo a realizar junto con las responsabilidades de cada uno.

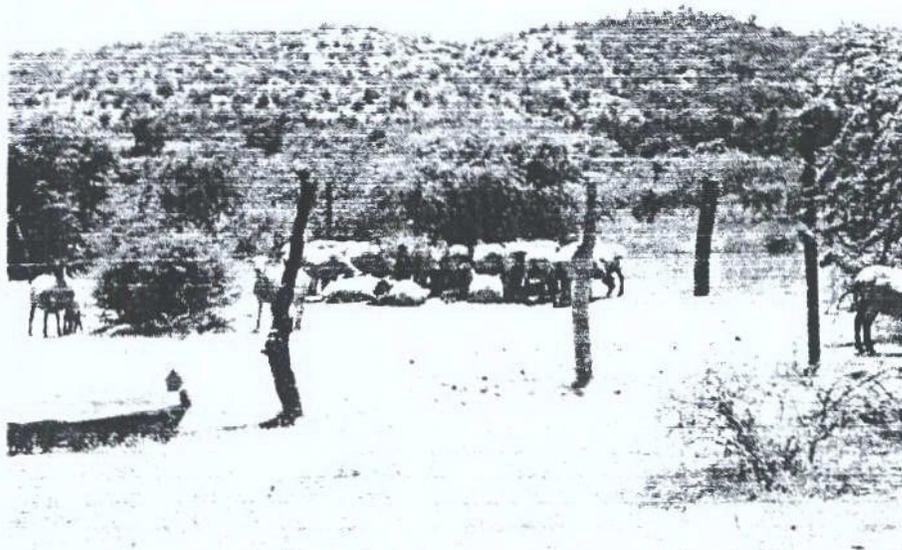


Foto 34. Predio de Pumanque, Sexta Región

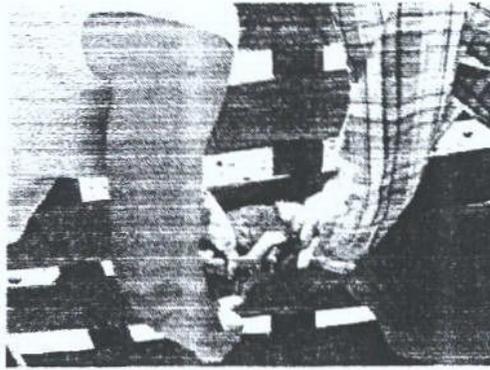


Foto 35. Individualización de animales mediante aretes plásticos

Identificación de hembras donantes y receptoras desde el rebaño

En esta primera visita se seleccionó del rebaño existente los animales que fueron debidamente identificados con aretes plásticos numerados, dejando 6 hembras donantes y 12 hembras receptoras.

Se dieron instrucciones sobre el manejo de estos animales particularmente sobre la importancia de su aislamiento del resto de los animales, especialmente de los machos del rebaño. Como manejo preventivo se trataron todas las ovejas con prostaglandina con un intervalo de tres horas aproximadamente y se dejó indicada una tercera aplicación de prostaglandina nueve días después para asegurarse que ningún animal estuviese gestante.

Selección del macho

Se hicieron gestiones para conseguir los mejores carneros de la zona como un incentivo para el pequeño productor de obtener crías con mejor genética.

Tratamiento con dispositivos y superovulación

El tratamiento de superovulación de acuerdo al protocolo usado en Valdivia fue aplicado por el veterinario del proyecto dirigiendo además el encaste de las ovejas donantes.

Encaste

Para la detección de celos se usó uno de los carneros del mismo predio con un chaleco para evitar la monta.

Se trajeron dos carneros Dorset de un predio vecino para el encaste de las ovejas donantes. A cada carnero se le destinaron tres hembras. En el momento de los encastes se detectó que ambos carneros no estaban en óptimas condiciones de salud, ya que uno presentaba cojera en una mano y el otro presentó un fuerte compromiso del sistema respiratorio al ejercicio. Pese a esto, las montas se llevaron a cabo completando al menos tres montas por oveja donante cada uno.

Segunda visita, Enero 2003



Tratamiento de ovejas donantes

Sincronización de ovejas receptoras

Detección de celos

Encaste de ovejas donantes

Foto 36. Actividades desarrolladas en una visita a Pumanque

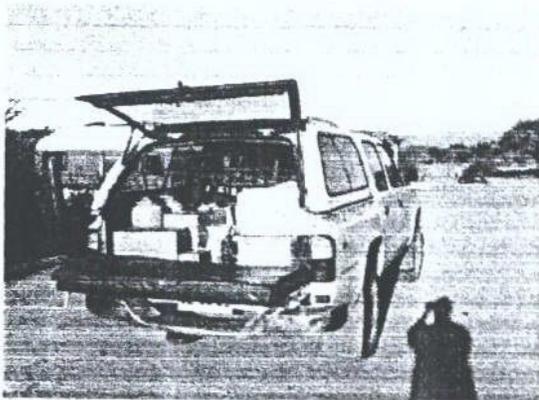


Foto 37. Llegada al predio con materiales



Foto 38. Preparación de oveja por vecinos

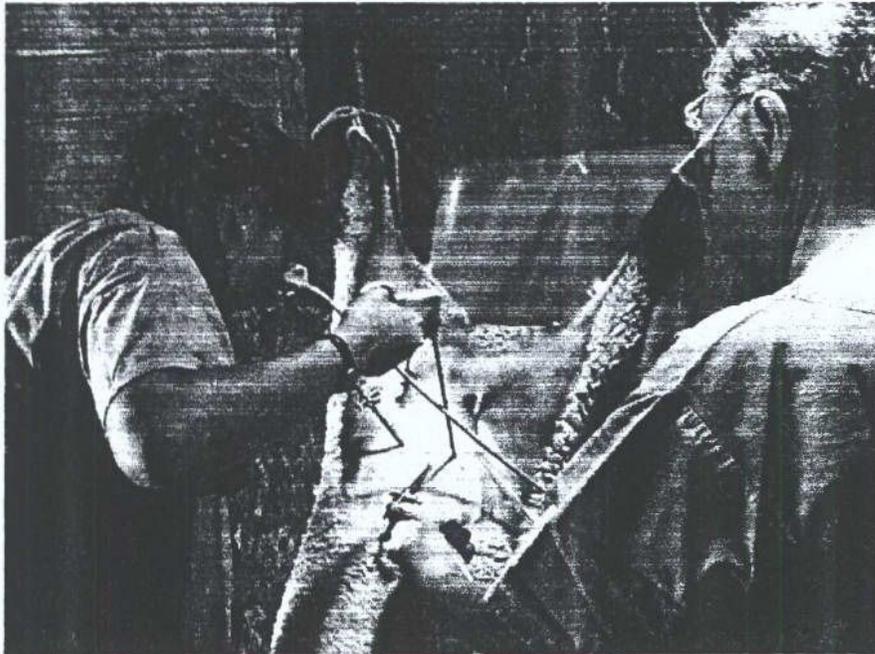


Foto 39. Equipo realizando recuperación de embriones en Pumanque

Recuperación y transferencia de embriones

El equipo técnico del proyecto visitó el predio el día anterior a la TE, verificando ayuno de los animales, como la habilitación y limpieza del lugar destinado para realizar las laparoscopías. Se instaló una casa rodante traída por BTA desde Santiago que habilitó como laboratorio y se conversó con el agricultor de las labores a desempeñar por ellos al día siguiente.

Se realizó recolección y TE de acuerdo a las técnicas descritas en Metodología.



Foto 40. Búsqueda de embriones junto a propietaria

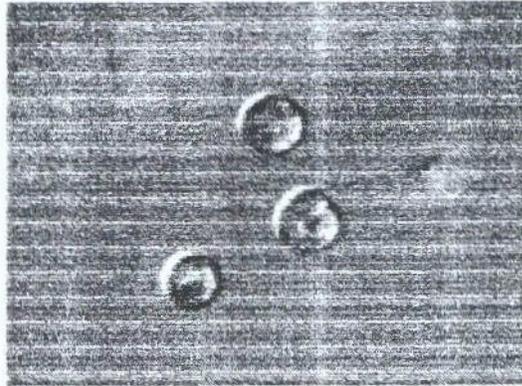


Foto 41. Blastocistos recuperados



Foto 42. Cordero producto de TE en Pumanque

Aplicación de TE en la Zona Centro-Sur

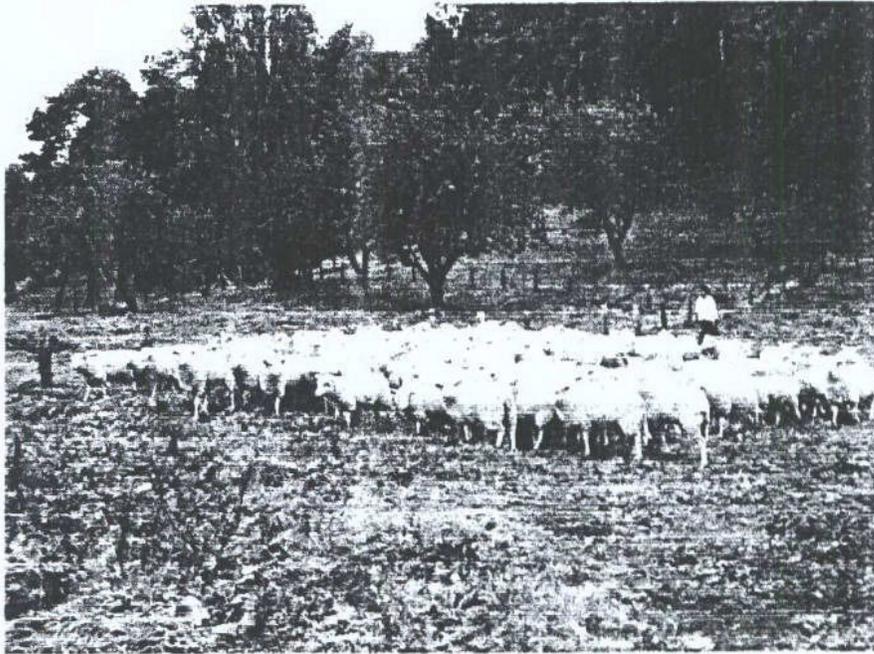


Foto 43. Ovejas del Predio Quillayes, Futrono, Décima Región

Este ensayo se realizó en un predio perteneciente a la empresa Quillayes, productora de leche ovina, en la zona de Futrono (X Región). La discusión y planificación del trabajo se realizó en forma similar al ejecutado en la Zona Central pero aquí se agregó la idea de evaluar la capacidad de trabajo del equipo técnico en un día, incluyendo el viaje desde y hacia Valdivia. Por esto la cantidad de animales preparados para este ensayo fue menor al usado en la Zona Central. Se usó las instalaciones de la lechería ovina como lugar para trabajar con laparoscopias y adaptar un laboratorio.

La identificación de hembras donantes y receptoras y demás procedimientos fueron similares al empleado en la Zona Central

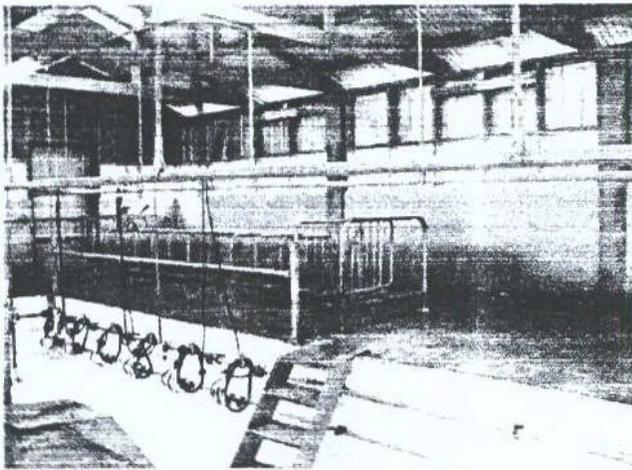


Foto 44. Facilidades de lechería ovina de Fundo Quillayes



Foto 45. Preparando una oveja junto a personal técnico del predio

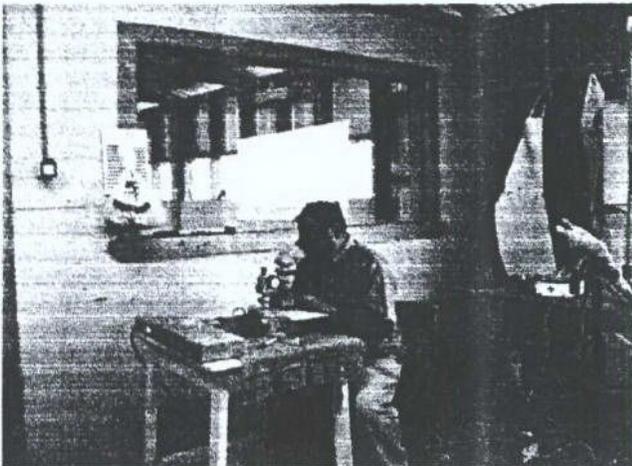
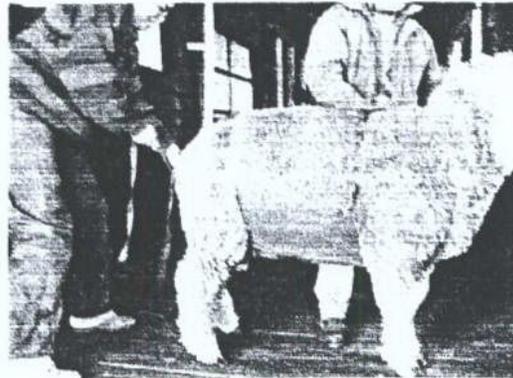


Foto 46. Búsqueda de embriones en la sala de lechería ovina

Aplicación de TE en la Zona Austral

Además de los mismos objetivos planteados para las zonas Central y Centro-Sur la actividad en esta zona consideró:

Evaluar el sistema de desplazamiento del equipo técnico, instrumentos y materiales de laboratorio desde Valdivia por avión y barco respectivamente a la ciudad de Punta Arenas.



Fotos 47 y 48 Colocación de chaleco a carnero de cabaña en Punta Arenas



Foto 49. Movimiento de grupo de ovejas receptoras con carnero celador

Discusión y planificación del trabajo

Se contactó un productor en la zona de Punta Arenas (XII Región) y por mail se planificó el trabajo a realizar.

Identificación de hembras donantes y receptoras

La elección tanto de donantes como receptoras quedó a cargo del productor quien seleccionó de su rebaño 8 hembras donantes y 20 receptoras. Se dio instrucciones para que estos animales fueran debidamente identificados con aretes plásticos numerados.

Selección del macho

El productor disponía de machos de elevado valor genético, campeones en distintas ferias de raza Corriedale en los últimos años, por lo que se seleccionó dos machos excelentes.

El tratamiento de sincronización y superovulación fue igual al usado en las zonas anteriores. Al productor se le enviaron por avión los dispositivos intra-vaginales los cuales fueron colocados a donantes y receptoras de acuerdo a instrucciones dadas desde Valdivia. Para aplicar el tratamiento con FSH, los Drs. Correa y Bücher se trasladaron a la ciudad de Punta Arenas donde permanecieron hasta el término de las transferencias de embriones.

Encaste

Para la detección de celos se usaron dos de los carneros de pedigrí del mismo predio con chalecos para evitar la monta. Se intentó hacer monta natural pero los carneros no fueron capaces de montar por lo tanto debió usarse inseminación artificial con semen fresco diluido en leche. Esta actividad fue realizada por el hijo del propietario quien insemina a sus ovejas rutinariamente. Las hembras donantes fueron inseminadas una sola vez alrededor de 4 a 6 horas post-detección de celo.

La recuperación y TE realizó en un galpón con facilidades de laboratorio para inseminación artificial.

Pruebas de campo similares se repitieron al año siguiente (2004) en el predio de un pequeño productor de Marchigüe (VI Región) y de Chonchi (Xa Región) y en una estancia de un productor de la XII Región. Aunque en el proyecto se planteó realizar pruebas de campo con animales de valor genético en la segunda temporada, se privilegió el aspecto social antes que el genético eligiendo los predios de la sexta y décima región dado la buena relación que se había establecido con la directiva de ARCO S.A. y el inicio de conversaciones con AGRECOR de Chiloé.

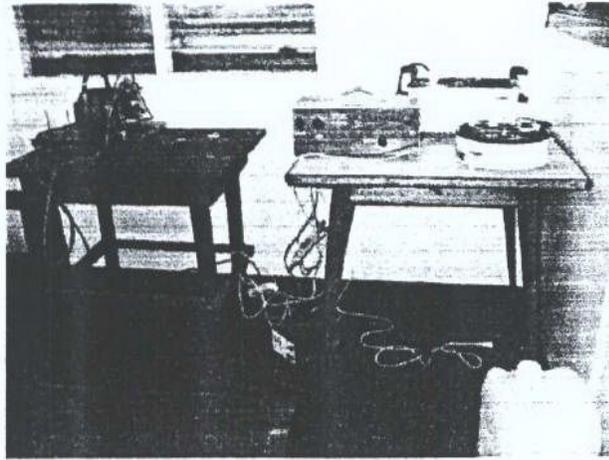


Foto 50. Facilidades para laparoscopia en cabaña Teruel Aike Sur

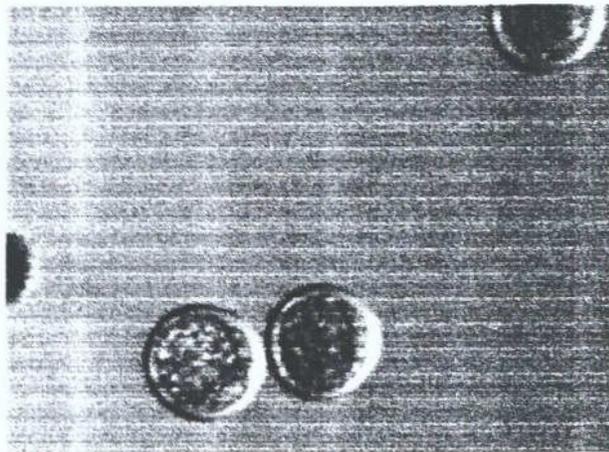


Foto 51. Blastocistos recuperados

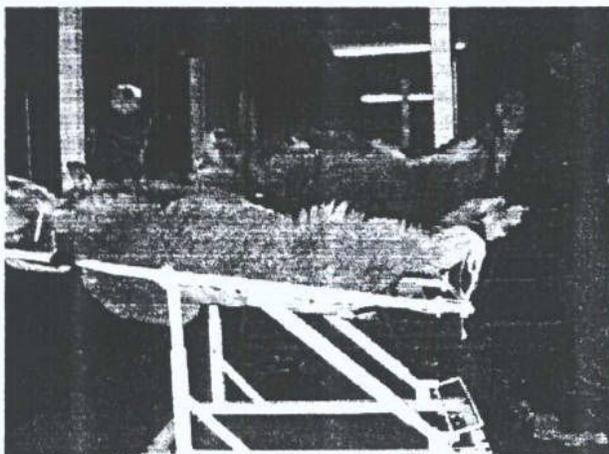


Foto 52. Receptoras preparadas para recibir embriones

Aplicación de TE en la Zona Central

Este ensayo se realizó en un predio en Marchigüe perteneciente a Don Luis Osorio Contreras, pequeño productor asociado a ARCO S.A. La discusión y planificación del trabajo se realizó en forma similar al ensayo del año anterior.

Aplicación de TE en la Zona Centro-Sur

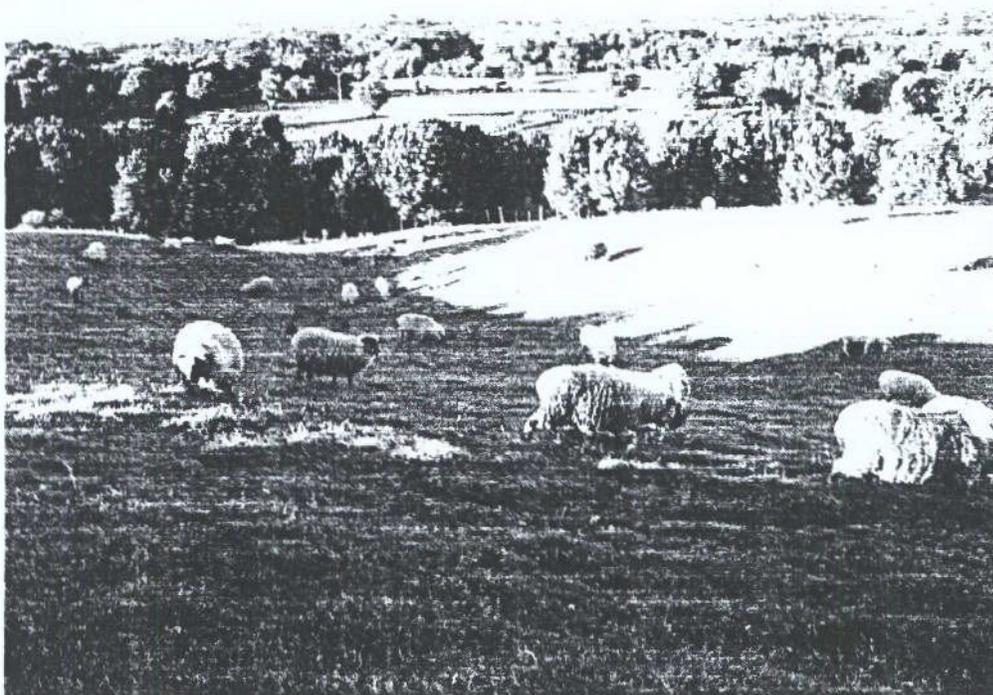


Foto 53. Predio de Chonchi, Chiloé, Décima Región

Este ensayo se realizó en un predio perteneciente a un pequeño productor de Chonchi asociado a AGRECOR, Chiloé, X Región. Conviene destacar que después del seminario realizado en Quellón se acordó con los asociados que esta novedosa experiencia se realizara en el predio de don Jaime Rain. Además es necesario destacar la cooperación de INIA Butalcura, Chiloé que prestó hembras Suffolk de alta calidad genética para ser usadas como donantes.

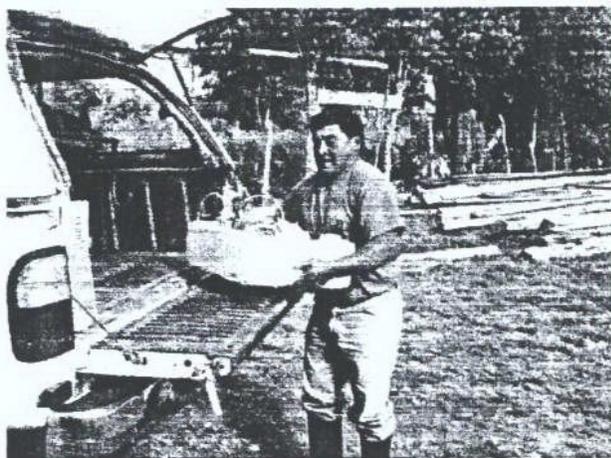


Foto 54. Descargando el material para montar el laboratorio



Foto 55. Preparando una oveja donante por el Sr Rain y esposa

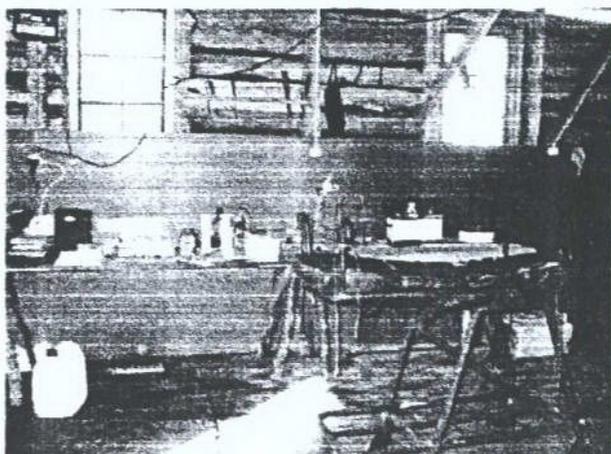


Foto 56. Adaptación de un pequeño galpón para trabajar

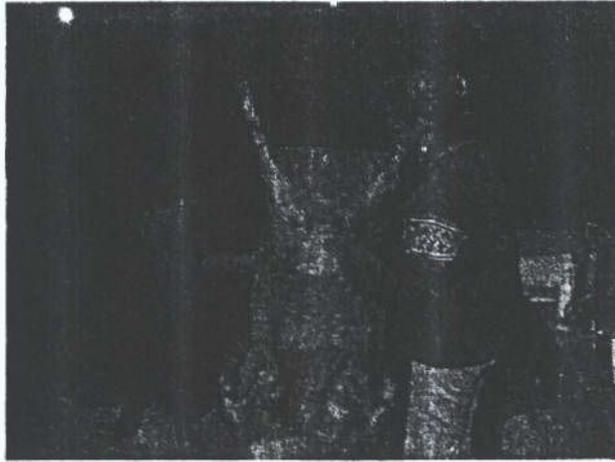


Foto 57. Oveja receptora lista, el propietario se prepara para sacarla de la camilla

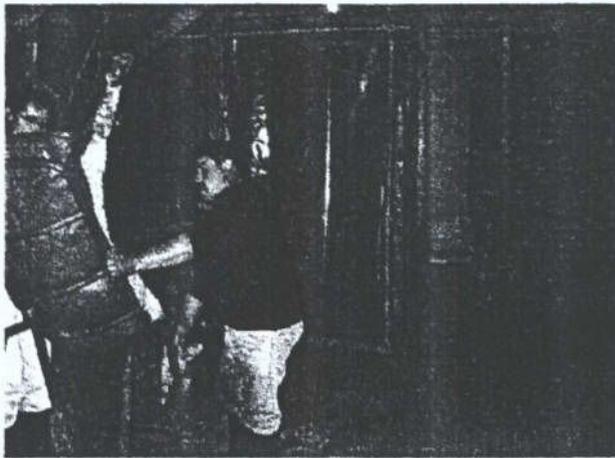


Foto 58. Junto a la camilla donde se trabaja la oveja note el "Laboratorio" que se ha adaptado al fondo del galpón

Aplicación de TE en la Zona Austral

Esta prueba se realizó en la estancia Santa Josefina, Punta Arenas, XII Región. Se decidió realizar esta experiencia en esta Estancia por los contactos establecidos durante un día de campo en el que se dieron a conocer los resultados de proyectos realizados en la estancia, de otros proyectos regionales y de este mismo proyecto. Se utilizaron ovejas Corriedale comunes como donantes y receptoras.

Los dispositivos vaginales se enviaron por correo y los procedimientos de superovulación y encaste fueron iguales a los utilizados en los otros ensayos.

TERCERA ETAPA TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES OVINOS

Punción de ovarios post mortem

Inicialmente se realizó punción y aspiración folicular en ovarios de ovejas muertas durante la implementación de la técnica laparoscópica y ovarios bovinos traídos del matadero. Los ovarios adquiridos en la Planta Faenadora de Valdivia fueron transportados al Instituto de Reproducción Animal en termos con solución salina más antibiótico (penicilina-estreptomicina) entre 27°C y 30°C

Punción folicular

Luego se iniciaron trabajos de punción folicular mediante laparoscopia en seis ovejas; se afinaron detalles de la técnica, equipamiento y montaje del sistema de vacío y succión. Al comienzo se trabajó con las ovejas sin ningún tipo de estimulación y luego se se repitió la punción folicular en cuatro animales, dos de los cuales recibieron tratamiento de 1000 UI de eCG por animal haciendo la punción folicular 6 días mas tarde.

Estudio y maduración de ovocitos

Se aprendió a identificar COCs, su evaluación y se realizaron ensayos preliminares de maduración.

Capacitación Espermática

Se continuó con el adiestramiento de los carneros para ser manejados, llevados a la sala de recolección, saltar sobre una oveja en celo, permitir la manipulación del pene y aceptación de la vagina artificial.

Se fueron fijando parámetros de análisis espermático como volumen, concentración y calidad espermática. Se hicieron pruebas de dilución y congelación con distintos crío protectores como TRIS y Lactosa al 11%.

CUARTA ETAPA IMPLEMENTACION DE UN BANCO GENETICO

Los primeros pasos para la creación de un banco genético ovino se dieron con la traída desde Magallanes de dos carneros y dos ovejas Texel producto de un proyecto FIA en esa región. Hubo dificultades en el transporte de estos animales porque en avión el costo es muy alto y además la línea aérea los dejaba en Puerto Montt. Finalmente se logró que llegaran a Valdivia.

Después de un periodo de adaptación se hizo tratamiento para inducir superovulación con FSH y eCG. La presentación de estro fue controlada en mañana y

tarde y cada oveja fue cubierta con un solo carnero. Siete días después de la cubierta se efectuó lavado uterino mediante laparoscopia.

Paralelamente, comenzó el entrenamiento de los carneros a la vagina artificial

5. RESULTADOS

PRIMERA ETAPA ENTRENAMIENTO EN TECNICAS DE LAPAROSCOPIA

Desarrollo del protocolo de lavado y recuperación de embriones

La técnica laparoscópica se fue perfeccionando a medida que se avanzó en el desarrollo de la actividad lográndose finalmente un adecuado manejo de ella. En total se realizaron 42 laparoscopías en 25 ovejas. Se logró lavar 35 cuernos uterinos recuperando líquido en 30 de ellos. En los cinco cuernos restantes aunque el catéter fue colocado adecuadamente infundiéndose medio hacia el lumen no fue posible recuperarlo. Con estos resultados puede considerarse que la técnica quedó ocupando en promedio de 24 minutos para el lavado uterino.

Hubo una mejoría notable en la ejecución de la técnica a medida que se adquirió experiencia en el manejo de ésta. Sin embargo conviene hacer notar que aún hay oportunidades en que pese a que todo se hace en forma correcta no se logra recuperar todo el medio infundido sin existir una causa aparente para ello.

Inducción de superovulación

El protocolo de sincronización de estros e inducción de superovulación usado tuvo como resultado que el 90% de las ovejas respondieron con estro antes de 24 horas de removido el CIDR y el 100% dentro de las 72 horas. Hubo un promedio de 8,9 y 7,0 CL/oveja para las Pruebas 1 y 2, respectivamente.

Lavado y recuperación de embriones

De las 20 ovejas sometidas al tratamiento gonadotrófico, 18 de ellas superovularon, es decir tenían 3 o más cuerpos lúteos.

Se recuperó un total de 91 ova de los cuales el 87 % estaban fecundados. Se obtuvo una eficiencia de recolección de 42% en la Prueba 1 y 53% en la Prueba 2 y un promedio de 3,8 embriones por oveja en ambas pruebas.

Implementación de TE

Proceso de TE por laparoscopia

Tres de las ocho ovejas receptoras fueron diagnosticadas preñadas por ultrasonografía y estas tres ovejas parieron cuatro corderos (dos una cría y una mellizos). Este 37,5% de preñez puede parecer bajo pero hay que considerar que fue la primera experiencia que se hacía y que además los embriones no fueron transferidos inmediatamente ya que fueron llevados a otro laboratorio para exposiciones y fotografías. De hecho esta tasa de preñez aumentó en las pruebas de campo por lo que puede considerarse como satisfactoria tanto la implementación de la técnica como el entrenamiento del profesional contratado para el proyecto.

SEGUNDA ETAPA

PROGRAMA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN TERRENO:

Los resultados de la TE en terreno de la primera temporada (2003) se presentan en los cuadros 1, 2 y 3. Estos resultados indican que fue posible realizar TE a nivel predial, implementando un laboratorio mínimo para observar y manejar embriones. Se adaptó un lugar para realizar operaciones de laparoscopia usada en la recolección y TE; esto es particularmente notorio en los predios de los pequeños productores donde se trabajó en condiciones mínimas; conviene hacer notar el entusiasmo del propietario, su familia y sus vecinos que ayudaron en todas las faenas. Es necesario hacer notar el aumento del promedio de ova recolectados en Pumanque (6 ova por oveja versus 3,8 logrado en el laboratorio de Valdivia). Lamentablemente los carneros utilizados mostraron algunos problemas físicos lo que se tradujo en una baja tasa de fecundación y bajo número de embriones transferibles. En la Zona Sur se demostró que era posible hacer lavado uterino a cuatro ovejas donantes y transferir todos los embriones recuperados en un solo día, incluyendo el viaje de ida y vuelta a Valdivia. En la Zona Austral la tasa de superovulación y el número de ova recuperados disminuyó notablemente al ser comparado con los resultados obtenidos en las otras zonas del país, no pudiendo establecerse si esto se debe a la raza Corriedale, o a condiciones ambientales o tal vez a la sumatoria de ambas causas.

Pese a esta menor respuesta en la Zona Austral, los promedios totales de 4,5 ova recuperados, 2,7 embriones por oveja están dentro de los márgenes considerados como normales para este tipo de trabajo en esta especie (Cuadro 1).

Además de estos resultados fue posible confirmar que se puede trasladar el equipo técnico, material e instrumental de laboratorio a las condiciones de campo, y realizar estas técnicas que siempre han sido consideradas sofisticadas y de uso exclusivo para una élite de productores. Tal vez la mayor dificultad en este aspecto se dio para trasladar los implementos necesarios a Magallanes donde hubo que preparar siete baúles y enviarlos 14 días antes por vía terrestre-marítima. Lo sorprendente fue que en ambas estancias (temporadas 2003-2004) tenían facilidades extraordinarias para trabajar y no era necesario llevar tanto instrumental.

CUADRO 1. Resultados del programa de recuperación de embriones en terreno. Temporada 2003.

ZONA	N° ovejas donantes	Ova recuperadas	Ova fecundadas	Embriones Transferibles
CENTRAL	6	36	12	11
SUR	4	20	18	16
AUSTRAL	7	20	15	14
TOTAL	17	76	45	43

CUADRO 2. Resultados de la recuperación de embriones con respecto a la presencia de cuerpos lúteos.

ZONA	N° ovejas donantes*	Cuerpos lúteos	Total Ova recuperadas	% Recuperación
CENTRAL	4	49	28	57,1
SUR	4	43	20	46,5
AUSTRAL	7	41	20	48,8
TOTAL	15	133	68	51,1

* Sólo se consideró las ovejas donantes con registro completo.

CUADRO 3. Resultados del programa de transferencia de embriones en terreno. Temporada 2003.

ZONA	N° ovejas receptoras	Embriones transferidos	Ovejas preñadas	Corderos Nacidos
CENTRAL	10	11	6	7
SUR	6	10	3	5
AUSTRAL	14	14	8	8
TOTAL	30	35	17	20

Los resultados de la segunda temporada de pruebas de campo (2004) se presentan en los Cuadros 4 y 5. Cabe señalar que los resultados de TE en la Zona Austral fueron anulados porque hubo un problema grave en la preparación del medio TMC 199 que se destinó para usar en terreno. Por error del técnico que preparaba los medios para ser embalados y llevados a Punta Arenas puso una concentración del medio de cultivo 10

veces mayor, esto afectó gravemente a los embriones y no hubo preñez. Paradojalmente, en la Zona Austral que era la última prueba de campo que hacíamos, el lugar con un laboratorio maravilloso para trabajar, con una persona excelente como don Hugo Vera para ayudar también tuvimos problemas para hacer el lavado uterino y recuperar embriones; de hecho 3 de 8 ovejas donantes quedaron preñadas indicando que hubo embriones que no fueron retirados por el lavado uterino. La presentación de problemas en el manejo de las hembras donantes, que bajaron de peso (5-6 kg) porque se mantuvieron en un solo potrero cercano al laboratorio y no comieron el suplemento que se les dio podría ser una causa para explicar estos resultados.

En el Cuadro 4 se presentan los resultados del programa de recuperaciones de embriones durante la temporada 2004, aquí nuevamente se ratifica que en la Zona Austral fueron los resultados mas pobres

CUADRO 4. Resultados del programa de recuperación de embriones en terreno. Temporada 2004.

ZONA	Nº ovejas donantes	Ova recuperadas	Ova fecundadas	Embriones Transferibles
CENTRAL	5	25	17	17
SUR	5	19	14	14
AUSTRAL	3	11	9	9
TOTAL	13	55	40	40

CUADRO 5. Resultados del programa de transferencia de embriones en terreno. Temporada 2004.

ZONA	Nº ovejas receptoras	Embriones transferidos	Ovejas preñadas	Corderos Nacidos
CENTRAL	14	17	5	7
SUR	11	13	6	6
AUSTRAL	*	*	*	*
TOTAL	25	30	11	13

a. Resultados anulados por fallas técnicas

CUADRO 6. Resultados totales del programa de recuperación de embriones en terreno. Años 2003-2004.

ZONA	N° ovejas donantes	Ova recuperadas	Ova fecundadas	Embriones Transferibles
CENTRAL	11	61	29	28
SUR	9	49	32	30
AUSTRAL	10	31	24	23
TOTAL	30	131	85	83

CUADRO 7. Resultados totales del programa de transferencia de embriones en terreno. Años 2003-2004.

ZONA	N° ovejas donantes*	Embriones Transferidos	Ovejas preñadas	Corderos Nacidos
CENTRAL	24	28	11	14
SUR	17	23	9	11
AUSTRAL	14	14	8	8
TOTAL	55	65	28	33

El 50,1% de preñez total (28 de 55) y de corderos nacidos por embriones transferidos (33 de 65) están dentro de los márgenes normales de este tipo de experiencias. Esto significa que puede considerarse como establecidas las técnicas de recuperación y transferencia de embriones mediante laparoscopia. Estos resultados coinciden con aquellos obtenidos en Valdivia donde las pruebas preliminares indicaban una eficiencia de 53% en la recuperación de líquido infundido al útero y el número de embriones recuperados en relación al número de cuerpos luteos observados. Esto indica que la técnica no es capaz de recuperar todos los embriones. Los técnicos australianos y algunos sudamericanos que siguen su escuela continúan usando la laparotomía para lavar el útero y recuperar embriones con mayor eficiencia; el argumento para utilizar la técnica quirúrgica es que desde el punto de vista genético si el cruzamiento ha sido con carneros de alta selección siempre las hijas serán genéticamente superiores a las madres por lo tanto es suficiente realizar dos a tres recuperaciones quirúrgicas por temporada. Creemos que esta justificación no es válida en el caso de Chile donde el grupo de hembras de razas valiosas es muy pequeño; por lo tanto debiera utilizarse la laparoscopia, técnica que en Nueva Zelanda se ha utilizado hasta 6 veces en el mismo animal en una temporada, pudiendo usarse en los años siguientes (W. Vivanco, comunicación personal).

III ETAPA PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES OVINOS.

Punción Folicular en ovejas:

Se logró establecer la técnica de aspiración folicular de ovocitos desde el tracto reproductivo de ovejas a través de laparoscopia. Con los siguientes resultados:

CUADRO 8: Resultados obtenidos en el programa de punción folicular por laparoscopia.

Sesiones	Nº ovejas intervenidas	Nº COCs recuperados	Nº Folículos MIV*
Primera	2	11	8
Segunda	1	0	0
Tercera	2	9	8
Cuarta	1	6	6
Quinta	1	5	5
Sexta	2	5	5
Séptima	2	9	8
Octava	2	11	9
Novena	2	7	6
Décima	2	7	7
Décima primera	2	6	5
Décima segunda	4	18	14
TOTAL	22	94	81
Promedio sesión		8,6	7,4
Promedio oveja		4,3	3,7

El Cuadro 8 muestra el número de COCs recuperados por oveja de 4,3 y de los cuales son posibles de continuar a producción in vitro 3,7, lo cual para ser ovejas no estimuladas exógenamente, es un buen número, además que esta intervención al no ser invasiva, ni demorosa, permite trabajar semanalmente con los animales en un ritmo de 4 ovejas en una hora.

Maduración de ovocitos:

los COCs recuperados de ovejas fueron madurados logrando un adecuado desarrollo en cambio los COCs obtenidos de material postmortem, no maduraron por lo que fueron desechados y no pudieron continuar su proceso.

Fecundación y cultivo in vitro:

Inicialmente los resultados obtenidos en el cultivo de ova fecundados no sobrepasaron el estado de 4 células a los 2 días de desarrollo.

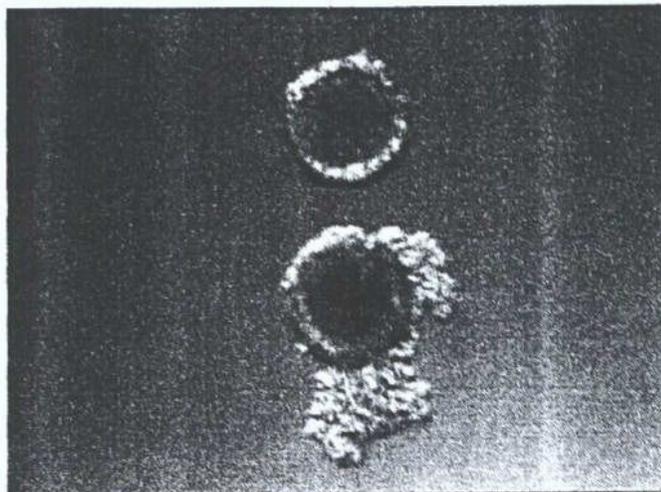


Foto 59. COCs aspirado por laparoscopia.



Foto 60. Los mismos COCs de la fotografía superior pero con 22 horas de maduración.

- Estudios de maduración de ovocitos y fecundación in vitro en ovinos

Los resultados de la maduración y fecundación in vitro se observan en el Cuadro 9 a través del porcentaje de segmentación, este se observa desde las 48 horas post-inseminación y se evalúa el grado de desarrollo embrionario.

CUADRO 9. Resultados del programa de maduración y fecundación in vitro.

Maduración In-Vitro (N° COCs)	Desarrollo embrionario				
	2 células	4 células	8 células	Mórula	Blastocisto
81 COCs	8	3	1	3	0

La eficiencia de la fecundación in vitro esta representada por la tasa de segmentación alcanzada que fue de 18,5%, este valor es bajo; pero se debe considerar como experiencia, y se demuestra que es posible y que hay que mejorar este porcentaje.



Foto 61. Embrión de dos células.

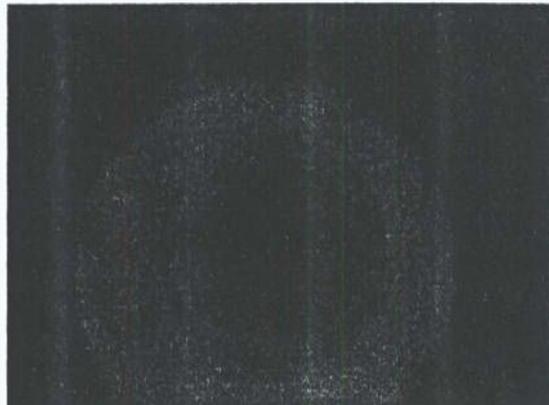


Foto 62. Embrión de cuatro células

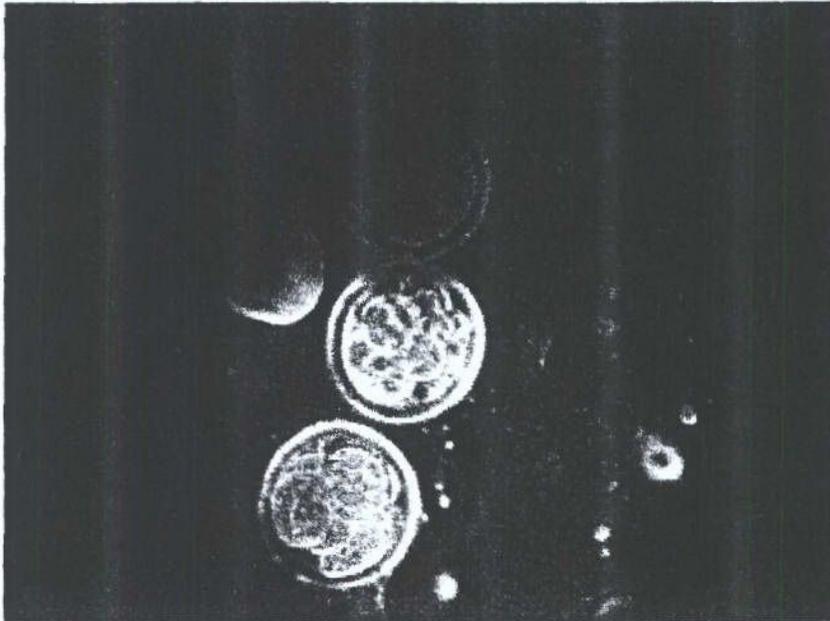


Foto 63. Ova con diferentes estados de desarrollo embrionario.



Foto 64. Embrión en estado de mórula.

- Estudios de Cultivo In Vitro de embriones ovinos

El grado de desarrollo embrionario llegó a mórula sin alcanzar el estado de blastocisto, que es el estado ideal para congelar. Esto significa que hay que seguir trabajando hasta lograr una tasa aceptable de desarrollo de blastocistos por lo tanto es necesario analizar los sistemas de cultivo y manejo del embrión.



Foto 65. Primer embrión ovino obtenido in vitro en Chile.

El 4,9% de desarrollo embrionario hasta mórula es meritorio pero todavía puede ser considerado bajo por lo que será una meta prioritaria de un próximo proyecto validar estos resultados conseguir tasas de desarrollo mas altas.

- Estudios de producción in vitro de bovinos (ovarios de matadero)

En bovinos se han realizado desde octubre 2003 aspiración folicular de ovarios de matadero, con lo cual se chequean los medios y se realiza paralelamente producción de embriones in vitro de estos. En las experiencias realizadas desde enero en adelante ya se vio resultados, los cuales se muestran en la siguiente tabla:

Sesiones	Nº COCs recuperados	Nº COCs MIV	Nº de ova segmentados (> de 2 células)	Porcentaje de Fecundación
Primera	60	50	20	40
Segunda	30	25	10	40
Tercera	40	35	15	43
Cuarta	50	40	21	52,5
Quinta	50	40	25	62,5
Sexta	40	35	15	43
Séptima	50	40	25	62,5
Octava	50	40	22	55
TOTAL	370	305	153	50,2

El desarrollo embrionario alcanzó a de 8 –16 células, no llegando a mórula, lo que indica que si bien hay un aceptable índice de fecundación hay fallas en el sistema de cultivo in vitro los medios que se opera (CR1aa).

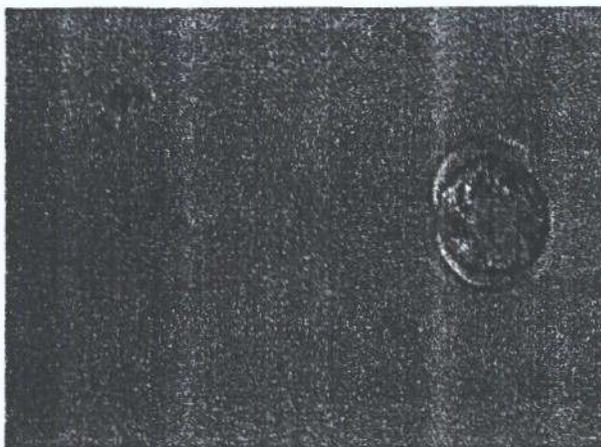


Foto 66. Embrión recuperado de TE en Chiloé y transferido a oveja receptora.

6. DIFUSION

Durante el periodo que abarcó el proyecto FIA BIOT-01-P-063 se llevaron a cabo las siguientes actividades de difusión:

Seminarios:

- **27 de Septiembre de 2002** se realizó en Valdivia el Seminario 1 con el Lanzamiento del Proyecto BIOT-01-P-063. En dicho evento se contó con la asistencia de 16 invitados, a quienes se les informó de los alcances del proyecto dentro del marco de una gestión a nivel nacional en pro del desarrollo de biotecnologías reproductivas para el rubro ovino, con el fin de mejorar la calidad y productividad de los sistemas e incrementar así la competitividad del sector.

Como expositores se contó con la presencia de un miembro de la empresa BTA, quien habló sobre el desarrollo de la página web: www.embriones.cl y de los alcances en difusión que se pretenden lograr por dicho medio. Otro expositor fue el Coordinador del proyecto Dr. Jorge Correa quien presentó el trabajo realizado hasta el momento y finalmente el señor Ignacio Briones de FIA hizo ver la importancia que a nivel nacional se está dando al desarrollo de biotecnologías.

- **20 de Noviembre 2003** :Taller de Trabajo-Marchigüe. Actividad en la que se mostró los proyectos que estaban operando de alguna u otra manera en la región con respecto a desarrollo ovino. El Dr. Correa presentó el tema “Herramientas biotecnológicas y su perspectiva en la producción ovina de la VI Región”, luego en la tarde participaron de una reunión de trabajo con los agricultores de ARCO S.A., GTT, FIA para estudiar la posibilidad de realizar actividades futuras.

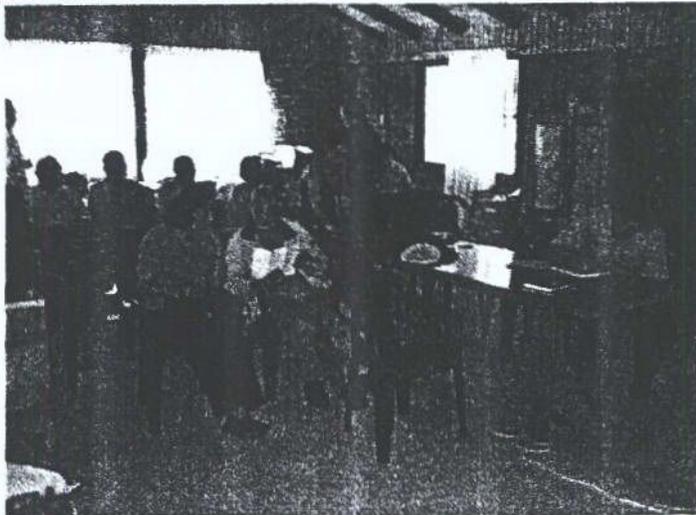


Foto 67. Seminario Taller Marchigue, VI Región.

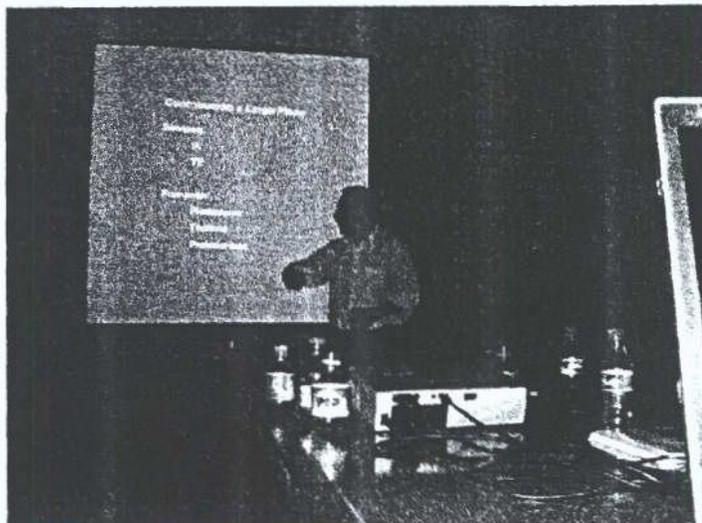


Foto 68. Presentación Dr. Correa.

- **Enero 2004.** El seminario fue realizado en la Isla de Chiloé, en vista de las necesidades observadas en la visita de diciembre, donde tuvimos la posibilidad de intercambiar con sus organizaciones las expectativas y falencias que tenían, viendo en conjunto que la realización de un seminario en el ámbito de la reproducción, sería valorado por los agricultores productores de ovinos, aprovechando además, que estos se encuentran ya organizados, bajo AGRECOR. Luego de las conversaciones se llegó al acuerdo de realizar

este seminario, para los líderes de cada organización dependientes de AGRECOR, pero finalmente el medio solicitó un mayor cupo de participantes, ampliando la invitación a representantes de las agrupaciones de AGRECOR de Chonchi, Quellón, Dalcahue y diferentes agricultores agrupados en PRODESAL, junto con la presencia de técnicos y profesionales del área.

La actividad se realizó en la Hostería de Quellón, comenzando a las 11:00 de la mañana esperando a los agricultores con un desayuno, luego el seminario y finalmente un almuerzo.

El seminario fue realizado por el equipo técnico del proyecto distribuido en los siguientes temas y orden:

Programa Seminario Quellón.

Fisiología reproductiva del macho	Dra. Letelier
Fisiología reproductiva de la hembra	Dra. Bücher
Manejos reproductivos del rebaño ovino al encaste e inseminación artificial	Dra. Letelier
Aplicación de biotecnologías reproductivas	Dr. Correa

- **18 de enero de 2005:** Seminario de finalización del proyecto FIA BIOT-01-P-063, La actividad se realizó en el Campus Universitario de la Universidad Austral de Chile comenzando a las 10:30 con las charlas y finalmente un almuerzo; se invitó a autoridades de la zona, del rubro agropecuario, representantes de asociaciones de productores ovinos y pequeños productores. Asistieron 19 personas.

Programa Seminario Final.

Saludo autoridades universitarias y del agro.	
Vision de FIA en el sector agropecuario.	Representante de FIA
Proyección comercial del rubro ovino de carne.	Gerente carnes Ñuble
Sistemas de Información y gestión.	Gerente BTA
Resultados proyecto FIA-01-P-063.	Dr. Correa

Congresos

- Presentación de un poster en el Seminario "Investigación y desarrollo en biotecnologías silvoagropecuarias: situación actual chilena". Organizado por FIA, Ministerio de Agricultura, CORFO y CONICYT.
- XXVII Reunión Anual Sociedad Chilena de Producción Animal donde se presentó el trabajo; "Transferencia de embriones en ovinos mediante laparoscopia" Correa J.E., D.D. Bücher y C.V. Schüler.
- XII Congreso Chileno de Medicina Veterinaria con el trabajo; "Ensayos preliminares de lavado uterino mediante laparoscopia en ovinos" Bücher D.D., C.V. Schüler y J.E. Correa.
- 15th International Congress on Animal Reproduction. Porto Seguro, Brazil.
- Small Ruminant Satellite meeting, Colonia, Uruguay.

Otros:

- Puesta en marcha y mantención de la página web www.embriones.cl.

7. PRODUCTORES PARTICIPANTES

ZONA CENTRAL	
Nombre del productor	Luis Osorio Contreras
Identificación predial	Parcela N° 5 El Esfuerzo (200 ha) La Estrella, VI Región.
Dirección postal	Correo La Estrella, Sector Barrancas, VI Región.
Teléfono	09-9053392
e-mail	-
Identificación de ovinos	Rebaño de 160 animales Suffolk
Hembras donantes	6 ovejas Suffolk y 2 Milchschaf
Hembras receptoras	24 ovejas mestizas de Suffolk/Merino
Machos encaste	2 carneros Suffolk y 2 Milchschaf
Número de embriones transferidos	17 embriones a 14 receptoras
Fecha de la transferencia	06 y 07 de Mayo de 2004
Diagnóstico de preñez: fecha	
Número receptoras preñadas	
Número de gestaciones dobles	
Partos: fecha	
Número de crías nacidas	
ZONA CENTRO- SUR	
Nombre del productor	Jaime Rain
Identificación predial	X Región.
Dirección postal	X Región.
Teléfono	09-5753552
e-mail	-
Identificación de ovinos	Rebaño de animales cruza de, Latxa Romney, Suffolk y Mestizas
Hembras donantes	8 ovejas Suffolk
Hembras receptoras	24 ovejas mestizas
Machos encaste	1 macho Suffolk
Número de embriones transferidos	13 embriones a 11 receptoras
Fecha de la transferencia	18 y 19 de Marzo de 2004
Diagnóstico de preñez: fecha	6 por no retorno al celo 1-10/04/04
Número receptoras preñadas	
Número de gestaciones dobles	
Partos: fecha	
Número de crías nacidas	

ZONA CENTRAL

Nombre del productor	Felipe Parraguez Gálvez
Identificación predial	Parcela San Felipe (123 há), comuna de Pumanque, VI Región.
Dirección postal	Correo Pumanque, VI Región.
Teléfono	09-9309203
Identificación de ovinos	Rebaño de 115 animales Suffolk/Hamsire
Hembras donantes	6 ovejas mezcla de Suffolk/Hamsire
Hembras receptoras	12 ovejas mezcla de Suffolk/Hamsire
Machos encaste	2 carneros Dorset
Número de embriones transferidos	11 embriones a 10 receptoras
Fecha de la transferencia	06 y 07 de Febrero de 2003

ZONA CENTRO- SUR

Nombre del productor	Quillayes de Peteroa Ltda.
Identificación predial	Inmobiliaria Campo Bueno (60 há), comuna de Futrono, X Región.
Dirección postal	Casilla 42, Futrono, X Región.
Teléfono	063-1972083
e-mail	respinosav@hotmail.com
Identificación de ovinos	Rebaño de 550 animales cruza de Milchscaf, Corriedale y Romney
Hembras donantes	4 ovejas Milchscaf/ Romney
Hembras receptoras	6 ovejas Milchscaf/ Corriedale

8. CONCLUSIONES

Capacitación de personal. El proyecto permitió que tres médicas veterinarias jóvenes se capacitaran en biotécnicas reproductivas aplicadas al ovino e incluso dos de ellas están realizando estudios superiores (Doctorado en Ciencias Veterinarias) estimuladas por la participación en el proyecto, la experiencia recibida y están conscientes que sus estudios actuales en la especie ovina puede aportar al desarrollo pecuario de Chile en un futuro cercano. La tercera de ellas continúa trabajando en esta área al ser contratada para el nuevo proyecto FIA, continuación de éste, dedicado a la creación de un Centro Tecnológico para ovinos. Si sumamos los dos estudiantes de Medicina Veterinaria que hicieron sus tesis de grado con apoyo del proyecto podemos concluir que hay 5 médicos veterinarios entrenados en técnicas reproductivas en la especie ovina.

Por otro lado, las actividades del proyecto demostraron que hay una falta de preparación del personal a nivel de usuarios y sus trabajadores, y especialmente a nivel de técnicos para ayudar en un manejo reproductivo intensivo en los ovinos.

Recuperación y transferencia de embriones mediante laparoscopia en ovinos. A través del proyecto se logró desarrollar técnicas para recuperar y transferir embriones mediante laparoscopia con una eficiencia aceptable y dentro de los márgenes descritos como normales para esta especie.

Programa de TE en terreno. Los resultados, con excepción de una experiencia en Magallanes, de las pruebas de campo demostraron que es posible aplicar estas biotecnologías en cualquier parte de Chile, incluso a nivel de pequeños productores. Esto no significa que estas técnicas puedan masificarse pero si esta experiencia está demostrando que sería posible asistir a lugares que puedan usarse como centros locales de semen, embriones, o reproductores (machos y hembras).

Estudios de Fecundación in Vitro y cultivo de embriones ovinos. El proyecto permitió establecer técnicas como punción folicular mediante laparoscopia, maduración ovocitaria, capacitación espermática, fecundación in vitro y cultivo de embriones. Técnicas que si continúan siendo perfeccionadas podrían ser una valiosa herramienta para la difusión de material genético ovino.

Relación con productores. A través del proyecto, y particularmente la activa y valiosa participación del Dr. Ignacio Briones, supervisor de FIA, se estableció contacto con dirigentes de agrupaciones de productores, particularmente pequeños productores de las Sexta y Décima Regiones que abren enormes posibilidades de trabajo futuro. También se establecieron relaciones con inquietos e innovadores productores de la región magallánica,

particularmente con otros ejecutores de proyectos FIA lo que permite una integración y futuros trabajos conjuntos.

Relación con dirigentes e industriales de productos ovinos. Gracias al proyecto hubo contacto e incluso un experimento en el predio de un dirigente de la Asociación de Criadores Corriedale de Magallanes; además hubo contactos preliminares y colaboración de la gerencia técnica de Carnes Ñuble, eventuales exportadores de carne ovina de la zona Sur de Chile, además de la región magallánica tradicional.

Relación con Servicios Públicos. A través del proyecto se han abierto excelentes contactos con personal de INDAP (Décima Región) e INIA (Duodécima Región).

Relación con ciber-espacio. Gracias a la cooperación y participación de BTA se pudo dar a conocer el proyecto (www.embriones.cl) y establecer contacto con el sector productivo a través de un servicio de chat.

9. RECOMENDACIONES

- Apoyar nuevas iniciativas destinadas a aplicar las técnicas desarrolladas en este proyecto.
- La existencia de los profesionales preparados en el proyecto debiera ser considerada para trabajos especializados en reproducción ovina.
- Apoyar capacitación de personal a nivel de usuarios, técnicos y profesionales.
- Dar énfasis a las actividades de transferencia tecnológica dirigidas a los pequeños agricultores y agrupaciones de productores ovinos, con el fin de que las técnicas desarrolladas puedan ser utilizadas para mejorar la calidad de los rebaños y así cumplir con las nuevas exigencias del mercado.
- Sugerir que a niveles superiores (Ministerio de Agricultura, MIDEPLAN) se den a conocer y se aprovechen las capacidades intelectuales, profesionales y de infraestructura existente en el país.
- Apoyar el uso de Internet como una herramienta de difusión y comunicación entre el sector productivo, público y académico a través de páginas como www.embriones.cl o páginas similares que puedan ser creadas.

10. OTROS ASPECTOS DE INTERES

A través del proyecto se hizo trabajos preliminares sobre conservación de embriones ovinos mediante crioconservación o vitrificación. Estos resultados dio origen a presentación científicas a congresos internacionales de reproducción. Esta situación permitió que un profesional joven tuviera acceso a un encuentro con especialistas e investigadores de una amplia gama de actividades en reproducción animal e inseminación artificial. De hecho, Danai Bücher a través de estos contactos personales logró ser aceptada para una pasantía de seis semanas en un centro de investigación de excelencia en Nueva Zelanda entre Marzo y Abril de 2005.

EMBRYO TRANSFER IN SHEEP UNDER THREE DIFFERENT FIELD CONDITIONS IN CHILE*

D. Bücher and J.E. Correa

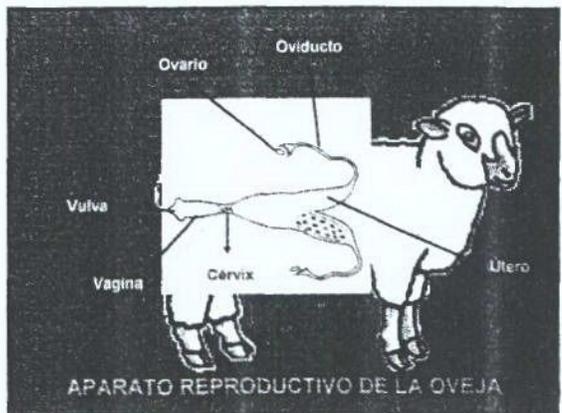
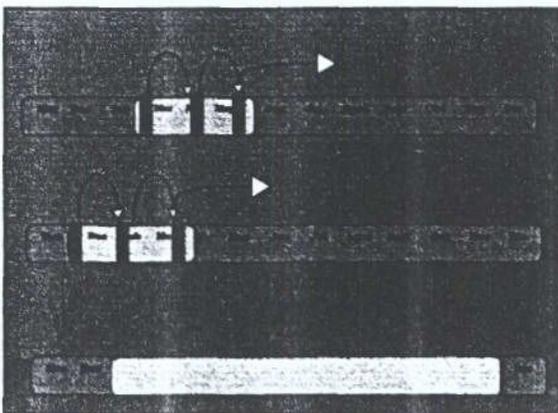
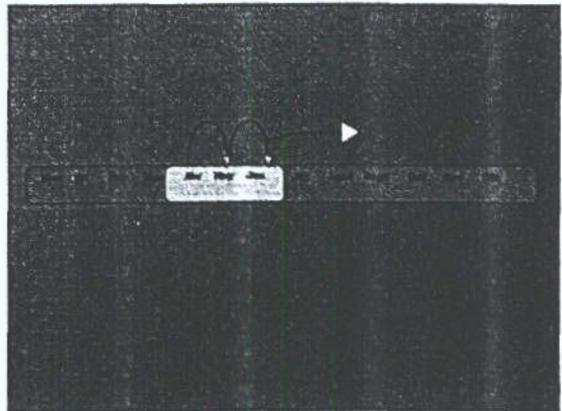
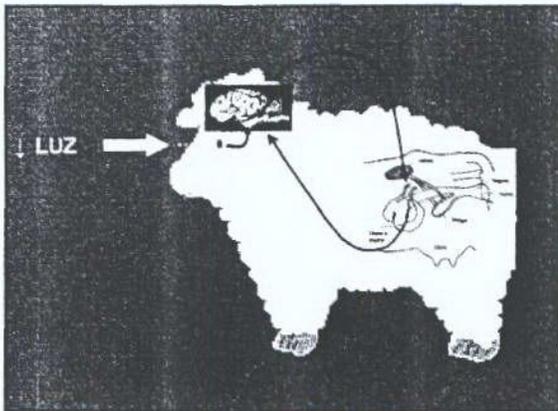
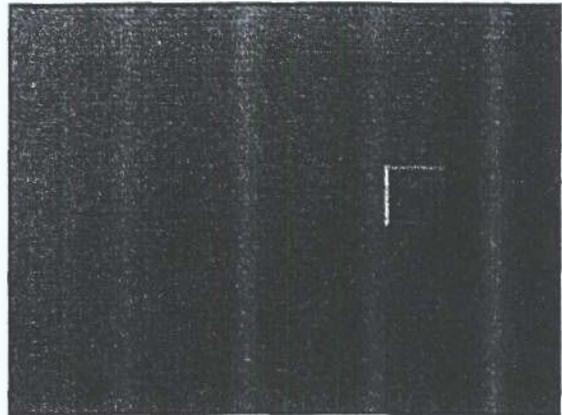
Animal Reproduction Institute, Universidad Austral, Valdivia, CHILE.

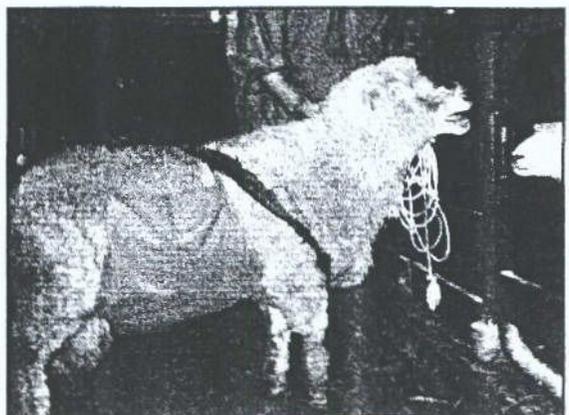
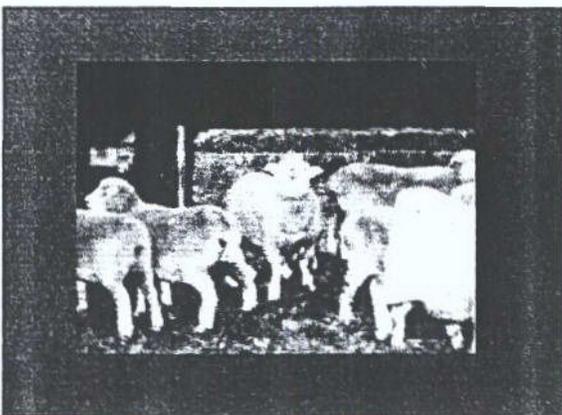
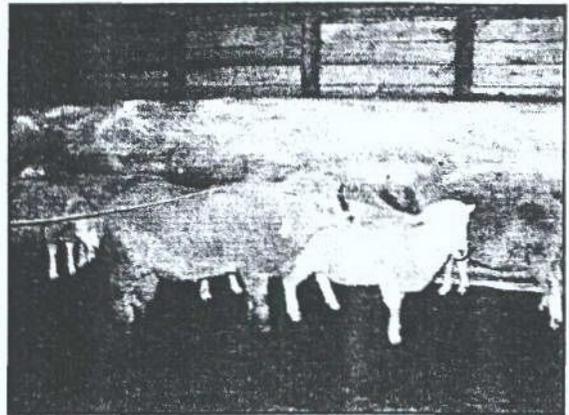
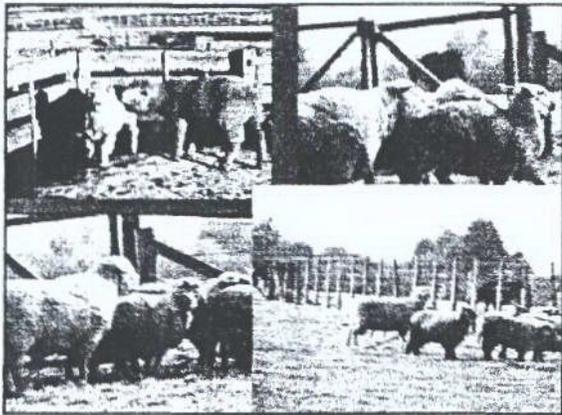
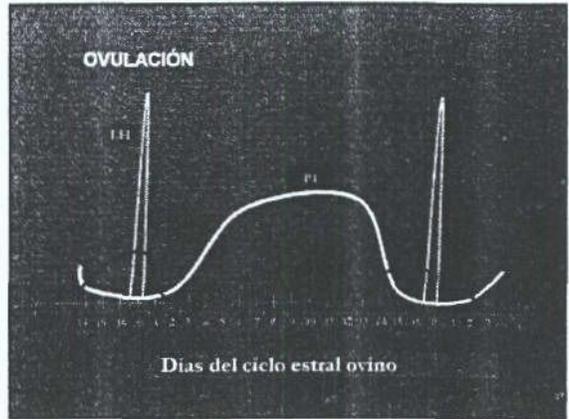
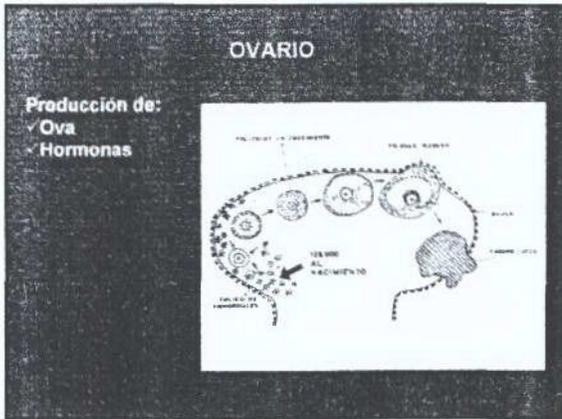
The use of Embryo Transfer (ET) in sheep is limited due to surgical collection and high cost. The present project was carried out in order to setup the recovery and transfer of sheep embryos by laparoscopic techniques and then study their application under field conditions. Embryos were collected by Vivanco's laparoscopic embryo recovery technique described by us (1). The transfer technique was into the uterine horn ipsilateral to ovulation side exposed through a small incision with the aid of a Grasping forceps. Three field assays were carried out in the Central (800 km), South (100 km) and Patagonian (2.400 km away from the university) zones of Chile. *Central Zone*: Eighteen Suffolk Down ewes belonging to one small farm holder were synchronized and super ovulated as per treatment described by Vivanco (2). All technical operations were carried out by the authors of the abstract improvising a mobile house as laboratory. *South Zone*: A milking shed was conditioned as laboratory and recovery place. Ten Milchschaef ewes were used. Super ovulation, recovery and transfer techniques were performed as in Central Zone. *Patagonian Zone*: Synchronization of 28 Corriedale ewes was done by a local technician. Equipment was sent previously by truck in a ferry and the 2 person team flew at time for the beginning of the super ovulation FSH-treatment. Laparoscopies were done in an AI laboratory of the farm. The total average of 4.5 recovered embryos per ewe is within normal range. This recovery could have been higher if the result obtained in Patagonia had not been as low as it is shown in Table 1. Breed could be the factor causing this poor ovulation.

Table 1. Recovery and transfer results of the field assays

Zone	Recovery Ova/donor	Receptors (n)	Lambing rate
Central	6	10	60
South	5	6	50
Patagonian	2.9	14	57
Total	4.5	30	56.7

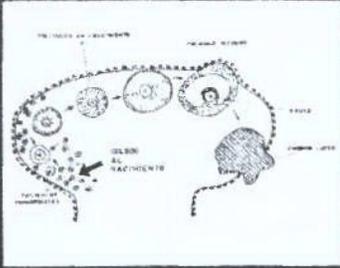
The 56.7 lambing rate is within the normal range for ET in sheep (2). These preliminary results are showing that laparoscopic embryo recovery and transfer performs satisfactorily under different field conditions. 1) Bücher D, Schüler C y Correa JE. 2002. XII Congreso Nacional de Medicina Veterinaria, Chillán, Chile. 2) Vivanco W. 2001. In Biotecnología de la reproducción. Gustavo Palma. Ediciones INTA, Argentina. *Project FIA BIOT 01 P 063, Chile. E-mail: danaibucher@uach.cl





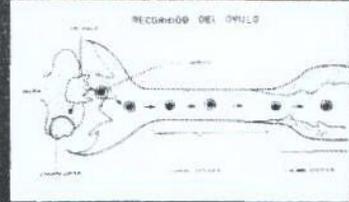
OVARIO

- ✓ Producción de:
- ✓ Ova
- ✓ Hormonas

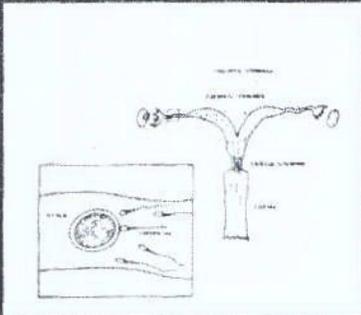


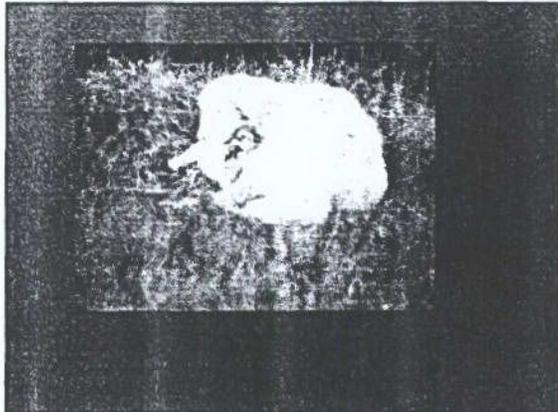
OVIDUCTO

- ✓ Transporte
- ✓ Fecundación
- ✓ Desarrollo temprano del embrión



FECUNDACIÓN





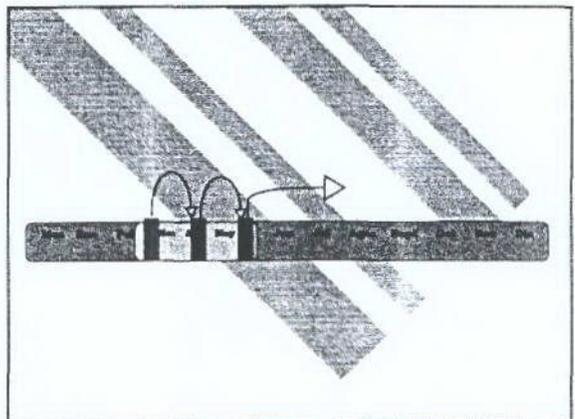
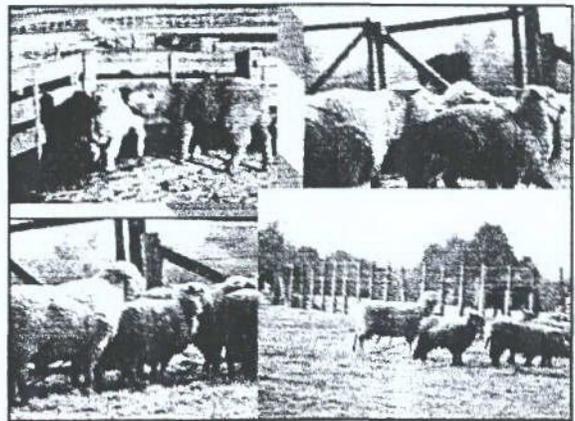
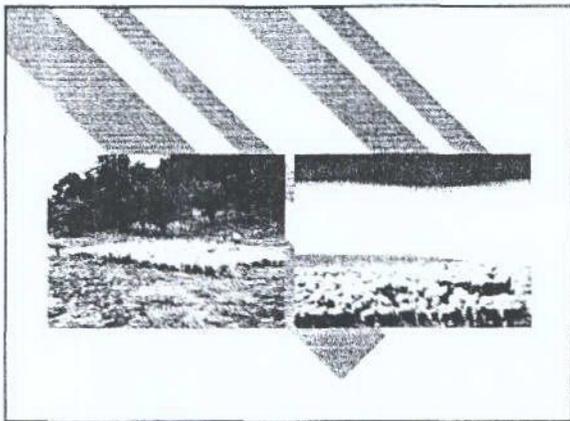
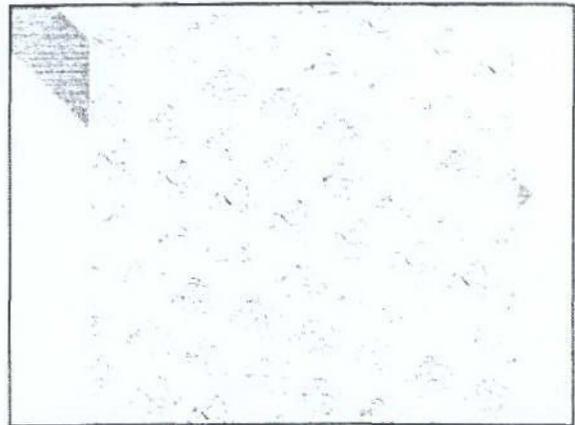
UTERO
✓ Implantación
✓ Gestación: protección y nutrición

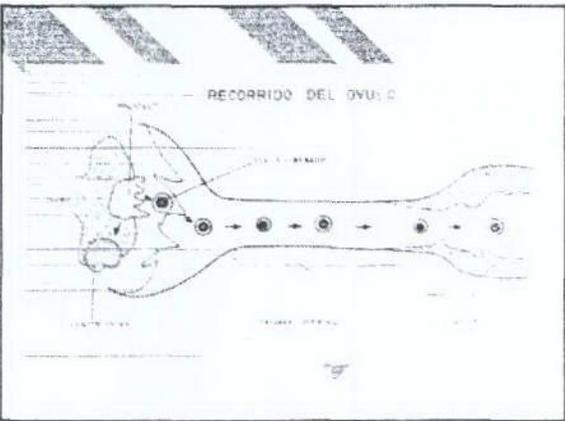
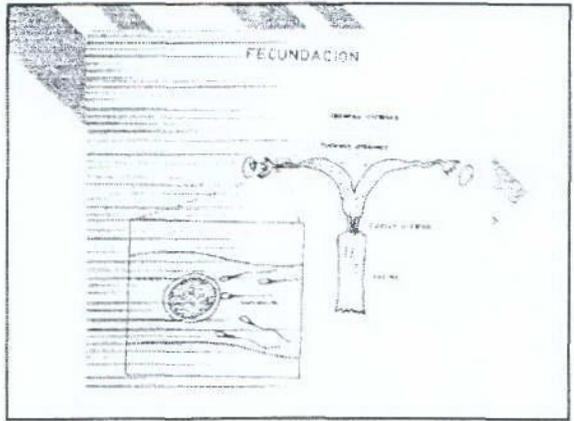
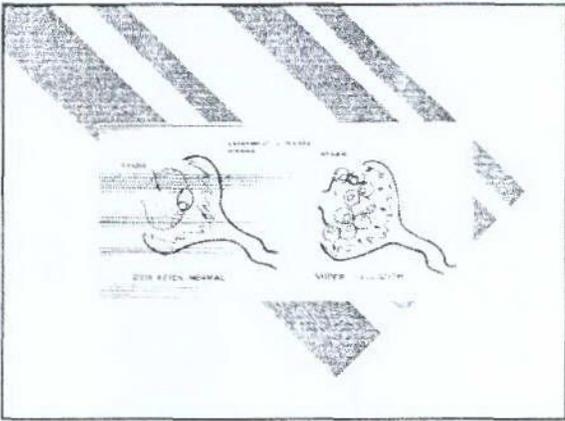
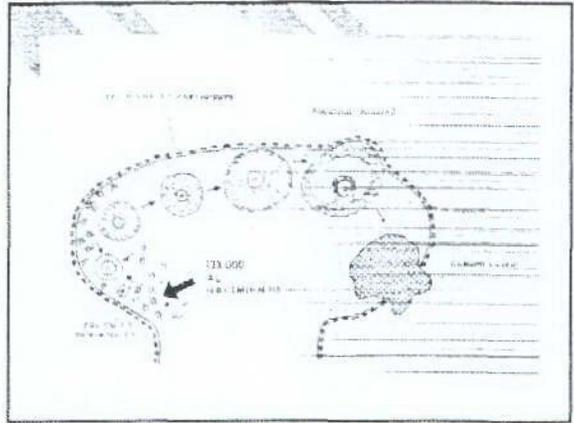
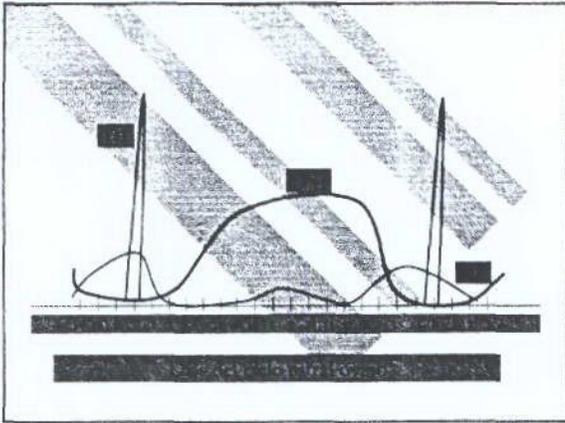
CERVIX
✓ Barrera
✓ Puerta

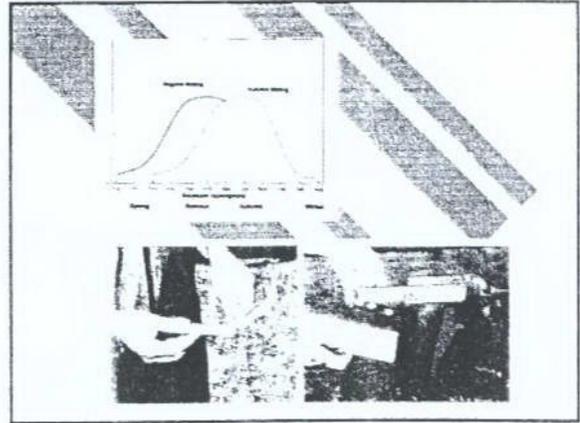
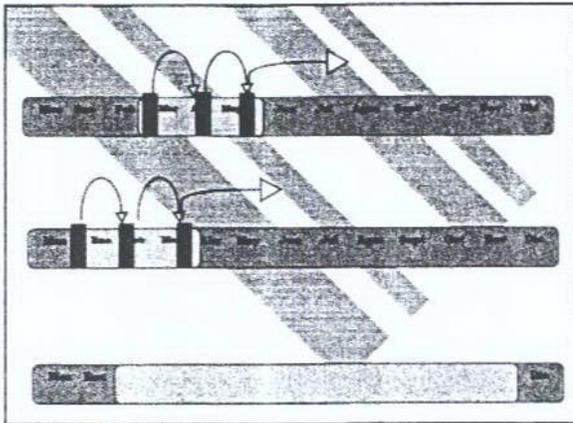
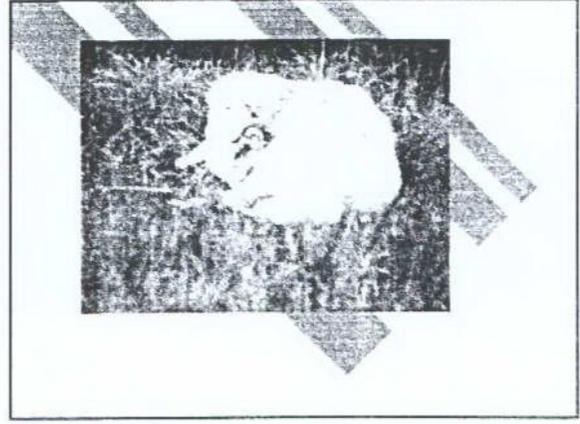
VAGINA
✓ Eyaculado

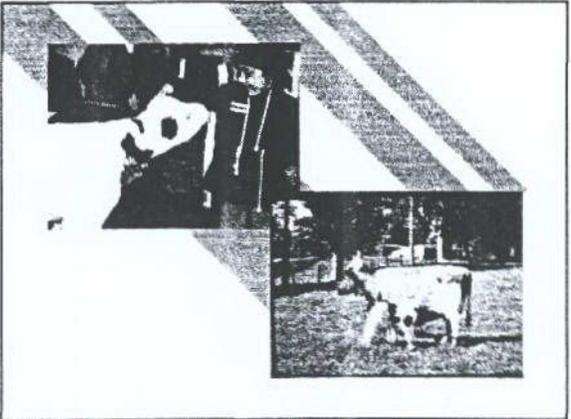
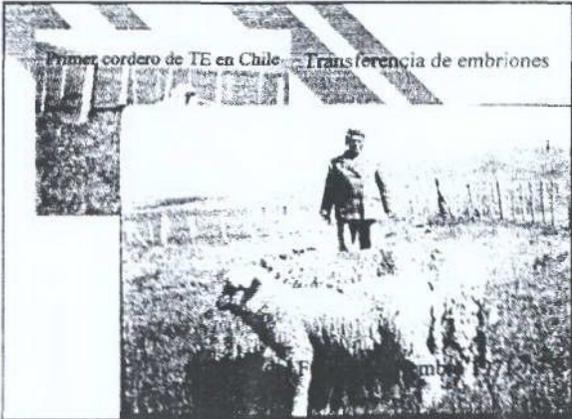
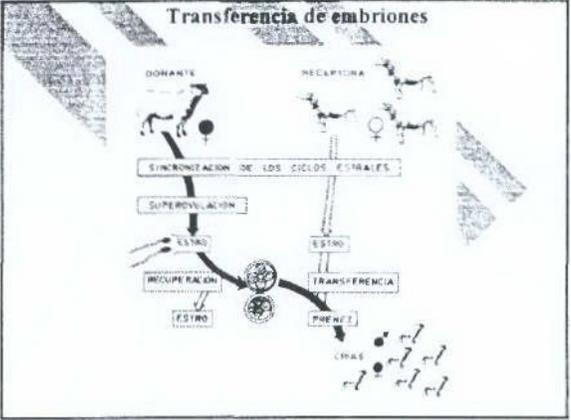
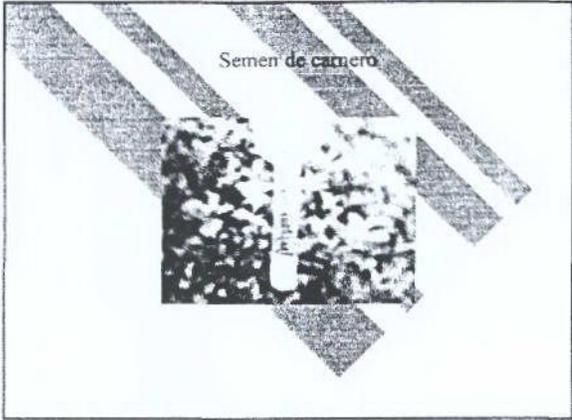
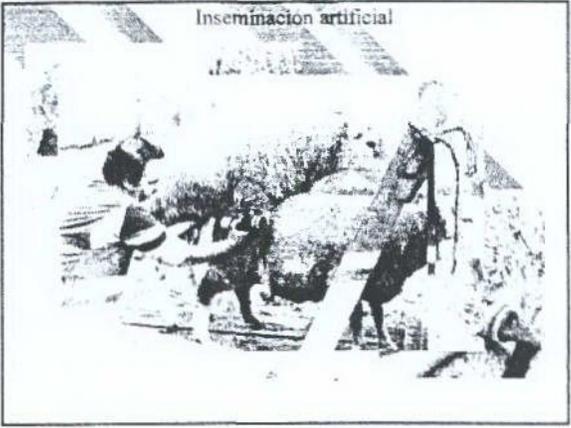
VULVA
✓ Órgano externo

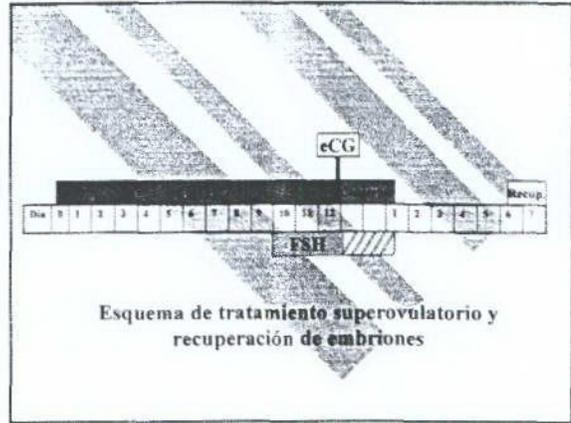
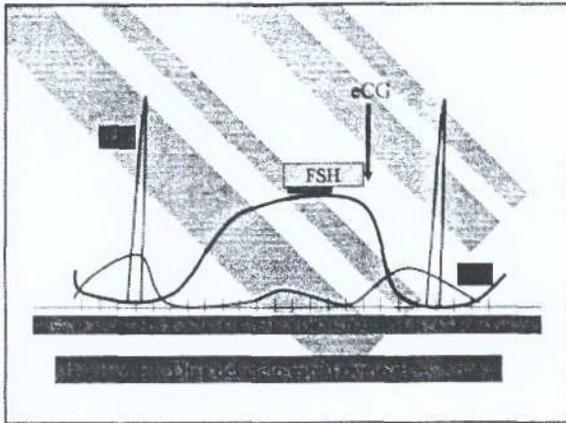
The diagram shows a frontal view of the female reproductive system. At the top are the 'Cuernos Uterinos' (uterine horns). Below them are the 'Fallopian tube' and 'Ovary'. The main part of the uterus is labeled 'Body of Uterus', with 'Caruncles in uterus wall' indicated. Below the body is the 'Cervix', which leads into the 'Vagina'. The 'Vulva' is shown at the bottom. The diagram is enclosed in a rectangular box.

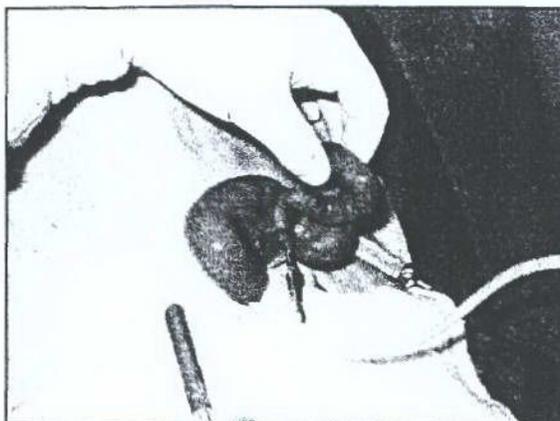
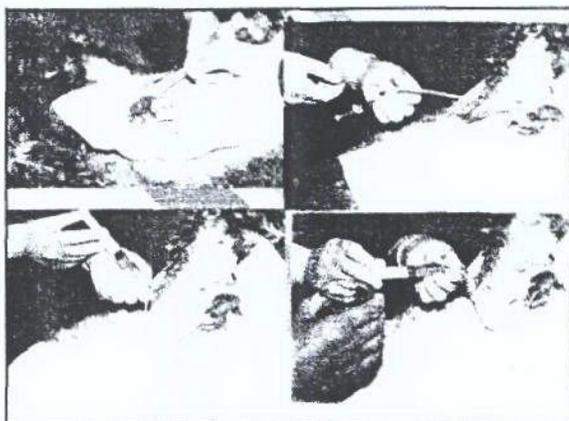












Recuperación y Transferencia de embriones mediante laparoscopia en ovejas

Proyecto FIA BIOT 01 P 063

Objetivos

Desarrollar e implementar técnicas de recuperación y transferencia de embriones por laparoscopia

Estudiar aplicación de técnicas a nivel de predios

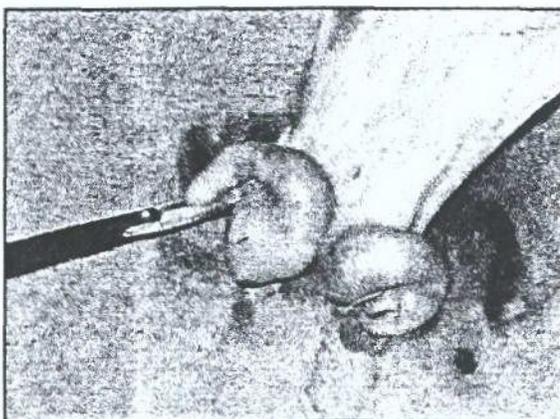
Comenzar estudios de producción *in vitro* de embriones ovinos

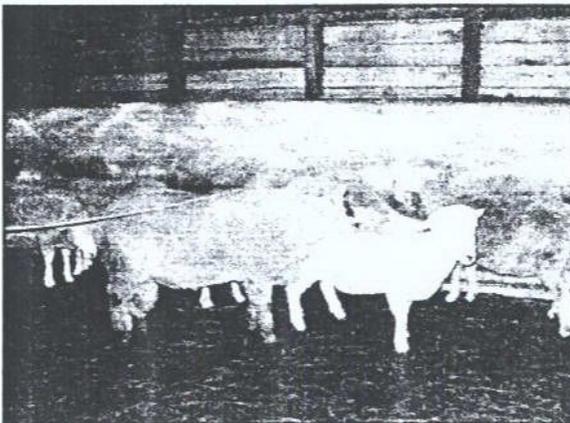
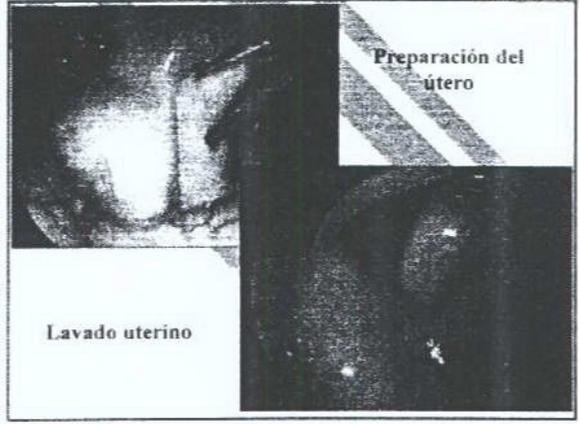
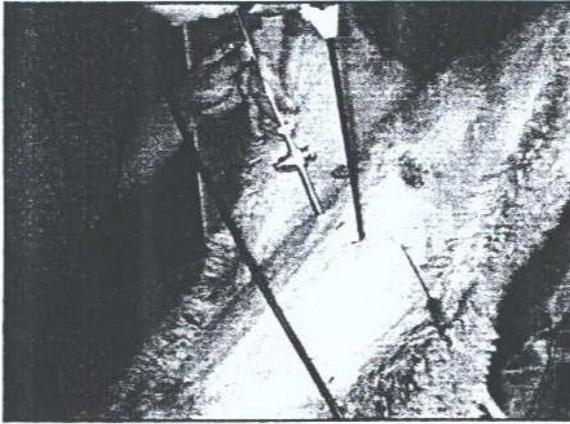
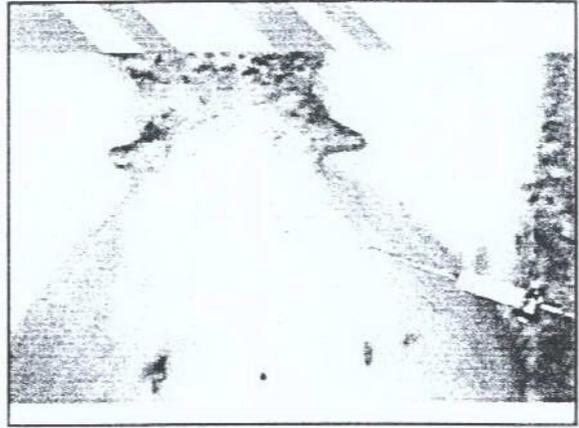
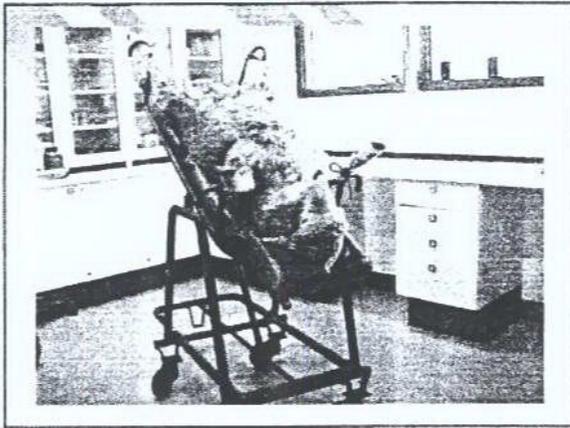
ETAPAS

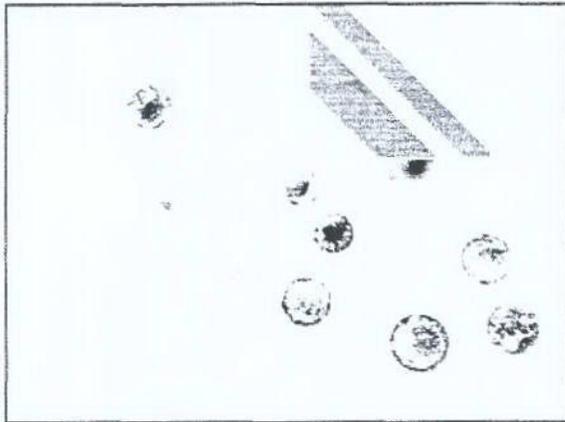
Implementar técnicas en el laboratorio

Estudiar aplicación de técnicas a nivel de predios

Producción de embriones de ovejas de alto valor genético

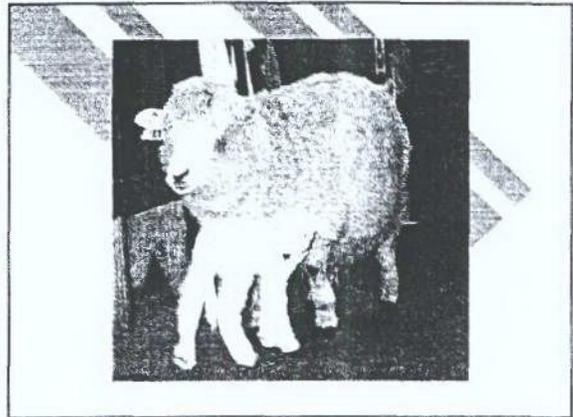


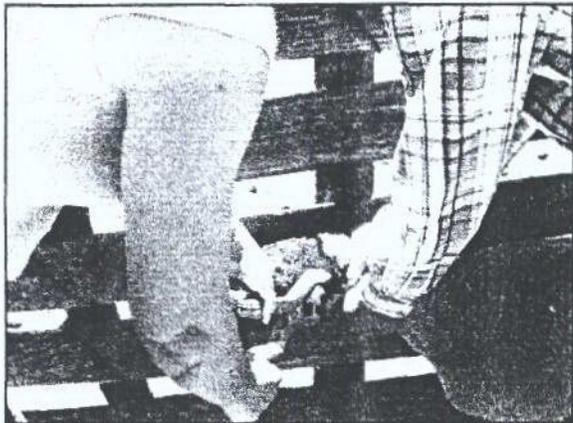




Características	Fases de inseminación	
	1ª Laparoscopia (n = 15)	2ª Laparoscopia (n = 8)
Tiempo promedio (min. por ova)	21,7 ± 2,4	20,8 ± 3
Nº total de CL	134	80
Nº total de ovas recuperadas	52	30
CL/Oveja	8,9 ± 4,3	2,5 ± 1,9
Tasa de recuperación (%)	42,5	37,5
Nº total de Ovas fecundadas	23	24
Ovas fecundadas/ovaja	2,3 ± 2,4	1 ± 1,4
Fecundación (%)	44	80

Ovejas Receptoras	Ovejas Preñadas	Porcentaje
8	3	37,5

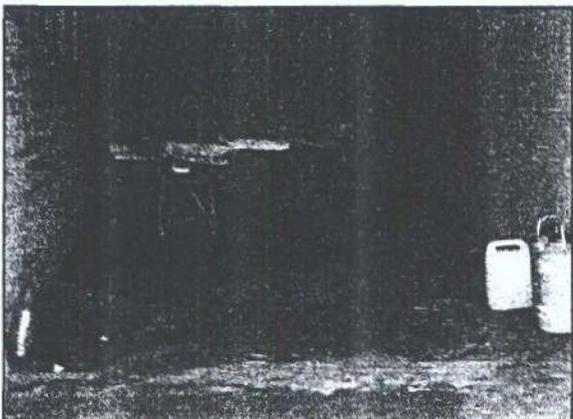
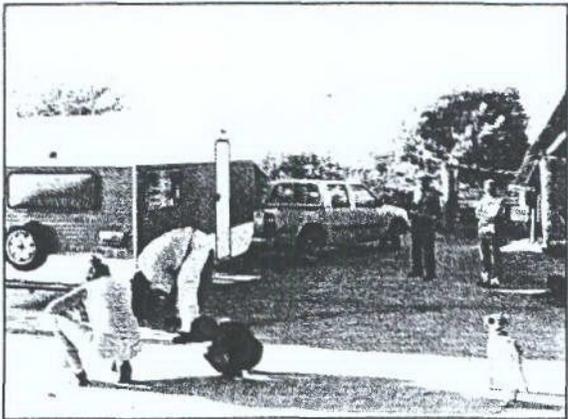
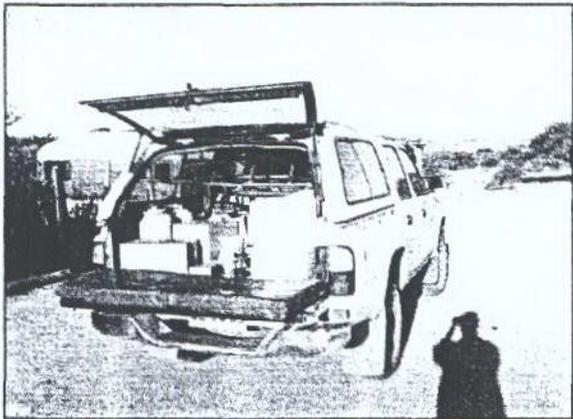


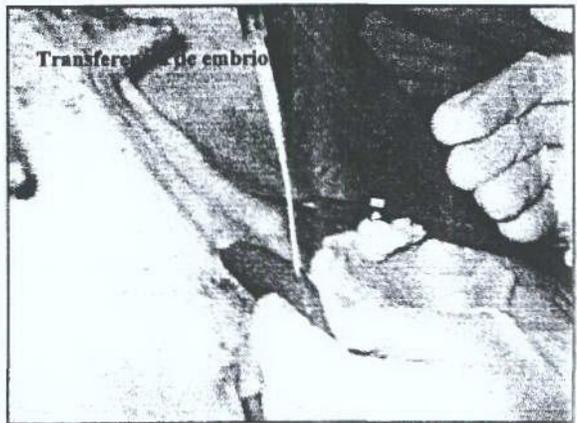
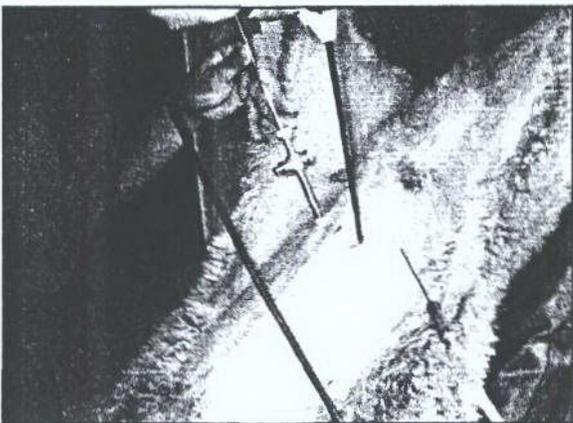
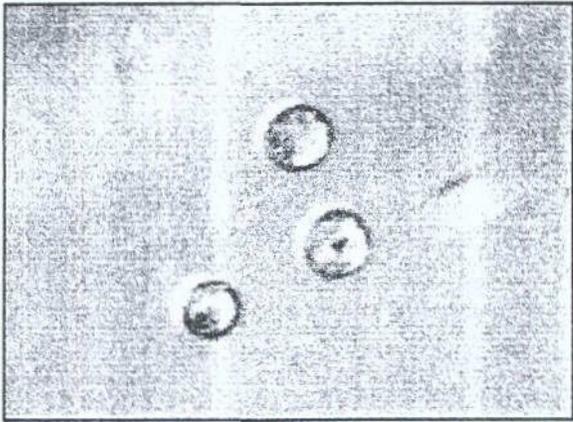
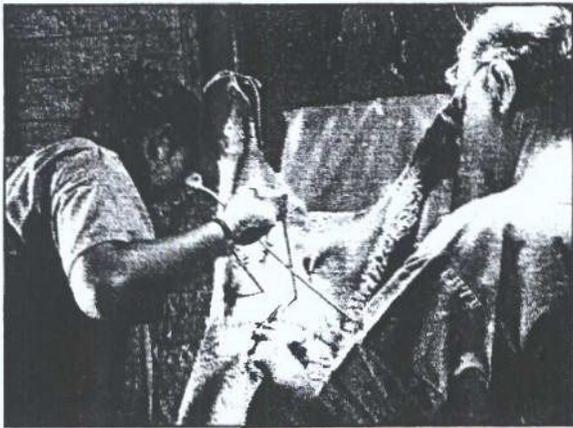


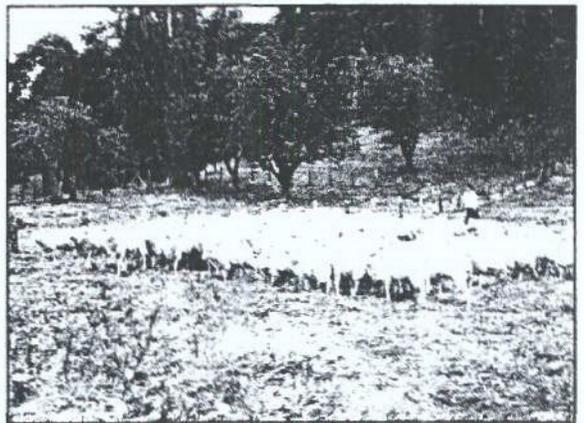
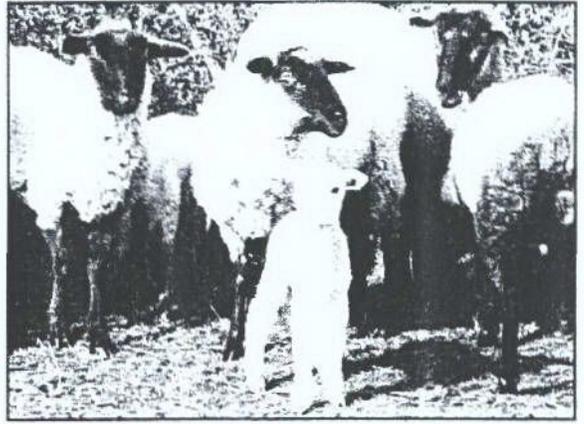
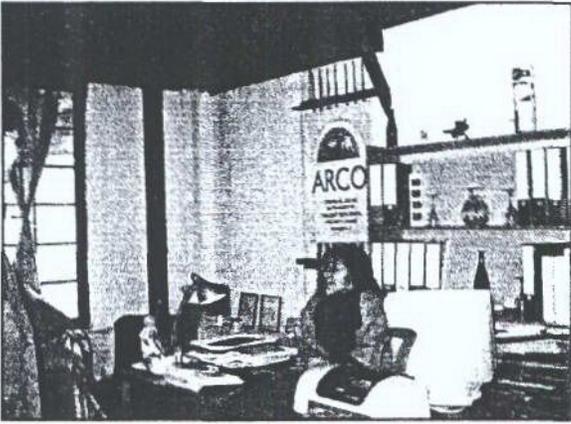
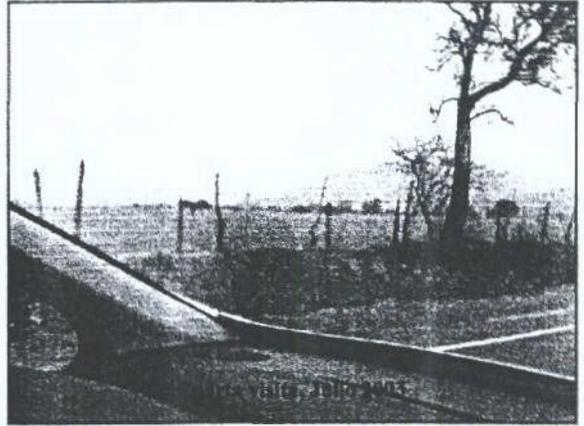
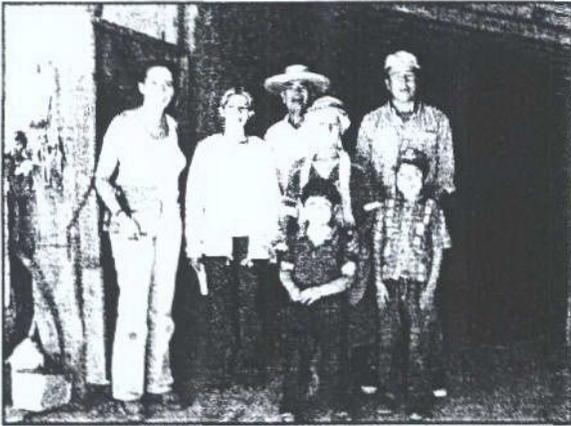
Segunda visita, Enero 2003

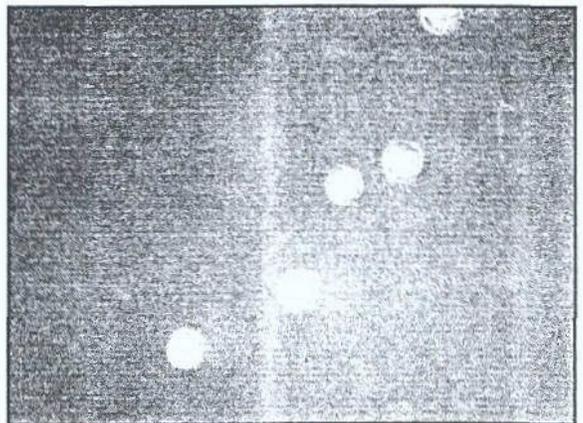
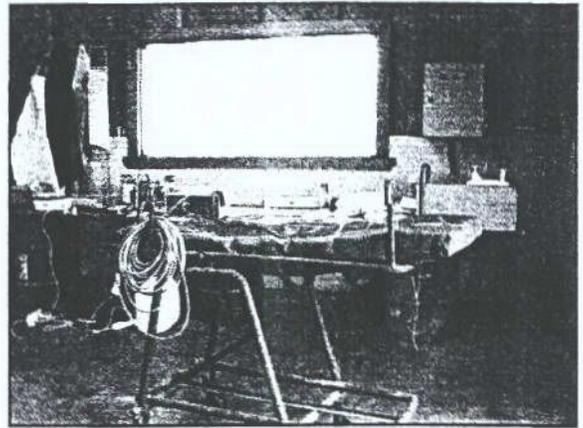
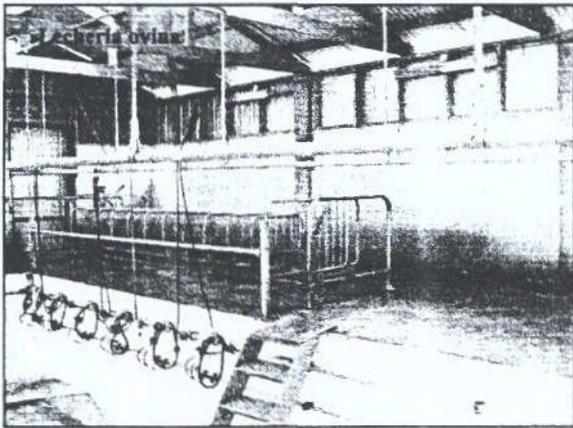


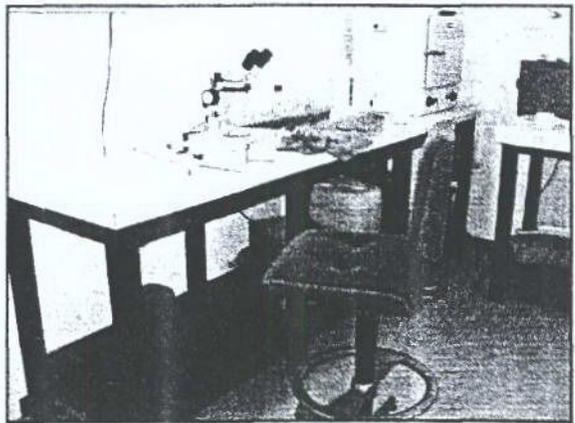
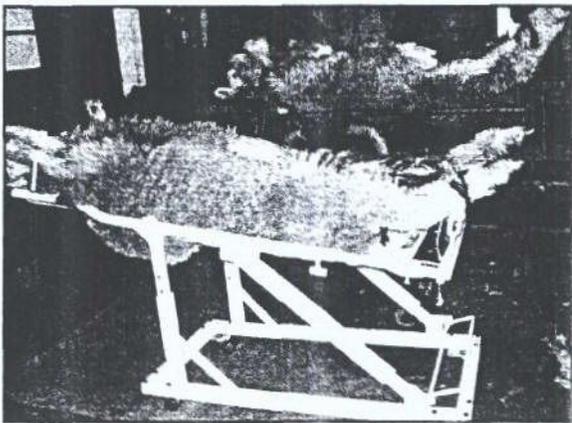
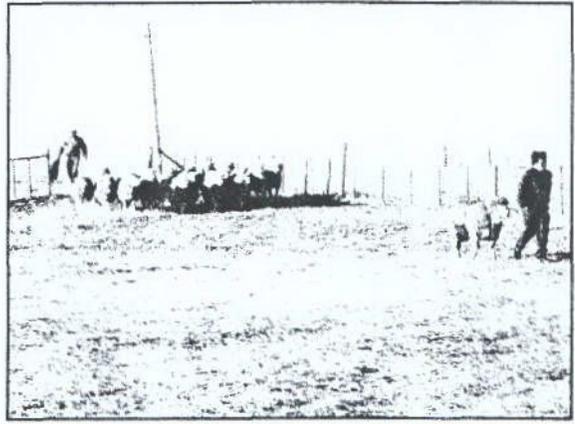
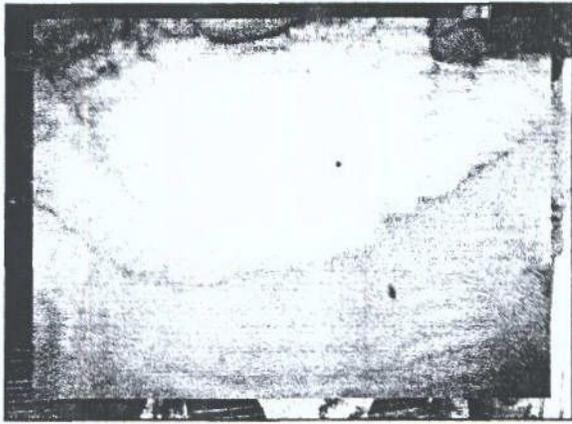
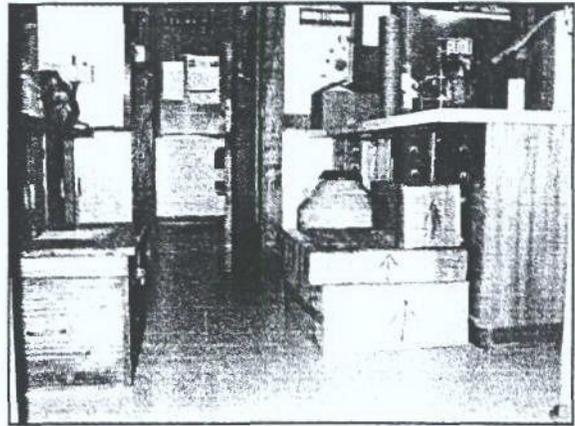
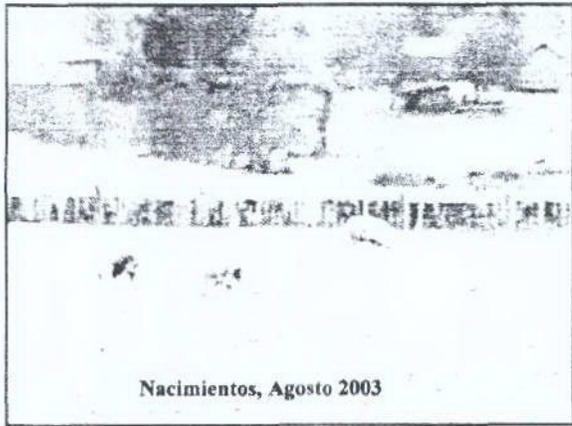
Tratamiento de ovejas donantes
Sincronización de ovejas receptoras
Detección de celos
Encaste de ovejas donantes

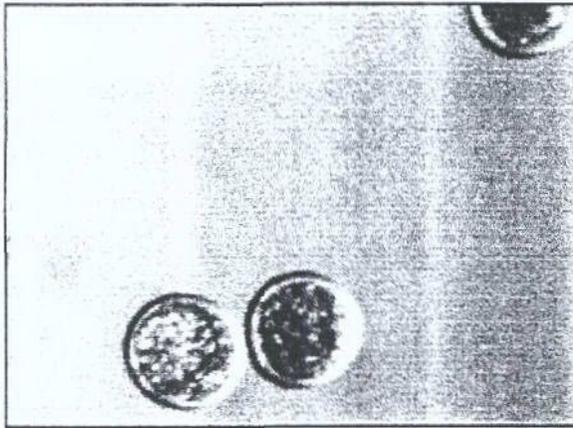










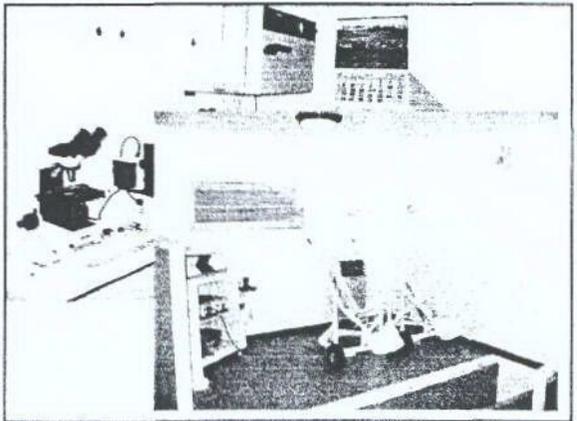
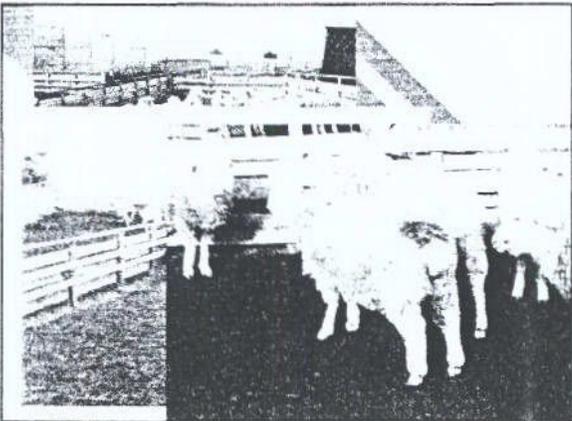
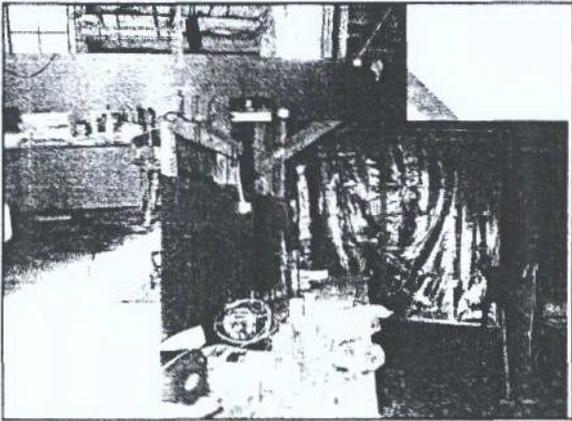
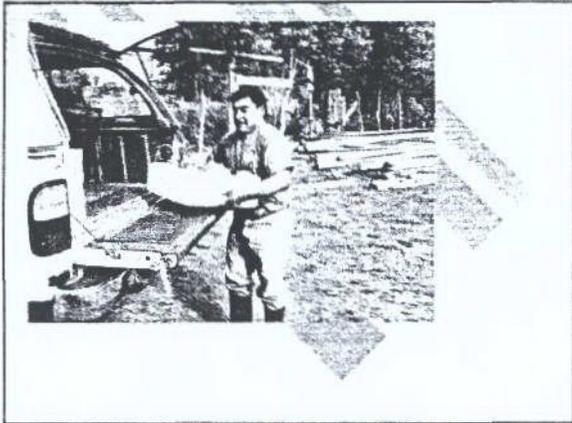


Resumen de recuperación de embriones

Zona	Ovejas donantes	Ova recuperada	Ova Donante
Centro	6	36	6
Sur	4	20	5
Meridional	7	20	29
TOTAL	17	76	45

Zona	Ovejas receptoras	Tasa preñe	Tasa parición
Centro	10	60	63,6
Sur	6	60	66,7
Meridional	14	60	64,3
TOTAL	30	60	63,6

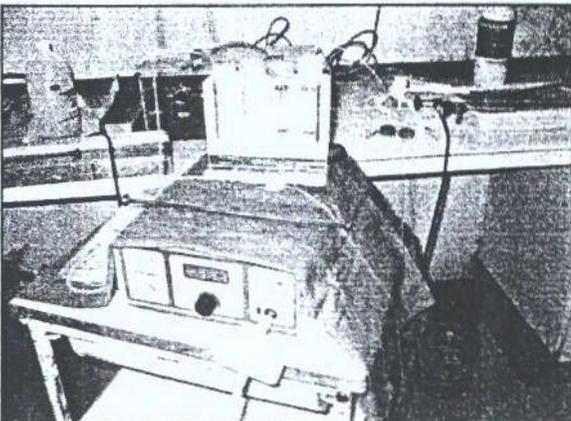
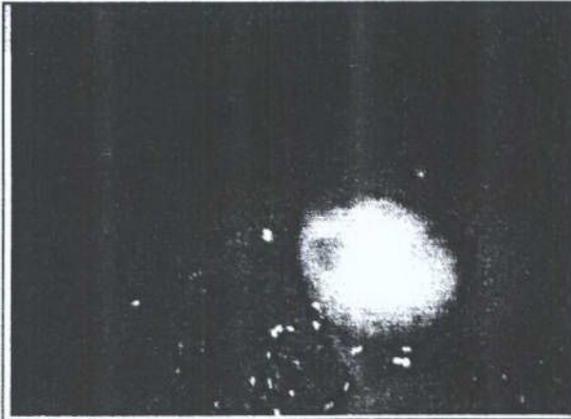
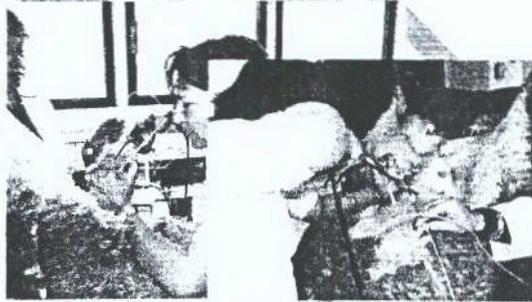


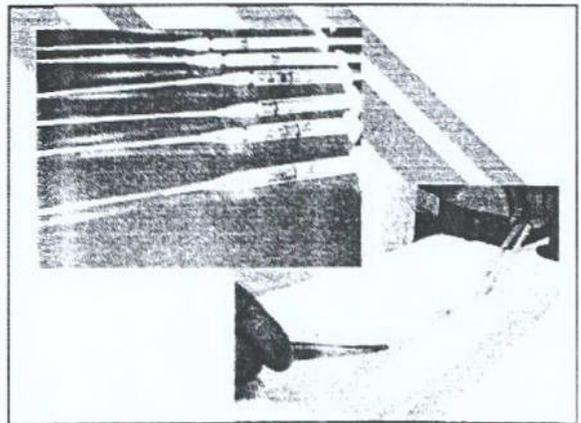
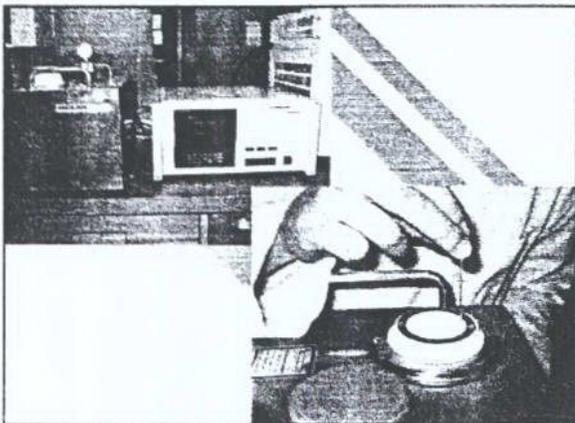
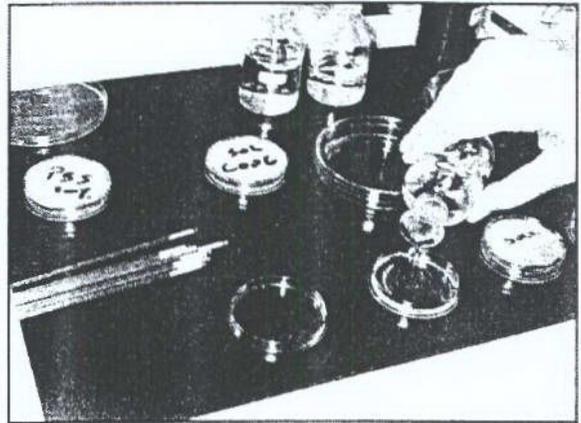
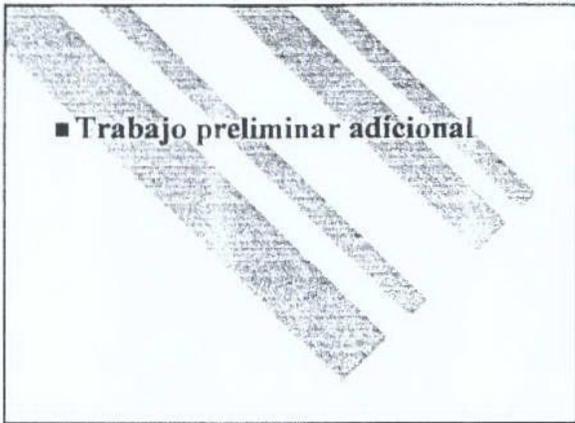
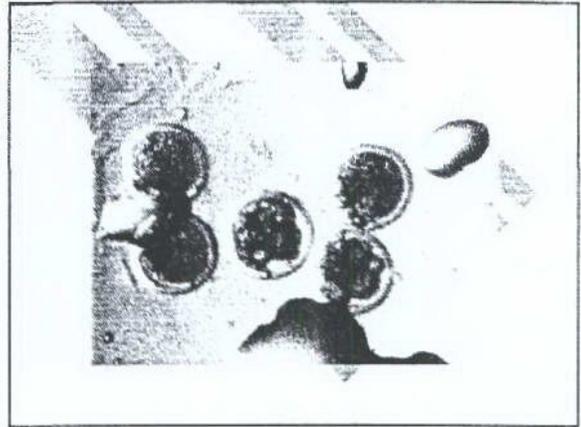
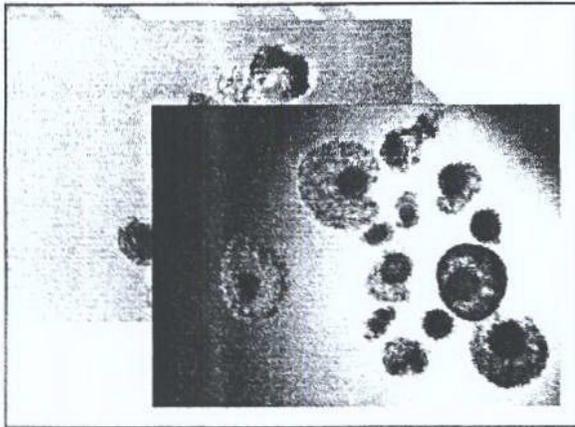


Resumen de recuperación de embriones

Zona	Ovejas donantes	Ova recuperada	Ova/Donante
Centro	6	36	6
Sur	6	19	3.1
Austral	7	20	2.9
TOTAL	17	76	4.5

■ Punción y aspiración Folicular





Supervivencia de embriones ovinos (24 h de cultivo *in vitro*)

Grupo	Método	n	N vivos	Porcentaje
A	Vitrificación	24	18	75
B	Congelación	25	19	76
C	Frescos	16	16	100

•Este proyecto ha demostrado que puede hacerse **TE en condiciones de terreno**

•Sin embargo, la TE no es para **multiplicar animales comunes**

•La TE es una **herramienta para multiplicar hembras valiosas**

Ovejas de nuevas razas (Texel, Dorset, Milchscaf, Latxa)

Ovejas madres de carneros para IA

Ovejas madres de carneros para IA

Identificación de ovejas genéticamente valiosas a través de:

Test de **progenie**

Tipo de animal **ya sea** de carne, leche o lana, crecimiento precoz, **rusticidad**)

Proyecciones

Crear un **banco genético**

Disponer la **tecnología** al servicio **ganadero**

Favorecer la **comunicación** entre **Universidad** y **productores**

- **Tenemos buena comunicación con:**
- **Pequeños productores de VI Región**
- **Pequeños productores de Chiloé**
- **Cabañeros de Magallanes**

- **Disponemos de personal capacitado en:**
- **Recuperación y TE por laparoscopia**
- **Punción folicular**
- **Congelación de semen de carneros**
- **Inseminación artificial de ovejas**



Laparoscopic embryo flushing and embryo transfer in sheep under three different field conditions in Chile

D. D. Böcher and J. E. Correa
Animal Reproduction Institute, Universidad Austral de Chile, P.O. Box 567, Valdivia, CHILE

INTRODUCTION

Major studies of sheep reproduction have been conducted under different field conditions. However, the use of laparoscopic techniques for embryo flushing and transfer in sheep has not been widely reported. The objective of this study was to evaluate the feasibility of laparoscopic embryo flushing and transfer in sheep under three different field conditions.

MATERIAL AND METHODS

Fourteen adult female sheep (ewes) were used in this study. The ewes were divided into three groups according to the field conditions: 1) dry, 2) pregnant, and 3) lactating. The ewes were anesthetized and positioned for laparoscopic surgery. The uterine horns were flushed with a saline solution to collect embryos. The embryos were then transferred into the uterine horns of recipient ewes.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of this study showed that laparoscopic embryo flushing and transfer is feasible in sheep under three different field conditions. The success rate of embryo flushing was 100% in all cases. The success rate of embryo transfer was 100% in all cases. The results of this study suggest that laparoscopic techniques can be used for embryo flushing and transfer in sheep under different field conditions.

Group	Embryos flushed	Embryos transferred	Embryos recovered
1 (dry)	10	10	10
2 (pregnant)	10	10	10
3 (lactating)	10	10	10

197-3

SURVIVAL OF OVINE VITRIFIED HATCHED BLASTOCYSTS

Arteaga X, D. D. Böcher and J. E. Correa
Animal Reproduction Institute, Universidad Austral de Chile, P.O. Box 567, Valdivia, CHILE

INTRODUCTION

The objective of this study was to evaluate the survival of ovine vitrified hatched blastocysts. The study was conducted under three different field conditions: 1) dry, 2) pregnant, and 3) lactating. The blastocysts were vitrified and then thawed. The survival of the blastocysts was evaluated by the number of embryos recovered after transfer into recipient ewes.

MATERIAL AND METHODS

Fourteen adult female sheep (ewes) were used in this study. The ewes were divided into three groups according to the field conditions: 1) dry, 2) pregnant, and 3) lactating. The blastocysts were vitrified and then thawed. The blastocysts were then transferred into the uterine horns of recipient ewes.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of this study showed that the survival of ovine vitrified hatched blastocysts is high. The success rate of blastocyst transfer was 100% in all cases. The results of this study suggest that vitrified hatched blastocysts can be used for embryo transfer in sheep under different field conditions.

Group	Blastocysts transferred	Embryos recovered
1 (dry)	10	10
2 (pregnant)	10	10
3 (lactating)	10	10

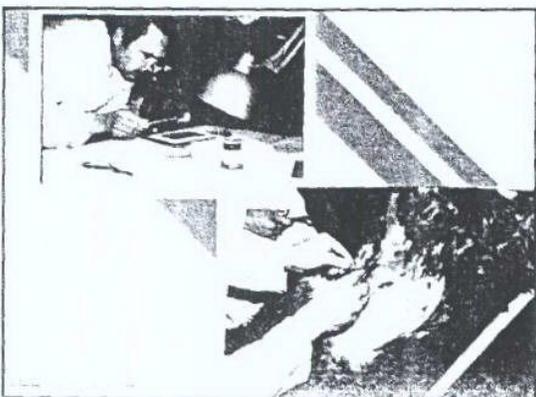
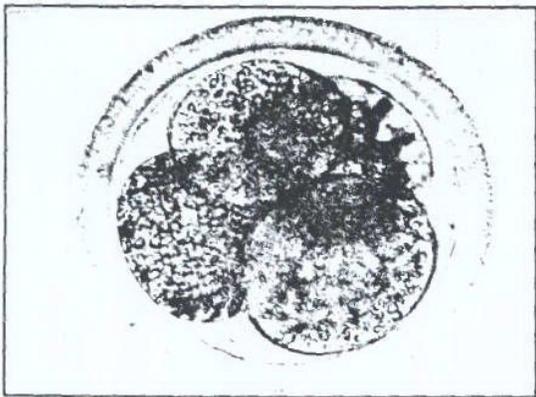
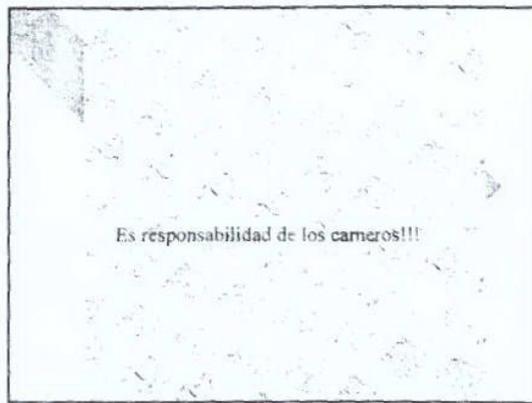
197-4

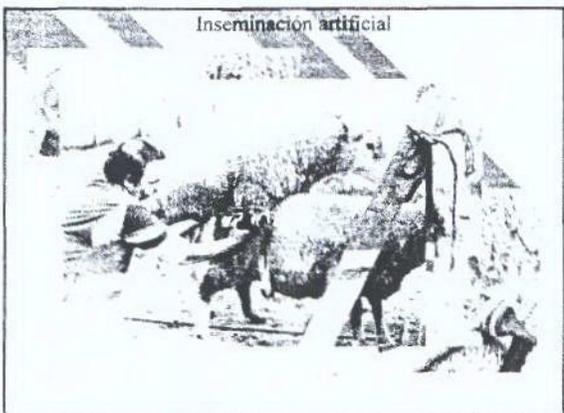
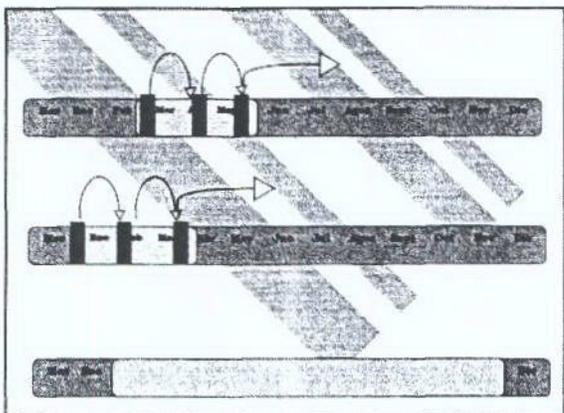
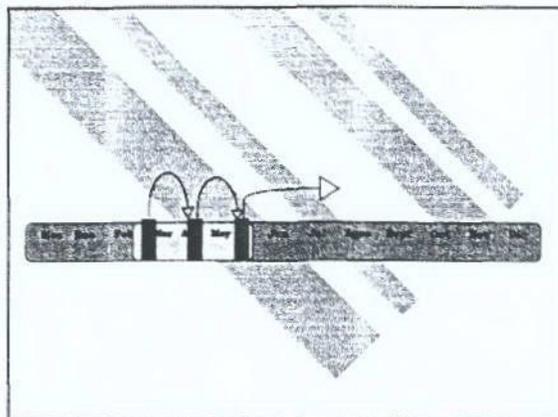
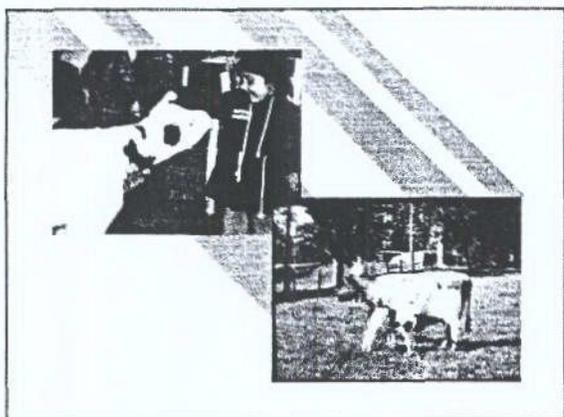


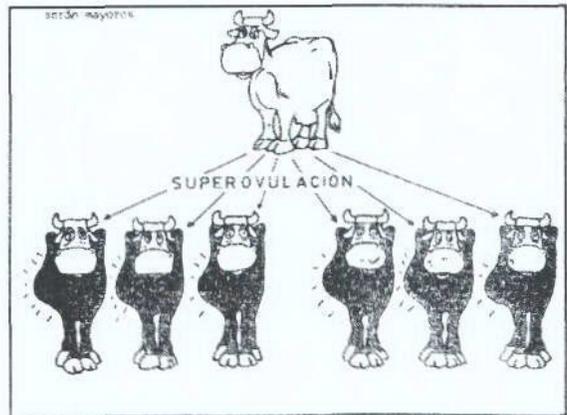
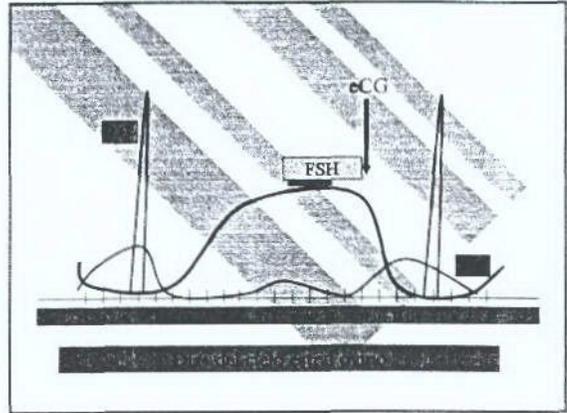
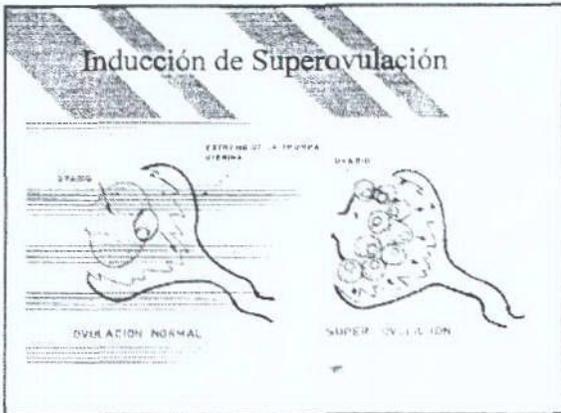
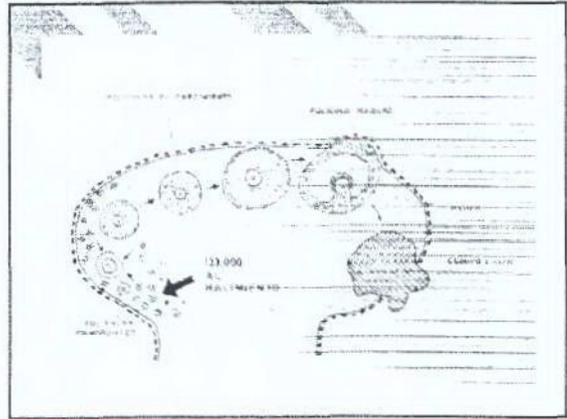
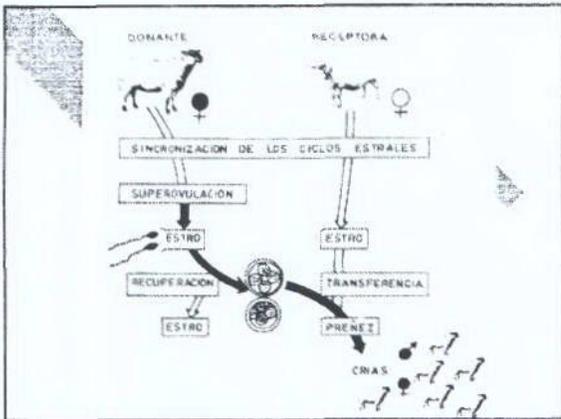
GRACIAS

Contribución del Proyecto FIA BIOT 01 P 063 al desarrollo ovino

The map shows the outline of Chile with several locations marked. A large arrow points from the text on the right towards the map, indicating the geographical context of the project.







Superovulación



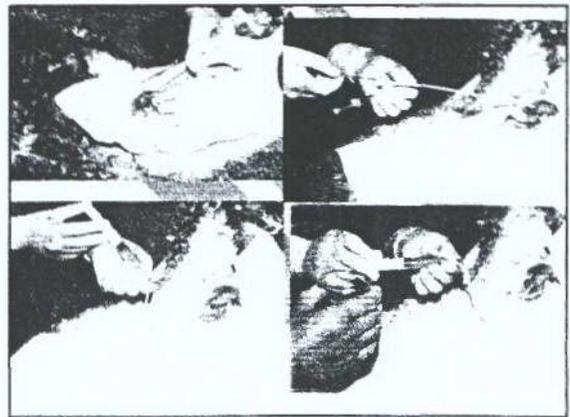
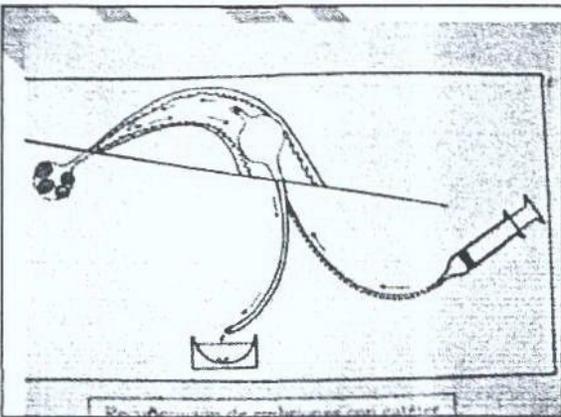
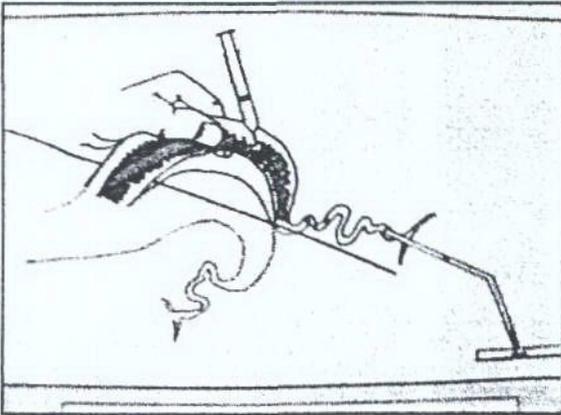
Recuperación de embriones

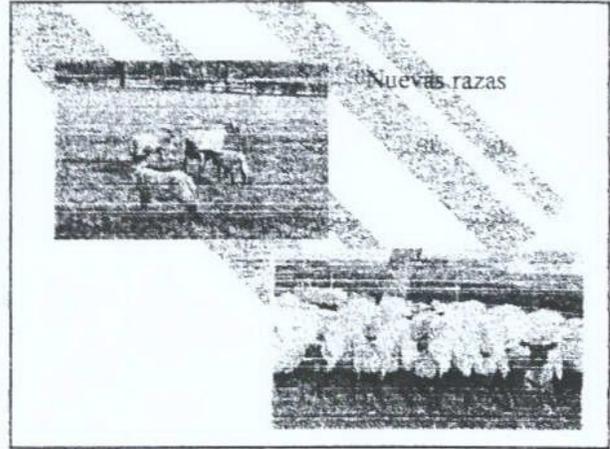
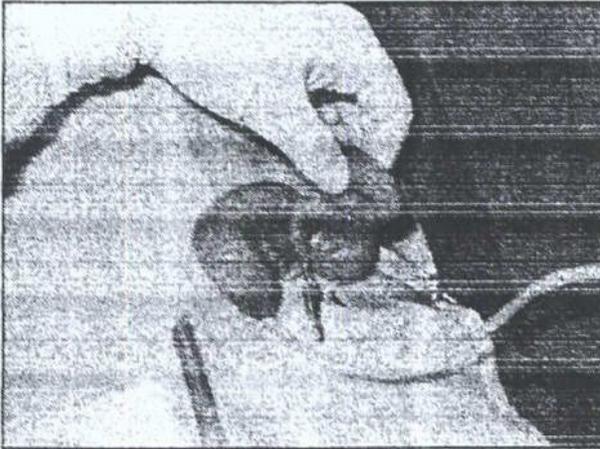
Métodos:

Quirúrgico

Laparoscopia

Transcervical





Recuperación y Transferencia de
embriónes mediante laparoscopia en
ovejas

Proyecto FIA BIOT 01 P 063

Objetivos

Desarrollar e implementar técnicas de recuperación y
transferencia de embriónes por laparoscopia

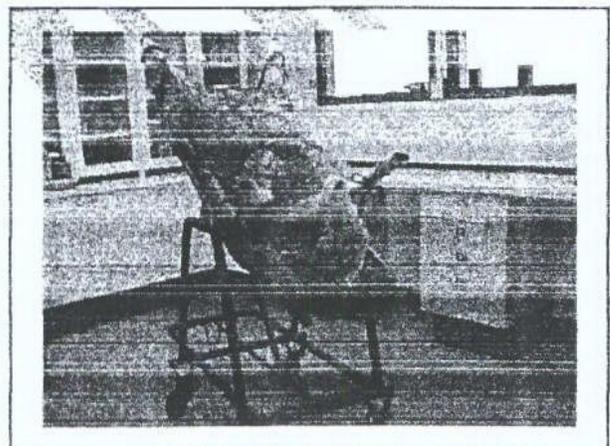
Comenzar estudios de producción *in vitro* de embriónes
ovinos

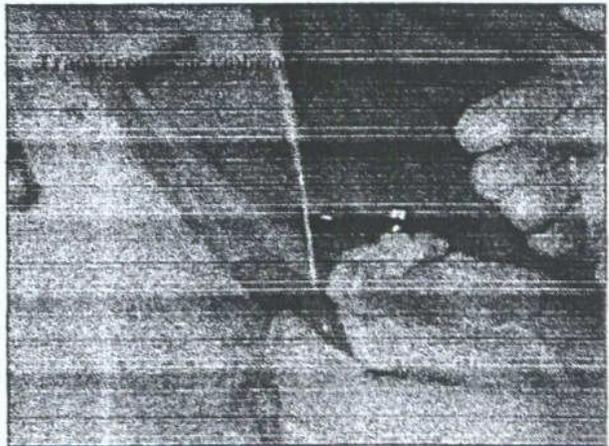
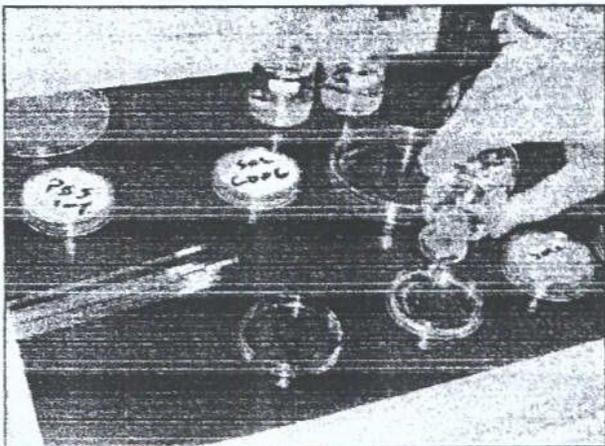
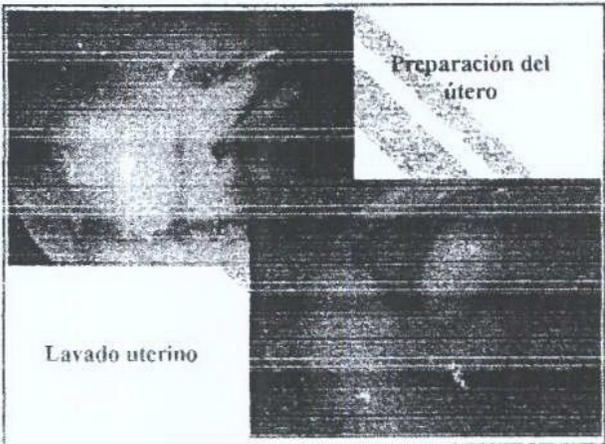
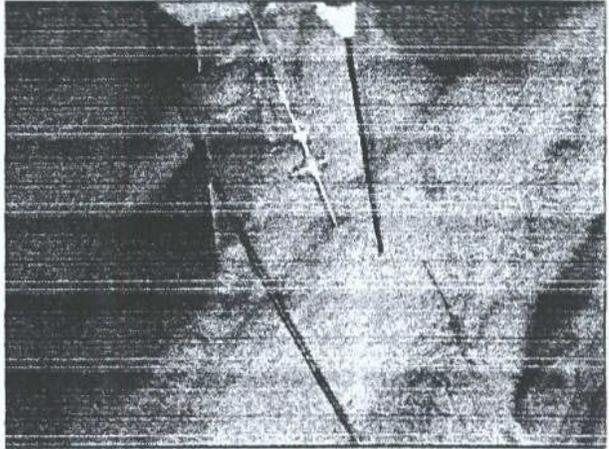
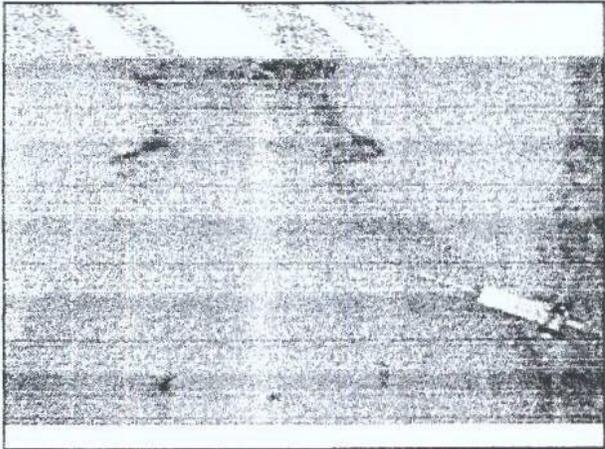
Proyecciones

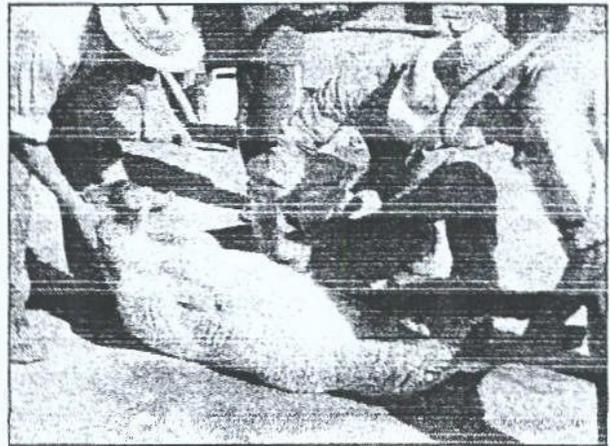
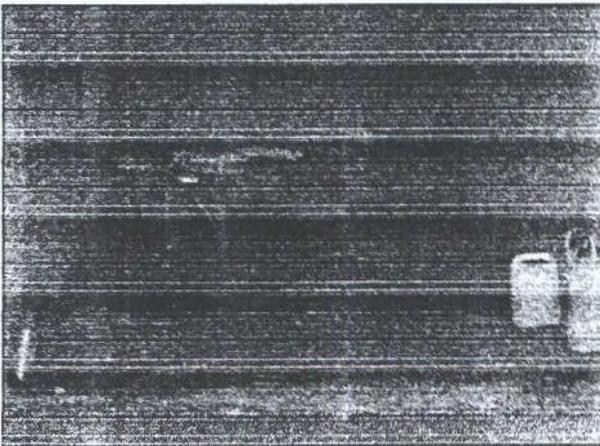
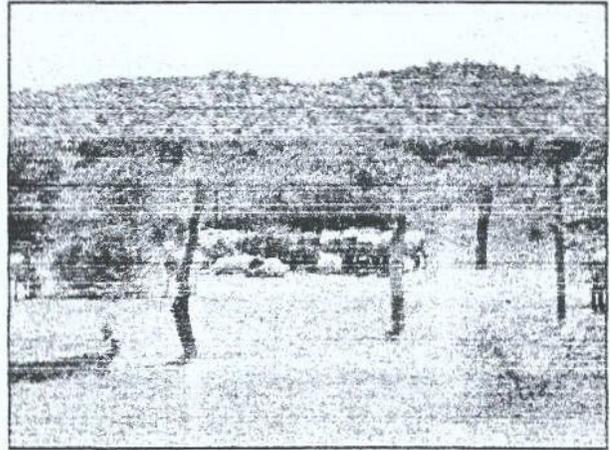
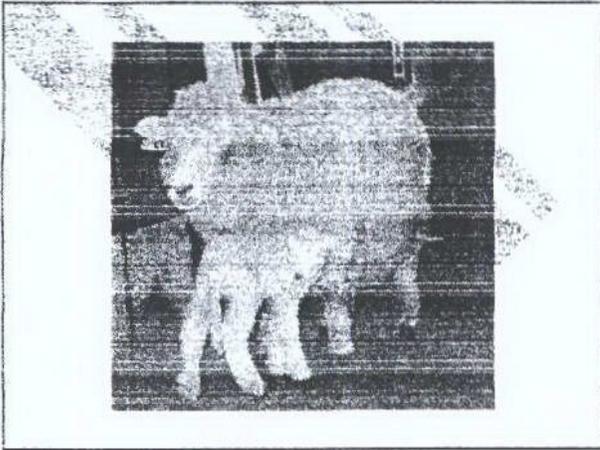
Crear un banco genético

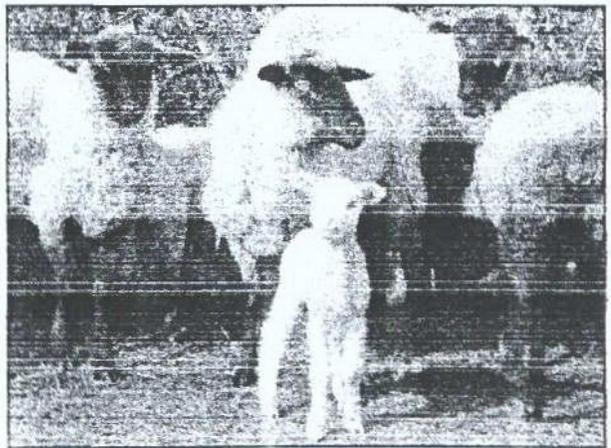
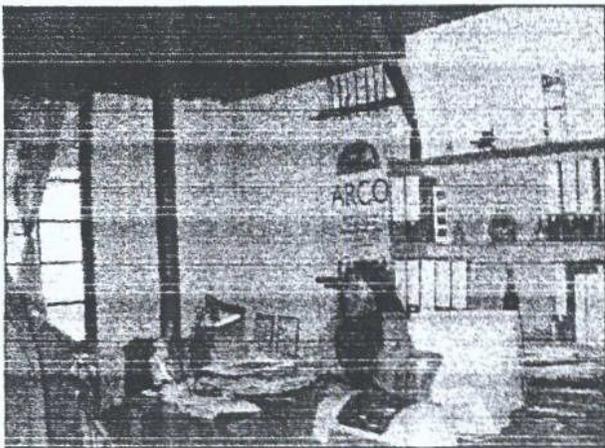
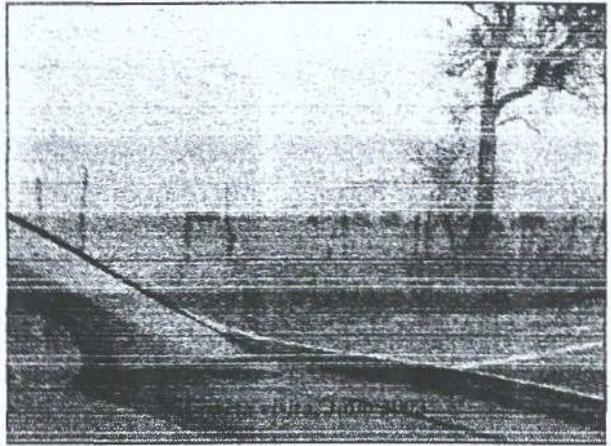
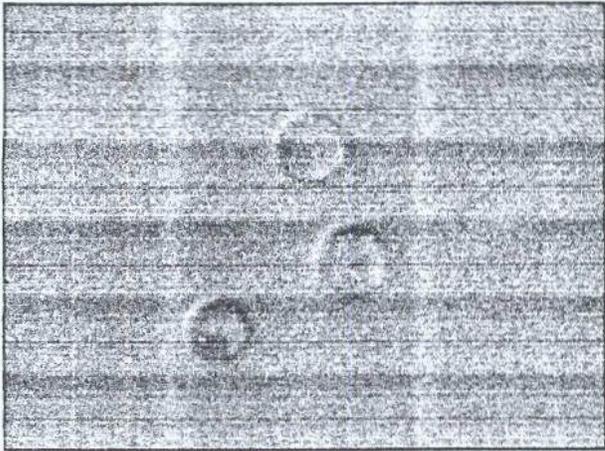
Disponer la tecnología al servicio ganadero

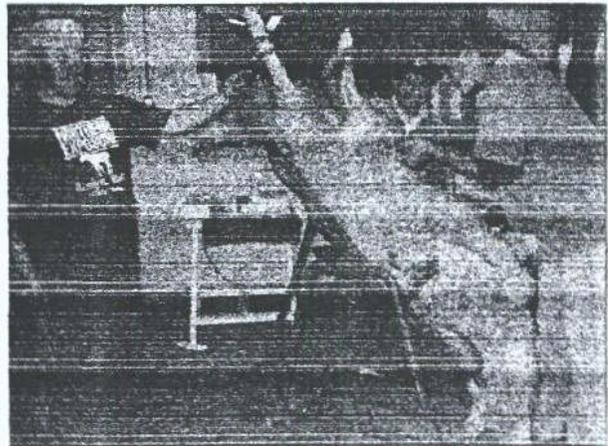
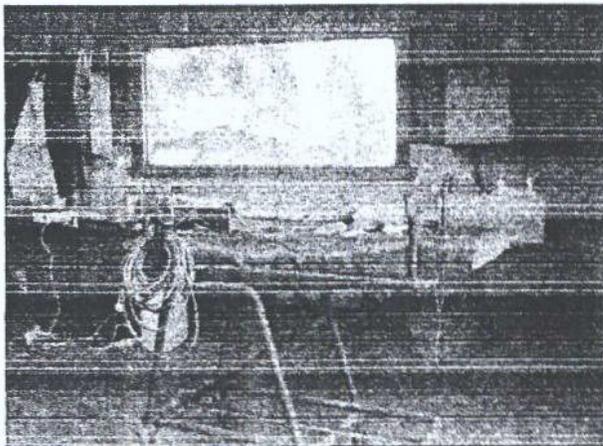
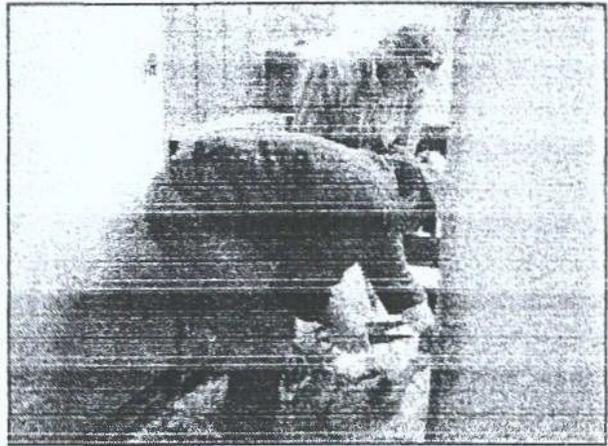
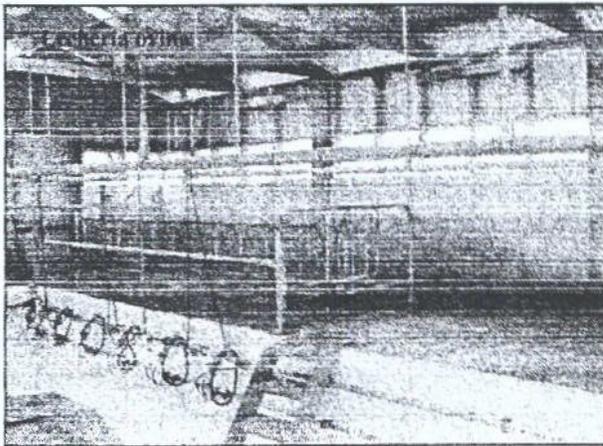
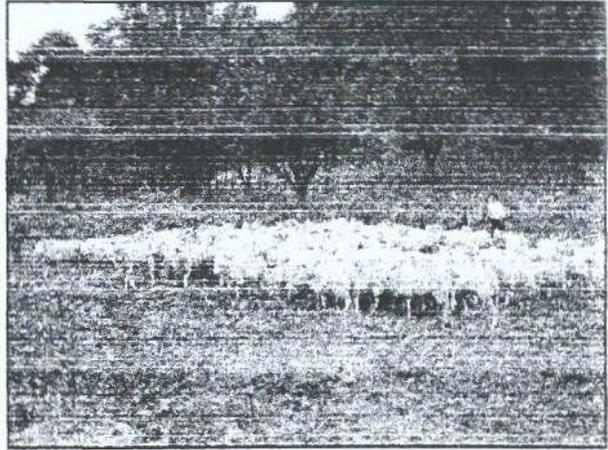
Favorecer la comunicación entre universidad
y productores

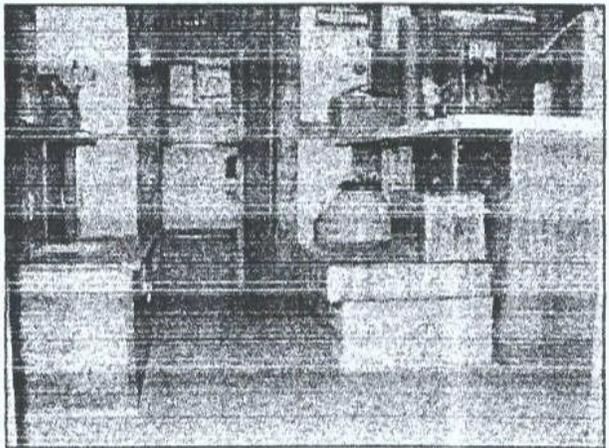
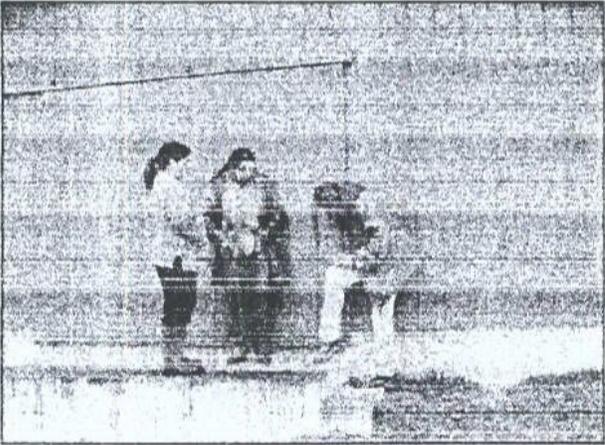
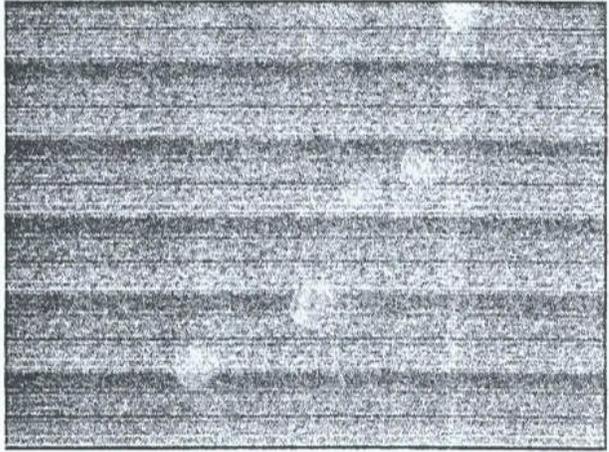
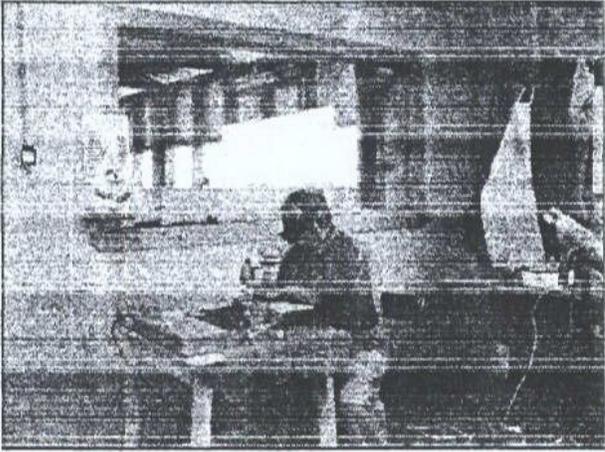


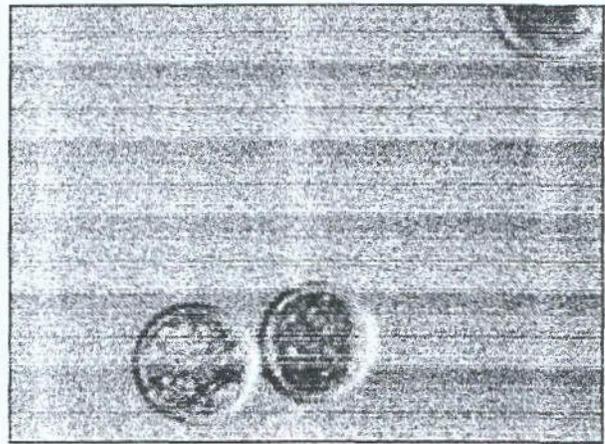
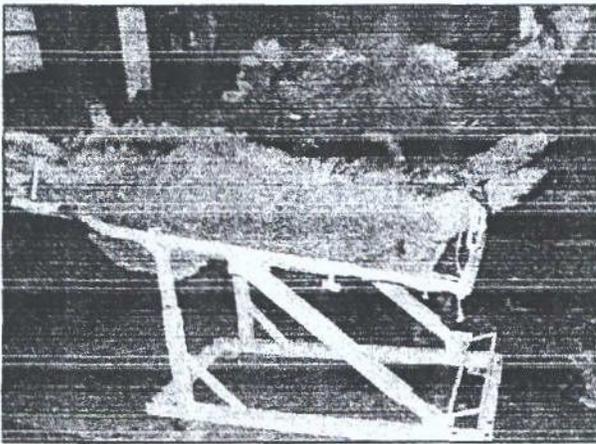
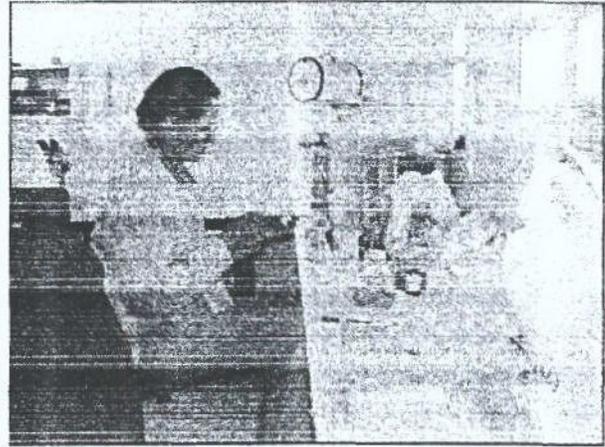
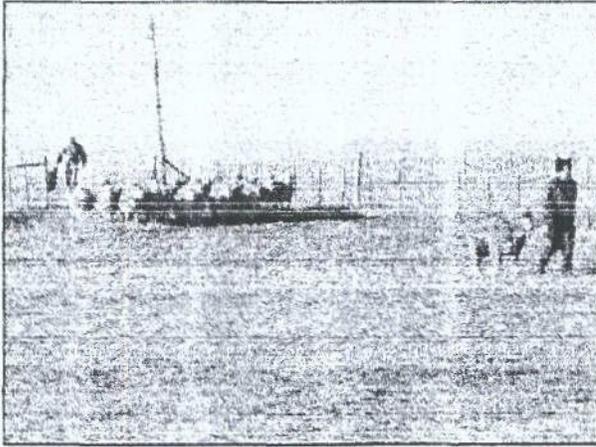










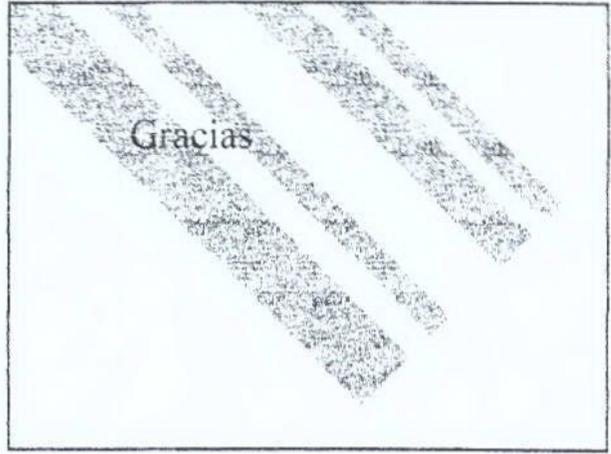


Resumen de recuperación de embriones
HANCAGUA

Zona	Ovejas donantes	Ovejas recuperadas	Ovejas Donante
Centro	6	36	6
Sur	7	20	5
Occidental	7	30	2,9
TOTAL	20	86	4,5

Resumen de recuperación de embriones

Zona	Ovejas receptoras	Tasa preñ	Tasa parición
Centro	10	60	63,6
Sur	6	60	66,7
Occidental	4	60	67,5
TOTAL	20	60	65,8



12. BIBLIOGRAFIA

Amoah, E. y Gelaye, S. Biotechnological advances in goat reproduction.

<http://www.ag.fvsu.edu/html/publications/goatcenter/goat1.htm>.

Cardwell, B., Fitch, G. y Geisert, R. 1997. Ultrasonic evaluation for the time of ovulation in ewes treated with norgestomet and pregnant serum gonadotropin during the spring and fall breeding seasons. <http://www.ansi.okstate.edu/research/1997rr/031.htm>.

Colleau, J., Heyman, Y. y Renad, J. 1998. Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications reyes ou potentielles en selection. INRA productions animales. 11:41-56.

Correa, J. 1976. Use of mass laparotomy for an egg transfer technique to the uterus of the ewe. The Veterinary Records. 99:377.

Correa, J., Bergmann, B. y Gatica, R. 1994. Fertilization rate in sheep unilaterally inseminated with frozen semen. Samll ruminant research. 13:99-101.

Correa, J., Ratto, M. y Gatica, R. 1997. Superovulation in llamas (*Lama glama*) with pFSH and equine chorionic gonadotropin used individually or in combination. Animal reproduction Science. 46:289-296.

Dally, M. Laparoscopic artificial insemination, a means to improve genetics. <http://www.toprams.com/lai.htm>.

De los Reyes, M., Aguayo, J., del Campo, H. y Barros, C. 1999. Evaluación de ovocitos de vaca para maduración en cultivo. Avances en Ciencias Veterinarias. 14(1 y 2):42-53.

Dynamic development Oogenesis: A collaborative effort.

<http://www.ucalgary.ca/UofC/eduweb/virtualembryo/oogen.html>.

El don de la vida. <http://eldondelavida.cl/18.htm>.

Embryo transfer home Cameron University. page.

<http://wwwcameron.edu/academic/science/agriculture/embryo.html>

Farin, P. 2000. Future reproductive biotechnologies in dairy cattle.

http://www.cals.ncsu.edu/an_sci/extension/dairy/repr2000/Farin.htm.

Fitzgerald, J y Stellflug, J. Laparoscopy and artificial insemination of sheep.

<http://www.hawaii.edu/ansc/proceed/Hhl/sheepplap.htm>.

Flores, A., Luengo, M. y Gutierrez, J. 1999. Introducción a la técnica laparoscópica diagnóstica: Indicaciones preparación y pasos previos.

http://www.colvet.es/infovet/sep99/ciencias_v/articulo2.htm.

Fundación para la Innovación Agraria (FIA). 2000. Estrategia de innovación agraria para producción de carne ovina. Santiago, Chile. 69 p.

Fundación para la Innovación Agraria. 2000. Estrategia de innovación agraria para producción de leche ovina. Santiago, Chile. 57 p.

Grandes avances científicos en biotecnología reproductiva. Agrozona.
[http://www.bioplanet.net/2000-junio/noticias/n14jun2000\(1\).htm](http://www.bioplanet.net/2000-junio/noticias/n14jun2000(1).htm).

Herrera, I. 2000. Efecto del tratamiento repetido con FSH + eCG en la respuesta ovárica y aspiración folicular via laparoscópica en temeras prepúberes. Valdivia Chile. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. 42 p.

Letelier, C. 1997. Efectos del origen de la FSH en la inducción de superovulación en ovejas. Valdivia, Chile. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. 32 p.

Lorenzini, E. 1997. Desarrollo de embriones bovinos obtenidos de ovocitos madurados *in vitro* bajo diferentes condiciones de cultivo. Valdivia, Chile. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. 49 p.

Oyarzo, J., Tappan, R., Selner, D., Bellin, M. Y Ax, R. 1997. Successful embryo transfer from heifers. Near puberty: opportunities for the future.
<http://www.afns.ualberta.ca/wcds/wcd97/ch15-97.htm>.

Pavez, C. y Correa, J. 1988. Estudio laparoscópico seriado del aparato reproductivo de la oveja a través del ciclo estral y gestación temprana. Archivos de Medicina Veterinaria. 20(1):64-68.

Ratto, M., Gatica, R. Y Correa, J. Timing of mating and ovarian response in llamas (*Lama glama*) treated with pFSH. Animal reproduction science. 48:325-330.

Mapletoft, R. 1999. Summary of embryo transfer activity in Canada.
<http://www.ceta.ca/ET1999.pdf>.

Rivera, V. y Villanueva, C. 2000. Capacitación espermática.
<http://www.inper.edu.mx/capacitaesperm4-2000.html>.

Rusell, D. 1998. Increasing numbers of elite stock with embryo transfer in sheep and goats. <http://www.users.on.net/drussell/etransfer.html>.

Schoenian, S. An update on Sheep A.I. <http://www.sheepandgoat.com/ai.html>.

Sellnow, L. 1998. Embryo transfer Magazine Highlights from horse interactive.
http://www.thehorse.com/0298/embryo_transfer0298.html.